



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DI PISA
FACOLTA' DI AGRARIA**

**Dottorato di Ricerca
in Scienza delle produzioni vegetali eco-compatibili
a.a 2005/2007**

Tesi di dottorato

**Contributo della simbiosi micorrizica alla
realizzazione di agroecosistemi
arborei sostenibili**

Tutori

Prof.ssa Manuela Giovannetti

Candidato

Dott.ssa Paola Fortuna

Prof. Stefano Morini

INTRODUZIONE

1. Lo sviluppo sostenibile in agricoltura

L'esigenza di conciliare le attività economiche con la salvaguardia ambientale ha aperto, a partire dagli anni '70, un vasto dibattito internazionale che ha portato alla "Conferenza mondiale su ambiente e sviluppo" di Rio de Janeiro del 1992 nella quale è diventato fondamentale il concetto di "sviluppo sostenibile". Secondo questo principio, già formulato nel rapporto Brundtland del 1987 e successivamente ripreso dalla Commissione mondiale sull'ambiente e lo sviluppo dell'ONU (World Commission on Environment and Development) *"lo sviluppo è sostenibile se è in grado di soddisfare i bisogni delle generazioni presenti senza compromettere la possibilità per le generazioni future di soddisfare i propri"*. Sebbene parta da una visione antropocentrica dello sviluppo, questa definizione permette di sintetizzare alcuni aspetti importanti del rapporto tra sviluppo economico, equità sociale e rispetto dell'ambiente. Negli ultimi anni il concetto di sviluppo sostenibile ha subito una evoluzione verso una visione più ampia e globale che, oltre alla dimensione economica, sociale ed ambientale, tiene conto anche della diversità culturale della popolazione umana, poiché, secondo l'UNESCO, *"la diversità culturale è necessaria per l'umanità quanto la biodiversità per la natura"*. Il nuovo concetto di sviluppo sostenibile ha contribuito a generare approcci multidisciplinari sia nelle iniziative politiche che nella ricerca e attualmente, nonostante difficoltà oggettive e resistenze per il suo recepimento in quadro normativo, nei paesi avanzati l'applicazione del principio della sostenibilità è ormai ritenuta indispensabile in tutti i settori economici.

Considerando che l'agricoltura occupa circa un terzo della superficie del pianeta (www.faostat.fao.org) e che costituisce l'attività centrale di buona parte della popolazione mondiale, si intuisce l'importanza che l'attività agricola riveste per la tutela dell'ambiente naturale. L'inquinamento ambientale, la frammentazione degli habitat, la perdita di biodiversità, lo sfruttamento eccessivo delle risorse naturali e

l'accelerato consumo delle risorse idriche possono essere anche frutto di pratiche agricole e di un utilizzo del suolo inappropriati.

Nel tentativo di dare una risposta alle urgenti questioni in materia di salvaguardia ambientale e tutela della salute umana, l'Unione Europea, a partire dalla fine degli anni '80, ha iniziato una progressiva integrazione delle problematiche ambientali nella normativa che disciplina la Politica Agricola Comunitaria (PAC). Una prima svolta si è avuta nel 1992, quando è stata resa obbligatoria per gli Stati membri l'attuazione di programmi agroambientali nell'ambito dei piani di sviluppo rurale ed inoltre, attraverso il Regolamento 2078, il rilascio di incentivi per gli operatori agricoli è stato subordinato all'assunzione di impegni per la salvaguardia ambientale.

La necessità di mettere in atto strategie di sviluppo sostenibile nella gestione degli agroecosistemi, temi fondamentali del programma d'azione "Agenda 2000" sottoscritto il 26 marzo 1999 dai capi di Stato e di governo al termine del Consiglio europeo di Berlino e, conseguentemente, l'urgenza di una revisione negli interventi indirizzati all'agricoltura ed allo sviluppo rurale, hanno portato alla riforma della PAC del 2003 mediante la quale "la Comunità si propone di ottenere un corretto equilibrio tra una produzione agricola competitiva e il rispetto della natura e dell'ambiente". Tra le nuove misure adottate, la novità principale è costituita dalla cosiddetta "condizionalità obbligatoria" dei pagamenti: in base a questo principio gli agricoltori sono obbligati al rispetto delle norme in materia di salvaguardia ambientale, sicurezza alimentare, sanità animale e vegetale e protezione degli animali, come pure all'obbligo di mantenere la terra in buone condizioni agronomiche ed ecologiche per poter beneficiare delle sovvenzioni comunitarie.

2. Il contributo delle micorrize nell'agricoltura sostenibile

Il miglioramento della sostenibilità degli agroecosistemi richiede che si verifichino contemporaneamente tre condizioni: la sostenibilità nell'uso delle risorse, in modo da garantire l'attività produttiva futura, la sostenibilità economica, attraverso il mantenimento di livelli di reddito adeguati, e la sostenibilità per la salute

umana, intesa sia come sicurezza alimentare dei consumatori che come tutela degli operatori. Cio' si realizza attraverso l'applicazione sinergica di norme tecniche e metodologie operative atte a ridurre e razionalizzare l'impiego di fattori produttivi, privilegiando l'uso di risorse rinnovabili e garantendo in questo modo l'ottenimento di produzioni di alta qualita'.

Per il raggiungimento di tali obiettivi, nei sistemi agricoli sostenibili si cerca di salvaguardare e valorizzare gli equilibri naturali presenti nell'agroecosistema allo scopo di ricreare un sistema complesso ed equilibrato che permetta di sfruttare i processi naturali vantaggiosi.

Tra questi grande importanza assumono le attivita' microbiche presenti nel terreno, per il contributo insostituibile che danno al mantenimento della fertilita' del suolo, vero anello centrale in ogni sistema colturale che si prefigga una riduzione dell'impatto ambientale dell'attivita' agricola e una sostenibilita' nel tempo di tale processo produttivo.

Tra i microrganismi utili presenti nel terreno, particolarmente importanti risultano essere i funghi micorrizici che, data la loro ubiquita' ed il loro diretto coinvolgimento nei meccanismi nutrizionali della pianta ospite, rivestono un ruolo centrale e insostituibile .

Nella quasi totalita' delle piante presenti in natura, infatti, il sistema radicale e' costituito dalla simbiosi di tipo mutualistico tra le radici della pianta stessa e un numeroso gruppo di funghi presenti nel suolo (Smith e Read, 1997). Questa associazione prende il nome di "micorriza" (dal greco *mykos*: fungo, e *rhiza*: radice), termine coniato nel 1885 dallo studioso tedesco Albert Bernard Frank, il quale osservo' queste strutture nelle radici di alberi di alto fusto e, oltre a fornire una descrizione morfologica di tale associazione, ne suggerì per primo un ruolo attivo nell'interazione pianta-fungo.

Alla base del successo ecologico delle micorrize ci sono i vantaggi nutrizionali che ne derivano per entrambi i simbionti: il fungo migliora la nutrizione minerale dell'ospite cedendo alla pianta acqua ed elementi nutritivi mentre la pianta rifornisce il fungo, organismo chemioeterotrofo, dei carboidrati prodotti attraverso la fotosintesi. Sebbene per l'organismo vegetale questo tipo di associazione non possa essere definita "simbiosi obbligata" in senso stretto, dal momento che la pianta, nella

maggior parte dei casi, puo' crescere anche in assenza del simbionte fungino, le micorrize svolgono un ruolo cosi' importante in quasi tutti gli ecosistemi terrestri da poter essere considerate "ecologicamente obbligate".

I funghi micorrizici possono contribuire alla realizzazione di sistemi colturali a maggiore sostenibilita' ambientale attraverso una molteplicita' di azioni interdipendenti tra loro.

Innanzitutto la presenza della simbiosi micorrizica, agendo non soltanto sulla fisiologia della pianta ospite ma su tutti i processi che si svolgono nell'ecosistema, e' in grado di influire sulla composizione e la stabilita' della comunita' vegetale e microbiologica del suolo (Rillig, 2004), favorendo l'instaurazione degli equilibri dinamici che sono garanzia di una maggiore stabilita' dell'agroecosistema. D'altra parte questi endofiti, contribuendo al mantenimento della fertilita' del terreno e alla difesa dai patogeni, permettono di ridurre l'impiego degli inputs chimici senza compromettere i risultati quali-quantitativi della coltura stessa e, per questa ragione, vengono considerati come dei veri "fertilizzanti biologici" (Giovannetti, 2006), particolarmente importanti nella gestione sostenibile degli agroecosistemi .

Dobbiamo considerare infine che le pratiche agricole applicate nell'agricoltura convenzionale possono alterare il naturale ciclo del carbonio, favorendo la conversione del carbonio organico del suolo in CO₂ atmosferica, con conseguenze negative sia per la qualita' del suolo che per la produttivita' agricola, ma soprattutto per l'ambiente. Sono infatti di drammatica attualita' i problemi conseguenti al progressivo incremento della concentrazione atmosferica di CO₂ e degli altri gas-serra (global change). A tale proposito si ritiene che l'attivitaa' agricola convenzionale abbia un considerevole impatto sull'incremento delle emissioni di gas serra di origine antropica che viene stimato del 25% per la CO₂, del 50% per il metano e del 75% per il protossido di azoto (Tubiello & Fischer, 2007) e pertanto cambiamenti nella gestione degli agroecosistemi risultano indispensabili e urgenti. Tuttavia, mentre le perdite di carbonio dal suolo sono ben documentate, piu' problematico e' stabilire quali strategie possono essere messe in atto per stabilizzare o incrementare l'immagazzinamento del carbonio nel terreno.

Molto interessante a riguardo risulta la potenzialita' dei funghi micorrizici di intervenire nel normale svolgimento del ciclo del carbonio agendo come " sink" di

fotosintetati, ovvero come strumento di sottrazione dall'atmosfera ed immagazzinamento nel suolo del carbonio assimilato dalla pianta. In questo modo la salvaguardia o il potenziamento della biomassa fungina nel suolo potrebbe essere visto come uno strumento in grado di contribuire ad una maggiore sostenibilita' dell'attivita' agricola attraverso un duplice beneficio: la riduzione di "gas serra" e l'aumento del contenuto di carbonio organico nel terreno.

3. La simbiosi micorrizica: caratteristiche anatomiche, biochimiche e fisiologiche

Come e' noto le simbiosi, associazioni tra specie diverse che persistono nel tempo, sono molto diffuse in natura e si ritiene che abbiano avuto un ruolo importante nell'evoluzione della vita sul nostro pianeta. Dati molecolari e fossili dimostrano che la simbiosi micorrizica e' comparsa sul nostro pianeta circa 450 milioni di anni fa (Redecker *et al.*, 2000) e che ha rappresentato un fattore fondamentale per la colonizzazione delle terre emerse; i funghi micorrizici, infatti, avrebbero permesso ai primi organismi vegetali, dotati di un apparato radicale molto limitato, di svincolarsi dall'ambiente acquatico, favorendone l'insediamento in condizioni ambientali differenti (Malloch *et al.*, 1980).

La simbiosi micorrizica ha una diffusione enorme nel regno vegetale: si calcola che piu' del 90% delle piante esistenti in natura, che vivono nei principali biomi terrestri, dalla regioni sub-artiche a quelle equatoriali, formino questo tipo di associazione (Read, 1991). Aree che risultano differenti per clima, latitudine, vegetazione, tipo di suolo e disponibilita' di elementi nutritivi, sono caratterizzate da micorrize di tipo differente. Gli unici ambienti in cui la simbiosi micorrizica e' completamente assente sono gli ambienti acquatici e quelli perennemente coperti dai ghiacci. Inoltre, la simbiosi micorrizica e' assente in un limitato numero di specie appartenenti prevalentemente ad alcune famiglie delle Angiosperme, quali ad esempio *Chenopodiaceae*, *Cruciferae*, *Cariofillaceae*, *Cyperaceae*, *Juncaceae*, che mostrano un'incompatibilita' verso i funghi micorrizici (Newman & Reddel, 1987).

A seconda delle caratteristiche morfo-funzionali della associazione, le micorrize si distinguono in: ectomicorrize, ectoendomicorrize, endomicorrize. Le tre

principali tipologie, distinguibili prevalentemente in base allo sviluppo del fungo simbiote rispetto a quello della cellula vegetale, sono illustrate in Fig. 1.

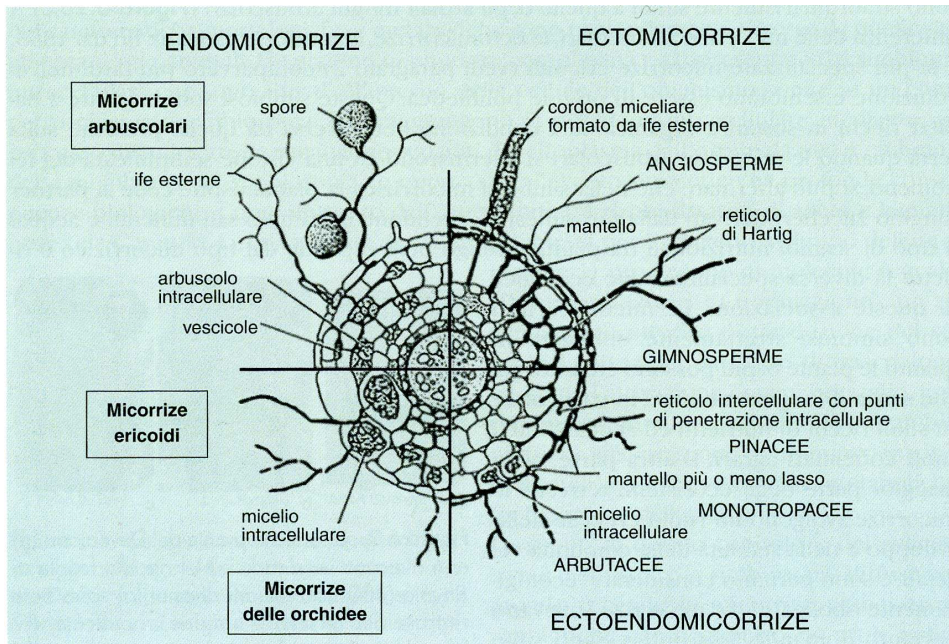


Fig. 1 - Principali tipi di micorrizza identificati in base alla forma delle strutture fungine e alle modalita' di sviluppo del fungo all'interno della radice (Bonfante, 2006).

Le ectomicorrize, che sono formate da Ascomiceti, Basidiomiceti e Deuteromiceti, sono tipiche degli ambienti forestali e nel complesso interessano il 3% delle fanerogame. In esse il micelio fungino si sviluppa prevalentemente all'esterno della radice, formando un rivestimento detto mantello o micoclena, e soltanto poche ife penetrano nel parenchima corticale, con percorso esclusivamente intercellulare, formando il cosiddetto reticolo di Hartig. Le ife fungine che esplorano il terreno circostante la radice, grazie alla produzione di enzimi idrolitici ed ossidativi, svolgono un ruolo importante nella mineralizzazione del fosforo e dell'azoto organico.

Nelle ectoendomicorrize il simbionte fungino, pur formando un mantello di ife intorno alla radice come nel caso precedente, e' anche in grado di penetrare all'interno delle cellule radicali formando una struttura con funzione austoriale che, in alcuni casi, prende la forma di un gomitollo (Fig. 1); questo tipo di micorrize hanno una

diffusione limitata in natura essendo presenti in alcune *Ericales*, dove formano ectoendomicorrize arbutoidi, in alcune conifere (*Pinus*, *Larix* e *Picea*) che normalmente o per gran parte della loro vita formano ectomicorrize, ed in alcuni generi, quali ad esempio *Monotropa* (ectoendomicorrize monotropoidi), dove assumono un ruolo particolare per il fatto che le piante ospiti sono generalmente aclorofilliche. Le ectoendomicorrize possono essere formate da Basiomiceti che, su altre specie vegetali, determinano la formazione di associazioni ectomicorriziche.

Nelle endomicorrize il fungo si sviluppa abbondantemente all'interno del parenchima corticale, con crescita sia inter che intracellulare; questo tipo di micorrize si distinguono a loro volta in micorrize ericoidi, delle Orchidee e arbuscolari (Fig. 1).

Le endomicorrize ericoidi sono presenti in piante appartenenti alla famiglia delle *Ericaceae* caratterizzate da radici molto fini; in queste piante lo strato corticale della radice è molto sottile ed il fungo colonizza l'epidermide, arrivando ad occupare più dell'80% del tessuto radicale. Per lungo tempo si è ritenuto che questo tipo di endomicorrize fossero sviluppate da un unico tipo di Ascomicete, *Hymenoscyphus ericae*, ma successivamente sulle radici di queste piante sono stati individuati altri Ascomiceti per cui è probabile che la diversità fungina, anche in questo tipo di micorrize, sia molto maggiore rispetto a quella precedentemente conosciuta. Pur essendo presenti in un numero limitato di specie vegetali, questo tipo di micorrize sono molto importanti dal punto di vista ecologico perché, in ambienti caratterizzati da terreni acidi e poveri come le brughiere, la tundra artica e le zone alpine, permettono l'insediamento di piante considerate essenziali per la colonizzazione degli ambienti sfavorevoli.

Nelle orchidee la presenza delle micorrize si rivela addirittura indispensabile per la germinazione del seme, dato che il simbionte fungino infetta le cellule del sospensore dell'embrione permettendo la traslocazione delle sostanze nutritive. Successivamente, l'apparato radicale della pianta verrà infettato in modo permanente da uno o più funghi diversi provenienti dal terreno circostante. Nel caso di orchidee aclorofilliche, la dipendenza dal fungo simbionte per la nutrizione non solo minerale ma anche carboidratica rimane necessaria anche nella fase adulta, durante la quale vengono attuate raffinate strategie per l'acquisizione degli zuccheri. Piante

parzialmente o totalmente dipendenti dal fungo simbiote per l'acquisizione di carbonio organico vengono chiamate "micoeterotrofe" (Leake, 1994b).

Le endomicorrize che risultano piu' interessanti da un punto di vista agronomico, tuttavia, sono quelle di tipo arbuscolare, dato che questo tipo di associazione e' presente nella maggior parte delle piante coltivate, sia erbacee che arboree.

E' da ricordare, infine, che in alcune specie vegetali, e' possibile ritrovare sulla radice, contemporaneamente o in fasi successive dello sviluppo, tipi differenti di micorrize o differenti simbionti fungini; in queste situazioni, le differenze funzionali associate ai diversi tipi di micorrize potrebbero garantire alla pianta piu' ampi benefici soprattutto in campo nutrizionale.

4 - Le micorrize arbuscolari

Le micorrize arbuscolari sono le piu' diffuse in natura, sia da un punto di vista geografico, essendo presenti in regioni comprese tra la fascia tropicale e quella sub-polare, sia da un punto di vista botanico, dato che questo tipo di simbiosi viene formata in tutte le divisioni del regno vegetale (Briofite, Pteridofite, Spermatofite), anche se prevale nelle Angiosperme (Harley & Smith, 1983). In questo tipo di micorrize lo sviluppo intracellulare del fungo e' caratterizzato dalla presenza di organi austoriali detti arbuscoli, costituiti da ramificazioni sottilissime delle ife all'interno delle cellule del parenchima corticale, a livello delle quali avvengono gli scambi nutrizionali tra i due partners (Smith & Read, 1997). Spesso si ha anche la presenza di vescicole, intra o intercellulari, contenenti sostanze lipidiche ed aventi funzione di riserva. La colonizzazione radicale e' accompagnata dallo sviluppo di una estesa rete di ife che circondano la radice e esplorano il terreno circostante.

I funghi micorrizico-arbuscolari (MA), attualmente inclusi nel nuovo phylum *Glomeromycota*, non mostrano specificita' d'ospite in senso stretto, ossia uno stesso fungo puo' infettare specie vegetali diverse e, viceversa, una stessa pianta puo' essere micorrizzata da specie fungine differenti; tuttavia, nei diversi binomi fungo-pianta ospite l'infettivita' dell'endofita e l'efficienza della simbiosi puo' variare notevolmente, influenzando in modo rilevante il successo dell'interazione.

4.1 - Il ciclo vitale dei funghi micorrizico-arbuscolari

I funghi MA sono organismi multicariotici (polinucleati), asessuali, che si comportano come simbionti obbligati e pertanto il loro ciclo vitale puo' compiersi completamente esclusivamente in presenza della pianta ospite (Fig. 2).

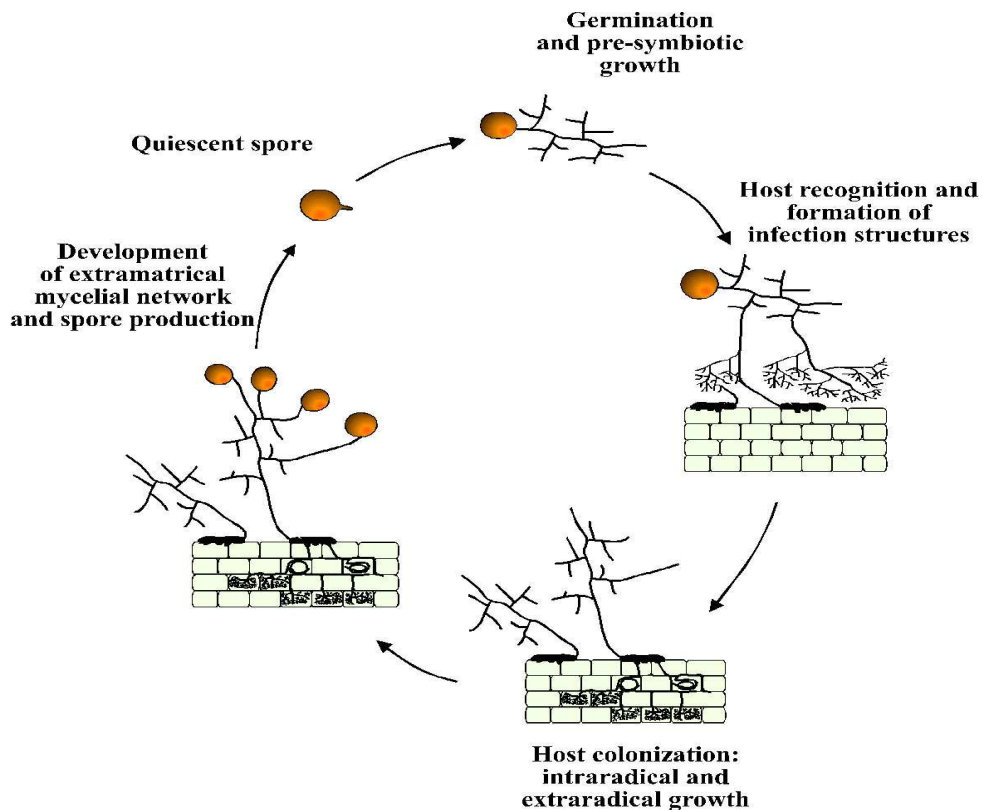


Fig. 2 - Ciclo vitale dei funghi micorrizico-arbuscolari (Giovannetti, 2000)

I meccanismi che regolano il riconoscimento tra i due partners e che permettono la realizzazione della simbiosi, sono stati oggetto di numerosi studi per comprendere le complesse interazioni che portano, attraverso successivi meccanismi di reciproco riconoscimento e conseguente modificazione dell'espressione genica, alla completa integrazione tra i due organismi.

All'interno del loro ciclo vitale possiamo distinguere due fasi, una presimbiotica ed una simbiotica, caratterizzate da un diverso comportamento a livello biochimico, metabolico e funzionale del fungo.

4.1.1 - La fase presimbiotica

Le spore presenti nel terreno, in condizioni ambientali adatte, germinano dando origine ad un micelio pre-simbiotico la cui crescita, tuttavia, si arresta precocemente se non riesce a stabilire un rapporto simbiotico con l'ospite (Giovannetti *et al.*, 2000). L'arresto della crescita e' seguito da una fase di retrazione del protoplasma dagli apici ifali, con successiva formazione di setti di separazione tra i segmenti ifali vuoti e quelli vitali; cio' e' stato interpretato come un processo di riallocazione delle risorse, funzionale al mantenimento delle limitate disponibilita' energetiche delle ife germinative (Logi *et al.*, 1998). L'arresto della crescita comporta il ritorno ad uno stato di dormienza che puo' successivamente dare ai propaguli fungini la possibilita' di una nuova germinazione (Koske, 1981).

Lo studio della germinazione delle spore ha permesso di approfondire le conoscenze relative allo sviluppo del micelio dei funghi MA ed in particolare e' risultato che le anastomosi, strutture gia' descritte negli Ascomiceti e Basidiomiceti, vengono largamente realizzate anche nei funghi che formano questo tipo di simbiosi micorrizica. E' stato osservato, infatti, che ife originatesi dalla stessa spora o da spore differenti dello stesso isolato fungino sono in grado di fondere e di realizzare una continuita' citoplasmatica tra le ife, attraverso la quale puo' verificarsi il passaggio di nuclei (Giovannetti *et al.*, 1999). Dal momento che le spore dei funghi MA sono multinucleate e che queste sono risultate multigenomiche, lo scambio di nuclei che si realizza attraverso le anastomosi potrebbe rappresentare un meccanismo genetico interessante, in assenza di ricombinazione sessuale (Sanders, 1999). La realizzazione di anastomosi, presente nel genere *Glomus*, mancherebbe invece nei generi *Gigaspora* e *Scutellospora* (Giovannetti *et al.*, 1999). Inoltre, la mancata formazione di anastomosi quando vengono messe in contatto spore appartenenti a specie o generi differenti (Giovannetti *et al.*, 1999), dimostra che i funghi MA, anche allo stato presimbiotico, sono in grado di discriminare tra interazioni compatibili e incompatibili.

Sorprendentemente e' risultato che neppure isolati fungini della stessa specie ma provenienti da aree geografiche differenti sono in grado di fondere, suggerendo che l'isolamento geografico possa originare la comparsa meccanismi di incompatibilita' anche all'interno della stessa specie (Giovannetti *et al.*, 2003).

4.1.2 - La fase simbiotica

Il passaggio dallo stato pre-simbiotico a quello simbiotico, comporta notevoli cambiamenti metabolici sia per il fungo (Saito, 1995) che per la pianta (Shachar-Hill *et al.*, 1995). La presenza di radici suscettibili influisce notevolmente sullo sviluppo delle ife, suggerendo che, prima ancora che avvenga il contatto tra le pareti cellulari dei due simbionti, si verifichi uno scambio di segnali di riconoscimento tra le radici della pianta ospite e i funghi MA presenti nel suolo (Becard & Piche, 1989). La presenza di segnali chimici specifici negli essudati radicali delle piante ospiti e' in grado di stimolare una morfogenesi differenziale delle ife fungine, caratterizzata da perdita della dominanza apicale ed intensa ramificazione delle ife (Giovannetti *et al.*, 1993b; Giovannetti *et al.*, 1994).

Stabilito il contatto con la radice, il micelio fungino comincia la formazione degli appressori, strutture infettive costituite da un ifa allargata che aderisce alla superficie radicale per permettere la penetrazione di un'ifa all'interno della radice stessa. La formazione degli appressori e' un evento importante del riconoscimento tra i due simbionti e, nel caso di combinazioni incompatibili, la formazione di queste strutture non viene realizzata (Giovannetti *et al.*, 1993a). In mutanti non-ospiti di *Pisum sativum* L., inoltre, e' stata osservata la formazione di inspessimenti della parete delle cellule radicali in corrispondenza degli appressori formati dal fungo che possono costituire una reazione di difesa della pianta al momento del contatto tra i due partners (Gollotte *et al.*, 1993).

Superata questa fase di riconoscimento, le ife fungine penetrano attraverso l'epidermide e cominciano a diffondersi intercellularmente negli strati piu' esterni del parenchima, formando talvolta degli avvolgimenti intracellulari detti "coils". La maggior parte dello sviluppo del fungo, tuttavia, si ha negli strati piu' interni del parenchima corticale dove si verifica la formazione degli arbuscoli (Fig. 3). La realizzazione di queste strutture e' un segno evidente dell'integrazione tra i due

organismi coinvolti; gli arbuscoli rappresentano, infatti, il sito dove avvengono gli scambi nutrizionali tra i due partners e sono l'espressione di una serie complessa di eventi di riconoscimento che richiedono una risposta positiva da parte di entrambi i simbionti.

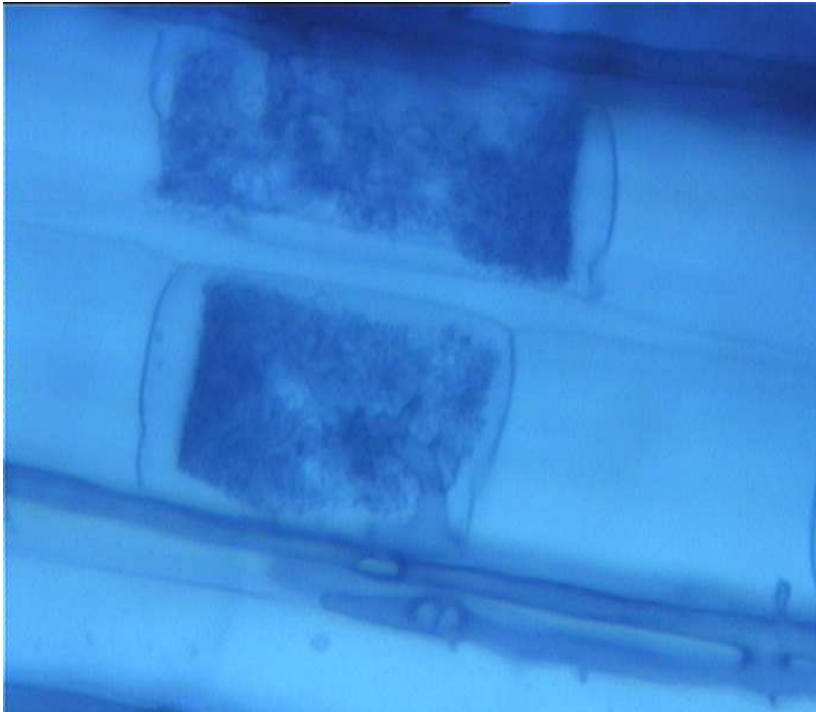


Fig. 3 - Arbuscoli formati dal fungo *G. mosseae* all'interno di cellule radicali di girasole.

Esistono alcuni casi in cui il fungo, pur riuscendo ad infettare la radice e a diffondere le sue ife nel parenchima corticale, non e' in grado di formare arbuscoli; a questo riguardo e' stato osservato che, innestando il germoglio di una pianta non-ospite (*Lupinus albus* L.) su una pianta che forma micorrize arbuscolari (*Pisum sativum* L.) non si riduce la frequenza dell'infezione micorrizica ma si inibisce completamente la formazione di arbuscoli (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1989). La formazione dell'arbuscolo comincia con la penetrazione di un'ifa fungina all'interno di una cellula radicale, attraverso la parete cellulare. L'ifa si ramifica in maniera dicotomica mentre il plasmalemma della cellula ospite segue questo accrescimento incrementando notevolmente la sua estensione (Cox & Tinker, 1976;

Alexander *et al.*, 1989) e circondando completamente le ramificazioni del fungo. Contemporaneamente allo sviluppo dell'arbuscolo, la cellula subisce profonde modificazioni: il grosso vacuolo centrale diminuisce di volume mentre il citoplasma puo' aumentare fino a 20 volte, si ha una proliferazione di organuli cellulari ed ipertrofia del nucleo, al quale e' associata un'intensa attivita' di trascrizione (Cox & Tinker, 1976; Toth & Miller, 1984; Berta *et al.*, 1993). Tutte queste modificazioni sono espressione di un'intensa attivita' metabolica della cellula infettata che per certi aspetti ricordano una condizione di giovanilita' della cellula. Considerando che l'arbuscolo arriva ad occupare buona parte del volume della cellula ospite e che le ramificazioni terminali del fungo sono estremamente sottili (0,5-1 μm di diametro rispetto ai 4-5 μm di diametro dell'ifa intercellulare) si comprende quanto sia estesa la superficie di contatto, facilitando cosi' gli scambi nutrizionali tra i due simbionti (Harley & Smith, 1983). Tra il plasmalemma della cellula ospite e la parete cellulare fungina resta una zona di interfaccia (100-700 μm) estremamente interessante perche' e' attraverso di essa che avviene il passaggio di nutrienti tra fungo e pianta. L'identificazione delle sostanze presenti in questa zona di interfaccia ha evidenziato la presenza di composti, come cellulosa, pectine ed anche proteine, che costituiscono la parete cellulare della cellula ospite. Si puo' ipotizzare pertanto, che la cellula vegetale produca egualmente i componenti di parete, riversandoli all'esterno attraverso il plasmalemma dove, tuttavia, la presenza del fungo impedisce a tali sostanze di assemblarsi per costituire la parete. D'altra parte anche la parete cellulare del fungo subisce modificazioni; da osservazioni al microscopio elettronico e' emerso che, passando dalla fase intercellulare a quella intraradicale, oltre ad una progressiva riduzione dello spessore della parete (20-30nm) si verifica anche una semplificazione della struttura dovuta, probabilmente, ad un minor grado di polimerizzazione delle molecole di N-acetilglucosammina che costituiscono la chitina, il componente fondamentale della parete fungina (Bonfante-Fasolo, 1987; Bonfante-Fasolo, 1988).

Gli arbuscoli hanno una vita piuttosto breve di 1-2 settimane (Harley & Smith, 1983), mentre le vescicole sono piu' persistenti. Dopo breve tempo, il citoplasma del fungo comincia a ritirarsi dall'arbuscolo e le pareti delle ife collassano, rimanendo avvolte dal plasmalemma della cellula ospite e dai materiali polisaccaridici depositati nell'interfaccia (Alexander *et al.*, 1989). La cellula vegetale sopravvive e, con il

tempo, riacquista l'aspetto di una normale cellula del parenchima corticale (Jacquelinet-Jeanmougin *et al.*, 1987). L'infezione della radice, tuttavia, procede attraverso la continua formazione di nuovi arbuscoli.

Una volta che si è instaurato il rapporto simbiotico, il fungo si accresce all'esterno della radice formando reti miceliari molto estese che circondano la radice e permettono l'esplorazione del terreno circostante; queste strutture, particolarmente importanti dal punto di vista ecologico e agronomico, verranno descritte dettagliatamente nel paragrafo 4.4.

Il micelio extraradicale produce nuove spore, isolate o riunite in sporocarpî, che possono restare dormienti nel terreno o germinare subito, dando inizio ad un nuovo ciclo vitale. In alcuni casi, come ad esempio nel *Glomus intraradices*, le spore vengono formate anche all'interno della radice stessa.

4.2 - La classificazione dei funghi micorrizici arbuscolari

A confronto del grande numero di potenziali ospiti, sono pochi i funghi agenti di micorrize arbuscolari. La loro classificazione è stata condotta per lungo tempo basandosi prevalentemente sulle caratteristiche morfologiche delle spore (colore, forma, dimensioni, caratteristiche della parete, modalità di attacco all'ifa ecc.) e sulle loro modalità di formazione. Inizialmente i funghi micorrizici arbuscolari venivano suddivisi in 4 generi (*Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora* e *Sclerocystis*) appartenenti alla famiglia delle *Endogonaceae*.

Successivamente i funghi MA sono stati collocati nella classe *Zygomycota*, costituita da un solo ordine, quello delle *Glomales*, comprendente 3 famiglie (*Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae* e *Glomaceae*) ed un totale di 6 generi: *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Sclerocystis*, *Entrophospora* e *Scutellospora* (Morton & Benny, 1990).

In questi ultimi anni, le tradizionali modalità di classificazione sono state affiancate dalle più moderne tecniche di biologia molecolare e, sulla base di tali risultati, è stata proposta una nuova classificazione tassonomica in base alla quale i funghi MA vengono inclusi nel nuovo phylum *Glomeromycota* (Schussler *et al.*,

2001) che comprende 4 nuovi ordini: *Archaeosporales*, *Paraglomerales*, *Glomerales* e *Diversisporales* (Fig. 4).

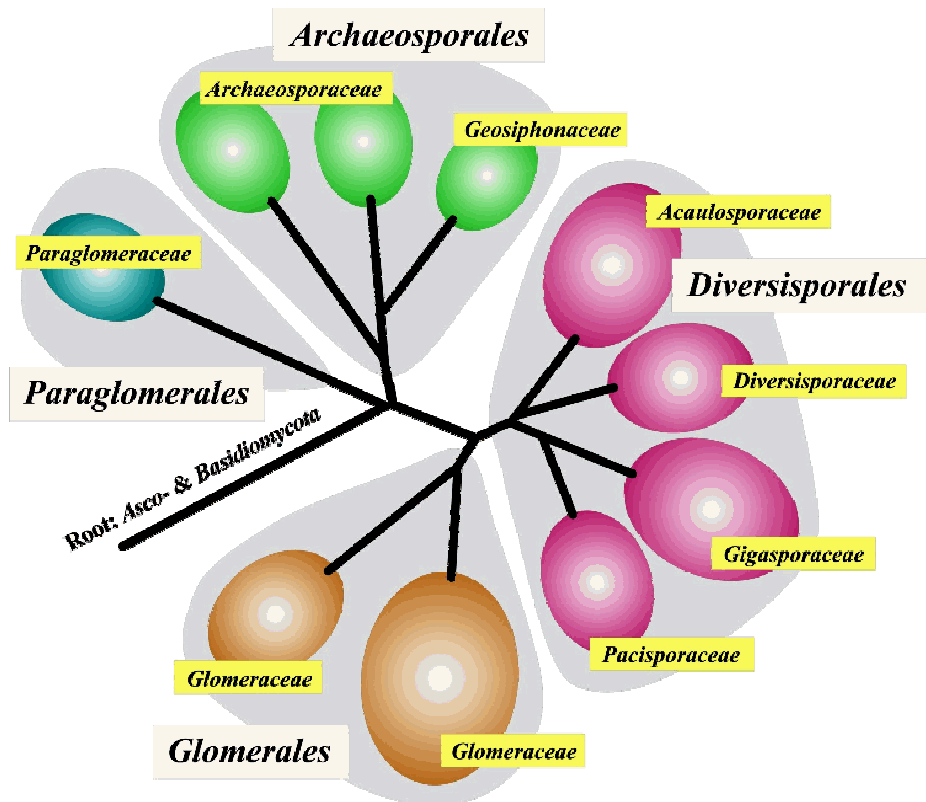


Fig. 4 - Albero filogenetico dei funghi micorrizici arbuscolari (da: <http://www.lrz-uenchen.de/~schuessler/amphylo/>)

4.3 - Gli scambi metabolici tra i due simbionti

Il trasferimento di carbonio dalla pianta all'endofita fungina è fondamentale per la funzionalità della simbiosi dato che i funghi MA, essendo biotrofi obbligati, dipendono totalmente dall'ospite per il rifornimento di carboidrati. Il flusso di carbonio (C) permette la realizzazione di una estesa ed efficiente rete miceliare extraradicale, indispensabile per la sopravvivenza e la diffusione del fungo, oltre che per il migliore sviluppo della pianta ospite (Smith & Read, 1997). L'impossibilità per

la pianta di produrre fotoassimilati, come si verifica ad esempio in assenza di luce, determina la mancata colonizzazione da parte del fungo (Vierheilig *et al.*, 2002). Tutto ciò può essere visto come un costo per la pianta imposto dalla simbiosi, che viene tuttavia ampiamente compensato dai benefici in termini di assorbimento di nutrienti, acqua ecc., in modo da determinare un bilancio che, nella maggior parte dei casi, risulta decisamente positivo per la pianta ospite.

Il passaggio di carbonio conseguente all'interazione simbiotica tra la pianta e il fungo è stato dimostrato per la prima volta mediante l'impiego di ^{14}C (Ho & Trappe, 1973). Tuttavia, anche se notevoli progressi sono stati fatti grazie alle tecniche di biologia molecolare, la comprensione dei meccanismi che regolano la ripartizione del carbonio e la sua traslocazione al fungo simbiote è ancora oggetto di studio.

Si ritiene che la simbiosi micorrizica determini una maggiore allocazione verso la parte ipogea della pianta del C assimilato attraverso la fotosintesi (Jakobsen & Rosendahl, 1990; Grimoldi *et al.*, 2006) e che, nella radice micorrizata, il metabolismo del carbonio subisca modifiche sostanziali (Douds *et al.*, 2000), come dimostrerebbe, ad esempio, il più basso contenuto di saccarosio e il più elevato consumo di glucosio (Shachar-Hill *et al.*, 1995). Nella radice micorrizata è stato individuato un trasportatore di esosi (Mtst1) che agisce esclusivamente nelle porzioni colonizzate e che viene attivato dalla presenza di ife (Harrison, 1996), la cui caratterizzazione è stata effettuata recentemente (Schussler *et al.*, 2006). Vari autori hanno osservato, infatti, che il passaggio di carbonio dalla cellula vegetale alle ife intraradicali del fungo avviene sotto forma di esosi, preferenzialmente glucosio il quale viene poi rapidamente convertito in trealosio, glicogeno, lipidi e in altre molecole necessarie per il metabolismo fungino (Shachar-Hill *et al.*, 1995; Pfeffer *et al.*, 1999; Bago *et al.*, 2000).

Una parte consistente del C traslocato dalla pianta al fungo micorrizico viene usato nel micelio intraradicale per la sintesi di lipidi, la principale forma di conservazione del carbonio nei funghi MA, e si ritiene che siano questi i principali composti attraverso i quali il C viene traslocato dalle ife interne alla radice al micelio extraradicale (Pfeffer *et al.*, 1999; Bago *et al.*, 2000) (Fig. 5). La traslocazione di C sotto forma lipidica è avvalorata dal fatto che la produzione di esosi nel micelio extraradicale, e successivamente di trealosio, si verificherebbe prevalentemente,

attraverso un processo di gluconeogenesi a partire da lipidi (Pfeffer *et al.*, 1999) e non da carboidrati. Il legame tra il metabolismo lipidico e quello glucidico risulterebbe anche dall'intensità rilevata nel micelio extraradicale nello svolgimento del ciclo del gliossilato (Lammers *et al.*, 2001). D'altra parte una scarsa attività degli enzimi glicolitici era stata osservata precedentemente nel micelio di spore germinate (Saito, 1995). Tuttavia, esperimenti successivi condotti con il C marcato dimostrano che, accanto alla traslocazione di lipidi dalla radice micorrizzata al micelio extraradicale, si verifica anche un flusso di carboidrati, principalmente sotto forma di glicogeno (Bago *et al.*, 2003) (Fig. 5).

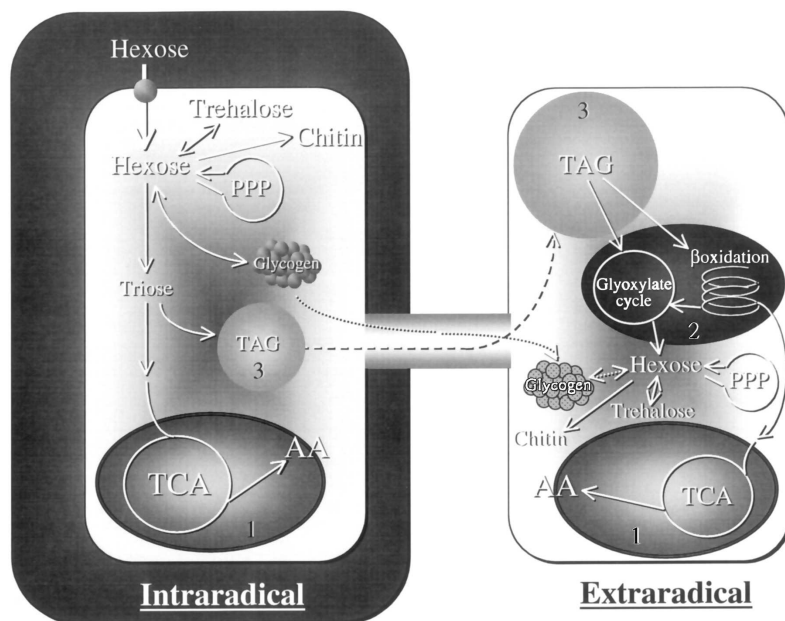


Fig. 5 - Flussi metabolici del carbonio nella fase intra ed extraradicale di funghi micorrizico-arbuscolari. (1: mitocondri, 2: gliossisomi, 3: corpi lipidici. TCA: acidi tricarbossilici (ciclo di Krebs), TAG: triacilgliceridi, PPP: via dei pentosi-fosfati, AA: AcetilCoA). (da Bago *et al.* 2000).

Tutte queste osservazioni non solo confermano il trasferimento di carboidrati al fungo, ma dimostrano soprattutto come la radice micorrizzata possa costituire un forte "sink" metabolico, ossia esercitare un'azione di richiamo in senso basipeto dei fotosintetati prodotti dalla pianta (Wright *et al.*, 1998a; Zhu & Miller, 2003; Grimoldi *et al.*, 2006).

E' molto interessante, quindi, stimare la quantita' di carbonio assimilato per via fotosintetica che viene ceduto al simbionte fungino e valutare se l'efficienza delle diverse combinazioni fungo-pianta ospite possa essere messa in relazione a tale parametro. In presenza della simbiosi micorrizica la quantita' di C che viene traslocato dal germoglio alla radice micorrizzata puo' aumentare di una percentuale variabile tra il 3 e il 12% del totale del carbonio fissato dalla pianta (Pang & Paul, 1980; Snellgrove *et al.*, 1982; Douds *et al.*, 1988) e, attraverso opportuni calcoli, e' stato stimato che la quantita' di fotoassimilati che giornalmente vengono ceduti dalla pianta al fungo simbionte possa variare tra il 4 e il 20% (Jakobsen & Rosendahl, 1990), mentre recentemente sono stati stimati valori variabili tra 3 e 8% della fotosintesi lorda giornaliera (Grimoldi *et al.*, 2006). La rapidita' con cui si verifica il flusso di C tra i due simbionti e' dimostrata da esperimenti condotti con ^{14}C in cui dopo 70 ore si rilevava che il 3.4% del C fissato dalla pianta era stato trasferito al micelio fungino (Johnson *et al.*, 2002). Le vere cause dell'ampia variabilita' osservata nel flusso di C dalla pianta al fungo, come pure i meccanismi che regolano la ripartizione delle risorse, non sono ancora del tutto chiari.

Se da una parte questa cessione di C al fungo puo' essere vista come un costo della simbiosi, dall'altra parte e' stato suggerito che il richiamo di fotosintetati esercitato dalla colonizzazione radicale possa stimolare il processo di assimilazione della CO_2 da parte della pianta ospite (Fitter, 1991; Tinker *et al.*, 1994). L'incremento dell'attivita' fotosintetica rilevata da alcuni autori in presenza del simbionte micorrizico (Wright *et al.*, 1998b; Miller *et al.*, 2002; Morini *et al.*, 2003) potrebbe quindi dipendere da una maggiore "sink strength" esercitata dalla radice micorrizzata. Differenze nella "carbon sink strength" possono dipendere dall'identita' di entrambi i partners coinvolti nella simbiosi (Lerat *et al.*, 2003a; Lerat *et al.*, 2003b) ed e' verosimile che il passaggio di carbonio dalla pianta al fungo possa variare quantitativamente nelle diverse fasi del ciclo di sviluppo della simbiosi. Una correlazione tra la "sink strength" esercitata dal simbionte fungino e il livello di colonizzazione radicale e' stata osservata in piante di orzo micorrizzate con *Gigaspora rosea* o *Glomus intraradices* (Lerat *et al.*, 2003a).

Sulla base di quanto affermato e' possibile ipotizzare che i funghi micorrizici possono giocare un ruolo importante nello svolgimento del ciclo del carbonio ed in

particolare nella fase di rimozione di C dall'atmosfera (Treseder & Allen, 2000; Staddon *et al.*, 2002). Questo e' particolarmente interessante considerando le problematiche attuali legate al progressivo aumento della concentrazione di CO₂ nell'atmosfera e alle allarmanti conseguenze legate all'incremento di questo gas-serra (global change).

La possibilita' che, in determinate situazioni, si possa verificare un'inversione nella direzione del flusso metabolico tra fungo e pianta, come dimostrerebbero gli interessanti esperimenti nei quali e' stato rilevato un trasferimento di carbonio e altri nutrienti tra piante collegate da una comune rete micorrizica (Simard *et al.*, 1997b), sara' discussa estesamente piu' avanti (paragrafo 4.4.1).

Come gia' affermato precedentemente, i vantaggi per la pianta ospite conseguenti all'instaurazione della simbiosi micorrizica dipendono dal bilancio tra la sottrazione di fotosintetati da parte del fungo e i benefici derivanti principalmente dal migliore stato nutrizionale. Grazie alla presenza del fungo simbiote, infatti, la pianta riceve una maggiore quantita' degli elementi nutritivi presenti nel suolo, specialmente di quelli poco mobili (Giovannetti & Avio, 2002b; Giovannetti, 2006). Tra questi, l'elemento fondamentale e' costituito dal fosforo, il cui ruolo e' stato ampiamente indagato e discusso da quando i primi esperimenti condotti da Barbara Mosse nel 1965 dimostrarono che somministrando forti dosi di questo elemento alle piante non micorrizzate era possibile ottenere un accrescimento comparabile a quello delle piante micorrizzate. Esperimenti successivi realizzati con il fosforo radioattivo hanno dimostrato che la radice micorrizzata e' in grado di incrementare l'assorbimento di fosforo e che la forma chimica assorbita e' la stessa della radice non micorrizzata (Mosse *et al.*, 1973; Powell, 1975). La maggiore concentrazione di fosforo nei tessuti di piante micorrizzate e' stata successivamente confermata da numerosissime prove sperimentali (Berta *et al.*, 1995; Fortuna *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000). Poiche' il fosforo e' un elemento chiave dei principali processi metabolici che si svolgono nella pianta, la migliore nutrizione fosfatica determinata dalla simbiosi micorrizica determina sostanziali vantaggi per lo sviluppo della pianta ospite; la relazione tra maggiore contenuto di fosforo nei tessuti delle piante micorrizzate e migliore sviluppo e' stata rilevata in numerose specie sia erbacee che arboree (Johnson, 1984; Fortuna *et al.*, 1996).

Il contributo dei funghi MA all'assorbimento di fosforo da parte della pianta puo' variare da percentuali basse alla quasi totalita' a seconda della combinazione fungo-pianta ospite (Pearson & Jakobsen, 1993; Javot *et al.*, 2007b). Una volta che il fosforo e' stato assorbito dal fungo, viene accumulato e trasportato sottoforma di granuli di polifosfato dal micelio extraradicale a quello intraradicale (Olsson *et al.*, 2002). Le catene di polifosfato vengono progressivamente idrolizzate nel micelio intraradicale (Solaiman *et al.*, 1999; Ohtomo & Saito, 2005); il successivo processo di rilascio di fosforo alla cellula vegetale che si verifica a livello degli arbuscoli, si ritiene coinvolga l'azione di polifosfatasi e fosfatasi alcaline (Tisserant *et al.*, 1993; Giovannetti & Avio, 2002a). Recentemente e' stato visto che la mancanza di specifici trasportatori per l'acquisizione del P nella pianta, porterebbero alla morte prematura dell'arbuscolo, dimostrando che il flusso di P dal fungo alla pianta e' necessario non solo per l'ospite vegetale ma anche per il simbionte fungino (Javot *et al.*, 2007a).

Alti livelli di fosforo nel suolo possono avere effetti negativi sul processo di colonizzazione radicale da parte dei funghi MA; per spiegare questo fenomeno e' stato ipotizzato che la pianta, in presenza di concentrazioni di P intracellulari soddisfacenti, non traslochi carbonio al fungo (Olsson *et al.*, 2002; Olsson *et al.*, 2006). Interessanti legami tra l'assorbimento del fosforo e il flusso di carbonio sono stati suggeriti in recente lavoro (Fitter, 2006) secondo il quale la cessione del fosforo alle cellule corticali della radice costituirebbe il segnale che assicura alla pianta i reciproci vantaggi della simbiosi e cio' scatenerrebbe la traslocazione di carbonio al fungo. L'identificazione molecolare dei segnali coinvolti in questo meccanismo permetterebbe di comprendere meglio le interconnessioni esistenti tra il metabolismo del P e del carbonio nella pianta micorrizata (Javot *et al.*, 2007b).

I funghi micorrizici arbuscolari sono molto importanti anche per l'assorbimento di azoto, che puo' essere assimilato dalle ife extraradicali in diverse forme molecolari (Jin *et al.*, 2005).

I benefici effetti dell'infezione micorrizica non si limitano soltanto ad una migliore nutrizione fosfatica e azotata della pianta ospite ma consistono anche in un incremento nell'assorbimento di altri elementi minerali, quali ad esempio calcio, potassio, magnesio, zolfo, rame e zinco, il cui assorbimento potrebbe essere

incrementato da fattori analoghi a quelli illustrati per il fosforo (Gildon & Tinker, 1983; Ojala *et al.*, 1983).

E' da aggiungere infine che alcuni elementi, come ad esempio il sodio e il cloro, possono essere ritrovati in concentrazione minore nelle piante micorrizzate, specie se il suolo ne e' particolarmente ricco. La capacita' di limitare l'accumulo di alcuni elementi e' stato associato ad una migliore selettivita' di assorbimento posseduta dalla ife fungine le quali sarebbero in grado di stimolare l'assorbimento di ioni carenti e ridurre l'assunzione di quelli presenti in eccesso (Rivera-Becerril *et al.*, 2002).

I vantaggi osservati nella nutrizione delle piante micorrizzate sono normalmente messi in relazione alla loro migliore capacita' di esplorare il suolo, grazie alla presenza della densa rete di sottilissime ife che dalla radice si estendono nell'ambiente circostante (Smith & Read, 1997).

4.4 - La rete micorrizica extraradicale

Una volta che si e' instaurata la relazione simbiotica tra i 2 organismi, il fungo comincia ad esplorare il terreno circostante la radice attraverso la produzione di estese reti miceliari, costituite da ife di diametro maggiore (8-20 μm) e da ife piu' sottili (circa 10 μm), estremamente ramificate ed interconnesse tra loro. La formazione di un'estesa rete micorrizica extraradicale e' fondamentale sia per le strategie di sopravvivenza del fungo, sia per lo sviluppo della pianta ospite.

La struttura di questa rete miceliare, caratterizzata da un elevato rapporto superficie/volume, determina sia un ampliamento della superficie assorbente, con conseguente incremento dell'assorbimento di acqua ed elementi nutritivi, sia una migliore esplorazione del suolo rispetto a quella che la pianta sarebbe in grado di realizzare mediante il proprio apparato radicale. Cio' e' importante soprattutto per gli elementi poco mobili per i quali, data la maggiore velocita' di assorbimento radicale rispetto alla velocita' di diffusione nel suolo, tende a formarsi intorno alla radice una "zona di esaurimento".

Informazioni sui meccanismi di formazione e sulla funzionalita' delle reti micorriziche extraradicali sono fondamentali per valutare la capacita' di differenti specie o isolati fungini di migliorare la crescita e la nutrizione minerale della pianta.

D'altra parte, questa fase di sviluppo del fungo e' influenzata da una molteplicita' di fattori, quali ad esempio l'affinita' tra i due simbionti, il livello di colonizzazione radicale, lo stato nutrizionale della pianta ospite, le condizioni pedoclimatiche in cui si sviluppa la simbiosi, ecc.. Il coinvolgimento di numerose variabili e le difficolta' oggettive che comporta lo studio di un organismo che, come endofita obbligato, deve necessariamente svilupparsi in presenza dell'ospite, costituiscono un ostacolo allo svolgimento delle ricerche in questo settore.

Le indagini su questa fase di sviluppo dei funghi MA sono state condotte, nella maggior parte dei casi, con tecniche distruttive che comportano l'estrazione del micelio dal suolo (Schubert *et al.*, 1987b; Jakobsen & Rosendahl, 1990; Jakobsen *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1998) mentre alcune osservazioni non distruttive della struttura delle reti micorriziche sono state effettuate mediante l'utilizzo di "root observation chambers" (Friesse & Allen, 1991; Newman *et al.*, 1994; Hart & Reader, 2005) o mediante coltura *in vitro* di radici trasformate (Bago *et al.*, 1998a; Bago *et al.*, 1998b; de la Providencia *et al.*, 2005). La valutazione della estensione del micelio extraradicale del fungo simbiote, viene generalmente effettuata mediante misurazione della lunghezza delle ife con il "grid-line intersect method" (Jakobsen *et al.*, 1992), dopo aver effettuato una filtrazione su membrana dei campione di suolo secondo varie metodologie descritte (Schubert *et al.*, 1987b; Li *et al.*, 1991; Jakobsen *et al.*, 1992; Boddington *et al.*, 1999).

La produzione di ife extraradicali puo' variare considerevolmente a seconda della specie fungina considerata (Jakobsen *et al.*, 1992; Schreiner *et al.*, 1997), della pianta ospite (Giovannetti *et al.*, 2001), oltre che naturalmente in funzione delle condizioni ambientali e del tempo di sviluppo; in ogni caso, tuttavia, risulta evidente la notevole estensione delle ife fungine nel suolo, la cui lunghezza, in base ai dati reperibili in letteratura, risulta oscillare in genere tra 1 e 10 m/g di suolo (Tab. 1).

Bisogna d'altra parte considerare che le modalita' di quantificazione sopra menzionate comportano normalmente margini di errore e di soggettivita' piuttosto elevati, dal momento che e' necessario differenziare le ife del fungo micorrizico da quelle degli altri funghi non micorrizici presenti nel suolo mediante una accurata osservazione microscopica.

Specie fungine	Organizzaz. esperimento	Tempo di incubazione	Lunghezza del micelio	Riferimenti bibliografici
<i>Acaulospora laevis</i>	in suolo	7 giorni 14 giorni	1.1-6.2 m/g 2.7-6.9 m/g	(Jakobsen <i>et al.</i> , 1992)
<i>Gigaspora rosea</i>	in suolo	135 giorni	4.8 m/g	(Schreiner <i>et al.</i> , 1997)
<i>Scutellospora calaspora</i>	in suolo	27 giorni	10.6-12.6 m/g	(Pearson & Jakobsen, 1993)
	in suolo	42 giorni 14 giorni	9-10 m/g 2.5-9.2 m/g	(Smith <i>et al.</i> , 2000) (Jakobsen <i>et al.</i> , 1992)
<i>Glomus caledonium</i>	in suolo	42 giorni	3 - 5 m/g	(Smith <i>et al.</i> , 2000)
	in suolo	27 giorni	8.92-10.31 m/g	(Pearson & Jakobsen, 1993)
	in suolo	30 giorni	2-4.5 m/g	(Olsson <i>et al.</i> , 1995)
<i>Glomus etunicatum</i>	in suolo	135 giorni	3.3 m/g	(Schreiner <i>et al.</i> , 1997)
<i>Glomus intraradices</i>	<i>in vitro</i>	14 sett 120 gg 8-15 sett	30 cm/ cm ² 25-100 cm/cm ² 2.6±0.3 mm/mm ²	(Bago <i>et al.</i> , 1998a) (Bago <i>et al.</i> , 1998b) (StArnaud <i>et al.</i> , 1996)
	Compart. ife Comp. inoculo	4 mesi	4.31 m/g 44.8 m/g	(Frey <i>et al.</i> , 1994)
<i>Glomus mosseae</i>	in suolo	135 giorni	8.1 m/g	(Schreiner <i>et al.</i> , 1997)
	microcosmo	7 giorni	5.3 m/cm ³	(Giovannetti & Sbrana, 1998)
	pot cultures	48 giorni	7 -10.4 m/g di	(Bethlenfalvay & Ames, 1987)
<i>Glomus sp</i>	misurazione in campo	-	49 m/m radici 7.8 m/g suolo	(Tisdall & Oades, 1979)
	Compart. radici Compart. ifale	30 giorni	12 m/g suolo 5.7 m/g suolo	(Olsson <i>et al.</i> , 1995)
<i>G. occultum</i>	pot cultures	4 mesi	7.43 m/g suolo	(Vilarino <i>et al.</i> , 1993)

Tab. 1 - Lunghezza del micelio extraradicale prodotto da funghi MA cresciuti in differenti condizioni sperimentali. I valori della lunghezza ifale sono espressi su peso secco del suolo o per area nel caso di colture *in vitro*.

In determinate situazioni, l'attendibilita' di tali misure puo' essere migliorata mediante procedure che facilitino l'estrazione delle ife dal substrato (Vilarino *et al.*, 1993) o attraverso l'uso di microcosmi dotati di compartimenti separati per la crescita delle ife (Jakobsen *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1995; Sanders *et al.*, 1998; Neumann & George, 2005). In ogni caso, indipendentemente da come si realizza la fase di estrazione e quantificazione del micelio, tale modalita' di studio della rete fungina, non permettendo l'estrazione di ife intatte, impedisce lo studio della reale architettura della rete micorrizica extraradicale che invece puo' influire sulla efficienza di differenti combinazioni fungo-pianta ospite.

Recentemente, la messa a punto di un sistema sperimentale innovativo per lo studio della rete micorrizica extraradicale *in vivo*, denominato dagli autori "metodo sandwich", ha permesso di avere a disposizione una tecnica "non-distruittiva" per studiare lo sviluppo, la morfologia e l'architettura della rete ifale (Giovannetti *et al.*, 2001). Questa tecnica, oltre a rendere possibile la visualizzazione e la misurazione dell'estensione della rete fungina (lunghezza, densita' ifale ecc.), permette di effettuare rilevazioni quali-quantitative utili alla comprensione dei meccanismi che portano alla realizzazione di tale fondamentale struttura. La possibilita' degli apici ifali di fondere con la stessa ifa o con ife differenti dello stesso micelio extraradicale mediante la formazione di anastomosi, gia' osservata nella fase presimbiotica, ha mostrato di essere un meccanismo fondamentale anche nella fase esterna di sviluppo simbiotico. L'elevato numero di ramificazioni e la frequente formazione di anastomosi determina in *Glomus mosseae* la realizzazione di fitte reti miceliari extraradicali estremamente interconnesse che circondano la radice e si estendono nell'ambiente circostante (Giovannetti *et al.*, 2001; Giovannetti *et al.*, 2004) (Fig. 6). Analoghi meccanismi di realizzazione delle reti micorriziche extraradicali, pur variando a seconda della specie fungina e della pianta ospite considerata, sono stati descritti in altre specie del genere *Glomus*, sebbene esistano differenze nei modelli di sviluppo anche tra isolati della stessa specie fungina provenienti da aree geografiche differenti (Avio *et al.*, 2006). Tuttavia, mentre nel genere *Glomus* la percentuale di anastomosi e' sempre molto elevata (Giovannetti *et al.*, 2001), nei generi *Gigaspora* e *Scutellospora* la frequenza e' risultata notevolmente inferiore (de la Providencia *et al.*, 2005). Inoltre, mentre nelle *Glomeraceae* le anastomosi si formano tra ife

differenti dello stesso micelio extraradicale, nelle *Gigasporaceae* generalmente si formano ponti all'interno della stessa ifa (de la Providencia *et al.*, 2005). Questi differenti meccanismi di sviluppo, che portano alla realizzazione di strutture differenti, rappresentano ulteriori caratteri di distinzione tra queste due famiglie e corrispondono verosimilmente a strategie ecologiche distinte.

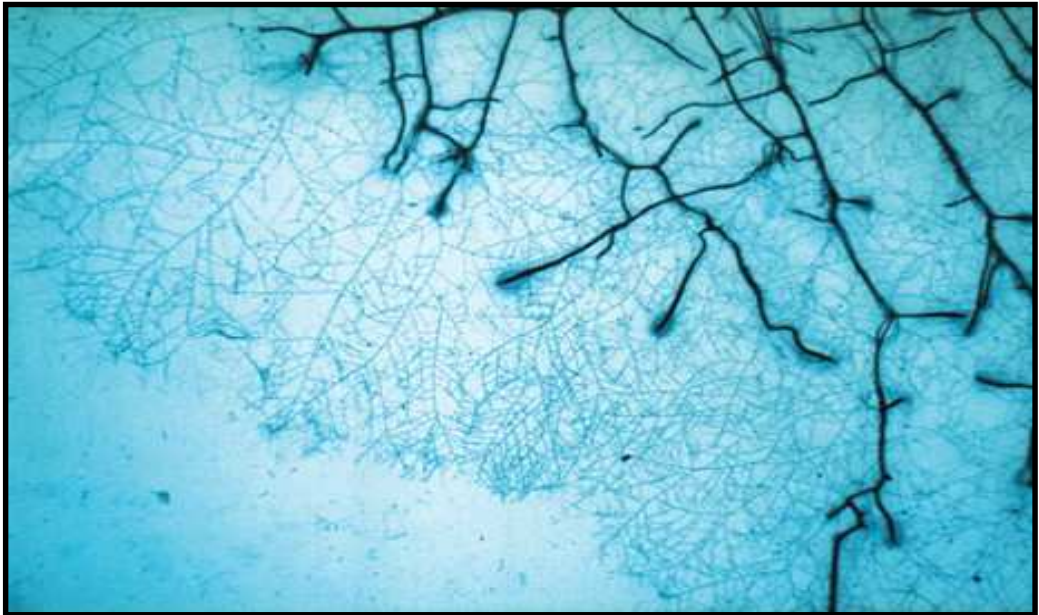


Fig. 6 - La rete micorrizica extraradicale formata dal fungo *Glomus mosseae* circonda l'apparato radicale di *Prunus cerasifera* (da Giovannetti *et al.* 2001).

4.4.1 - La produzione di comuni reti micorriziche extraradicali

L'importanza della rete micorrizica extraradicale nella determinazione dei vantaggi che portano al successo ecologico della simbiosi sono stati ampiamente documentati ma, in questi ultimi anni, stanno emergendo nuovi scenari che conferiscono alla simbiosi micorrizica un ruolo ancora più importante per il funzionamento degli ecosistemi in natura.

Le ife dei funghi micorrizici che si sviluppano intorno all'apparato radicale di una pianta micorrizata possono formare una rete sotterranea che interconnette piante presenti nello stesso ambiente ed alla quale è stato dato il nome di "common mycorrhizal network" (CMN) (Simard & Durall, 2004). La formazione di questa rete

di interconnessione si ritiene possa realizzarsi sia tramite le ife extraradicali di una pianta micorrizzata che vanno a colonizzare le radici un'altra pianta contigua (Graves *et al.*, 1997), sia mediante la formazione di anastomosi tra ife fungine esterne provenienti da due apparati radicali adiacenti (Giovannetti *et al.*, 1999) che, fondendo tra loro, stabiliscono una continuit  citoplasmatica nella rete micorrizica extraradicale (Giovannetti *et al.*, 2004); in assenza di meccanismi di ricombinazione sessuale, cio' potrebbe facilitare lo scambio di materiale genetico.

La scarsa specificita' d'ospite dei funghi MA e la possibilita' delle ife micorriziche di interconnettere miceli extraradicali mediante anastomosi, permetterebbe ai funghi MA la realizzazione di una rete sotterranea di dimensioni indefinite in grado di connettere piante della stessa specie o di specie diversa presenti nella comunita' vegetale. L'esistenza di un collegamento tra piante contigue e' stata messa in evidenza tramite osservazione diretta attraverso lastre trasparenti (Finlay & Read, 1986; Newman *et al.*, 1994) o mediante autoradiografia (Francis & Read, 1984). L'importanza di tale rete miceliare assume ancora piu' risalto se si considera che, da studi molecolari condotti con il fungo *Armillaria bulbosa* in foreste del Michigan (USA), e' risultato che il micelio appartenente ad un unico individuo, chiamato clone 1, si estendeva per un minimo di 15 ettari e per un peso complessivo di 10.000 Kg (Smith *et al.*, 1992).

Grandissimo interesse all'interno della comunita' scientifica e' stato suscitato da ricerche che hanno messo in evidenza la possibilita' di un trasferimento del carbonio fissato fotosinteticamente o altri nutrienti, attraverso le interconnessioni ifali del micelio extraradicale, tra piante che formano ectomicorrize (Finlay & Read, 1986; Simard *et al.*, 1997a; Simard *et al.*, 1997b) o micorrize arbuscolari (Francis & Read, 1984; Martins, 1993; Fitter *et al.*, 1998; Carey *et al.*, 2004). Cio' ha aperto un intenso dibattito all'interno della comunita' scientifica per le complesse conseguenze che tale scoperta potrebbe avere per il funzionamento degli ecosistemi (Robinson & Fitter, 1999; Carey *et al.*, 2004; Simard & Durall, 2004; Selosse *et al.*, 2006). La possibilita' che gli organismi vegetali presenti in un ecosistema possano scambiarsi nutrienti e/o informazioni attraverso una rete in grado di connettere tra loro i singoli individui presenti, ha fatto parlare, sulle piu' autorevoli riviste scientifiche, di "wood-wide web" (num. 388 di Nature 1997). La redistribuzione di risorse attraverso questa rete

potrebbe avere importanti conseguenze per il mantenimento della biodiversità e per la stabilità degli ecosistemi in natura (Read, 1997; Read, 1998).

L'esistenza di un flusso di carbonio attraverso le ife micorriziche era già nota per alcune piante, ad esempio orchidee, che essendo parzialmente o totalmente dipendenti dal fungo simbionte per l'acquisizione di carbonio organico vengono chiamate "micoeterotrofe" (Leake, 1994a) e, recentemente, è stato mostrato che piante di questo tipo possono essere associate anche con funghi MA (Bidartondo *et al.*, 2002).

Trasferimento di C o P tra piante fotosintetizzanti era stato riportato da alcuni autori ma, in mancanza di evidenze dirette, rimaneva la possibilità di un passaggio indiretto, non mediato dalla comune rete micorrizica (Heap & Newman, 1980b; Heap & Newman, 1980a; Chiariello *et al.*, 1982; Whittingham & Read, 1982). Ricerche successive, oltre a evidenziare la possibilità di un flusso di C tra piante "in rete" mediante la somministrazione di ^{14}C ad una pianta "donatrice" e la rilevazione di una parte del C marcato nella pianta ricevente, hanno potuto dimostrare attraverso l'autoradiografia, che tale passaggio avveniva principalmente attraverso le interconnessioni del micelio micorrizico (Francis & Read, 1984). È stato osservato, inoltre, che la quantità di C trasferito aumentava in seguito all'ombreggiamento della pianta ricevente (Francis & Read, 1984; Finlay & Read, 1986; Simard *et al.*, 1997b). Per chiarire i meccanismi che regolano i movimenti dei nutrienti tra piante collegate tramite la rete micorrizica, è stato somministrato ^{13}C a una pianta e ^{14}C all'altra pianta ed è stato accertato che il flusso di carbonio è bidirezionale (Simard *et al.*, 1997a); anche in questo caso, il guadagno netto di carbonio rilevato per una delle due specie veniva aumentato in caso di ombreggiamento della pianta ricevente, indicando che il passaggio è governato da una relazione "source-sink" (Simard *et al.*, 1997b).

Alcuni lavori, tuttavia, esprimono perplessità a riguardo (Robinson & Fitter, 1999) poiché non sarebbe possibile escludere del tutto la possibilità di un passaggio di C "tramite suolo" anziché "tramite fungo". Esistono, infatti, varie strade per il trasferimento di C da una pianta ad un'altra che funzionano contemporaneamente e delle quali deve essere tenuto conto. Da un esperimento realizzato per quantificare il contributo relativo dei vari meccanismi per il passaggio di C da una pianta ad un'altra, è risultato che il trasferimento diretto attraverso le ife del fungo MA era il

46% , mentre la parte restante avveniva attraverso un trasferimento indiretto con o senza l'intermediazione del fungo micorrizico o di altri microrganismi del suolo (Martins, 1993; Simard & Durall, 2004). Lavori successivi condotti con piante ectomicorriziche, nei quali grande attenzione viene posta nell'indagare il movimento di C attraverso le interconnessioni ifali, sembrano confermare inequivocabilmente il movimento bidirezionale di carbonio attraverso la CMN presente nel suolo (Wu *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda le micorrize arbuscolari, vari studi hanno dimostrato la possibilità di un trasferimento di C da una pianta ad un'altra ma la maggior parte del carbonio marcato tenderebbe a restare nell'apparato radicale della pianta ricevente, con scarse percentuali di traslocazione nel germoglio (Watkins *et al.*, 1996; Graves *et al.*, 1997; Fitter *et al.*, 1998); ciò ha fatto ipotizzare una sua permanenza nelle strutture intraradicali del fungo micorrizico (Pfeffer *et al.*, 2004). L'aumento della concentrazione di CO₂ atmosferica non influiva sul processo di traslocazione e il taglio della parte aerea di piante erbacee, avente lo scopo di favorire la mobilitazione delle sostanze nutritive dalla parte ipogea a quella epigea durante la nuova crescita del germoglio, non incrementava il trasferimento di C dalla radice al germoglio (Fitter *et al.*, 1998). D'altra parte la redistribuzione di C attraverso la rete miceliare può variare a seconda della specie vegetale che agisce come "pianta donatrice" (Nakano-Hylander & Olsson, 2007).

Questi risultati suggeriscono che le modalità di traslocazione possono differire tra micorrize arbuscolari e ectomicorrize, anche se le ragioni di tali differenze devono ancora essere investigate (Simard & Durall, 2004). È stato suggerito tuttavia che, anche se il C trasferito non venisse ceduto dal fungo alla pianta, potrebbero realizzarsi comunque vantaggi per la pianta ricevente, ad esempio in termini di riduzione della domanda di C da parte dell'endofita fungino o di maggior vigore fungino a spese di un'altra pianta (Simard & Durall, 2004; Selosse *et al.*, 2006); è stato ipotizzato, infatti, che buona parte o l'intera richiesta di carboidrati da parte del fungo possa essere soddisfatta attraverso il trasferimento di C mediante la CMN (Fitter *et al.*, 1998).

Nella valutazione dei risultati sperimentali dobbiamo considerare, inoltre, che nei lavori realizzati con l'uso del C marcato i brevi periodi di osservazione potrebbero

non essere sufficienti per permettere il passaggio fungo-pianta e che le inevitabili modificazioni ambientali conseguenti alla somministrazione di C marcato comporta, potrebbero influire sui risultati ottenuti. Rilievi basati su singole misurazioni, quindi, possono essere inadeguati e fornire risultati talvolta contraddittori, come hanno dimostrato lavori recenti condotti in campo con piante che formano micorrize arbuscolari, dai quali e' risultato che la direzione e l'ammontare del carbonio traslocato puo' cambiare con la stagione, in relazione allo stadio fenologico delle piante coinvolte (Lerat *et al.*, 2002); cio' confermerebbe che il passaggio di carbonio attraverso la rete e' governato da una relazione "source-sink" guidata dalla pianta. Un approccio nuovo, basato su un punto di vista micocentrico, e' stato recentemente proposto da alcuni autori (Fitter *et al.*, 2000), secondo i quali la ripartizione del carbonio e degli altri nutrienti tra radice e fungo sarebbe frutto di reciproche interazioni che rispondono sia alle esigenze della pianta che a quelle del fungo.

A questo proposito un punto fondamentale, specialmente per le micorrize arbuscolari, e' cercare di capire se il trasferimento di carbonio tramite la CMN sia realmente in grado di influire sulla crescita delle piante "in rete", come risulterebbe da esperimenti condotti con mutanti non-fotosintetizzanti di tabacco, i quali avevano un numero di foglie e una biomassa del germoglio maggiore se venivano coltivati insieme con la pianta "wild-type" e in presenza del fungo MA (Muller & Dulieu, 1998). Alcuni autori hanno addirittura ipotizzato che il "carbon parasitism" attraverso i funghi MA presenti nel suolo possa essere un importante meccanismo che permette a piante invasive di diffondersi (Carey *et al.*, 2004); l'ingresso nella CMN di una nuova pianta potrebbe quindi costituire un rischio che modifica gli equilibri presenti in uno specifico ecosistema e avvantaggia i competitori (Selosse *et al.*, 2006). D'altra parte, la redistribuzione di risorse mediante la CMN potrebbe aumentare la diversita' della comunita' vegetale (Grime *et al.*, 1987), alterando le capacita' competitive della specie dominante.

In ogni caso, pur non conoscendo ancora i meccanismi che regolano questo complesso fenomeno, si ritiene che l'esistenza di una comune rete micorrizica abbia la potenzialita' di influenzare, attraverso la redistribuzione delle risorse, la struttura e il funzionamento dell'intero ecosistema ed esercitare, pertanto, un ruolo ecologico fondamentale.

5 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica sullo sviluppo intra e extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari

I cambiamenti climatici a cui il nostro pianeta sta andando incontro (global environmental change) come conseguenza dell'incremento delle emissioni antropogeniche di CO₂ sono in grado di influenzare sia la composizione che il funzionamento degli ecosistemi naturali (Kerr, 2001; Kerr, 2007) (Fig. 7).

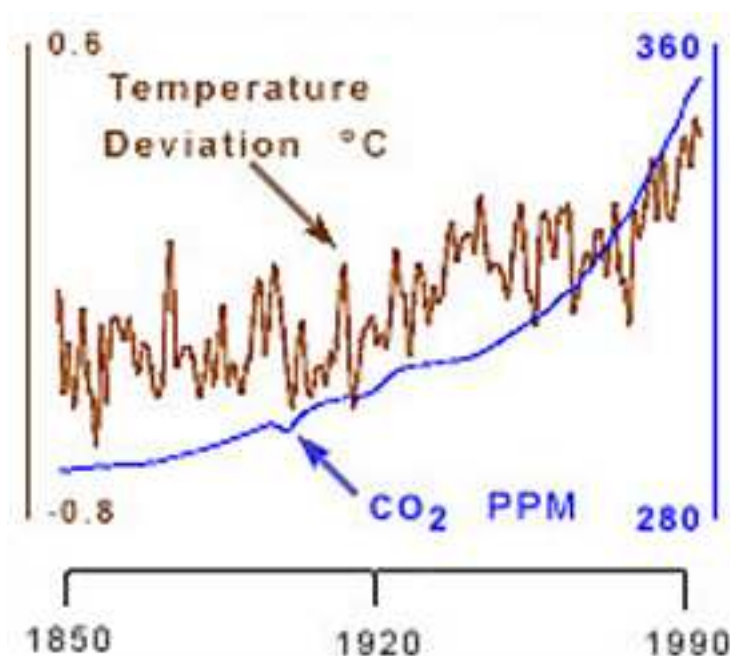


Fig. 7 - Andamento della concentrazione atmosferica di CO₂ e della temperatura a partire dal 1850 (da IPCC Third assessment report: climate change 2001)

Da una concentrazione preindustriale di CO₂ atmosferica di 280 ppm siamo passati ad una concentrazione nel 2005 di 379 ppm e, nonostante gli impegni assunti nell'ambito del Protocollo di Kyoto, le emissioni di questo gas serra a livello globale continuano ad aumentare, con valori medi di emissioni annuali (a partire dal 2000) di 26 miliardi di tonnellate l'anno, corrispondenti a 7 GtC/anno. Gli scenari delineati dal

III rapporto dell'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) ipotizzano che, per l'anno 2100, la concentrazione di CO₂ potrebbe raggiungere un valore compreso tra 540 e 970 ppm (Fig. 8), con un conseguente incremento di temperatura, tra il 1990 e il 2100, di 1,4-5,8 °C.

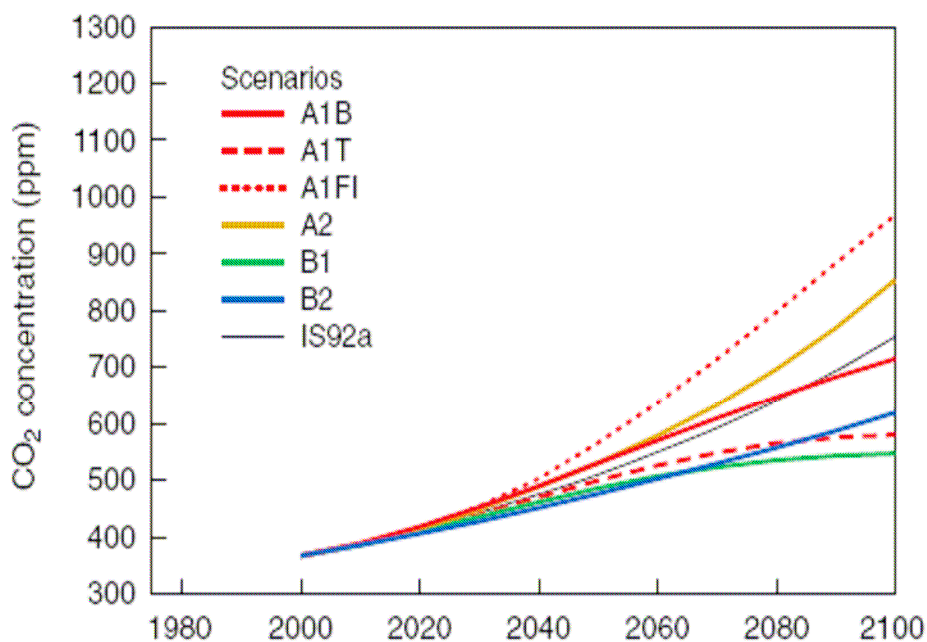


Fig. 8 - Andamento futuro della concentrazione atmosferica di CO₂, ipotizzabile sulla base di differenti modelli di previsione (da IPCC Third assessment report: climate change 2001)

E' stato stimato che, di tutta la CO₂ emessa in atmosfera nel periodo 2000-2005, il 41.2% sia stata assorbita, per tre quarti dagli oceani e per la parte restante dagli ecosistemi vegetali terrestri, ma tali capacita' naturali di assorbimento, gia' ridotte rispetto al secolo precedente, tenderebbero a diminuire ulteriormente (Ferrara & Farruggia, 2007). E' molto importante, quindi, indagare sui fattori che possono influire sulle naturali capacita' degli ecosistemi vegetali di sottrarre CO₂ dall'atmosfera ed individuare le cause che possono favorire o ridurre il fenomeno.

Poiche' il progressivo incremento della CO₂ atmosferica, attraverso l'alterazione del ciclo del carbonio, puo' modificare gli equilibri naturali presenti nell'agroecosistema, le ricerche condotte devono prendere in considerazione non solo

gli effetti sulla comunità vegetale bensì devono valutare le conseguenze su tutte le componenti del sistema pianta-suolo-microrganismi. Ciò appare ancora più interessante se si considerano non solo gli scambi pianta-fungo-atmosfera, ma anche gli scambi “plant to plant” che potrebbero realizzarsi se le ipotesi relative alla traslocazione di fotosintetati attraverso una “comune rete micorrizica” fossero confermate (vedi paragrafo 4.4.1).

È noto che la maggiore disponibilità di CO₂ atmosferica stimola la crescita della pianta (Ceulemans *et al.*, 1999; Poole *et al.*, 2000) attraverso una stimolazione dell'attività fotosintetica; conseguentemente alla maggiore produzione di carboidrati, è possibile che una maggiore quantità di carbonio divenga disponibile per supportare le attività microbiche che si svolgono nella rizosfera ed è pertanto ipotizzabile che la maggiore disponibilità di CO₂ possa influire non solo sulla comunità vegetale ma anche sulle componenti microbiche dei suoli.

Tra queste, come è noto, particolare importanza rivestono i funghi micorrizici i quali, essendo biotrofi obbligati, dipendono totalmente dalla pianta ospite per il rifornimento di carboidrati. Come è noto, i vantaggi per la pianta ospite conseguenti all'instaurazione della simbiosi micorrizica dipendono dal bilancio tra la sottrazione di fotosintetati da parte del fungo e i benefici derivanti principalmente dal maggior rifornimento di elementi nutritivi. È verosimile, quindi, che la relazione mutualistica tra i 2 partners sia sensibile alle variazioni di CO₂ atmosferica e che i funghi micorrizici arbuscolari possano costituire degli ottimi indicatori per testare gli effetti dell'innalzamento di questo gas serra. Pertanto, la reale consistenza e la funzionalità della simbiosi micorrizica deve essere adeguatamente considerata se si vogliono valutare le conseguenze dei cambiamenti ambientali in atto sullo svolgimento del ciclo del carbonio negli ecosistemi naturali o agrari (Fitter *et al.*, 2004; Hawkes *et al.*, 2008).

In condizioni di elevata CO₂ il costo della simbiosi micorrizica potrebbe variare, con conseguente modificazione del rapporto costi/benefici (Johnson *et al.*, 2005; Cavagnaro *et al.*, 2007), come pure la maggiore disponibilità di carbonio potrebbe tradursi in una maggiore possibilità di crescita del micelio fungino intra e/o extraradicale (Sanders *et al.*, 1998; Staddon *et al.*, 2004).

E' gia' stato visto che, sebbene non si conosca sufficientemente come la pianta regoli la ripartizione del carbonio e la sua traslocazione al fungo (Jakobsen & Rosendahl, 1990; Wright *et al.*, 1998a; Fitter *et al.*, 2000), i simbionti fungini possono essere considerati come veri e propri "sink" di fotosintetati, ovvero uno strumento di sottrazione dall'atmosfera ed immagazzinamento nel suolo del carbonio assimilato dalla pianta (Treseder & Allen, 2000; Olsson & Johnson, 2005). Si ritiene, infatti, che la maggior parte della biomassa microbica nel terreno sia rappresentata dal micelio micorrizico extraradicale (Olsson *et al.*, 1999; Olsson & Wilhelmsson, 2000) e che il principale costituente della parete fungina, la chitina, sia degradato più lentamente nel terreno, rispetto ad altri polisaccaridi di origine vegetale (Gooday, 1990). Inoltre i funghi MA sono ritenuti gli unici produttori di glomalina, una glicoproteina abbondante nei suoli (Wright & Upadhyaya, 1996) probabilmente perche' difficilmente degradabile (Steinberg & Rillig, 2003).

Sebbene il turnover delle strutture fungine possa essere differente in condizioni pedoclimatiche differenti, un incremento della biomassa fungina nel suolo potrebbe determinare una temporanea immobilizzazione di C nel terreno. Questa funzione dei funghi MA, presente negli ecosistemi naturali, potrebbe essere alterata nei sistemi agricoli convenzionali, dove le pratiche colturali applicate possono determinare un progressivo impoverimento biologico.

Se, in condizioni di elevata concentrazione di CO₂ atmosferica, la crescita intra ed extraradicale dell'endofita micorrizico risultasse stimolata, la capacita' di sottrazione ed immagazzinamento nel suolo di carbonio da parte dei funghi MA potrebbe risultare significativamente incrementata e pertanto il ruolo di "carbon sink" esercitato dai funghi micorrizici potrebbe essere sensibilmente potenziato.

Poiche' nei funghi MA la maggior parte della biomassa totale e' costituita dal micelio extraradicale (Sanders *et al.*, 1998; Olsson *et al.*, 1999; Fujiyoshi *et al.*, 2000), l'effetto dell'incremento della CO₂ atmosferica su questa fase di sviluppo del fungo dovrebbe essere adeguatamente considerato per poter valutare la potenzialita' dei funghi micorrizici di immobilizzare C nel terreno. Nonostante parecchi studi condotti nell'ultimo decennio, le conoscenze a riguardo non permettono ancora di giungere a conclusioni chiare e univoche, considerando inoltre che gli esperimenti a lungo termine sono piuttosto rari (Rillig *et al.*, 1999; Klironomos *et al.*, 2005).

La maggior parte dei lavori hanno valutato l'influenza della maggiore disponibilita' di carbonio sullo sviluppo intraradicale del fungo. L'aumento della concentrazione atmosferica di CO₂ ha determinato un incremento della colonizzazione radicale da parte dell'endofita fungino in differenti specie vegetali (Morgan *et al.*, 1994; Olesniewicz & Thomas, 1999; Rillig *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2005) o un incremento dell'intensita' dell'infezione radicale (Rillig *et al.*, 1998); in altri casi, tuttavia, la maggiore disponibilita' di carbonio non influenzava significativamente la colonizzazione micorrizica (Jongen *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 1998; Staddon *et al.*, 2004; Cavagnaro *et al.*, 2007). E' stato osservato, inoltre, che le risposte possono variare a seconda del binomio fungo-pianta ospite considerato (Monz *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2005) e delle condizioni nutritive (Klironomos *et al.*, 1996; Rillig *et al.*, 1998). Gli effetti riscontrati sui parametri di crescita, d'altra parte, possono scomparire quando si tiene conto del differente accrescimento delle piante; esperimenti "time course" possono permettere di valutare se gli effetti osservati sono dipendenti o indipendenti dalla crescita della pianta ospite (Staddon *et al.*, 1998). Tuttavia, anche quando la percentuale d'infezione micorrizica non subisce variazioni di rilievo, lo sviluppo totale del fungo in termini quantitativi puo' risultare comunque aumentato.

Come e' noto, la colonizzazione intraradicale e la conseguente instaurazione dei rapporti di reciproco scambio tra i 2 simbionti, permette al fungo micorrizico di svilupparsi all'esterno della radice andando a formare le estese reti miceliari descritte precedentemente (vedi par. 4.4). Indipendentemente dall'effetto della CO₂ sullo sviluppo intraradicale dell'endofita fungino, la crescita extraradicale del micelio micorrizico puo' essere incrementata in conseguenza di una differente ripartizione (carbon allocation) dei fotosintetati ceduti al fungo tra la fase intra ed extraradicale. D'altra parte sono gia' stati riportati modificazioni nei rapporti percentuali tra la fase interna ed esterna del fungo a seconda della fase di sviluppo della pianta ospite (Betlenfalvay *et al.*, 1982; Olsson *et al.*, 1999).

Nonostante che la colonizzazione intraradicale non avesse mostrato sostanziali variazioni, la produzione di ife extraradicali veniva stimolata dall'incremento di CO₂ in *Plantago lanceolata* e tale risposta risultava indipendente dalla crescita della pianta (Staddon *et al.*, 2004), sebbene in un lavoro precedente gli stessi autori fossero

arrivati a conclusioni differenti (Staddon *et al.*, 1999). Analogamente in *Prunella vulgaris*, pur in presenza di una colonizzazione intraradicale statisticamente uguale, la lunghezza delle ife extraradicali aumentava di circa 5 volte in presenza di una maggiore concentrazione atmosferica di CO₂ (Sanders *et al.*, 1998), indicando che la maggiore disponibilita' di carbonio determinava una diversa ripartizione delle risorse tra la fase interna ed esterna del fungo micorrizico. La produzione extraradicale di ife e' risultata stimolata anche in *Artemisia tridentata*, ma l'aggiunta di nutrienti influiva negativamente su tale risposta (Klironomos *et al.*, 1996). Naturalmente, una differente allocazione delle maggiori risorse disponibili puo' modificare anche i rapporti di sviluppo tra radice e fungo, favorendo la crescita radicale o quella delle ife fungine extraradicali a seconda delle condizioni pedologiche esistenti (Rillig *et al.*, 1999). Tempi e modalita' di somministrazione della CO₂, infine, possono influire sui risultati osservati (Klironomos *et al.*, 2005).

In conclusione, sebbene le risposte possano variare a seconda dell'endofita considerato (Klironomos *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1998; Staddon *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005) o in condizioni pedoclimatiche differenti (Rillig *et al.*, 1999), il simbionte fungino, nella maggior parte dei casi, risponde positivamente all'incremento della disponibilita' di CO₂ (Alberton *et al.*, 2005) e, almeno per quanto riguarda il genere *Glomus*, si ha una stimolazione della produzione di reti micorriziche extraradicali, come e' possibile dedurre dalla tab. 2.

E' da sottolineare che nella maggior parte dei lavori condotti per valutare gli effetti dell'incremento della concentrazione di CO₂ sullo sviluppo di reti extraradicali, la misurazione e' stata effettuata in termini di lunghezza, mentre gli effetti sul fungo in termini di biomassa non sono stati mai valutati, se non indirettamente attraverso stime basate sul calcolo del biovolume (Lussenhop *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 1998).

La valutazione della reale estensione della rete micorrizica extraradicale prodotta da differenti specie o isolati di funghi micorrizici, ma anche una appropriata quantificazione della biomassa fungina, costituiscono un presupposto indispensabile per poter valutare il ruolo dei funghi MA come potenziali "sink" di carbonio dall'atmosfera.

Specie fungina	Specie vegetale	Periodo di crescita	Lunghezza micelio		Riferimenti bibliografici
			CO ₂ ambientale	CO ₂ elevata	
<i>Glomus mosseae</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	84 gg	~2 m/g suolo	~4 m/g suolo	(Staddon <i>et al.</i> , 2004)
<i>Glomus spp</i>	<i>Prunella vulgaris</i>	20 sett.	~1-4 m/g suolo	~4-15 m/g suolo	(Sanders <i>et al.</i> , 1998)
<i>Glomus intraradices</i>	<i>Artemisia tridentata</i>	16 sett	~5.5 m/g suolo	~6.1 m/g suolo	(Klironomos <i>et al.</i> , 1998)
<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Artemisia tridentata</i>	16 sett	~3.3 m/g suolo	~3.8 m/g suolo	(Klironomos <i>et al.</i> , 1998)
<i>Glomus sp</i>	<i>Bromus inermis</i>	15 sett.	1.7 m/g suolo	1.3-1.4 m/g suolo	(Klironomos <i>et al.</i> , 2005)

Tab. 2 - Effetto dell'incremento della concentrazione atmosferica di CO₂ sullo sviluppo del micelio extraradicale di funghi micorrizico-arbuscolari

Cambiamenti nella gestione degli agroecosistemi e l'utilizzo di idonee pratiche agricole possono contribuire a ridurre le emissioni di CO₂ proposte dal protocollo di Kyoto ed incrementare il contenuto di carbonio organico nel suolo con conseguenze positive sia per l'ambiente che per la qualità dei suoli (Lal *et al.*, 1999; Willson *et al.*, 2001).

6 – La valutazione quantitativa della biomassa fungina

Vista l'importanza della simbiosi micorrizica nello svolgimento del ciclo del carbonio e considerando il contributo fondamentale dei funghi MA al mantenimento della qualità biologica del suolo, risulta di fondamentale importanza avere a disposizione parametri validi e sicuri per stimare la presenza dei funghi micorrizici

nei suoli. La misurazione della lunghezza ifale, pur costituendo un valido strumento, non puo' rappresentare l'unico parametro usato per quantificare la reale consistenza dei funghi MA nel terreno. Cio' nonostante, non esistono ancora test di determinazione della biomassa fungina di facile e rapida applicazione, che vengano ritenuti inequivocabilmente affidabili e sicuri.

La stima della biomassa intra ed extraradicale e' stata effettuata mediante la determinazione del contenuto di vari componenti chimici presenti nella cellula fungina, come chitina, ergosterolo, fosfolipidi e acidi grassi (Hepper, 1977; Bethlenfalvay *et al.*, 1981; Bethlenfalvay *et al.*, 1982; Pacovsky & Bethlenfalvay, 1982; Bethlenfalvay & Ames, 1987; Frey *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1995; Medina *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2005; Appuhn & Joergensen, 2006; Grigera *et al.*, 2007). Sfortunatamente, nessuno di queste molecole e' presente in modo esclusivo nei funghi micorrizici arbuscolari e pertanto e' possibile che le misure nel suolo siano inficiate dalla presenza di altri organismi, fungini e non. Un promettente indicatore della presenza di funghi MA nel suolo potrebbe essere la glomalina, una glicoproteina presente nella parete dei funghi micorrizici e difficilmente degradabile nel suolo (Wright & Upadhyaya, 1996; Bedini *et al.*, 2007; Purin & Rillig, 2007; Treseder *et al.*, 2007), sebbene le ricerche relative a questa molecola, la cui natura biochimica deve ancora essere chiarita, presentano per il momento molti punti controversi.

La scelta dell'indicatore piu' opportuno per valutare la biomassa fungina nel suolo, pertanto, deve tenere in considerazione numerosi fattori dipendenti dalla specifica situazione in cui si opera, oltre che, naturalmente, lo scopo per cui si procede alla determinazione.

L'ergosterolo e' il principale sterolo presente nelle membrane cellulari fungine (Fig. 9) e, dal momento che decade rapidamente nei tessuti morti, puo' essere considerato un buon indicatore della biomassa fungina vivente (Fujiyoshi *et al.*, 2000; Hart & Reader, 2002).

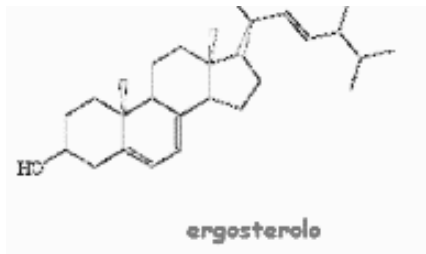


Fig. 9 - Formula di struttura dell'ergosterolo

Tuttavia, la concentrazione di questa molecola nei tessuti fungini è molto variabile in funzione della specie considerata e ciò costituisce un ostacolo all'utilizzo di questo indicatore per la stima della biomassa fungina nel suolo (Schmitz *et al.*, 1991); inoltre, il contenuto di ergosterolo nei funghi micorrizici è, generalmente, più basso rispetto a quello di altri funghi e in parecchi funghi MA è risultato addirittura assente (Olsson *et al.*, 2003).

Differenti lipidi sono stati presi in considerazione come indicatori di biomassa fungina e tra questi il PLFA (phospholipid fatty acid) 16:1 ω 5 e il NLFA (neutral lipid fatty acid) 16:1 ω 5 sono risultati buoni indicatori della presenza di funghi AM nel suolo, essendo normalmente assenti nei funghi non micorrizici, anche se si trovano in altri organismi come i batteri (Olsson *et al.*, 1995; Olsson *et al.*, 1999; Olsson & Wilhelmsson, 2000; Olsson *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2005; Labidi *et al.*, 2007). D'altra parte sono state trovate differenze tassonomiche nella composizione e nel contenuto di acidi grassi che potrebbero causare problemi nella stima della biomassa soprattutto in presenza di popolazione fungine miste o di isolati fungini di differente provenienza (Graham *et al.*, 1995).

La chitina (β 1 \rightarrow 4 N-acetil-D-glucosammina), polisaccaride azotato prodotto dalla condensazione dell'N-acetil glucosammina (Fig. 10), è uno dei principali componenti della parete cellulare dei funghi ma è presente anche negli artropodi, mentre è assente nelle piante superiori.

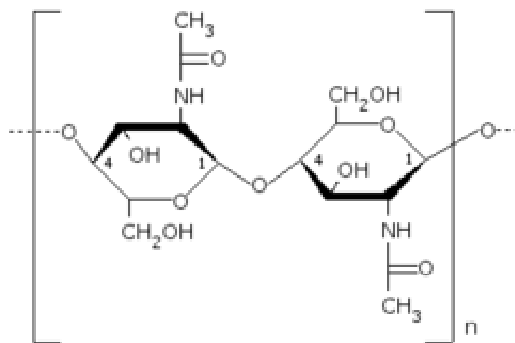


Fig. 10 - Formula di struttura della chitina

Il dosaggio della chitina nelle radici o nel suolo viene effettuato mediante la determinazione spettrofotometrica del contenuto di glucosammina ottenuta dalla depolimerizzazione della molecola. Sebbene la concentrazione di glucosammina nella parete fungina possa subire variazioni di rilievo a seconda del phylum considerato, essendo stati rilevati valori che oscillavano da 2 a 170 mg·g⁻¹ di peso secco (Appuhn & Joergensen, 2006), nei funghi micorrizici arbuscolari del genere *Glomus* questa variabilità sembra essere più contenuta e, dai dati disponibili in letteratura, risulta una variazione compresa tra 21 e 40 mg·g⁻¹ di peso secco, come possiamo osservare nella tab. 3.

Una buona correlazione tra quantità di chitina nel suolo e lunghezza delle ife è stata trovata, in esperimenti condotti in contenitore, per *G. mosseae* (Bethlenfalvay & Ames, 1987) e *G. intraradices* (Frey *et al.*, 1994), mentre in altri casi il contenuto di chitina non risultava correlato con la colonizzazione micorrizica (Schmitz *et al.*, 1991). Sebbene l'utilizzo di questo parametro presenti come inconveniente la scarsa specificità, la chitina presenta il vantaggio che, essendo una molecola a lenta degradazione, a differenza di ergosterolo e acidi grassi, costituisce un buon indicatore della biomassa fungina totale, sia vitale che non-vitale. Questo tipo di dosaggio, pertanto, può risultare particolarmente indicato quando, attraverso la quantificazione della biomassa fungina, si vuole effettuare una stima della quantità di carbonio organico "più lentamente degradabile" presente nel suolo.

Specie fungina	Contenuto di glucosamina (mg·g⁻¹ di peso secco)	Riferimenti bibliografici
<i>Glomus mosseae</i>	40	(Hepper, 1977)
<i>Glomus fasciculatus</i>	21 32.9	(Hepper, 1977) (Bethlenfalvay <i>et al.</i> , 1982)
<i>Glomus caledonium</i>	33	(Hepper, 1977)
<i>Acaulospora laevis</i>	26	(Hepper, 1977)
<i>Glomus intraradices</i>	28.9	(Frey <i>et al.</i> , 1994)

Tab. 3 - Contenuto di glucosamina di differenti specie di funghi micorrizici arbuscolari

Indipendentemente dalla metodologia analitica utilizzata, la quantificazione del fungo presente nel suolo mediante dosaggio biochimico comporta necessariamente una precedente stima del fattore di conversione appropriato per poter calcolare, sulla base dei dosaggi effettuati, la quantità totale di biomassa fungina presente. Poiché la stima del fattore di conversione presenta difficoltà oggettive, spesso la quantificazione della biomassa fungina viene effettuata sulla base di calcoli e valutazioni che comportano incertezze e sensibili margini di errore. Ne risulta così che i valori riportati in bibliografia, compresi tra 16 e 350 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Frey *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 1999; Olsson & Johansen, 2000) possono variare considerevolmente a seconda della metodologia di stima effettuata oltre che, naturalmente, a seconda del tipo di fungo e dalle condizioni sperimentali utilizzate.

In conclusione, sebbene indagini più precise ed approfondite debbano essere condotte, soprattutto per quanto riguarda la determinazione di fattori di conversione per le diverse specie fungine, le prospettive per l'impiego di questo tipo di analisi per la quantificazione della biomassa fungina sono incoraggianti (Appuhn & Joergensen, 2006).

7 – Gli agroecosistemi arborei : micorrize e gestione sostenibile

Le potenzialita' dei funghi micorrizici possono manifestarsi in maniera particolarmente efficace nelle colture pluriennali e in particolare nelle specie arboree, la maggior parte delle quali, come e' noto, rispondono in maniera molto positiva alla inoculazione con funghi MA; tra queste ricordiamo il melo (Covey *et al.*, 1981; Hoepfner *et al.*, 1983), il pesco (La Rue *et al.*, 1975), la vite (Schubert & Cammarata, 1986), gli agrumi (Timmer & Leyden, 1978), il ciliegio (Pons *et al.*, 1983), l'actinidia (Schubert *et al.*, 1987a), e numerosi portinnesti di specie arboree da frutto (Fortuna *et al.*, 1992; Sbrana *et al.*, 1994; Fortuna *et al.*, 1996). Naturalmente le risposte ottenute sono molto variabili a seconda del binomio fungo-pianta ospite considerato; specie arboree differenti presentano, infatti, una diversa dipendenza micorrizica e, d'altra parte, le capacita' infettive e il grado di efficienza di differenti endofiti fungini sono molto variabile nelle varie combinazioni prese in considerazione (Fortuna *et al.*, 1992).

Durante lo sviluppo delle specie arboree, la presenza della simbiosi micorrizica determina sia vantaggi di tipo nutrizionale (Gianinazzi & Vosatka, 2004; Giovannetti, 2006) che modificazioni morfologiche, fisiologiche e biochimiche, tali da conferire alla pianta ospite una maggiore resistenza agli stress di natura biotica (Giovannetti *et al.*, 1991; Tosi *et al.*, 1993) o abiotica, come ad esempio una maggiore resistenza alla siccita' (Nelsen & Safir, 1982), alla salinita' (Ojala *et al.*, 1983) o allo stress da trapianto (Menge, 1978).

La maggiore resistenza agli stress risulta particolarmente interessante nel settore vivaistico e in particolare nell'acclimatazione di piante micropropagate (Fortuna, 1992; Fortuna *et al.*, 1996; Fortuna *et al.*, 1998) che vengono frequentemente usate negli impianti arborei.

La presenza del micelio extraradicale puo' contribuire, inoltre, alla stabilizzazione degli aggregati nel suolo (Miller & Jastrow, 1990; Kabir & Koide, 2002) e puo' conferire alla pianta una migliore protezione nei confronti di livelli tossici di elementi dannosi nel suolo (Rivera-Becerril *et al.*, 2002)

La colonizzazione micorrizica puo' influire inoltre sulla morfologia dell'apparato radicale (Berta *et al.*, 1995) che, nella maggior parte dei casi, si presenta

piu' ramificato, ossia con un maggior numero di radici piu' corte, come e' stato visto in *Vitis vinifera* L. (Schellenbaum *et al.*, 1991) e in *Prunus cerasifera* (Fortuna *et al.*, 1998). Una migliore esplorazione del suolo e, conseguentemente, un migliore stato nutrizionale della pianta ospite, puo' essere molto importante per le piante arboree, sia in relazione alla capacita' di attecchimento del materiale utilizzato al momento di un nuovo impianto, sia per un buon sviluppo e una rapida entrata in produzione delle specie frutticole.

Per le specie arboree, inoltre, e' molto interessante valutare la relazione tra il miglioramento della nutrizione minerale determinato dalla simbiosi micorrizica e le caratteristiche qualitative del frutto.

Se da una parte i risultati sperimentali sottolineano l'importanza della simbiosi micorrizica per un miglioramento quali-quantitativo e una maggiore sostenibilita' della produzione agricola, dall'altra dobbiamo constatare che le tecniche agronomiche applicate nei sistemi colturali convenzionali possono influire negativamente sull'instaurazione e la funzionalita' di tale associazione. Negli agroecosistemi convenzionali la consistenza e la diversita' dei funghi MA e' risultata fortemente alterata rispetto agli ambienti naturali. Ad esempio, in terreni soggetti all'aratura il fungo dominante e' risultato *Glomus mosseae* (92%) mentre in terreni non lavorati attigui la biodiversita' era molto maggiore (Helgason 1998). Inoltre, prove di campo di lungo periodo hanno mostrato che la percentuale di colonizzazione radicale era molto maggiore (30-60% in piu') in piante cresciute in sistemi colturali "low input" rispetto a quella presente in piante allevate con sistemi colturali convenzionali (Mader *et al.*, 2000).

Dobbiamo considerare infine la possibilita', gia' discussa nel paragrafo 4.4.1, che si realizzi la formazione nel terreno di una comune rete micorrizica in grado di collegare, tramite le ife extraradicali, le specie vegetali presenti e attraverso la quale potrebbe avvenire il trasferimento di nutrienti (vedi bibliografia citata). L'esistenza di un tale sistema di interconnessione e' particolarmente interessante nell'agroecosistema frutteto dove sono presenti contemporaneamente piante arboree della stessa specie e, dove, frequentemente, viene favorito lo sviluppo, lungo filari e interfilari, di piante erbacee di differenti specie (cover crops) per ridurre l'erosione, incrementare la fertilita' e migliorare la struttura del suolo. Capire le interazioni che

avvengono nel sottosuolo tra la pianta da frutto coltivata e le specie usate per l'inerbimento e' importante per una gestione maggiormente sostenibile dell'agroecosistema frutteto, specie per quanto riguarda la fertilizzazione. Recentemente, in prove condotte in serra, e' stato mostrato un trasferimento di N marcato dalle specie erbacee utilizzate per l'inerbimento del vigneto a piante di vite (Cheng & Baumgartner, 2004).

Nonostante siano sempre maggiori le conoscenze scientifiche che evidenziano le molteplici e complesse relazioni di reciproco scambio tra le componenti presenti in un ecosistema naturale o coltivato, le ricerche in campo agronomico sono spesso centrate esclusivamente sul comportamento fisiologico e produttivo della pianta. Al contrario la sperimentazione agricola, consapevole dell'importanza di salvaguardare e valorizzare le interazioni nelle quali si trovano coinvolti la pianta e il simbionte fungino, deve tenere adeguatamente conto di cio' e passare da un tipo di indagine in cui la pianta e' studiata come individuo isolato, ad indagini in cui i due organismi sono visti come parti attive di un reciproco scambio e, a loro volta, parti integranti di relazioni piu' complesse.

SCOPO DEL LAVORO

Considerando quanto riportato sopra, possiamo comprendere l'importante contributo che i funghi micorrizici sono in grado di dare alla realizzazione di agroecosistemi a maggiore sostenibilita'. L'agroecosistema frutteto, per le sue caratteristiche di pluriennalita', risulta particolarmente indicato ad una gestione piu' equilibrata che salvaguardi e potenzi l'attivita' di questi organismi nel suolo. La conoscenza dei meccanismi che permettono la formazione nel suolo delle reti micorriziche extraradicali e del loro funzionamento, costituiscono un presupposto fondamentale per poter sfruttare a pieno le potenzialita' dei funghi MA. D'altra parte, considerando le modificazioni ambientali in corso e le possibili ripercussioni di queste sugli equilibri naturali presenti nell'agroecosistema, risulta particolarmente interessante indagare sulle conseguenze che la maggiore disponibilita' di CO₂ atmosferica potrebbe determinare su tutte le componenti del sistema pianta-suolo-microrganismi ed in particolare sullo sviluppo dei funghi micorrizici, data la loro diffusione e importanza negli ecosistemi sia naturali che coltivati.

Pertanto, la presente ricerca si prefigge i seguenti obiettivi:

- 1) Studiare la formazione e la funzionalita' nelle piante arboree da frutto di reti micorriziche extraradicali intra o interspecifiche.

Cio' verra' realizzato mediante un lavoro articolato nelle seguenti fasi successive:

- a) Visualizzazione e osservazione delle modalita' di realizzazione di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti, utilizzando un sistema bidimensionale *in vivo* (metodo sandwich).
- b) Valutazione dei tempi di formazione nel terreno di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti
- c) Verifica della funzionalita' di tale rete come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale, soprattutto in relazione allo scambio di carbonio.

- 2) Valutare l'influenza dell'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica sullo sviluppo di reti micorriziche extraradicali.

A tale scopo verranno presi in considerazione i seguenti aspetti:

- a) valutazione "time-course" dell'estensione e della struttura della rete micorrizica extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO₂
- b) determinazione della biomassa fungina intra ed extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO₂

MATERIALI E METODI

1 - Studio della formazione e della funzionalita' nelle piante arboree da frutto di reti micorriziche extraradicali intra o interspecifiche

Materiale vegetale

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando piantine micropropagate di due differenti portinnesti di specie arboree da frutto: l'Mr.S. 2/5, una selezione di semenzali ottenuti da libera impollinazione di mirabolano (*Prunus cerasifera* Ehrh), e il GF 677, un ibrido pesco x mandorlo.

Il substrato di crescita utilizzato per l'Mr.S. 2/5 e' stato quello proposto da Murashige e Skoog (1962) contenente macro e microelementi a cui sono stati aggiunti 0.4 mg/l di tiamina, 100 mg/l di inositolo, 60 mg/l di NaFeEDTA, 30 g/l di saccarosio e 6 gr/l di Difco Bacto Agar; il pH della soluzione e' stato portato a 5.2. La sterilizzazione del substrato e' avvenuta mediante trattamento in autoclave a 120° per 20 min. Nel corso della fase di proliferazione, durante la quale le subcolture avevano una durata di 15 giorni ciascuna, nel substrato sono stati aggiunti 0.6 mg/l di BA, 0.2 mg/l di GA₃ e 0.06 mg/l di IBA. Successivamente, germogli di circa 2 cm di lunghezza, venivano trasferiti in un substrato di allungamento nel quale la BA era stata ridotta a 0.2 mg/l, lasciando inalterate le concentrazioni degli altri ormoni; in tale substrato venivano aggiunti 200 mg/l di carbone attivo. Al termine di questa fase della durata di 10 giorni, le microtalee venivano poste per 20 giorni su un substrato di radicazione nel quale erano presenti 0.6 mg/l di IBA.

Per la propagazione *in vitro* del portinnesto GF 677, come substrato nutritivo e' stato utilizzato il substrato nutritivo DKW (Driver e Kuniyuki, 1984) al quale, per la fase di proliferazione sono stati aggiunti 2 mg/l di BA e 0.06 mg/l di IBA mentre per quella di allungamento la BA e' stata ridotta a 0.1 mg/l. Infine, per la fase di radicazione *in vitro* del GF 677, che ha avuto una durata di 20 giorni, nel mezzo nutritivo venivano aggiunti 0.6 mg/l di IBA.

La propagazione di entrambi i portinnesti avveniva in camere di crescita nelle quali era stato programmato un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, una

temperatura di 24°C durante il periodo di luce e 21°C durante il buio, e una densità di flusso fotonico di $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Funghi micorrizici

Nel corso delle prove sono stati utilizzati 2 differenti funghi MA: *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe (International Microbial Archives, code IMA1, Kent isolate), e *Glomus intraradices* Schenck & Smith (International Microbial Archives, code IMA5, Italy isolate, collector M. Giovannetti). Il materiale fungino, proveniente dalla collezione del Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie dell'Università di Pisa, veniva moltiplicato attraverso "pot-cultures". L'inoculo fungino utilizzato per gli esperimenti, costituito da radici micorrizzate, micelio extraradicale, spore e sporocarpi, veniva ottenuto attraverso "wet-sieving" di campioni di terreno prelevato dalle "pot cultures".

Inoculazione del materiale vegetale

Le piantine radicate *in vitro* di Mr.S. 2/5 o di GF 677, dopo essere state accuratamente lavate con acqua distillata per eliminare la presenza di eventuali residui del substrato agarizzato, venivano trapiantate in contenitori di 100 ml di volume, riempiti con ghiaia di quarzo precedentemente lavata e sterilizzata mediante trattamento a caldo in autoclave a 121°C per 40 min. L'inoculazione delle piante, con *G. mosseae* o *G. intraradices* a seconda dell'esperimento, veniva effettuata ponendo nel vasetto, al di sotto dell'apparato radicale, 500 mg circa del materiale ottenuto mediante "wet sieving" del terreno delle pot-cultures. Le piante inoculate sono state chiuse in appositi contenitori (Sun transparent bags, Sigma, USA) e mantenute in camera di crescita con gli stessi parametri ambientali utilizzati per la fase di propagazione *in vitro*, per un periodo di circa 4-5 settimane a seconda dell'esperimento (Fig. 11). Una volta la settimana ciascuna piantina veniva fertilizzata con 8 ml di soluzione Hoagland.



Fig. 11 - Piantine micropropagate di Mr.S. 2/5 inoculate con funghi micorrizici, durante la fase di ambientamento.

1.1 - Esperimento 1A. Visualizzazione e osservazione delle modalita' di realizzazione di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti, utilizzando un sistema bidimensionale *in vivo* (metodo "sandwich")

Le prove sono state condotte utilizzando un sistema bidimensionale *in vivo* denominato "metodo sandwich" che permette di far sviluppare le ife esterne di una piantina micorrizzata su una superficie piana la quale, successivamente, puo' essere sottoposta ad opportune colorazioni allo scopo di effettuare osservazioni e misurazioni sul micelio micorrizico extraradicale intatto.

Dopo aver inoculato, seguendo le modalita' precedentemente descritte, piantine radicate *in vitro* di Mr.S. 2/5 con i funghi *G. mosseae* o *G. intraradices*, queste venivano rimosse con accuratezza dal substrato mediante immersione in acqua e poste in capsula Petri con H₂O distillata. Mediante osservazione al microscopio stereoscopico, tutte le ife che fuoriuscivano dalla radice e si diffondevano nel mezzo

circostante venivano delicatamente asportate utilizzando delle pinzette idonee, come descritto in Giovannetti *et al.* 2001.

Dopo essere stato completamente privato del micelio extraradicale, l'apparato radicale di ogni piantina veniva posizionato su una membrana di nitrato di cellulosa (Millipore, porosita' 0.45µm). All'interno della stessa membrana, ma a qualche centimetro di distanza, veniva posta un'altra piantina di Mr.S. 2/5 o di GF 677 ottenuta nello stesso modo ma non micorrizzata (Fig. 12).



Fig.12 - Pianta micorrizzata di Mr.S. 2/5 privata di tutto il micelio extraradicale (sinistra) e pianta non micorrizzata dello stesso portinnesto (destra), poste su una membrana di nitrato di cellulosa.

Le coppie di piante, della stessa specie o di specie differente, con le radici racchiuse all'interno delle membrane, venivano poste all'interno di capsule Petri riempite con ghiaia sterile e mantenute in condizioni controllate di umidita' e temperatura.

A tempi successivi, a partire da 3 giorni dopo l'inizio della prova, le membrane venivano rimosse con cura dalla piastra, bagnate con H₂O distillata, delicatamente aperte e colorate, ricoprendole con cura con alcune gocce di Trypan

Blue 0.05% in acido lattico; dopo aver lasciato asciugare per diverse ore le membrane, il micelio extraradicale, che risultava visibile anche ad occhio nudo, veniva osservato al microscopio stereoscopico. Quando le ife extraradicale provenienti dalla piantina micorrizata avevano raggiunto una radice della piantina non micorrizata, tali aree della membrana venivano prelevate con l'aiuto di un bisturi, montate su un vetrino in acido lattico e osservate al microscopio ottico per l'individuazione di eventuali strutture infettive. Successivamente le radici presenti nelle aree di membrana individuate venivano rimosse, decolorate a caldo in KOH al 10% per pochi minuti, colorate con Trypan blue in acido lattico (Phillips & Hayman, 1970) e nuovamente osservate al microscopio ottico.

1.2 - Esperimento 1B. Valutazione dei tempi di formazione nel terreno di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti

L'esperimento e' stato realizzato con piantine radicate *in vitro* di Mr.S. 2/5 e di GF 677. Una parte delle piante, per entrambi i portinnesti, e' stata inoculata con il fungo *G. intraradices*, secondo le modalita' precedentemente descritte, mentre le piante non inoculate sono state poste nei vasetti con ghiaia sterile e inserite nelle sunbags come le altre ma, naturalmente, non veniva posto l'inoculo fungino al di sotto dell'apparato radicale. Dopo 30 giorni, 5 piantine inoculate di GF 677 e 5 di Mr.S. 2/5 sono state prelevate e le radici sono state chiarificate con KOH al 10% a caldo e colorate con Trypan blue in acido lattico (Phillips & Hayman, 1970) per poter determinare la percentuale di colonizzazione micorrizica mediante il metodo "grid-line intersect" (Giovannetti & Mosse, 1980). Accertata la consistenza della colonizzazione, le piante micorrizzate sono state delicatamente rimosse dal substrato e accuratamente private di tutte il micelio extraradicale come descritto per l'esperimento precedente. Terminata questa operazione, le piante micorrizzate di GF 677 o di Mr.S. 2/5 sono state trapiantate in suolo, al centro di un contenitore del diametro di 25 cm. Intorno alle piante micorrizzate di Mr.S. 2/5, ad una distanza di circa 10 cm, sono state poste 6 piantine non micorrizzate dello stesso portinnesto (Tesi intraspecifica MM = Mr.S. 2/5- Mr.S. 2/5) mentre intorno alle piante micorrizzate di GF 677 sono state poste o 6 piante non micorrizzate di GF 677 (Tesi intraspecifica GG

= GF 677- GF 677) oppure 3 piante non micorrizzate di GF 677 e 3 piante non micorrizzate di Mr.S. 2/5 (Tesi interspecifica GM = GF 677 - Mr.S. 2/5), come illustrato nella Fig. 13. Le tesi GG e GM erano costituite da 7 ripetizioni ciascuna, mentre la tesi MM era costituita da 9 ripetizioni. In seguito chiameremo “centrali” (Centr.), in relazione alla posizione all’interno del contenitore, le piante micorrizzate dalle quali inizia la formazione della rete micorrizica extraradicale e “lateralali” (Lat.) le piante non micorrizzate sulle quali verrebbe periodicamente valutata la colonizzazione micorrizica.

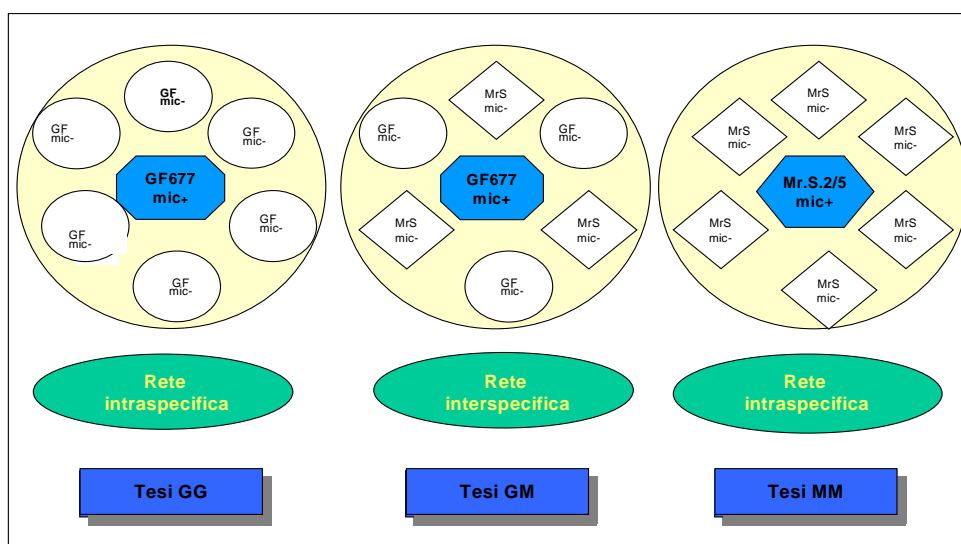


Fig. 13 – Disegno sperimentale utilizzato per la realizzazione dell’esperimento 1B. Tesi GG = GF 677- GF 677; tesi MM = Mr.S. 2/5- Mr.S. 2/5; tesi GM = GF 677 - Mr.S. 2/5.

Le prove sono state condotte utilizzando un terreno di tipo sabbioso, subcalcalino (pH 7.3), con scarso contenuto di calcare totale (1.4%) e di sostanza organica. Il terreno veniva sottoposto a sterilizzazione in autoclave mediante trattamento a 120°C per 40 min.

Le piante sono state mantenute per alcuni giorni in ambiente controllato per favorirne l’attecchimento e successivamente trasferite in serra. Dopo 20, 30 e 40 giorni dal trapianto in suolo, da ciascun contenitore veniva scelta casualmente e

accuratamente prelevata 1 piantina laterale di GF 677 nella tesi GG o di Mr.S. 2/5 se si trattava della tesi MM o della tesi GM. L'apparato radicale di tali espianti veniva lavato e colorato con Trypan blue in acido lattico come precedentemente descritto per poter determinare la % di colonizzazione micorrizica.

1.3 - Esperimento 1C. Verifica della funzionalità della rete micorrizica come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunità vegetale

Esperimento I anno - Al termine dell'esperimento 1B i contenitori con le piante di GF677 o di Mr.S. 2/5, nei quali era stata verificata l'esistenza di una comune rete micorrizica nel terreno, sono stati utilizzati per condurre la parte successiva della prova avente lo scopo di indagare sugli effetti che la presenza di tale rete ifale puo' avere per lo sviluppo delle piante interconnesse. I microcosmi prescelti contenevano tutti 1 pianta centrale, di GF 677 o di Mr.S. 2/5, e 3 laterali della stessa specie; nella tesi GM, infatti, erano state prelevate le piantine laterali di Mr.S. 2/5, rimanendo così, dopo il terzo prelievo, solo piante di GF 677.

Le piante sono state suddivise in 3 gruppi per ciascun portinnesto nel seguente modo: in un gruppo tutte le piante rimanevano esposte alla luce (tesi LL = Luce-Luce), in un altro gruppo solo la pianta centrale rimaneva esposta alla luce mentre tutte le piante laterali venivano coperte con cappucci realizzati con rete ombreggiante di colore nero (Tesi LB = Luce-Buio) ed infine nel terzo gruppo tutte le piante venivano coperte con i suddetti cappucci (Tesi BB = Buio-Buio) (Fig. 14). L'ombreggiamento riduceva la quantità di luce del 90%, senza tuttavia impedire la traspirazione della pianta.

Per il portinnesto GF 677 si avevano 5 ripetizioni per la tesi LL, 5 per la tesi LB e 4 ripetizioni per la tesi BB, mentre per il portinnesto Mr.S. 2/5 le ripetizioni erano 3 per ciascuna tesi. Nel corso della prova, che si è svolta nel periodo estivo, le piante sono state mantenute in serra ed innaffiate 3 volte alla settimana. Inoltre le piante venivano fertirrigate con 100 ml di Soluzione Hoagland 1 volta alla settimana.

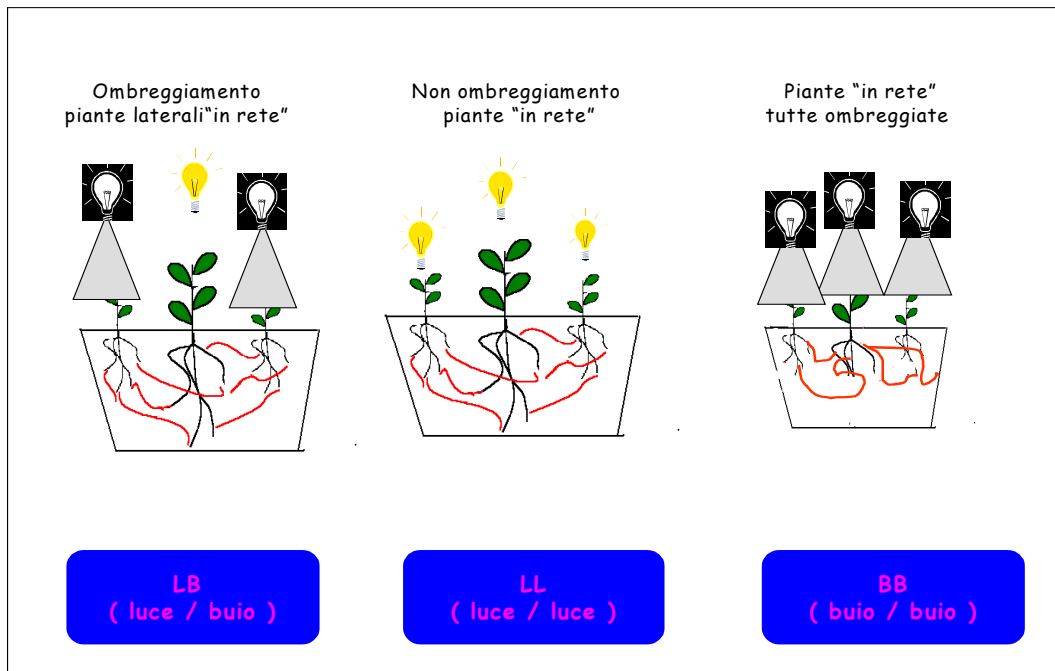


Fig. 14 – Rappresentazione schematica delle 3 tesi poste a confronto nell’esperimento 1C.

Nel corso dell’esperimento, dopo 20, 35, 50 e 90 giorni dal momento dell’ombreggiamento e’ stato valutato l’incremento di crescita dei germogli; inoltre, durante il primo mese di svolgimento della prova, sono stati condotti 7 successivi rilievi per misurare l’attività fotosintetica delle piante esposte alla luce delle tesi LL e LB. L’assimilazione di CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2/\text{cm}^2/\text{sec}$) e’ stata misurata sulle prime 3 foglie espanse di 3 piante per ciascuna tesi mediante lo strumento IRGA (InfraRed Gas Analyzer).

Al termine, dopo 3 mesi, sono stati misurati il peso fresco e secco delle radici e dei germogli, l’altezza della pianta, la % di sostanza secca della radice e del germoglio e la % di colonizzazione micorrizica delle radici. La quantificazione del fungo micorrizico all’interno delle radici e’ stata valutata inoltre mediante determinazione del contenuto di glucosamina intraradicale secondo il metodo descritto di seguito.

1.4 - Determinazione del contenuto di glucosamina intraradicale

Il contenuto di glucosamina (GLC) e' stato determinato mediante dosaggio spettrofotometrico, dopo opportuna degradazione, della chitina contenuta nei tessuti fungini intraradicali (Ride & Drysdale, 1972). Il metodo consiste in una deacetilazione, mediante trattamento con alcali a caldo, che permette di convertire la chitina in chitosano; questo, mediante depolimerizzazione e deaminazione, viene trasformato in 2,5-anidromannosio il quale, in presenza di opportuni reagenti, forma un complesso cromoforo che viene determinato spettrofotometricamente.

A tale scopo, dopo essiccazione in stufa, state sono stati pesati 15 mg di radici, precedentemente macinate, e autoclavati con 3 ml di KOH (120 g/100 ml H₂O) per 60 min a 121°C. La soluzione alcalina ottenuta e' stata mescolata con 8 ml di etanolo al 75% e messa a raffreddare in frigo. Dopo 15 minuti sono stati aggiunti 0.5 ml di Celite (5% in etanolo al 75%) e il materiale e' stato centrifugato ad una velocità di 3000 rpm, a 2°C per 10 minuti. Dopo eliminazione del surnatante, il residuo e' stato sottoposto a successivi lavaggi con etanolo al 40% e acqua distillata. Il pellet ottenuto é stato essiccato e risospeso in 0.5 ml di H₂O sterile, ottenendo cosi' una sospensione di chitosano. A questa sono stati aggiunti 0.5 ml di NaNO₂ al 5% e 0.5 ml di KHSO₄ al 5%. La sospensione e' stata posta in agitazione e successivamente centrifugata per 2 min a 3000 rpm. Dalla soluzione di anidromannosio ottenuta sono state prelevate 2 aliquote di 0.6 ml per ciascun campione che sono state fatte reagire per 15 minuti con ammoniosulfamato (NH₄SO₃NO₂) al 12.5%. Successivamente sono stati aggiunti 0.2 ml di MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone allo 0.5%) e i campioni sono stati immersi in acqua bollente per 3 minuti. Al termine, il materiale e' stato fatto raffreddare per pochi minuti e successivamente a ciascuna aliquota sono stati aggiunti 0.2 ml di FeCl₃. Dopo circa 30 minuti e' stata misurata la densita' ottica (OD) di ciascun campione a 650 nm, usando uno spettrofotometro Beckman DU-7 (Beckman Instruments, Inc., Irvine, Calif., USA) (Fig. 15).

Per poter determinare la quantita' di glucosamina contenuta nel campione iniziale, i risultati delle letture spettrofotometriche venivano comparati con quelli ottenuti dalla curva di taratura precedentemente realizzata.

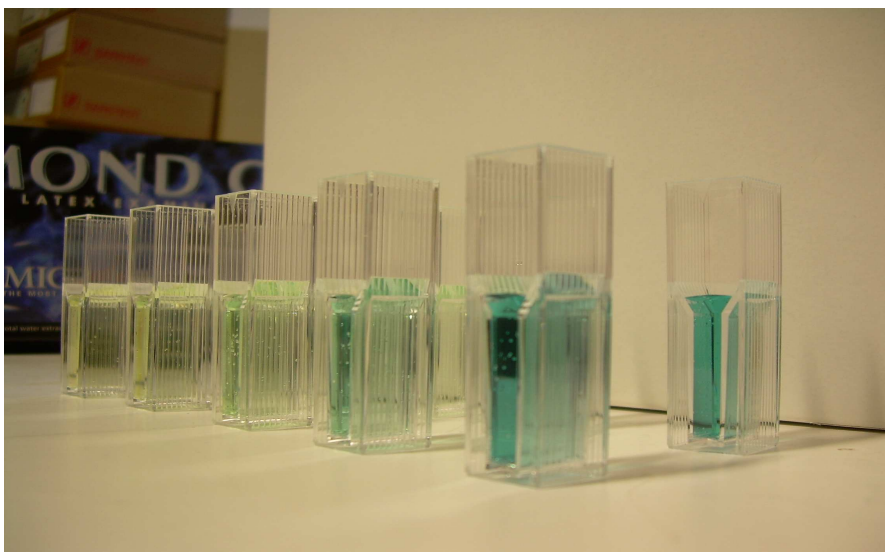


Fig. 15 - Reazione colorimetrica dei campioni che permette il dosaggio del contenuto di glucosammina

A tale scopo, concentrazioni note di glucosammina venivano trattate come precedentemente descritto, partendo dalla fase di deamminazione, in modo da costruire, parallelamente ad ogni dosaggio effettuato, una curva di taratura appropriata, come ad esempio quella riportata nella Fig. 16.

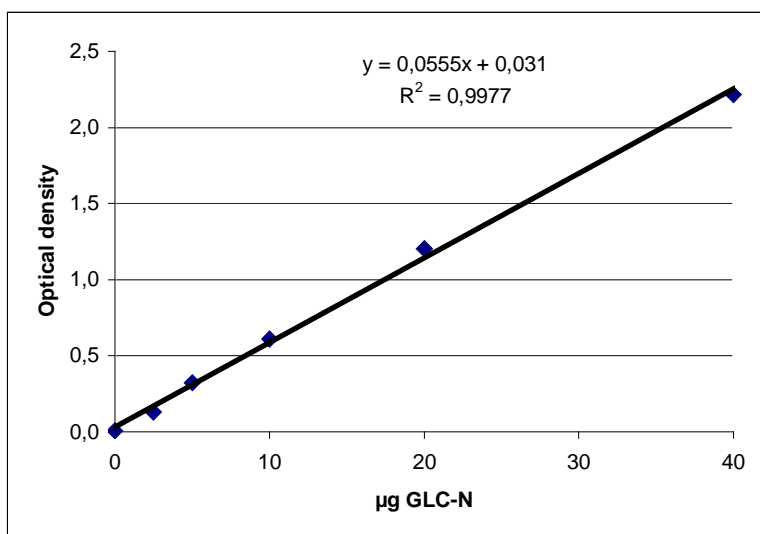


Fig. 16 - Curva di taratura della Glucosammina (GLC-N)

Esperimento II anno - Piantine radicate *in vitro* di Mr.S. 2/5, sono state poste in ambientamento ed inoculate con il fungo micorrizico *G. mosseae*, seguendo le stesse modalita' descritte precedentemente. Dopo 30 giorni, 5 piantine inoculate venivano prelevate e le radici venivano trattate secondo il metodo precedentemente descritto per poter determinare la % di colonizzazione micorrizica. Le piante micorrizzate sono state delicatamente rimosse dal substrato e accuratamente private di tutte il micelio extraradicale come precedentemente descritto. Terminata questa operazione, le suddette piante sono state trapiantate in suolo ponendole al centro di un contenitore del diametro di 24 cm e, intorno a ciascuna di esse, ad una distanza di circa 10 cm, sono state poste 4 piante non micorrizzate dello spesso portinnesto. Il terreno utilizzato aveva le stesse caratteristiche di quello usato nell'esperimento precedente. Le piante, dopo alcuni giorni in ambiente controllato, sono state trasferite in serra dove rimanevano per l'intera durata della prova.

Dopo 30 giorni dal trapianto in suolo, da ogni contenitore veniva prelevata 1 pianta scelta casualmente tra quelle laterali per poter controllare la colonizzazione micorrizica del suo apparato radicale.

A questo punto i vasi, contenenti ciascuno 1 pianta centrale e 3 laterali, sono stati suddivisi in gruppi e sottoposti a due differenti tipi di ombreggiamento: nel trattamento che chiameremo Nero (N) l'ombreggiamento veniva effettuato con cappucci ombreggianti realizzati in tessuto di cotone nero in modo da ridurre drasticamente la quantita' di luce ricevuta dall'apparato fogliare (solo 3%); l'apice del germoglio, tuttavia, restava completamente illuminato poiche' era stata realizzata una piccola apertura nel cappuccio che permetteva, alzando progressivamente la copertura che era sorretta da un supporto "a telescopio", di mantenere alla luce solo l'apice del germoglio mentre il resto della pianta era completamente ombreggiata. Invece, nel trattamento che chiameremo Bianco (B), l'ombreggiamento riguardava l'intera parte aerea della pianta ma, essendo stata realizzata con cappucci in tessuto di cotone bianco, provocava una riduzione dell'intensita' luminosa soltanto del 49%.

Pertanto, le tesi confrontate in questo esperimento risultano complessivamente 5: in un gruppo tutte le piante rimanevano esposte alla luce (tesi LL = Luce-Luce), in un altro gruppo solo la pianta centrale rimaneva esposta alla luce mentre tutte le piante laterali venivano coperte con cappucci neri (tesi LBN= Luce-

Buio-Nero), oppure di colore bianco (tesi LBB= Luce-Buio-Bianco). Infine negli altri 2 gruppi, tutte le piante venivano ombreggiate con cappuccio di colore nero (tesi BBN = Buio-Buio-Nero) o di colore bianco (tesi BBB = Buio-Buio-Bianco). Per ciascuna tesi sono state realizzate 3 ripetizioni. Ricapitolando i gruppi posti a confronto sono stati i seguenti :

- LL = tutti i germogli esposti alla luce
- LBN = germoglio centrale esposto alla luce e 3 germogli laterali ombreggiati con cappucci neri
- BBN = tutti germogli ombreggiati con cappucci neri
- LBB = germoglio centrale esposto alla luce e 3 germogli laterali ombreggiati con cappucci bianchi
- BBB = tutti germogli ombreggiati con cappucci bianchi

Nel corso dell'esperimento, dopo 20 e 40 giorni dal momento dell'ombreggiamento, e' stato valutato l'incremento di crescita dei germogli delle piante "laterali" mentre i parametri di crescita delle piante "centrali" in questo caso non sono stati rilevati; al termine dell'esperimento, che ha avuto una durata complessiva di 3 mesi (2 dall'ombreggiamento), nelle piante "laterali" (Lat) e' stato misurato il peso fresco e secco delle radici e dei germogli, l'altezza totale della pianta, la % di sostanza secca della radice e della parte aerea e la % di colonizzazione micorrizica delle radici.

Analisi statistica

I risultati degli esperimenti sono stati sottoposti all'ANOVA utilizzando il programma CoStat; i dati venivano preliminarmente sottoposti al test di Bartlett per saggiare l'omogeneita' della varianza e, nel caso di significativita' del test, opportunamente trasformati. Ogni vaso contenente 1 pianta centrale e 3 laterali veniva considerato come ripetizione e pertanto, per le piante laterali, veniva effettuata la media dei parametri misurati. Il contenuto di glucosamina e' stato confrontato mediante il t-test. I valori percentuali sono stati confrontati statisticamente dopo trasformazione angolare.

2 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica sullo sviluppo intra ed extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari

Materiale fungino

Le prove sono state condotte utilizzando il fungo micorrizico arbuscolare *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe (Kent isolate) (International Microbial Archives, code IMA1). L'inoculo fungino veniva ottenuto mediante "wet-sieving" del terreno di crescita delle pot-cultures come precedentemente descritto.

Materiale vegetale

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando piantine micropropagate di Mr.S. 2/5, ottenute come precedentemente descritto. Dopo 14 giorni di radicazione *in vitro*, quando le radici avevano una lunghezza di 1-2 cm circa, le piantine venivano rimosse dal substrato agarizzato, lavate accuratamente in acqua distillata e poste in vasetti di 100 ml di volume con ghiaia di quarzo, precedentemente lavata e sterilizzata. Ogni piantina veniva inoculata ponendo nel vasetto, al di sotto dell'apparato radicale, 600 mg del filtrato dell'inoculo ottenuto come precedentemente descritto. Le piantine inoculate venivano chiuse in appositi contenitori (Sun transparent bags, Sigma, USA) e mantenute in camere di crescita nelle quali si aveva un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, una temperatura di 23±1°C e un'intensità luminosa di 60μE·m⁻²·s⁻¹. Una volta la settimana ciascuna piantina veniva fertilizzata con 8 ml di soluzione Hoagland.

2.1 - Esperimento 2A . Valutazione "time-course dell'estensione e della struttura della rete micorrizica extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO₂

Al termine della fase di inoculazione, che ha avuto una durata di 4 settimane, venivano prelevate le radici di un campione di 4 piantine scelte casualmente e trattate secondo il metodo precedentemente descritto per poter stimare la percentuale di colonizzazione micorrizica. Accertata la presenza di una sufficiente

micorrizzazione, tutte le piante venivano rimosse con accuratezza dal substrato mediante immersione in acqua, poste in capsula Petri con H₂O distillata e, con l'aiuto di un microscopio stereoscopico e utilizzando delle pinzette microchirurgiche, completamente private di tutto il micelio extraradicale prodotto. Seguendo la metodologia già descritta come “metodo sandwich”, l'apparato radicale di ogni piantina è stato posto tra 2 membrane di dimensione 9 x 11 cm e posto in posizione verticale entro contenitori riempiti con ghiaia sterile. Le piante venivano quindi collocate all'interno di 2 celle di vetro nelle quali veniva mantenuto un flusso di aria costante con diversa concentrazione di CO₂ atmosferica: all'interno di un box veniva insufflata una miscela CO₂/aria con 350 ppm (±2%) di CO₂ mentre nell'altro box veniva introdotta una miscela analoga ma contenente 700 ppm (±2%) di CO₂ (miscele certificate da LINDE GAS Italia S.r.l., Arluno, Milano, Italy). La concentrazione di CO₂ all'interno delle celle di vetro veniva misurata attraverso un “IR-gas analyzer” e continuamente monitorata mediante un software di acquisizione dati che effettuava 15 letture al minuto. I due contenitori di vetro, del volume di 31,25 litri, erano mantenuti in camere di crescita con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, una temperatura di 23±1°C e un'intensità luminosa di 60 μE·m⁻²·s⁻¹ (Fig 17).



Fig. 17 – Celle utilizzate per sottoporre le piante di Mr.S. 2/5 a due diverse concentrazioni di CO₂ atmosferica.

Dopo 5, 7, 9 e 12 giorni, le piante, in numero variabile da 3 a 5 a seconda del rilievo, venivano rimosse dal substrato e le membrane venivano aperte e colorate con Trypan blue come precedentemente descritto nel paragrafo 1A per poter determinare, a tempi successivi, l'estensione totale del micelio e la densità della micelio extraradicale.

2.2 - Determinazione del fattore di conversione del fungo *G. mosseae* per la valutazione della biomassa fungina

Trenta piantine micorrizate sono state poste tra 2 membrane di nitrato di cellulosa dopo avere rimosso il micelio extraradicale come precedentemente descritto. Dopo 2 settimane, le membrane sono state aperte e le piantine sono state poste in una piastra con acqua distillata. Tutte le ife extraradicali che circondavano la radice sono state accuratamente prelevate e il micelio raccolto e' stato essiccato in stufa a 70°C fino a raggiungimento del peso costante. Dopo aver determinato il peso secco del campione di micelio ottenuto, il materiale e' stato autoclavato con 3 ml di KOH e successivamente trattato come descritto nel paragrafo 1.4, al fine di poter misurare spettrofotometricamente il contenuto di glucosamina del campione.

2.3 - Esperimento 2B. Valutazione "time-course" dell'estensione della rete micorrizica extraradicale e determinazione della biomassa fungina intra ed extraradicale con 2 differenti concentrazioni di CO₂

Esperimento preliminare - Allo scopo di testare un diverso meccanismo per il mantenimento della concentrazione di CO₂ all'interno delle celle di vetro, e' stato condotto un esperimento avente lo stesso disegno sperimentale di quello precedente. In questo caso, tuttavia, in una delle due celle veniva mantenuto un flusso costante di aria a concentrazione ambientale di CO₂ (circa 400 ppm), mentre nell'altra cella l'aria ambiente veniva miscelata con CO₂ (a 20000 ppm) fino ad ottenere una concentrazione finale di 850 (±10%) ppm. La concentrazione di CO₂ nelle celle di vetro e' stata continuamente monitorata come descritto sopra. Il materiale vegetale e fungino utilizzato era lo stesso dell'esperimento precedente con la sola differenza che la fase di inoculazione aveva avuto una durata di 8 settimane. Dopo 10 giorni

dall'inizio della prova, 4 piante per ciascun trattamento sono state raccolte per poter valutare i parametri di crescita del micelio.

Esperimento principale - Dopo 1 mese di inoculazione, le piantine micorrizzate venivano private del micelio extraradicale ed il loro apparato radicale veniva posto tra 2 membrane Millipore come precedentemente descritto. Le piante sono state collocate all'interno di 2 contenitori di vetro nei quali le concentrazioni di CO₂ erano le stesse dell'esperimento preliminare. Dopo 5, 8 e 12 giorni alcune piantine, in numero variabile da 3 a 5 a seconda del rilievo, venivano rimosse dal substrato e le membrane venivano aperte e colorate con Trypan blue come precedentemente descritto nel paragrafo 2A per poter determinare, a tempi successivi, l'estensione e la densità della micelio extraradicale. Inoltre, al momento dell'ultimo rilievo (12 giorni) 3 piantine per ciascuna tesi sono state pesate e su di esse è stata determinata la biomassa fungina intra ed extraradicale. A tale scopo le membrane venivano delicatamente rimosse dalla ghiaia e, con l'aiuto di un microscopio stereoscopico e utilizzando delle pinzette idonee, tutte le ife extraradicali venivano raccolte e poste in stufa a 70°C. Su ciascun campione di micelio veniva determinato il contenuto di glucosamina seguendo il metodo precedentemente descritto. Dopo aver completamente asportato il micelio extraradicale prodotto, le radici venivano seccate in stufa a 70°C fino a raggiungimento del peso costante. Per valutare la biomassa fungina intraradicale, aliquote di 15 mg di radici essiccate venivano trattate come descritto sopra in modo da determinare spettrofotometricamente il contenuto di glucosamina di ciascun campione. Per poter stimare la biomassa intraradicale ed extraradicale del fungo conoscendo la quantità di glucosamina, è stato utilizzato il fattore di conversione del fungo *G. mosseae* determinato in analoghe condizioni sperimentali, come precedentemente descritto; il confronto statistico relativo alla biomassa vegetale e fungina è stato effettuato mediante il t-test.

Determinazione dell'estensione e della densità della rete micorrizica extraradicale

Dopo aver opportunamente colorato le membrane sulle quali si è sviluppata la rete micorrizica extraradicale, la densità delle ife (mm/mm²) veniva calcolata mediante il "gridline intersect method" (Giovannetti & Mosse, 1980), usando un microscopio

stereoscopico con oculare provvisto di griglia e osservando 4 aree di 64 mm² per ciascuna membrana. L'estensione dell'area complessivamente occupata dal micelio extraradicale veniva determinata mediante un software adeguato (Image Tool) dopo acquisizione digitale tramite scanner della suddetta area. La lunghezza totale delle ife veniva calcolata moltiplicando la densità ifale per l'area totale coperta del micelio extraradicale di ciascuna piantina. Le radici venivano quindi rimosse dalla membrana e colorate con Trypan Blue come precedentemente descritto. Si procedeva quindi alla determinazione, per ciascun apparato radicale, della lunghezza totale delle radici, della lunghezza totale delle radici colonizzate e della percentuale di colonizzazione micorrizica con il "gridline intersect method" (Giovannetti & Mosse, 1980).

Negli esperimenti "time-course" i dati ottenuti sono stati analizzati mediante analisi della varianza a 2 vie utilizzando il programma SPSS

Determinazione della vitalità del micelio extraradicale

Per poter determinare la vitalità del micelio micorrizico extraradicale, la presenza e la localizzazione dei nuclei nelle ife è stata determinata mediante colorazione con diaminofenilindone (DAPI) (Sigma, St. Louis, USA). Alcune membrane sulle quali era stato fatto sviluppare il micelio extraradicale sono state delicatamente aperte e alcune aree selezionate venivano montate su un vetrino e colorate con una soluzione di 5 mg/ml di DAPI in acqua:glicerolo 1:1. I preparati venivano osservati con microscopio ottico a epifluorescenza.

RISULTATI

1 - Studio della formazione e della funzionalità nelle piante arboree da frutto di reti micorriziche extraradicali intra o interspecifiche

1.1 - Esperimento 1A - Visualizzazione e osservazione delle modalità di realizzazione di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti

L'esperimento si proponeva di verificare la capacità del micelio extraradicale prodotto da piante arboree micorrizzate con funghi MA di interconnettersi con altre piante arboree della stessa specie o di specie diversa formando una "comune rete micorrizica". Il prelievo e l'osservazione, a tempi successivi, delle membrane di nitrato di cellulosa contenenti le coppie di piante permetteva di rilevare l'eventuale esistenza di una rete ifale di collegamento tra piante contigue.

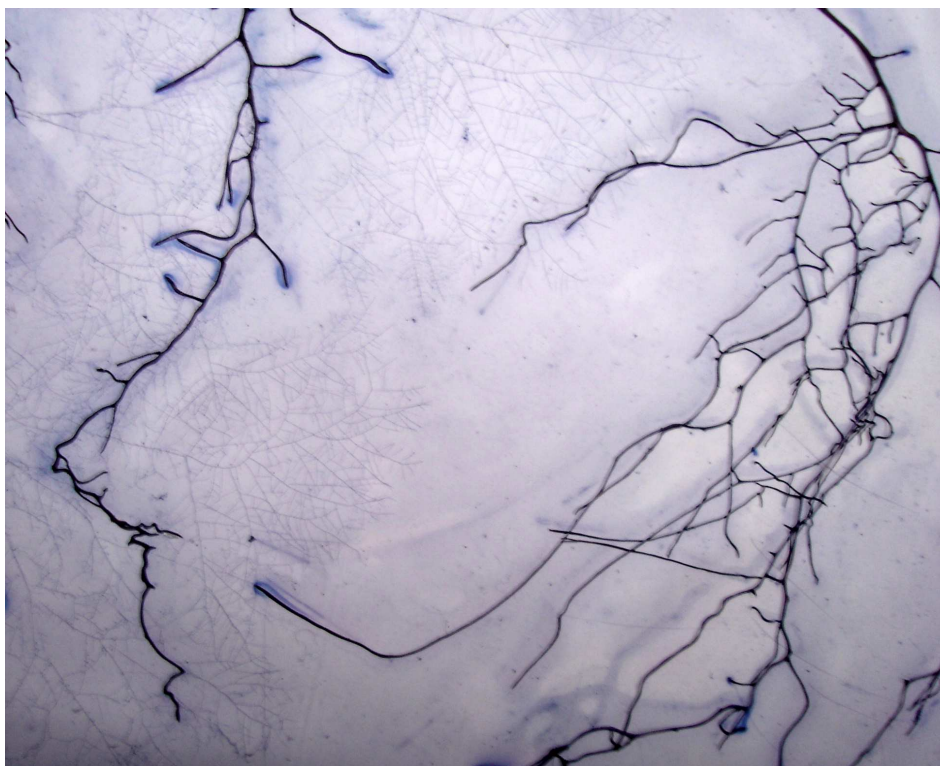


Fig. 18 - La rete micorrizica extraradicale prodotta da una pianta di Mr.S. 2/5 colonizzata dal fungo *G.mosseae* (sinistra) si sviluppa su una membrana di nitrato di cellulosa e raggiunge l'apparato radicale di un'altra pianta di Mr.S. 2/5 non inoculata (destra).

Cio' ha permesso di verificare che piantine di Mr.S. 2/5 micorrizzate con il fungo *G. mosseae* o con il fungo *G. intraradices*, precedentemente private di tutto il micelio extraradicale come descritto, dopo pochi giorni dall'inizio della prova sviluppavano una densa rete di ife intorno al proprio apparato radicale e che queste, dopo circa 7-10 giorni, raggiungeva le radici di un'altra pianta di Mr.S. 2/5 non micorrizzata posta a qualche centimetro di distanza (Fig. 18)

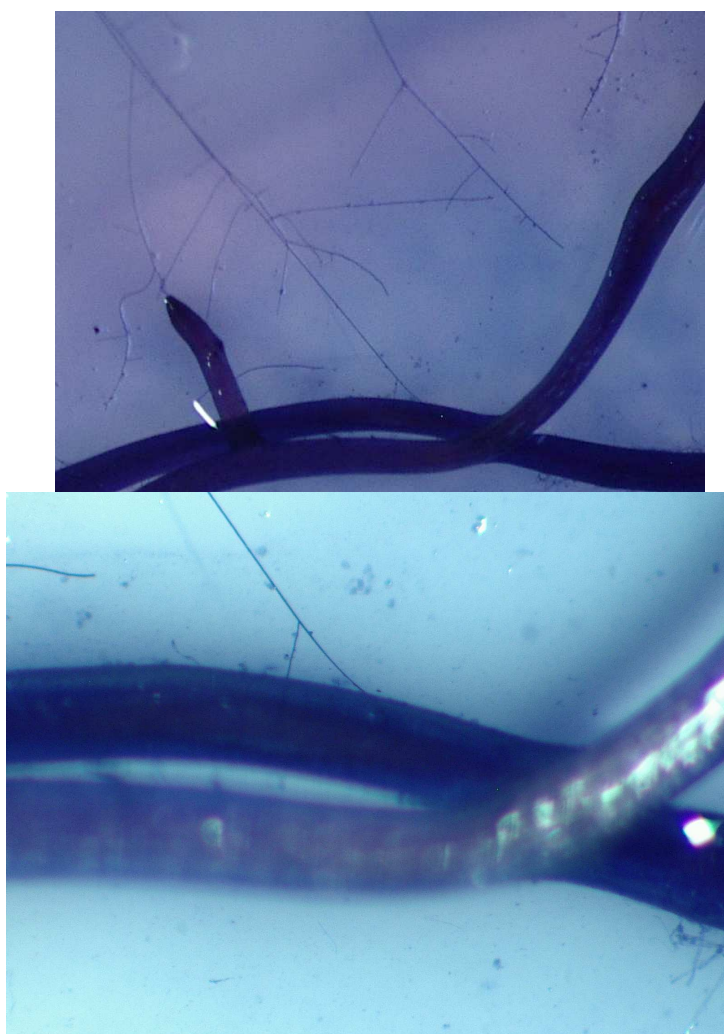


Fig 19 - Ife extraradicali prodotte da una pianta di Mr.S. 2/5 micorrizzata con *G. mosseae* hanno raggiunto la radice non micorrizzata di un'altra pianta della stessa specie.

Mediante osservazione diretta delle membrane colorate, venivano individuate le aree in cui le ife provenienti dalla radice micorrizzata raggiungevano la radice non micorrizzata e, per poter dimostrare l'avvenuta infezione, questi segmenti di radice venivano prelevati e opportunamente trattati per verificare l'esistenza di strutture infettive intraradicali (Fig. 19). La successiva osservazione al microscopio ottico metteva in evidenza la formazione di appressori sulla radice della pianta non inoculata e l'avvenuta penetrazione dell'endofita fungina all'interno dei tessuti radicali (Fig. 20).

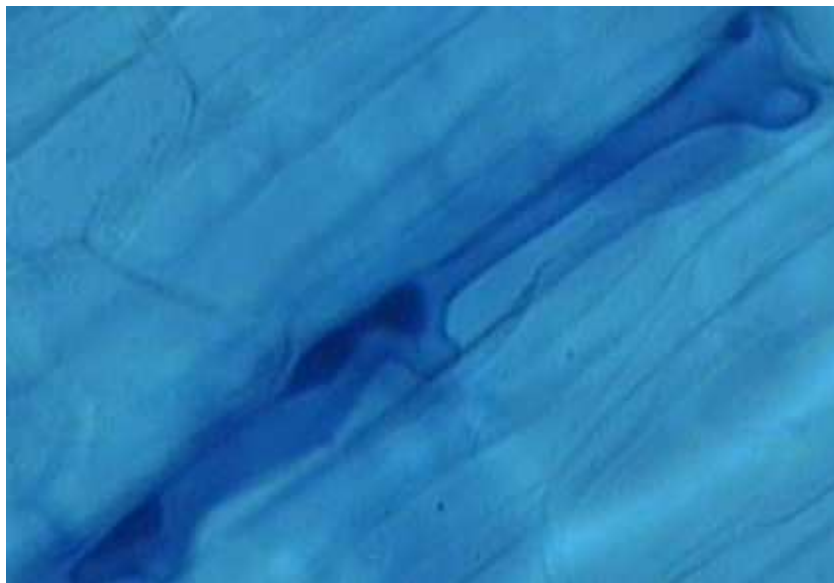


Fig. 20 - Appressorio formato da un'ifa extraradicale prodotta dal fungo MA *G. mosseae* su una radice di Mr.S. 2/5.

Risultati analoghi sono stati ottenuti quando venivano poste sulle membrane 2 diversi portinnesti; anche in questo caso, infatti, e' stato osservato che le ife esterne provenienti dalla pianta colonizzata di Mr.S. 2/5 raggiungevano e penetravano nelle radici di una pianta non micorrizzata di GF677, dimostrando che lo stesso fungo, presentando una scarsa specificita' nei confronti degli ospiti, e' in grado di collegare tramite le ife extraradicali sia piante della stessa specie (reti micorriziche intraspecifiche), sia piante di specie differente (reti micorriziche interspecifiche).

1.2 - Esperimento 1B. Valutazione dei tempi di formazione nel terreno di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti

Dal momento che, tramite il sistema bidimensionale descritto, e' stata evidenziata la possibilita' che piante contigue siano collegate da una rete di ife extraradicali, abbiamo voluto verificare la presenza di tale rete nel terreno e indagare sui tempi di formazione di questo sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale. A tale scopo piante di Mr.S. 2/5 o di GF 677, micorrizzate con *G. intraradices* e successivamente private di tutto il micelio extraradicale prodotto, sono state poste nel terreno e circondate da piante non micorrizzate dello stesso portinnesto o dell'altro portinnesto, per valutare i tempi di formazione di una rete intra o interspecifica. La percentuale di micorrizzazione delle piante poste al centro del microcosmo era del $25.9 \pm 2.7\%$ nel GF 677 e del $20.5 \pm 4.1\%$ nell'Mr.S.2/5. Il confronto statistico effettuato con il t-test non ha evidenziato differenze significative tra tali valori.

Dai prelievi periodici effettuati sulle piante laterali e' risultato che, dopo 20 giorni, le ife extraradicali prodotte dalla pianta centrale avevano raggiunto le radici delle piante laterali non micorrizzate, le quali presentavano gia' i segni dell'inizio di un processo di colonizzazione da parte del fungo micorrizico, sebbene con percentuali di micorrizzazione molto basse (Fig. 21). Al secondo rilievo, effettuato dopo 30 giorni, la percentuale di micorrizzazione risultava statisticamente uguale sia per le combinazioni intraspecifiche che interspecifica, con percentuali della lunghezza delle radici colonizzate del 33 e del 36 % nella tesi GG e MM rispettivamente, mentre nella tesi GM tale valore e' risultato 28.6 % (Fig. 21). Al termine dell'esperimento, dopo 40 giorni, le piante laterali presentavano una colonizzazione radicale del 39.1% nella tesi GG, del 50.7% nella tesi MM e del 41.6% nella tesi GM. (Fig. 21).

E' da sottolineare che nel periodo di tempo in cui si e' svolta la prova, la produzione di spore da parte dell'endofita fungino non si era ancora verificata e pertanto la colonizzazione delle piante laterali era da ritenersi realizzata attraverso le ife extraradicali prodotte dalla pianta centrale micorrizzata.

L'analisi della varianza a 2 vie mostrava che la colonizzazione radicale incrementava nel tempo ma non sono emerse differenze significative tra le tesi poste a

confronto; questo significa che la colonizzazione di radici di piante attigue da parte delle ife extraradicali provenienti da piante di GF o Mr.S. micorrizzate con il fungo *G. intraradices* e' risultata analoga sia nel caso di piante della stessa specie (rete intraspecifica GF-GF o Mr.S.-Mr.S.) sia nel caso di piante di specie differente (rete intraspecifica GF-Mr.S.).

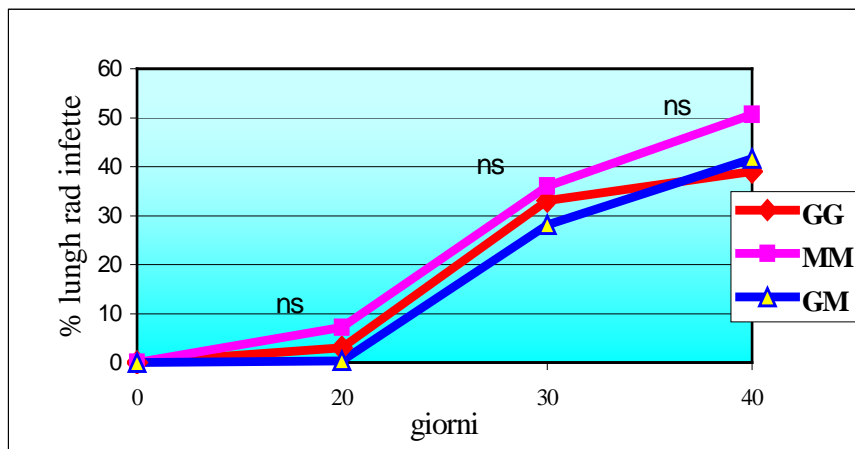


Fig 21 - Percentuale della lunghezza delle radici colonizzate dalle ife extraradicali prodotte da piante di GF 677 o Mr.S. 2/5 micorrizzate con il fungo *G. intraradices*, in differenti combinazioni di portinnesti. Tesi MM = Mr.S. 2/5- Mr.S. 2/5, tesi GG = GF 677- GF 677, tesi GM = GF 677 - Mr.S. 2/5; ns = valori non statisticamente diversi per ciascun rilievo effettuato ($p=0.05$).

1.3 - Esperimento 1C. Verifica della funzionalita' della rete micorrizica come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale

Accertata la presenza di una consistente rete di ife extraradicali nel terreno, si e' voluto indagare sulla funzionalita' di tale struttura come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale, valutando lo sviluppo di piante interconnesse tramite la rete micorrizica in differenti condizioni di intensita' luminosa. Il comportamento di piante ombreggiate che si sviluppavano in un microcosmo in cui era presente una pianta illuminata (Tesi LB) e' stato confrontato con quello di piante ombreggiate che si sviluppavano in un microcosmo in cui tutte le piante erano ombreggiate (Tesi BB) e con quello di piante esposte alla luce (Tesi LL). Dal momento che non sono emerse significative differenze nella formazione della rete

micorrizica tra combinazione intra e interspecifiche, nelle prova in questione sono state valutate soltanto le reti formate dai funghi MA tra piante arboree della stessa specie.

Esperimento I anno - Le prove condotte, sia con piante di GF 677 che con piante di Mr.S. 2/5, hanno valutato l'accrescimento delle piante e lo sviluppo del fungo MA nei tessuti radicali nelle diverse situazioni poste a confronto.

Per quanto riguarda il portinnesto GF 677, consistenti incrementi di crescita del germoglio sono stati ottenuti nelle piante esposte alla luce (LL centr, LL lat, LB centr) mentre nelle piante ombreggiate, sia della tesi LB (LB lat) che della tesi BB (BB centr e BB lat), l'apice del germoglio rimaneva bloccato impedendo l'allungamento della parte aerea della pianta, che rimaneva tuttavia vitale (Fig. 22).

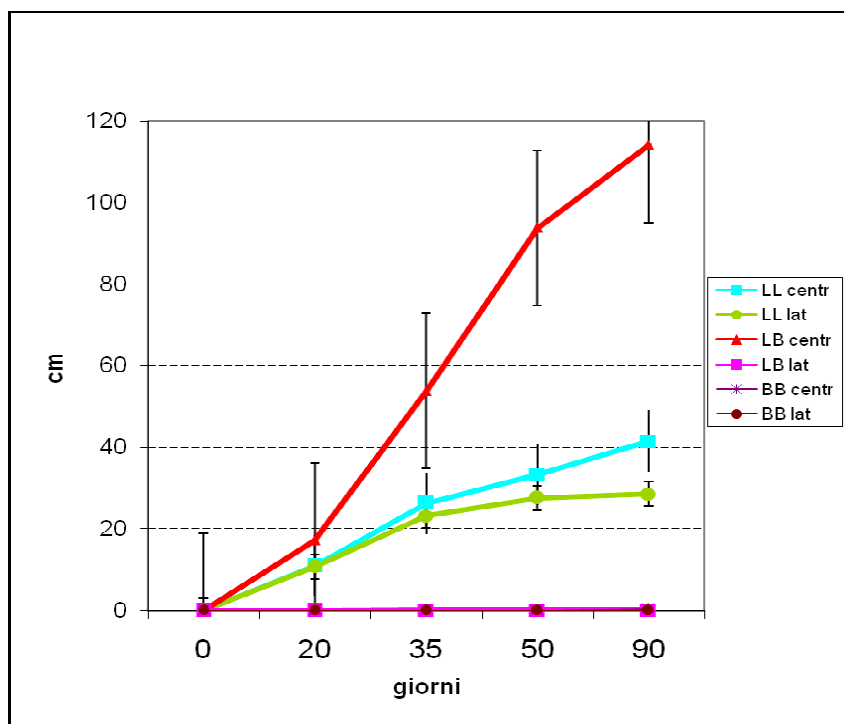


Fig. 22 - Incremento di crescita della parte aerea di piante di GF 677 mantenute in piena luce (LL centr, LL lat e LB centr) o ombreggiate (BB centr e BB lat) oppure ombreggiate ma interconnesse con una pianta illuminata (LB lat), dopo 20, 35, 50 e 90 giorni dal momento dell'ombreggiamento.

Confrontando statisticamente i valori degli incrementi di crescita delle piante illuminate (LL centr, LL lat, LB centr) possiamo osservare che nella tesi LB l'allungamento della parte aerea e' diventato statisticamente maggiore nel corso della prova rispetto alle piante della tesi LL (Tab. 4); verosimilmente, tale effetto e' stato determinato dalla minore competizione esercitata dalle piante ombreggiate laterali della tesi LB (LB lat). Al contrario, nella tesi LL l'allungamento del germoglio e' risultato uguale sia nelle piante micorrizzate poste al centro del microcosmo (LL centr) che nelle piante laterali (LL lat) che erano state colonizzate, durante l'esperimento 1B, tramite le ife extraradicali provenienti dalla pianta centrale (Tab. 4).

Trattamento	Lunghezza germogli (cm)			
	20 gg	35 gg	50 gg	90 gg
LB centr	17.2 a	53.8 a	93.8 a	114.12 a
LL centr	11.3 a	30.25 ab	40.5 b	41.5 b
LL lat	10.7 a	23.2 b	27.6 b	28.7 b

Tab. 4 - Incremento di crescita della parte aerea di piante di GF 677 dopo 20, 35, 50 e 90 giorni dal momento dell'ombreggiamento. Lettere diverse in ciascuna colonna indicano valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

Durante il primo mese di svolgimento della prova e' stata valutata l'attivita' fotosintetica delle piante illuminate delle tesi LL e LB misurando l'assimilazione di CO_2 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{sec}$) su foglie completamente espanse; dai dati rilevati, e' stato osservato che tale valore tendeva ad aumentare nel tempo ma non sono emerse differenze significative nella velocita' di assimilazione della CO_2 tra le due tesi (Fig. 23).

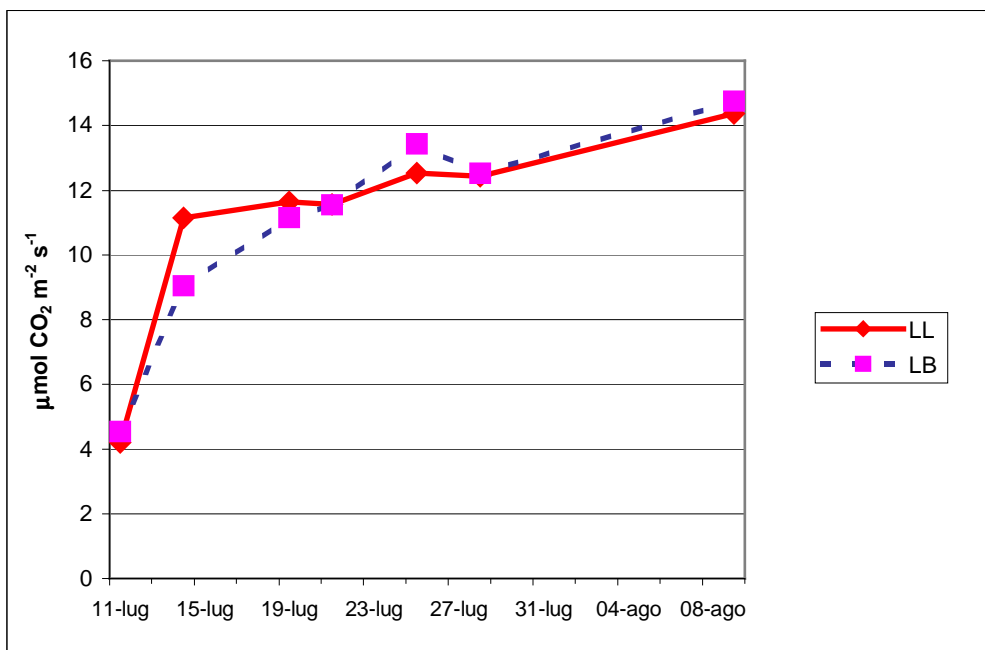


Fig. 23 - Assimilazione di CO₂ in piante micorrizate di GF 677 esposte alla luce e interconnesse con una pianta illuminata (LL) o con una pianta ombreggiata (LB). I rilievi sono stati effettuati a partire dal giorno successivo all'ombreggiamento delle piante.

Al termine della prova, 3 mesi dopo l'inizio dell'ombreggiamento, e' stato rilevato l'accrescimento del germoglio e della radice delle piante nelle diverse tesi confrontate (Fig. 24); poiche' nella tesi BB, dove avevamo piante tutte ombreggiate, non sono emerse differenze significative tra lo sviluppo delle piante centrali e quello delle piante laterali, e' stato riportato un solo dato per ogni parametro.

Per quanto riguarda l'analisi statistica dei suddetti dati, si e' ritenuto particolarmente interessante effettuare un confronto tra lo sviluppo delle piante laterali ombreggiate cresciute in presenza di una pianta illuminata all'interno dello stesso microcosmo (tesi LB lat) e piante ombreggiate sviluppatesi in presenza di una pianta non illuminata (tesi BB), rispetto a quello delle piante mantenute in piena luce (LL lat).

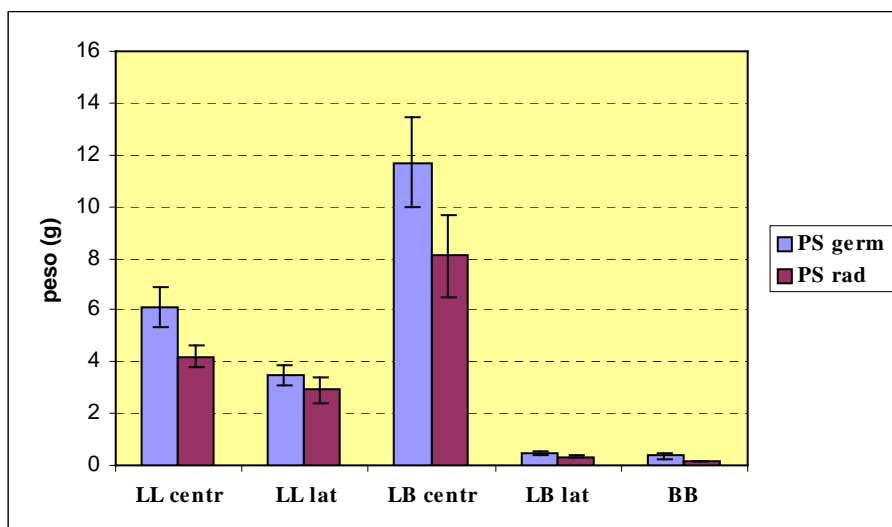


Fig. 24 - Peso secco del germoglio e della radice di piante di GF 677 mantenute in piena luce (LL centr, LL lat e LB centr), ombreggiate (BB) oppure ombreggiate ma interconnesse con una pianta illuminata (LB lat), dopo 90 giorni dal momento dell'ombreggiamento.

Nelle piante ombreggiate delle tesi LB e BB, il peso fresco e secco del germoglio ed il peso fresco radicale sono risultati statisticamente uguali, anche se significativamente inferiori rispetto a quelli della tesi LL (tab. 5). Al contrario il peso secco radicale delle piante della tesi LB, anche se notevolmente minore rispetto a quello della tesi LL, e' risultato statisticamente maggiore rispetto a quello della tesi BB, dove il valore registrato era circa la meta'.

Trattamento	Germoglio			Radice	
	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Altezza (cm)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)
LL lat	9,3 a	3,51 a	48.3 a	8,10 a	3,02 a
LB lat	1,43 b	0,49 b	21.75 b	0,84 b	0,32 b
BB	1,04 b	0,35 b	23 b	0,67 b	0,17 c

Tab. 5 - Peso fresco e secco del germoglio e della radice e altezza di piante di GF 677 mantenute alla luce (Tesi LL lat) oppure ombreggiate ma collegate "in rete" con una pianta esposta alla luce (Tesi LB lat) o con una pianta anch'essa ombreggiata (Tesi BB), dopo 3 mesi dall'inizio del trattamento. Nelle colonne, lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$. Il confronto statistico di PF e PS e' stato effettuato dopo trasformazione logaritmica.

In altre parole, nelle piante ombreggiate cresciute nello stesso contenitore in cui era presente una pianta illuminata (tesi LB lat) il peso secco radicale, pur essendo notevolmente inferiore rispetto a quello delle piante mantenute in piena luce (LL lat), era circa il doppio rispetto a quello di piante ombreggiate cresciute in combinazione con una pianta anch'essa ombreggiata (tesi BB).

Come si puo' osservare nella Tab. 6, questo risultato viene confermato confrontando la % di sostanza secca radicale: le piante ombreggiate della tesi LB avevano un contenuto di sostanza secca radicale statisticamente maggiore rispetto a quella delle piante della tesi BB e statisticamente uguale a quella delle piante esposte alla luce (LL lat). Per quanto riguarda la sostanza secca del germoglio, il valore ottenuto nelle piante della tesi BB e' risultato piu' basso e statisticamente diversa da quello ottenuto nelle piante mantenute alla luce (LL lat), anche se non statisticamente diversa da quello delle piante laterali della tesi LB (Tab. 6).

Trattamento	% SS germoglio	% SS radici
LL lat	37.73 a	37.52 a
LB lat	33,93 ab	38,98 a
BB	30,04 b	24,19 b

Tab. 6 - Percentuale di sostanza secca del germoglio e della radice di piante di GF 677 mantenute alla luce (Tesi LL lat) oppure ombreggiate ma collegate "in rete" con una pianta esposta alla luce (Tesi LB lat) o con una pianta anch'essa ombreggiata (Tesi BB), dopo 3 mesi dall'inizio del trattamento. Nelle colonne, lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

Infine e' stata valutata la colonizzazione micorrizica all'interno dei tessuti radicali e tale parametro e' risultato maggiore nelle radici delle piante esposte alla luce (LL lat) mentre la percentuale di micorrizzazione della tesi LB, pur essendo maggiore rispetto a quella misurata nella tesi BB, non e' risultata statisticamente differente (fig. 25).

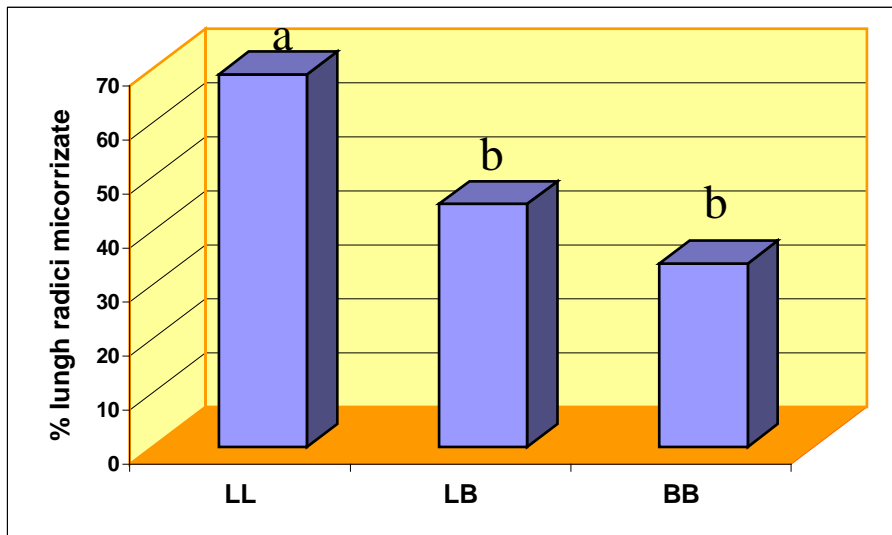


Fig. 25 - Percentuale della lunghezza delle radici micorrizzate in piante di GF 677 mantenute alla luce (Tesi LL) oppure ombreggiate ma collegate “in rete” con una pianta esposta alla luce (Tesi LB) o con una pianta anch’essa ombreggiata (Tesi BB). Lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

La colonizzazione radicale da parte del fungo micorrizico e’ stata stimata, inoltre, attraverso la determinazione del contenuto di glucosamina dei tessuti radicali, mediante idrolisi della chitina presente nelle ife fungine e successiva determinazione spettrofotometrica. Come si puo’ osservare nella fig. 26, mentre nelle piante della tesi LB il contenuto radicale di GLC era $1.29 \mu\text{g}/\text{mg}$ di radice, nelle piante della tesi BB il contenuto e’ stato $0.57 \mu\text{g}/\text{mg}$ di radice e tale differenza e’ risultata statisticamente significativa (t-test $p=0.05$). Quindi, nonostante che la % della lunghezza di radici micorrizzate fosse risultata statisticamente uguale nelle due tesi, nelle piante ombreggiate della tesi LB il contenuto di glucosamina e’ risultato notevolmente piu’ alto rispetto a quello riscontrato nelle radici della tesi BB.

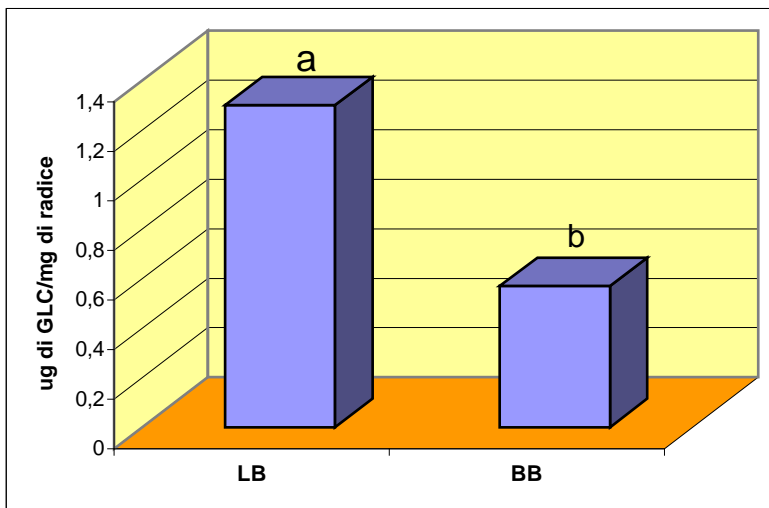


Fig. 26 - Contenuto di glucosamina in radici di piante di GF 677 ombreggiate ma collegate “in rete” con una pianta esposta alla luce (Tesi LB) o con una pianta anch’essa ombreggiata (Tesi BB). Lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

Un esperimento analogo e’ stato condotto con i microcosmi nei quali erano presenti piante di Mr.S. 2/5 interconnesse tramite le ife fungine extraradicali. Nella fig. 27 e’ possibile osservare l’incremento di crescita dei germogli mantenuti alla luce (LL centr, LL lat e LB centr) e di quelli ombreggiati (LB lat, BB centr e BB lat); in questi ultimi, l’apice del germoglio rimaneva, nella maggior parte dei casi, bloccato e la pianta, pur rimanendo vitale, cessava molto presto l’allungamento della parte aerea, analogamente a quanto precedentemente visto per il GF 677.

Confrontando statisticamente i valori degli incrementi di crescita delle piante illuminate (LL centr, LL lat, LB centr), possiamo osservare che nella tesi LB l’allungamento della parte aerea e’ diventato statisticamente maggiore nel corso della prova rispetto alla tesi LL (tab 7) mentre in quest’ultima tesi l’allungamento del germoglio e’ risultato uguale sia nelle piante micorrizzate poste al centro del microcosmo (LL centr) che nelle piante laterali (LL lat) che erano state colonizzate, durante l’esperimento 1B, tramite le ife extraradicali provenienti dalla pianta centrale.

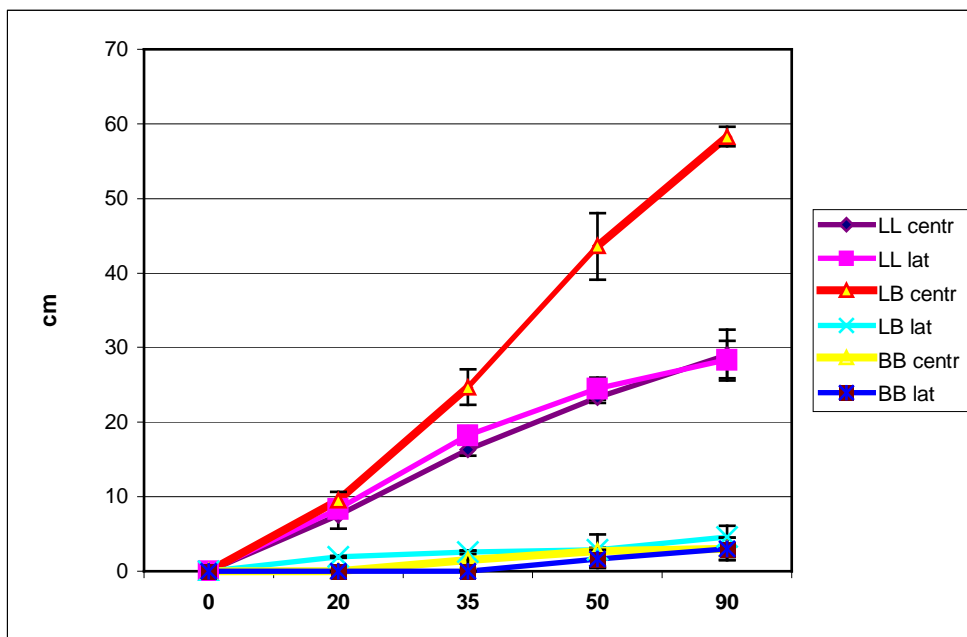


Fig. 27 - Incremento di crescita della parte aerea di piante di Mr.S. 2/5 mantenute in piena luce (LL centr, LL lat e LB centr) o ombreggiate (BB centr e BB lat) oppure ombreggiate ma interconnesse con una pianta illuminata (LB lat), dopo 20, 35, 50 e 90 giorni dal momento dell'ombreggiamento.

Trattamento	Altezza germogli (cm)			
	20gg	35gg	50gg	90gg
LB centr	9.5 a	24.7 a	43.7 a	58.3 a
LL centr	8.45 a	18.2 b	24.5 b	29 b
LL lat	7.5 a	16.5 b	23.3 b	28.4 b

Tab. 7 - Incremento di crescita della parte aerea di piante di GF 677 dopo 20, 35, 50 e 90 giorni dal momento dell'ombreggiamento. Lettere diverse in ciascuna colonna indicano valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

Anche nel caso del portinnesto Mr.S. 2/5, durante lo svolgimento della prova e' stata valutata l'attivit  fotosintetica delle piante illuminate delle tesi LL e LB. Dai

dati rilevati e' risultato che l'assimilazione di CO₂ (μmol/cm²/sec) aumentava nel tempo ma non sono emerse differenze significative tra le piante allevate in presenza di piante ombreggiate (LB) o di altre piante illuminate (LL) (Fig 28).

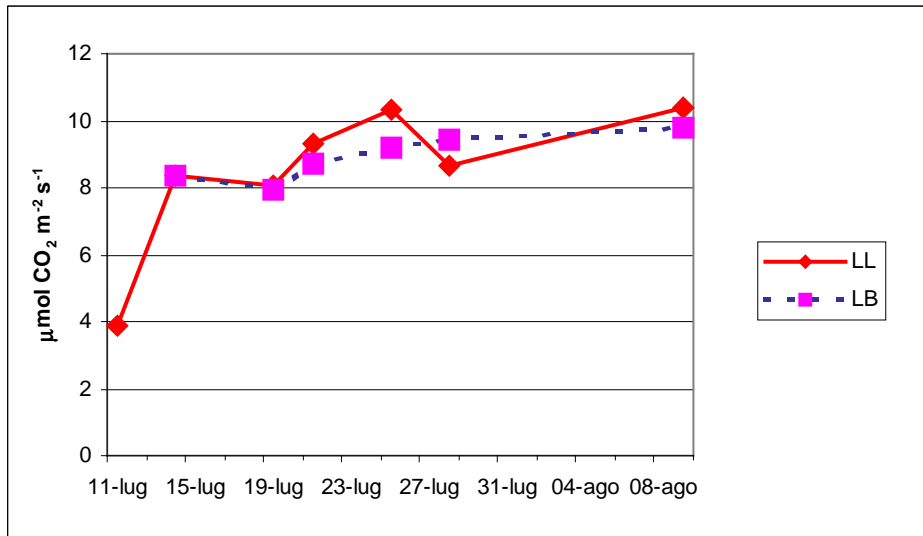


Fig. 28 - Assimilazione di CO₂ in piante micorrizate di Mr.S. 2/5 esposte alla luce e interconnesse con una pianta illuminata (LL) o con una pianta ombreggiata (LB). I rilievi sono stati effettuati a partire dal giorno successivo all'ombreggiamento delle piante

Al termine della prova lo sviluppo delle piante di Mr.S. 2/5 mantenute in differenti condizioni di illuminazione e' stato valutato in termini ponderali. Le piante illuminate della tesi LB (LB centr), a causa della minor competizione esercitata dalle piante laterali ombreggiate, mostravano un peso fresco e secco del germoglio molto elevato e quasi doppio rispetto a quelle della tesi LL; al contrario nelle piante della tesi BB e in quelle ombreggiate della tesi LB (LB later) lo sviluppo era molto contenuto (Fig. 29).

Confrontando statisticamente lo sviluppo delle piante laterali ombreggiate cresciute in presenza di una pianta illuminata all'interno dello stesso microcosmo (tesi LB lat) e piante ombreggiate sviluppatesi in presenza di una pianta non illuminata (tesi BB), rispetto a quello delle piante mantenute in piena luce (LL lat), possiamo notare che non emergono differenze significative tra le piante della tesi LB e quelle

della tesi BB, anche se entrambi i trattamenti riducono drasticamente la crescita della pianta rispetto a quella delle piante della tesi LL (Tab. 8).

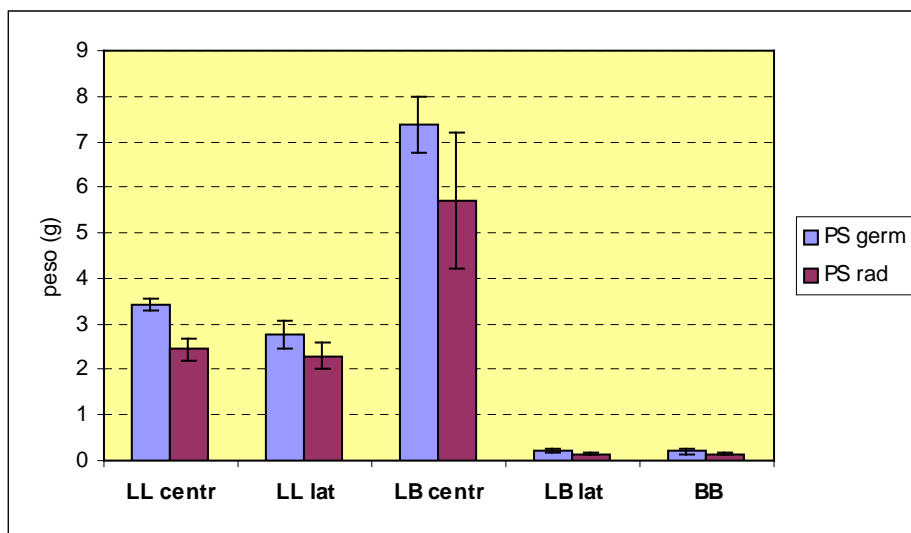


Fig. 29 - Peso secco del germoglio e delle radici di piante di Mr.S. 2/5 mantenute in piena luce (LL centr, LL lat e LB centr), ombreggiate (BB) oppure ombreggiate ma interconnesse con una pianta illuminata (LB lat), dopo 90 giorni dal momento dell'ombreggiamento.

Trattamento	Germoglio			Radice	
	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Altezza (cm)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)
LL lat	8.39 a	2.77 a	37.8 a	8.22 a	2.14 a
LB lat	0.77 b	0.23 b	16.2 b	0.62 b	0.15b
BB	0.76 b	0.19 b	14.2 b	0.87 b	0.14 b

Tab. 8 - Peso fresco e secco del germoglio e della radice e altezza complessiva di piante di Mr.S. 2/5 mantenute alla luce (Tesi LL) oppure ombreggiate ma collegate "in rete" con una pianta esposta alla luce (Tesi LB lat) o con una pianta anch'essa ombreggiata (Tesi BB). Nelle colonne, lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$. (Il confronto statistico di PF e PS e' stato effettuato dopo trasformazione logaritmica).

Tuttavia, esprimendo il contenuto di sostanza secca in percentuale, possiamo notare che sia nel germoglio che nella radice, la quantità accumulata risulta statisticamente inferiore nella tesi BB rispetto alla quantità accumulata nelle tesi LB e LL (Tab. 9); al contrario, nelle piante ombreggiate della tesi LB, sebbene in termini assoluti il peso secco fosse molto minore, la % di sostanza secca è risultata la stessa di quella rilevata nelle piante della tesi LL che si erano sviluppate alla luce (Tab. 9).

Trattamento	% di Sostanza secca	
	Germoglio	Radice
LL	32.7 a	28.6 a
LB lat	30.9 a	23.7 a
BB	25.8 b	17.2 b

Tab. 9 - Percentuale di sostanza secca del germoglio e della radice di piante di Mr.S. 2/5 mantenute alla luce (Tesi LL lat) oppure ombreggiate ma collegate “in rete” con una pianta esposta alla luce (Tesi LB lat) o con una pianta anch’essa ombreggiata (Tesi BB). Nelle colonne, lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

Anche la colonizzazione micorrizica è risultata statisticamente inferiore nel trattamento BB mentre nelle piante ombreggiate della tesi LB la lunghezza delle radici colonizzate dal fungo *G. intraradices* è risultata uguale a quella delle piante mantenute in piena luce (LL) (Fig. 30).

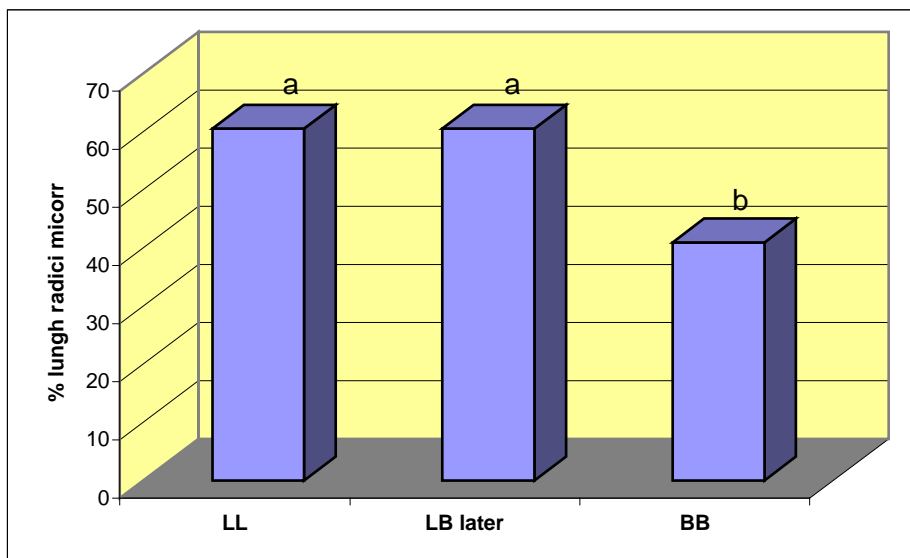


Fig. 30 - Percentuale della lunghezza delle radici micorrizzate in piante di Mr.S. 2/5 mantenute alla luce (Tesi LL) oppure ombreggiate ma collegate “in rete” con una pianta esposta alla luce (Tesi LB lat) o con una pianta anch’essa ombreggiata (Tesi BB), dopo 3 mesi dall’inizio dell’ombreggiamento. Lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

Esperimento II anno

Visto il comportamento simile dimostrato dai 2 portinnesti posti a confronto, nell’esperimento condotto l’anno successivo sono state utilizzate soltanto piante di Mr.S. 2/5 micorrizzate con il fungo *G. mosseae*. Dal momento che nelle piante ombreggiate con il sistema utilizzato precedentemente si era manifestato il blocco dell’apice, provocando l’arresto completo dell’allungamento della parte aerea, nell’esperimento svolto successivamente l’ombreggiamento è stato realizzato, come precedentemente descritto, secondo due differenti modalità che provocavano una riduzione dell’intensità luminosa molto differente.

Le piante micorrizzate di Mr.S. 2/5 utilizzate per la realizzazione della comune rete micorrizica nel terreno presentavano una colonizzazione radicale del $28.8 \pm 3.6\%$; nel corso della prova le ife fungine extraradicali della pianta centrale di ciascun microcosmo raggiungevano le piante laterali inizialmente non micorrizzate e, dopo 1

mezzo mese, queste risultavano aver raggiunto una percentuale della lunghezza delle radici infette del $18.2 \pm 4.2\%$. Accertata la presenza di tale rete micorrizica nel suolo, le piante sono state ombreggiate secondo le modalità descritte precedentemente in modo da poter valutare l'eventuale influenza delle connessioni ifali sullo sviluppo delle piante poste in posizione laterale, nelle diverse condizioni di illuminazione. In questo esperimento, pertanto, i confronti statistici sono stati effettuati solo sulle piante laterali.

A differenza dell'esperimento precedente, il germoglio delle piante ombreggiate, pur avendo un accrescimento ridotto rispetto a quello delle piante mantenute in condizioni di piena luce (LL), non è rimasto completamente bloccato, indicando che le differenti modalità usate per ridurre l'intensità luminosa hanno evitato il completo arresto dell'apice (Fig. 31).

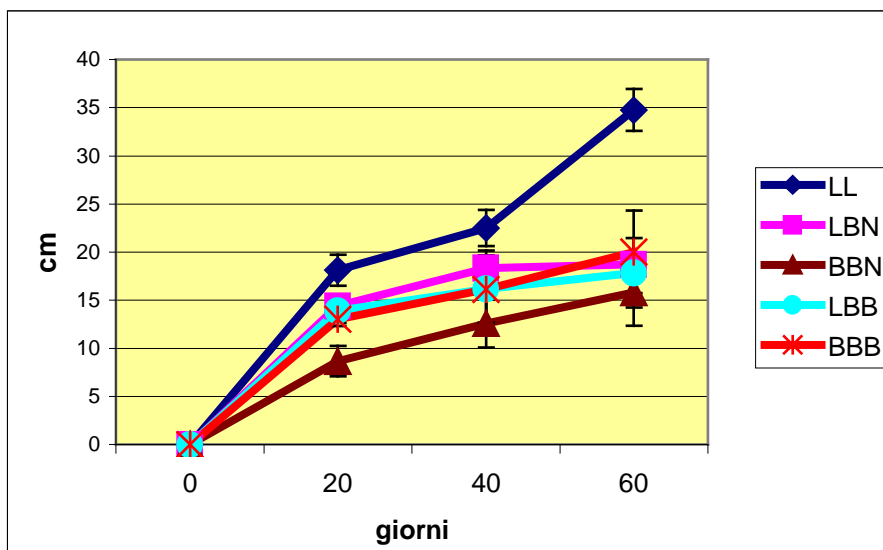


Fig. 31 - Incremento di crescita della parte aerea di piante "in rete" di Mr.S. 2/5 mantenute in piena luce (LL), ombreggiate ma collegate "in rete" con una pianta illuminata (LBN= ombreggiamento nero, LBB = ombreggiamento bianco) oppure ombreggiate ma interconnesse con un'altra pianta ombreggiata (BBN= ombreggiamento nero, BBB = ombreggiamento bianco) dopo 20, 40 e 60 giorni dal momento dell'ombreggiamento.

Confrontando statisticamente la lunghezza dei germogli laterali dopo 20, 40 e 60 giorni dal momento dell'ombreggiamento (Tab. 10) possiamo osservare che, già

dopo 20 giorni, le piante ombreggiate della tesi BBN mostravano un incremento di crescita inferiore rispetto a quello registrato in piante ombreggiate con cappucci neri ma collegate tramite le ife con una pianta alla luce (tesi LBN). Al contrario queste ultime hanno mostrato un incremento di crescita comparabile a quello rilevato nelle piante alla luce (tesi LL). Nelle piante ombreggiate con i cappucci bianchi le differenze osservate sono risultate meno accentuate e solo all'ultimo rilievo la lunghezza totale del germoglio delle tesi LBB e BBB e' risultata statisticamente minore rispetto a quella della tesi LL (Tab. 10).

Trattamento	Altezza (cm)		
	20 gg	40 gg	60 gg
LL	28.4 a	32.7 a	43.7 a
LBN	25.7 a	29.6 ab	31.8 ab
BBN	18.9 b	22.8 b	26.1 b
LBB	22.1 ab	24.3 ab	26.9 b
BBB	21 ab	24.1 ab	27.9 b

Tab. 10 - Lunghezza totale del germoglio di piante di Mr.S. 2/5 mantenute in piena luce (LL), ombreggiate ma collegate "in rete" con una pianta illuminata (LBN= ombreggiamento nero, LBB = ombreggiamento bianco) oppure ombreggiate ma interconnesse con un'altra pianta ombreggiata (BBN=ombreggiamento nero, BBB = ombreggiamento bianco), dopo 20, 40 e 60 giorni dall'inizio dell'ombreggiamento. Nelle colonne, lettere diverse corrispondono a valori statisticamente diversi per $p \leq 0.05$.

Dopo 2 mesi di ombreggiamento, il peso delle piante ombreggiate con i cappucci bianchi (LBB e BBB) e' risultato ridotto, rispetto a quello delle piante allevate in piena luce, in misura minore rispetto a quello ottenuto con i cappucci neri (LBN e BBN), sia per la crescita del germoglio che per quella della radice (Fig. 32).

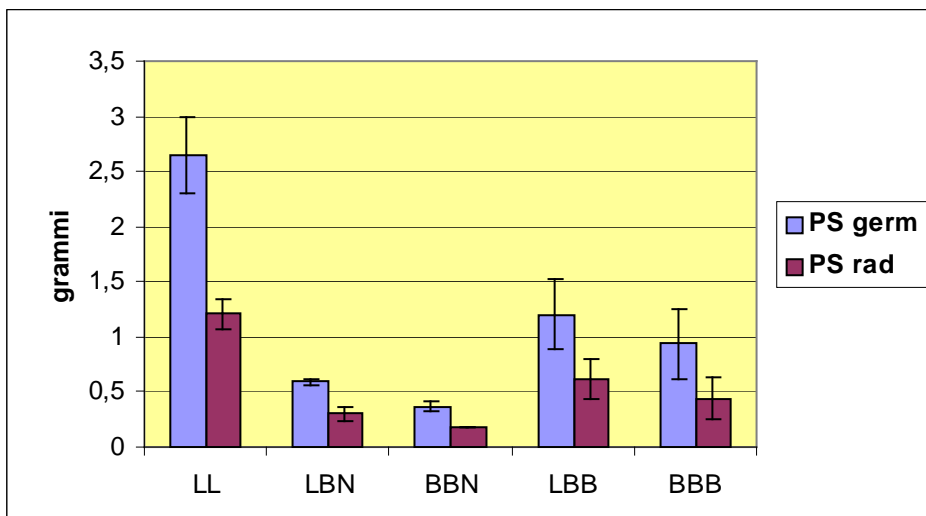


Fig 32 - Peso secco del germoglio e della radice di piante laterali di Mr.S. 2/5 mantenute in piena luce (LL), ombreggiate ma collegate “in rete” con una pianta illuminata (LBN= ombreggiamento nero, LBB = ombreggiamento bianco) oppure ombreggiate ma interconnesse con un'altra pianta ombreggiata (BBN= ombreggiamento nero, BBB = ombreggiamento bianco) dopo 60 giorni dal momento dell'ombreggiamento.

L'analisi statistica dei risultati ottenuti ha evidenziato che, nel caso dell'ombreggiamento con cappucci neri, al termine dell'esperimento le piante ombreggiate presentavano tutte una notevole riduzione dell'accrescimento, sia in termini di peso fresco che secco, rispetto alle piante esposte alla luce (LL) (Tab. 11).

TESI	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Sost. Secca (%)
LL	7,74 a	2,66 a	34,0 a
LBN	2,12 b	0,59 b	28,7 a
BBN	1,27 c	0,38 c	28,6 a

Tab. 11 - Peso fresco, peso secco e percentuale di sostanza secca del germoglio di piante di Mr.S. 2/5 esposte alla luce (LL) o ombreggiate ma collegate tramite le ife extraradicali con una pianta esposta alla luce (LBN) o con una pianta anch'essa ombreggiata (BBN), dopo 60 giorni dal momento dell'ombreggiamento. Nelle colonne valori seguiti da lettere diverse risultano statisticamente diversi per $p \leq 0.05$; (il confronto statistico del PF e PS e' stato effettuato dopo trasformazione logaritmica).

E' risultatao, pero', che le piante ombreggiate della tesi LBN presentavano un peso fresco e secco della parte aerea statisticamente maggiore rispetto a quelle della tesi BBN, mentre la percentuale di sostanza secca del germoglio non e' risultata statisticamente differente (Tab. 11).

Anche il peso dell'apparato radicale e' risultato notevolmente ridotto per effetto dell'ombreggiamento (Tab 12); tuttavia mentre il peso fresco radicale, pur essendo maggiore nella tesi LL, non e' risultato diverso nelle tesi LBN e BBN, il peso secco della radice nella tesi LBN e' risultato statisticamente maggiore rispetto a quello della tesi BBN. Confrontando i valori della sostanza secca espressi in percentuale possiamo osservare che la tesi BBN presentava un contenuto di sostanza secca statisticamente minore rispetto alla tesi LL anche se non statisticamente differente rispetto a quello della tesi LBN. La colonizzazione radicale, infine, pur risultando piu' bassa nelle piante ombreggiate, non presentava differenze statisticamente significative tra le varie tesi confrontate (Tab. 12).

TESI	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Sost. Secca (%)	Lungh rad micorrizate (%)
LL	4,06 a	1,22 a	30,0 a	47.8 a
LBN	1,07 b	0,31 b	28,1 ab	42.9 a
BBN	0,74 b	0,17 c	22,5 b	33.4 a

Tab. 12 - Peso fresco e secco, percentuale di sostanza secca e percentuale di micorrizzazione dell'apparato radicale di piante di Mr.S. 2/5 esposte alla luce (LL) o ombreggiate ma collegate tramite le ife extraradicali con una pianta esposta alla luce (LBN) o con una pianta anch'essa ombreggiata (BBN), dopo 60 giorni dal momento dell'ombreggiamento. Nelle colonne valori seguiti da lettere diverse risultano statisticamente diversi per $p \leq 0.05$ (test di Duncan); il confronto statistico del PF e PS e' stato effettuato dopo trasformazione logaritmica.

Nel caso dell'ombreggiamento realizzato con i cappucci bianchi, con i quali la riduzione di intensita' luminosa era circa la meta' rispetto all'altro tipo di ombreggiamento, gli effetti riscontrati nel caso precedente sono risultati meno evidenti, soprattutto per quel che riguarda la crescita del germoglio.

Al termine della prova, infatti, il peso fresco e secco del germoglio sono risultati statisticamente uguali nelle tesi LBB e BBB anche se inferiori rispetto alle piante della tesi LL e il contenuto percentuale di sostanza secca, pur essendo decisamente minore nella tesi BBB rispetto alle tesi LL e LBB, non e' risultato statisticamente differente nei 3 trattamenti confrontati (Tab. 13).

TESI	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Sost. Secca (%)
LL	7.74 a	2.66 a	34.09 a
LBB	3.60 b	1.20 b	32.69 a
BBB	3.39 b	0.94 b	27.36 a

Tab. 13 - Peso fresco e secco e percentuale di sostanza secca del germoglio di piante di Mr.S. 2/5 esposte alla luce (LL) o ombreggiate ma collegate tramite le ife extraradicali con una pianta esposta alla luce (LBB) o con una pianta anch'essa ombreggiata (BBB). Nelle colonne valori seguiti da lettere diverse risultano statisticamente diversi per $p \leq 0.05$ (test di Duncan).

Nel caso dello sviluppo radicale, invece, possiamo notare che la percentuale di sostanza secca e' risultata significativamente minore nella tesi BBB rispetto sia alle piante cresciute alla luce (LL) che rispetto a quelle della tesi LBB. La colonizzazione radicale, infine, non presentava differenze significative tra le varie tesi confrontate (Tab. 14) .

TESI	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Sost. Secca (%)	% lungh rad micorrizate
LL	4.06 a	1.22 a	30.60 a	47.85 a
LBB	2.00 ab	0.62 ab	30.03 a	46.32 a
BBB	1.91 b	0.44 b	23.45 b	43.31 a

Tab. 14 - Peso fresco e secco e percentuale di sostanza secca dell'apparato radicale di piante di Mr.S. 2/5 esposte alla luce (LL) o ombreggiate ma collegate tramite le ife extraradicali con una pianta esposta alla luce (LBN) o con una pianta anch'essa ombreggiata (BBN). Nelle colonne valori seguiti da lettere diverse risultano statisticamente diversi per $p \leq 0.05$ (test di Duncan).

2 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica sullo sviluppo intra ed extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari

2.1 - Esperimento 2A. Valutazione “time-course dell'estensione e della struttura della rete micorrizica extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO₂”

Piante di Mr.S. 2/5, che presentavano una colonizzazione micorrizica del 34.4%, sono state utilizzate per la realizzazione di un esperimento “time-course” avente lo scopo di valutare l'influenza della concentrazione di CO₂ atmosferica sullo sviluppo del micelio extraradicale in termini di estensione, tempi e modalita' di formazione della rete micorrizica. Il sistema bidimensionale *in vivo* utilizzato (metodo sandwich) ha permesso di visualizzare la rete fungina intatta e di rilevare vari parametri relativi allo sviluppo del micelio prodotto a tempi successivi.

Dopo 5 giorni dall'inserimento dell'apparato radicale tra le membrane, in tutte le piante era gia' rilevabile la produzione di ife extraradicali e dopo 12 giorni un'estesa rete miceliare, visibile anche ad occhio nudo, circondava l'apparato radicale delle piante di Mr.S. 2/5 in entrambi i trattamenti. L'estensione di tale rete micorrizica extraradicale, oltre ad aumentare significativamente nel corso dell'esperimento (Tab. 15b), risultava statisticamente stimolata dall'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica; infatti la lunghezza totale delle ife prodotte da ogni pianta micorrizzata passava, nel corso della prova, da 1968 mm a 7338 mm con 350 ppm di CO₂, mentre con 700 ppm tale parametro era 2525 mm e 12341 mm dopo 5 e 12 giorni rispettivamente (Tab. 15a). In particolare risultava influenzata dalla maggiore quantita' di CO₂ presente, con una significativita' decisamente elevata ($p \leq 0.001$), la densita' delle ife per unita' di superficie; questa, dopo 12 giorni di sviluppo, aveva raggiunto un valore di 1.99 mm/mm² con 350 ppm di CO₂, mentre con 700 ppm di CO₂ la densita' era 3.17 mm/mm² (tab. 15a). Per questo parametro e' stata messa in evidenza anche una interazione significativa dei fattori sperimentali considerati (tempo x concentrazione CO₂) (Tab. 15b). La stimolazione esercitata dalla maggiore disponibilita' di CO₂ sulla densita' delle ife determinava cosi' la formazione di una fitta rete di ife a maglie piu' strette come e' possibile constatare confrontando le immagini della Fig. 33.

Al contrario, l'ampiezza dell'area coperta dalla rete miceliare esterna, pur aumentando nel tempo, non risultava statisticamente influenzata dalla concentrazione di CO₂ (Tab. 15 a,b).

La lunghezza delle radici incrementava significativamente nel tempo ma non era statisticamente influenzata dalla concentrazione di CO₂ atmosferica; la percentuale di colonizzazione non variava significativamente nel corso della prova e pertanto anche la lunghezza delle radici colonizzate non subiva incrementi (tab. 15a).

	5 giorni		7 giorni		9 giorni		12 giorni	
	350	700	350	700	350	700	350	700
Lunghezza radici (mm)	1786±135	1783±191	1770±253	1934±129	1865±141	2234±180	2496±78	2367±160
Colonizzaz. MA (% lungh. radici)	34.28±4.22	33.02±3.67	29.40±1.69	37.97±1.96	38.26±2.46	39.74±6.86	36.99±2.48	26.72±4.59
Lunghezza radici micorrizate (mm)	612±89	603±114	524±88	738±79	706±39	892±166	920±38	627±93
Densita' ifale (mm mm⁻²)	1.47±0.16	1.63±0.12	1.56±0.19	2.06 ±0.06	1.62±0.21	1.71±0.13	1.99±0.09	3.17±0.16
Area micelio extraradicale (mm²)	1278±323	1527±206	2729±905	3729±796	2629±474	3097±833	3687±248	3946±657
Lunghezza totale ife (mm)	1968±602	2525±448	4611±2041	7770±1808	4430±1052	5488±1880	7338 ±616	12341±1657
Lungh. ife/lungh. radici (mm/mm)	1.05±0.27	1.38±0.11	2.67±1.05	4.11±1.08	2.38±0.57	2.37±0.66	2.93±0.16	5.28±0.91
Lungh. ife/ lungh. radici micorrizate (mm/mm)	2.93±0.64	4.23±0.20	8.85±3.12	10.87±1.99	6.31±1.42	6.06±1.33	8.02±0.81	19.87±1.10

Tab. 15a - Incremento nel tempo della lunghezza dell'apparato radicale, della colonizzazione micorrizica e della estensione del micelio extraradicale prodotto dal fungo micorrizico arbuscolare *Glomus mosseae* in simbiosi con piante di Mr.S. 2/5, in presenza di due differenti concentrazioni di CO₂ atmosferica (350 e 700 ppm).

	Tempo	CO ₂	Interazione
Lunghezza radici	**	ns	ns
Colonizzaz. MA	ns	ns	ns
Lunghezza radici micorrizate	ns	ns	ns
Densita' ifale	***	***	*
Area micelio extraradicale	**	ns	ns
Lunghezza totale ife	***	*	ns
Lunghezza ife/lunghezza radici	***	*	ns
Lungh. ife/lungh. radici micorrizate	***	**	**

Tab. 15b - Risultati dell' ANOVA a 2 vie: ns = non significativo, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$

Dal momento che l'incremento della concentrazione di CO₂ determinava una maggiore estensione della rete micorrizica extraradicale, mentre la lunghezza radicale non era influenzata, la lunghezza delle ife extraradicali prodotte per unita' di lunghezza di radice (mm/mm) risultava significativamente aumentata con 700 ppm di CO₂ e, alla fine dell'esperimento, tale parametro risultava quasi doppio (Tab. 15 a). Quando la lunghezza delle ife extraradicali e' stata espressa per unita' di radice colonizzata, le differenze sono risultate ancora piu' evidenti: dopo 12 giorni, infatti, mentre con 350 ppm di CO₂ sono state prodotte 8.02 mm di ife per mm di radice micorrizata, con 700 ppm di CO₂ sono state prodotte 19.87 mm di ife per ogni mm di radice micorrizata.

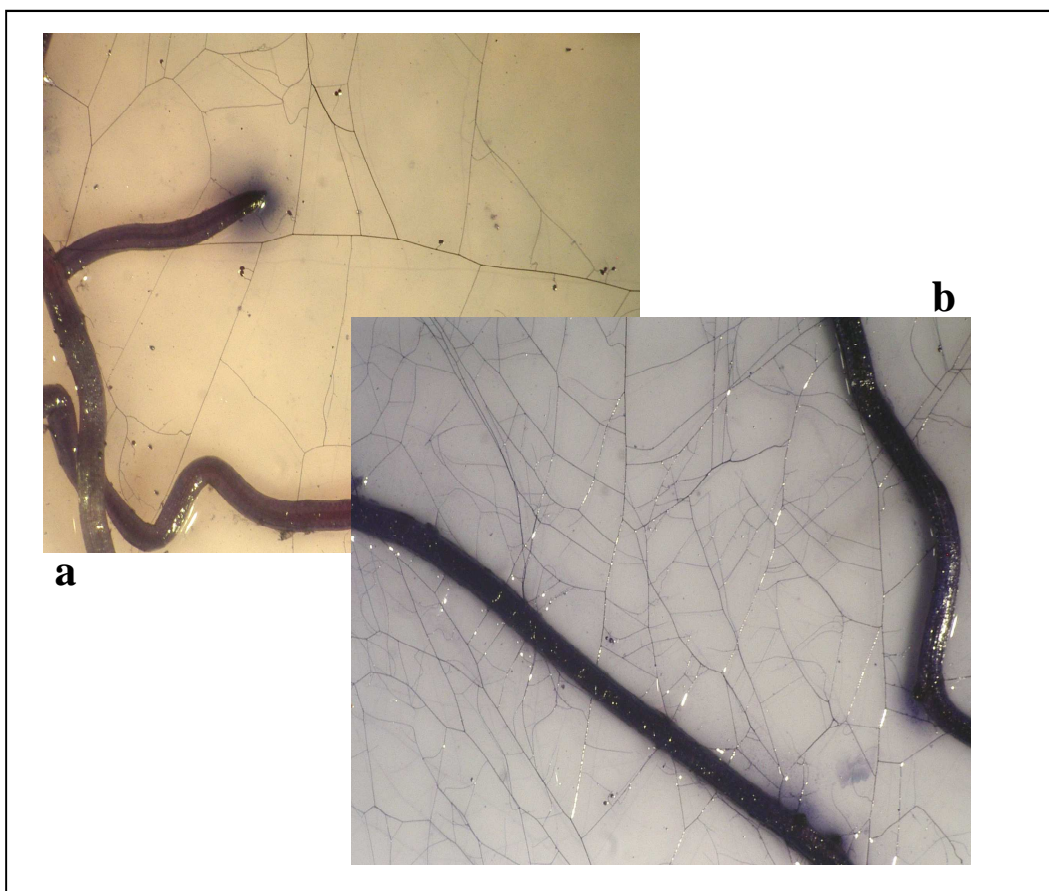


Fig. 33 - Rete micorrizica extraradicale prodotta da piante di Mr.S. 2/5 colonizzate dal fungo *G. mosseae* dopo 12 giorni di sviluppo in presenza di una concentrazione di 350 (a) o di 700 (b) ppm di CO₂.

2.2 - Determinazione del fattore di conversione del fungo *G. mosseae* per la valutazione della biomassa fungina

Per poter quantificare la biomassa fungina intra ed extraradicale prodotta alle diverse concentrazioni di CO₂ saggiate, e' stato necessario stimare, preliminarmente, il fattore di conversione necessario per trasformare il contenuto di glucosamina determinato nelle radici in quantita' di micelio fungino.

Il micelio utilizzato per tale determinazione, prodotto all'interno di membrane da piante di Mr.S. 2/5 micorrizzate con il fungo MA *G. mosseae* (metodo sandwich), aveva un peso secco di 2.45 mg. Il contenuto di glucosamina e' stato determinato

spettrofotometricamente dopo trattamento di 3 diversi “sub-campioni” ottenuti dalla degradazione del campione di micelio iniziale ed i dati ottenuti sono riportati nella tab. 16.

	Contenuto GLC (µg)	µg GLC/mg di fungo
Campione 1	171.8	70.1
Campione 2	170.7	69.7
Campione 3	158.6	64.7
MEDIA	167.0	68.2

Tab. 16 - Contenuto di glucosamina totale (GLC) ed espresso per unita' di peso secco di micelio fungino determinato spettrofotometricamente su micelio extraradicale prodotto da piante di *P. cerasifera* (Mr.S. 2/5) micorrizate con il fungo *G. mosseae*.

La quantita' di glucosamina contenuta nel micelio extraradicale del fungo MA *G. mosseae* risulta pertanto 68.2 ± 1.7 µg per mg di peso secco. Tale fattore di conversione permette la stima della biomassa fungina a partire dal contenuto di glucosamina e puo' essere utilizzato in tutti i casi in cui non e' possibile effettuare una misurazione diretta della quantita' di micelio, ad esempio quando le ife raccolte non sono sufficienti per essere pesate o per la determinazione della biomassa fungina intraradicale.

2.3 - Esperimento 2B - Valutazione “time-course” dell’estensione della rete micorrizica extraradicale e determinazione della biomassa fungina intra ed extraradicale con 2 differenti concentrazioni di CO₂

Esperimento preliminare - L’esperimento realizzato per saggiare il differente sistema di mantenimento della concentrazione di CO₂, ha fornito risultati analoghi a quelli dell’esperimento precedente. Dopo 5 giorni di sviluppo tutte le piante mostravano la

presenza di una rete micorrizica extraradicale ma nessun parametro analizzato mostrava differenze significative tra le 2 diverse concentrazioni di CO₂ utilizzate (Tab. 17). Al contrario, dopo 10 giorni di sviluppo, la maggiore disponibilit  di CO₂ ha determinato un significativo incremento della lunghezza totale del micelio extraradicale che, nelle piante micorrizzate con *G. mosseae* e mantenute a 850 ppm di CO₂, aveva un'estensione di 23457 mm mentre nelle piante mantenute alla concentrazione ambientale di CO₂ aveva una lunghezza di 11297 mm.

	5 giorni		10 giorni	
	ambiente	elevata	ambiente	elevata
Lunghezza radici (mm)	3518 a	3297 a	3374 a	3254 a
Colonizzaz. MA (% lungh. radici)	23.9 a	26.2 a	36.2 a	43.4 a
Lunghezza radici micorrizzate (mm)	826 a	863 a	1227 a	1411 a
Densita' ifale (mm mm ⁻²)	1.71 a	1.86 a	1.99 a	2.86 b*
Area micelio extraradicale (mm ²)	2861 a	2004 a	5691 a	8156 a
Lunghezza totale ife (mm)	5048 a	3771 a	11297 a	23457 b*
Lunghezza ife/lunghezza totale radici (mm mm ⁻¹)	1.44 a	1.15 a	3.34 a	7.45 b
Lungh. ife/lungh. totale radici micorriz. (mm mm ⁻¹)	6.25 a	4.48 a	9.38 a	17.29 b

Tab. 17 - Incremento nel tempo della lunghezza dell'apparato radicale, della colonizzazione micorrizica e della estensione del micelio extraradicale prodotto dal fungo MA *Glomus mosseae* in simbiosi con piante di Mr.S. 2/5, in presenza di una concentrazione ambientale o elevata (850 ppm) di CO₂ atmosferica. Nelle righe, per ciascun rilievo, valori seguiti dalla stessa lettera risultano statisticamente diversi per $p \leq 0.05$ o * $p \leq 0.01$ (t-test).

Anche in questo caso la maggiore produzione di ife extraradicali alla concentrazione maggiore di CO₂ non dipendeva da una maggiore estensione dell'area occupata dalla rete micorrizica esterna ma dalla maggiore densita' ifale della suddetta rete che passava da 1.99 mm/mm² a 2.86 mm/mm² (Tab. 17). Nel corso dell'esperimento, la concentrazione di CO₂ non ha avuto effetto sulla estensione dell'apparato radicale ne' sulla colonizzazione micorrizica del fungo *G. mosseae*. Rapportando la produzione di ife alla estensione dell'apparato radicale possiamo osservare che la maggiore disponibilita' di CO₂ ha determinato un effetto particolarmente significativo dal momento che la lunghezza delle ife prodotte per unita' di radice e' risultata piu' che raddoppiata con la concentrazione maggiore di CO₂.

Esperimento principale

I risultati di questo esperimento mostrano che la maggiore disponibilita' di CO₂ stimola la produzione di micelio extraradicale sia in termini di estensione sia in termini di quantita' di biomassa prodotta. La lunghezza totale delle ife extraradicali, infatti, e' aumentata nel corso della prova da 985 a 10701 mm alla concentrazione ambientale di CO₂ mentre con la concentrazione piu' elevata tale parametro e' passato da 2375 a 20268 mm, dopo 5 e 12 giorni rispettivamente (Tab. 18); oltre ad un effetto significativo del tempo e della disponibilita' di CO₂ su questo parametro, l'analisi statistica ha messo in evidenza anche una significativa interazione tra questi 2 fattori (tempo x CO₂). Anche in questo caso l'incremento dell'estensione del micelio extraradicale e' da mettere in relazione alla formazione, da parte delle piante micorrizzate, di una rete miceliare piu' fitta; a concentrazioni elevate di CO₂, infatti, la densita' ifale dopo 12 giorni di crescita e' risultata di 3.01 mm/mm² rispetto ad una densita' di 1.99 mm/mm² ottenuta a concentrazione ambientale di CO₂. Al contrario, l'area occupata dal micelio extraradicale, pur aumentando significativamente nel tempo, non e' stata significativamente influenzata dalla maggiore concentrazione di CO₂ (Tab. 18).

	5 giorni		8 giorni		12 giorni	
	ambiente	elevata	ambiente	elevata	ambiente	elevata
Lunghezza radici (mm)	1290±136	1221±133	1309±153	1952±308	1971±201	2481±196
Colonizzaz. MA (% lungh. radici)	24.1±3.37	29.4±4.3	28.3±11	30.8±5.24	35.9±3.6	42.9±2.9
Lungh. radici micorriz (mm)	303±35	370±97	364±152	640±163	727±130	1060±98
Densita' ifale (mm mm ⁻²)	1.43±0.16	1.90±0.21	1.58±0.31	2.44±0.29	1.99±0.17	3.01±0.18
Area micelio extrarad (mm ²)	645±186	1228±321	2196±843	3311±722	5455±863	6826±478
Lunghezza totale ife (mm)	985±359	2375±788	3743±1558	8611±2308	10701±1764	20268±1015
Lunghezza ife/lungh totale radici (mm/mm)	0.71±0.20	1.85±0.40	2.98±1.30	4.18±1.01	5.30±0.44	8.35±0.71
Lungh ife/lungh radici micorr (mm/mm)	3.10±0.84	6.21±0.41	9.92±0.96	13.3±1.7	14.91±0.99	19.55±1.31

	Tempo	CO ₂	Interazione
Lunghezza radici (mm)	***	ns	ns
Colonizzaz. MA (% lungh. radici)	*	ns	ns
Lunghezza radici micorrizate (mm)	***	*	ns
Densita' ifale (mm mm ⁻²)	**	***	ns
Area micelio extraradicale (mm ²)	***	ns	ns
Lunghezza totale ife (mm)	***	***	*
Lunghezza ife/lungh totale radici (mm mm ⁻¹)	***	**	ns
Lunghezza ife/lungh totale radici micorrizate (mm mm ⁻¹)	***	**	ns

Tab. 18 - Incremento nel tempo della lunghezza dell'apparato radicale, della colonizzazione micorrizica e della estensione e struttura del micelio extraradicale prodotto dal fungo MA *Glomus mosseae* in simbiosi con piante di Mr.S. 2/5, in presenza di una concentrazione ambientale o elevata (850 ppm) di CO₂ atmosferica. Valori di significativita' ottenuti tramite ANOVA a 2 vie: ns = non significativo, * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01, *** P ≤ 0.001

Analogamente, il breve periodo di esposizione a concentrazioni elevate di CO₂ non ha determinato un significativo incremento della lunghezza dell'apparato radicale che, pur aumentando statisticamente nel tempo, ha mostrato differenze tra i due trattamenti scarsamente significative (p= 0.054). Con concentrazione più elevata di CO₂ i valori della percentuale di colonizzazione micorrizica e della lunghezza delle radici micorrizzate tendevano ad essere leggermente più alti, ma tali differenze tra i due trattamenti non sono risultate statisticamente significative. La stimolazione esercitata dalla maggiore disponibilità di CO₂ sulla produzione di micelio extraradicale risultava altamente significativa esprimendo la lunghezza delle ife per unità di lunghezza di radice: dopo 12 giorni di sviluppo, infatti, con concentrazioni elevate di CO₂, le piante micorrizzate con *G. mosseae* producevano 8.35 mm ife/mm di radice e 19.5 mm di ife/mm di radice micorrizzata rispetto ai 5.3 mm ife/mm di radice e 14.9 mm di ife/mm di radice micorrizzata prodotti a concentrazioni ambientali di CO₂ (Tab. 18).

La colorazione con DAPI di alcune membrane sulle quali si era sviluppata la rete ifale intatta ha dimostrato che, dopo 12 giorni di crescita, tutto il micelio extraradicale era vitale, sia con concentrazioni ambientali di CO₂ che con livelli più elevati di tale gas (Fig. 34).

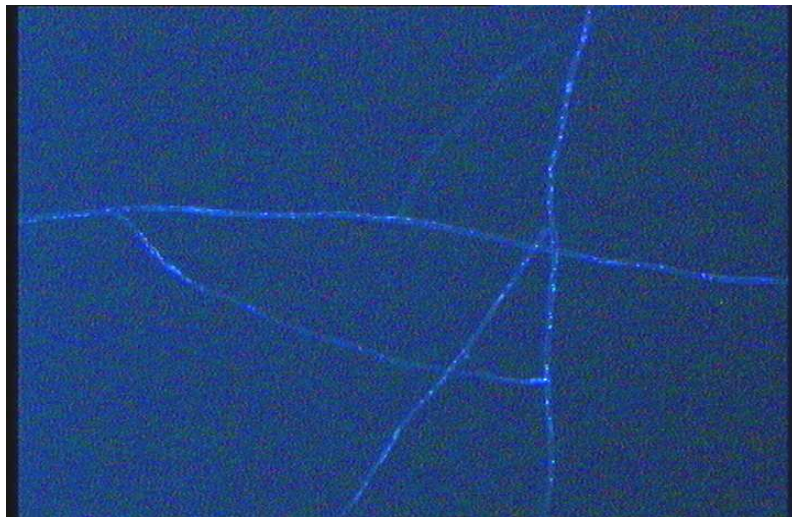


Fig. 34- Micelio extraradicale prodotto da piante micorrizzate con *G. mosseae* visualizzato mediante colorazione con DAPI e osservazione al MO a epifluorescenza.

Al termine della prova e' stato valutato, inoltre, l'effetto determinato dalla maggiore disponibilita' di CO₂ sullo sviluppo in termini quantitativi del fungo micorrizico all'interno ed all'esterno della radice, andando a stimare la biomassa fungina presente nelle radici e nel micelio extraradicale raccolto da ogni pianta. Il contenuto di glucosamina misurato nelle radici e nel micelio extraradicale raccolto da ciascuna pianta e' risultato piu' alto in presenza di concentrazione piu' elevate di CO₂ atmosferica (Tab. 19).

	Concentrazione di CO₂	
	ambiente	elevata
GLC intraradicale (µg/mg di radice)	0.174±0.02	0.252±0.04
GLC extraradicale (µg)	5.7±1.04	12.7±2.15

Tab. 19 - Contenuto di glucosamina (GLC) intraradicale (µg/mg di radice) ed extraradicale di piante di Mr.S. 2/5 micorrizzate con il fungo *G. mosseae* dopo 12 giorni di sviluppo, in presenza di una concentrazione ambientale o elevata (850 ppm) di CO₂ atmosferica.

Utilizzando il fattore di conversione stimato precedentemente per il fungo *G. mosseae*, e' stato possibile determinare la quantita' di biomassa intra ed extraradicale prodotta in condizioni di differente concentrazione di CO₂, rapportando tali valori allo sviluppo ponderale delle piante.

La maggiore disponibilita' di CO₂ ha determinato la produzione di una quantita' di biomassa fungina extraradicale circa 3 volte maggiore rispetto a quella ottenuta a concentrazioni ambientali di CO₂ (Tab. 20); in quest'ultimo trattamento, infatti, dopo 12 giorni di sviluppo, erano presenti 83.9 µg di ife per ciascuna pianta mentre ad elevata concentrazione di CO₂ erano stati prodotti 234 µg di micelio extraradicale (Tab. 20). Considerando che, nel breve periodo di esposizione a

concentrazioni piu' elevate di CO₂, il peso secco del germoglio e della radice non sono risultati statisticamente diversi, anche esprimendo la quantita' di biomassa fungina extraradicale per unita' di peso secco, si ottengono valori statisticamente maggiori nelle piante mantenute ad elevata concentrazione di CO₂ (Tab. 20).

	Concentrazione di CO₂	
	ambientale	elevata
Peso secco radicale (mg)	34.0±3.8 a	40.7±4.2 a
Peso secco del germoglio (mg)	65.0±4.35 a	92.67±11.89 a
Biomassa fungina intrarad (µg)	84.6±2.1 a	148.9±23.1 b
Biomassa fungina extrarad (µg)	83.9±15.2 a	243±31.5 b
Biomassa fungina intrarad / PS radicale (µg/mg)	2.55±0.26 a	3.70±0.60 a
Biomassa fungina extrarad / PS radicale (µg/mg)	2.49±0.39 a	6.00±0.69 b
Biomassa fung extrarad / biomassa fung intrarad	0.984±0.15 a	1.649±0.08 b

Tab. 20 - Peso secco radicale e biomassa fungina intra e extraradicale prodotta dal fungo *Glomus mosseae* in simbiosi con piante di *Prunus cerasifera* in presenza di CO₂ di una concentrazione ambientale o elevata (850 ppm) di CO₂ atmosferica. Nelle righe, valori seguiti dalla stessa lettera non sono statisticamente differenti per P≥0.05 (T-test).

Per quanto riguarda lo sviluppo del fungo all'interno della radice, e' possibile osservare che, a concentrazione piu' elevata di CO₂, la biomassa intraradicale prodotta e' risultata significativamente piu' elevata rispetto a quella prodotta a condizioni ambientali di CO₂, ma esprimendo tali valori in rapporto al peso secco della radice le differenze non risultavano statisticamente rilevanti (Tab. 20).

La stimolazione esercitata dalla maggiore disponibilit  di carbonio sulla produzione di reti micorriziche extraradicali risulta evidente anche in rapporto alla quantit  di biomassa fungina sviluppata all'interno della radice. E' molto interessante osservare infatti che, calcolando il rapporto tra biomassa extraradicale e intraradicale, il valore ottenuto alla concentrazione pi  elevata di CO₂ e' di 1.6 µg di micelio extraradicale per ogni µg di micelio intraradicale e tale valore risulta statisticamente maggiore rispetto a quello di 0.98 ottenuto alla concentrazione ambientale di CO₂ (Tab. 20).

DISCUSSIONE

1 - Studio della formazione e della funzionalità nelle piante arboree da frutto di reti micorriziche extraradicali intra o interspecifiche

1.1 - Visualizzazione dell'esistenza e delle modalità di realizzazione di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti

Gli esperimenti condotti hanno permesso di dimostrare che piante arboree della stessa specie o di specie differente possono essere collegate tramite le ife extraradicali prodotte dal simbionte fungino e che non esistono differenze significative nella formazione di reti micorriziche extraradicali intraspecifiche o interspecifiche. A queste conclusioni si è giunti sia mediante la visualizzazione diretta (Figg. 18, 19 e 20) del sistema ifale di interconnessione (esperimento 1a), sia mediante esperimenti in suolo nei quali la realizzazione di una comune rete micorrizica tra le specie presenti veniva dedotta in maniera indiretta (esperimento 1b) mediante l'individuazione, all'interno di radici di piante non inoculate, delle strutture infettive fungine prodotte da parte delle ife extraradicali provenienti da piante micorrizzate contigue (Fig. 21). Avendo inizialmente privato la pianta micorrizzata di tutto il micelio extraradicale prodotto e non essendosi ancora verificata la produzione di spore da parte dell'endofita fungino, la colonizzazione delle piante non micorrizzate era da ritenersi realizzata attraverso le ife extraradicali che fuoriuscivano dalla pianta micorrizzata.

L'esistenza di un collegamento tra piante contigue mediante la rete micorrizica extraradicale prodotta da funghi MA era stata evidenziata tra piante erbacee della stessa specie o di specie differente mediante autoradiografia (Francis & Read, 1984) o mediante osservazione diretta (Newman *et al.*, 1994), ma le modalità con cui questa continuità si realizza non sono state adeguatamente investigate. I rilievi effettuati nel presente lavoro, resi possibili mediante l'utilizzo di una tecnica "non-distruttiva" denominata "metodo sandwich" (Giovannetti *et al.* 2001), messa a punto precedentemente da questo gruppo di ricerca, ha permesso di seguire la formazione della rete micorrizica extraradicale intatta prodotta dai funghi *G. mosseae* o *G. intraradices* e di verificare l'esistenza di una continuità tra le ife esterne che

fuoriuscivano da una pianta di Mr.S. 2/5 e le radici di un'altra pianta di Mr.S. 2/5 o di GF 677.

Attraverso il successivo esperimento “time-course” effettuato in suolo e' stato possibile confermare la realizzazione di una comune rete micorrizica nel terreno, e verificare che la consistenza di tale sistema di interconnessione, almeno nelle associazioni fungo-pianta ospite da noi prese in considerazione, non differisce nelle combinazioni vegetali intra ed interspecifiche. Sebbene la possibilita' di formare comuni reti micorriziche anche tra specie vegetali differenti fosse un risultato atteso, vista la scarsa specificita' d'ospite che caratterizza i funghi MA, appare interessante constatare che la velocita' di realizzazione e la consistenza di tale sistema di interconnessione non manifesta differenze apprezzabili quando si realizza tra piante arboree di specie differente.

Esperimenti precedenti condotti con piante erbacee e realizzati con lo stesso “sistema bidimensionale *in vivo*” utilizzato nel presente lavoro, avevano preso in considerazione una differente modalita' di realizzazione del sistema di interconnessione ifale, dimostrando che le ife fungine extraradicali provenienti da una pianta micorrizzata sono in grado di fondere con le ife provenienti da un'altra pianta della stessa specie o di specie, genere o famiglia differente, colonizzata dallo stesso fungo, mediante la realizzazioni di anastomosi (Giovannetti *et al.*, 2004). In tale esperimento la frequenza della fusione tra le ife extraradicali provenienti da due piante erbacee della stessa specie era piu' alta (62%) rispetto a quella riscontrata quando le ife provenivano da piante differenti (44-48%) ma, in questo caso, le specie erbacee utilizzate erano piu' distanti da un punto di vista sistematico rispetto alle combinazioni prese in considerazione nel presente lavoro.

1.2 - Verifica della funzionalita' della comune rete micorrizica extraradicale come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale

I risultati ottenuti dimostrano che, in presenza di una comune rete micorrizica nel suolo, lo sviluppo di una pianta allevata in condizioni di ridotta intensita' luminosa puo' essere influenzato dalle condizioni di sviluppo di piante contigue. In particolare, il dato piu' significativo che emerge dalle prove condotte con entrambi i

portinnesti e' rappresentato dal maggiore accrescimento della radice, espresso come peso secco, delle piante ombreggiate cresciute in combinazione con una pianta mantenuta alla luce (tesi LB), rispetto a quello ottenuto in piante allevate in presenza di una pianta non illuminata (tesi BB) (vedi Tabb. 5 e 12). Nel caso di una drastica riduzione dell'intensita' luminosa, anche il peso del germoglio e' risultato significativamente maggiore dove era presente, all'interno del contenitore, una pianta illuminata (Tab. 11). Tuttavia, anche nei casi in cui il peso fresco o secco delle piante non mostrava differenze statisticamente rilevanti (Tabb. 8 e 14), il contenuto percentuale di sostanza secca delle piante cresciute con un'intensita' luminosa ridotta risultava significativamente aumentato se la pianta veniva allevata nello stesso contenitore con una pianta mantenuta in piena luce (Tabb. 9 e 14).

In conclusione, avendo precedentemente evidenziato l'esistenza di un sistema ifale di interconnessione tra le suddette piante, possiamo affermare che le piante ombreggiate collegate tramite le ife micorriziche extraradicali con una pianta alla luce (tesi LB) mostravano un maggiore accumulo di sostanza secca, soprattutto nelle radici, rispetto a quello rilevato in piante in cui le ife extraradicali stabilivano una connessione con piante non illuminate (tesi BB). In particolare, quando l'intensita' luminosa veniva ridotta al solo 3%, lo sviluppo della pianta "in rete" con una pianta illuminata era quasi il doppio rispetto a quello della pianta interconnessa con un'altra pianta ombreggiata (Tabb. 11 e 12).

I nostri risultati concordano con quelli ottenuti con mutanti non-fotosintetizzanti di tabacco nei quali e' stato ottenuto un numero di foglie e una biomassa del germoglio maggiore coltivando tali piante insieme con la pianta "wild-type" e in presenza del fungo MA (Muller & Dulieu, 1998).

Alla luce delle conoscenze scientifiche attuali, risulta verosimile ipotizzare che le risposte osservate possano essere state determinate dal passaggio di fotosintetati attraverso la comune rete micorrizica; ricerche effettuate da altri autori, infatti, oltre ad evidenziare l'esistenza di tale flusso attraverso l'impiego del ^{14}C , hanno anche dimostrato che il passaggio di fotosintetati si verifica attraverso le interconnessioni ifali (Francis & Read, 1984; Martins, 1993; Carey *et al.*, 2004). D'altra parte, soprattutto nel caso di funghi MA, dai dati disponibili in letteratura sembrerebbe che il C traslocato tendesse a restare nell'apparato radicale della pianta ricevente, con

scarse percentuali di traslocazione nel germoglio (Watkins *et al.*, 1996; Graves *et al.*, 1997; Fitter *et al.*, 1998). In effetti, anche nelle nostre prove, le risposte ottenute sono state maggiormente significative per lo sviluppo radicale mentre l'influenza sull'accrescimento del germoglio e' risultata meno evidente, tranne che in presenza di una drastica riduzione della disponibilita' di luce (esperimento II anno): in questo caso anche il peso fresco e secco del germoglio risultavano significativamente aumentati in presenza di un collegamento ifale con una pianta illuminata (Tab. 11). In altre parole, l'entita' delle risposte osservate sembra essere piu' consistente quando la disponibilita' luminosa e' molto bassa; confrontando infatti lo sviluppo di piante ombreggiate "in rete" con piante alla luce (tesi LB) con quello di piante ombreggiate "in rete" con un'altra pianta ombreggiata (tesi BB) abbiamo constatato che, nel caso di una drastica riduzione dell'intensita' luminosa ricevuta dalla pianta (esp. II anno), l'ombreggiamento della pianta interconnessa tramite le ife extraradicali riduceva il peso secco del germoglio e della radice del 36% e del 46% rispettivamente (Tabb. 11 e 12); nel caso invece di una riduzione piu' contenuta della disponibilita' di luce, la riduzione del peso secco del germoglio e della radice, che si verificava nella pianta "ricevente" in seguito all'ombreggiamento anche dell'altra pianta collegata tramite la rete miceliare, era del 22% e 29% rispettivamente (Tabb. 13 e 14). Cio' potrebbe dipendere dal fatto che, nel caso di una disponibilita' luminosa molto scarsa e, conseguentemente, di un'attivita' fotosintetica molto ridotta, la presenza di un collegamento tramite la rete micorrizica con una pianta esposta alla luce determina i maggiori vantaggi per lo sviluppo della pianta ombreggiata.

Queste considerazioni costituiscono un ulteriore elemento per avvalorare l'ipotesi di un passaggio di fotoassimilati dalla pianta illuminata a quella ombreggiata e sono in accordo con i risultati ottenuti da altri autori, i quali hanno osservato che il passaggio di C tra due piante interconnesse tramite il micelio risulta aumentato dall'ombreggiamento della pianta "ricevente" (Francis & Read, 1984; Finlay & Read, 1986).

D'altra parte e' necessario aggiungere che non essendo stato evidenziato un aumento dell'assimilazione della CO₂ nelle piante illuminate della tesi LB (Figg. 23 e 28) in risposta all'ombreggiamento delle piante interconnesse, non si puo' attribuire con certezza tale fenomeno ad un effetto di tipo nutrizionale, ma e' opportuno

considerare anche la presenza di fattori di diversa natura, legati ad esempio ad un differente svolgimento delle attività microbiche nel suolo, che potrebbero aver influito sul comportamento fisiologico della pianta. Bisogna tuttavia considerare anche che la metodologia usata per stimare l'incremento della attività fotosintetica nella pianta "donatrice", basato su misure istantanee dell'assimilazione di CO₂ attraverso gli stomi, potrebbe non essere stata adeguata a rilevare un fenomeno i cui effetti si sono realizzati in un intervallo di tempo relativamente lungo.

La possibilità di un reale vantaggio per la pianta ricevente come effetto del passaggio di C attraverso la rete micorrizica viene messa in discussione da alcuni autori i quali ritengono che, anche se si verifica il passaggio di carboidrati attraverso le ife, questi rimangono nei tessuti fungini intraradicali e non divengono disponibili per la nutrizione della pianta (Robinson & Fitter, 1999; Pfeffer *et al.*, 2004). Tuttavia, a tale proposito è stato suggerito che, anche se il C trasferito non venisse ceduto dal fungo alla pianta ricevente, potrebbero realizzarsi comunque vantaggi per la pianta in termini di riduzione della domanda di C da parte dell'endofita fungino o di maggior vigore fungino a spese di un'altra pianta (Simard & Durall, 2004; Selosse *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda la colonizzazione fungina all'interno della radice, le valutazioni espresse come percentuale della lunghezza delle radici infette hanno fornito dati non sempre concordi, ma che sembrerebbero evidenziare l'assenza di significative differenze nelle piante ombreggiate, indipendentemente dalle condizioni di illuminazione della pianta "in rete". Al contrario, il più elevato contenuto di glucosamina riscontrato nelle piante ombreggiate della tesi LB dimostrerebbe una maggiore presenza di biomassa fungina nelle piante cresciute in presenza di una pianta illuminata (tesi LB) rispetto a quelle "in rete" con una pianta non illuminata (tesi BB). Questo risultato, apparentemente contraddittorio, può derivare da differenti modalità di sviluppo intraradicale del fungo che, ad esempio, potrebbe realizzare un maggior numero di arbuscoli o di ife intercellulari, analogamente a quanto riportato in altri lavori (Rillig *et al.*, 1998). Considerando che alcuni autori hanno osservato una relazione tra la presenza di fotoassimilati nella radice e il livello di micorrizzazione radicale (Thomson *et al.*, 1990; Vierheilig *et al.*, 2002), sarebbe interessante verificare se la maggiore intensità della colonizzazione micorrizica

intraradicale osservata nelle piante ombreggiate “in rete” con una pianta illuminata (Tesi LB) possa essere messa in relazione ad un maggior flusso di carboidrati attraverso la rete micorrizica extraradicale. Utilizzando il fattore di conversione proposto da Frey et al. 1984 la biomassa fungina presente sarebbe 44.6 µg/mg di peso secco di radice nella tesi LB e 19.7 µg/mg nella tesi BB.

La possibile redistribuzione delle risorse attraverso la comune rete micorrizica, come quella ipotizzata per spiegare i risultati osservati, puo' essere visto come un meccanismo “source-sink” governato dalla piante ma, secondo una visione micocentrica delle relazioni pianta-fungo (Fitter *et al.*, 1998), puo' essere interpretato anche come un meccanismo governato dal fungo per dirigere il flusso delle sostanze verso le strutture intraradicali che piu' ne hanno necessita'. Non conoscendo ancora a fondo i meccanismi biochimici e fisiologici che regolano tale processo, mancano gli elementi per poter comprendere a fondo il significato ecologico di questo fenomeno. La constatazione che l'ombreggiamento aumenta il flusso di C verso la pianta ricevente (Francis & Read, 1984; Finlay & Read, 1986) e la maggiore intensita' della risposta determinata da riduzioni piu' drastiche dell'intensita' luminosa osservata nelle nostre prove, sembrerebbe indicare l'esistenza di un meccanismo governato dalle esigenze nutrizionali della pianta ma non si puo' escludere che, in condizione di scarsa disponibilita' di fotoassimilati, la riduzione del C traslocato dalla pianta al fungo simbiote attivi un meccanismo di richiamo da parte delle strutture intraradicali dell'endofita fungino.

2 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica sullo sviluppo intra ed extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari

Le prove condotte hanno permesso di dimostrare che la maggiore disponibilita' di CO₂ stimola la produzione di micelio extraradicale sia in termini di estensione sia in termini di quantita' di biomassa prodotta, determinando la realizzazione di reti micorriziche extraradicali piu' dense ed estese. La maggiore disponibilita' di C determina non solo una stimolazione della crescita fungina, ma anche una modificazione delle modalita' di sviluppo del simbiote fungino, attraverso

la modificazione dei rapporti quantitativi tra la fase extraradicale ed intraradicale del fungo MA.

Questi risultati dimostrano che il fungo risponde in tempi molto rapidi all'incremento di CO₂ atmosferica e che e' in grado di avvantaggiarsi della maggiore disponibilita' di C della pianta ospite, indipendentemente dalla crescita della pianta e dal livello di colonizzazione micorrizica.

2.1 - Estensione e densita' della rete micorrizica in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO₂

I risultati ottenuti mostrano che in presenza di concentrazioni piu' elevate di CO₂ atmosferica il fungo *G. mosseae* e' in grado di produrre un micelio extraradicale piu' esteso e piu' denso; aumentando il livello di CO₂, infatti, dopo solo 12 giorni, la lunghezza totale delle ife prodotte dalle piante micorrizzate di Mr.S. 2/5 aumentava del 68-97%, a seconda dell'esperimento effettuato (Tabb. 15, 17 e 18). Tali risposte risultano confermate anche esprimendo l'estensione delle ife in rapporto alla lunghezza delle radici: in presenza di livelli elevati di CO₂, infatti, la lunghezza delle ife extraradicali prodotte per unita' di radice aumentava di 1.6-2.2 volte e la lunghezza delle ife extraradicali prodotte per unita' di radice micorrizzata aumentava di 1.3-2.5 volte (Tabb. 15, 17 e 18). D'altra parte, mentre la maggiore disponibilita' di carbonio e' stato sufficiente a determinare un rapido incremento della produzione di micelio extraradicale, il breve periodo di esposizione non e' stato sufficiente a determinare un significativo effetto sulla lunghezza dell'apparato radicale che, pur aumentando statisticamente nel tempo, non ha mostrato un significativo incremento in presenza di livelli piu' elevati di CO₂.

Una stimolazione della crescita del micelio extraradicale in conseguenza dell'innalzamento della concentrazione di CO₂ e' stato ottenuto in altri lavori nei quali, tuttavia, i tempi di esposizione erano molto piu' lunghi; tali risposte variavano a seconda dell'endofita usato (Klironomos *et al.*, 1998), della disponibilita' di nutrienti (Klironomos *et al.*, 1996), del tipo di suolo (Rillig *et al.*, 1999) o delle modalita' di esposizione alla CO₂ (Klironomos *et al.*, 2005). E' necessario considerare che, nei lavori citati, la valutazione dell'estensione del micelio extraradicale del fungo simbionte veniva effettuata misurando la lunghezza delle ife

per unita' di suolo, dopo filtrazione su membrana di vari campioni di suolo, secondo varie metodologie descritte (Schubert *et al.*, 1987b; Li *et al.*, 1991; Jakobsen *et al.*, 1992; Boddington *et al.*, 1999). Tale modalita' di stima richiede una meticolosa osservazione al microscopio per poter distinguere le ife micorriziche da quelle non-micorriziche e puo' comportare margini di errore e di soggettivita' piuttosto elevati. L'utilizzo di compartimenti separati per la crescita delle ife puo' migliorare tale metodologia (Sanders *et al.*, 1998) ma in ogni caso, indipendentemente da come si realizza la fase di estrazione e quantificazione del micelio, tale modalita' di studio della rete fungina, non permettendo l'estrazione di ife intatte, impedisce lo studio della reale distribuzione nel suolo della rete micorrizica extraradicale e della sua architettura.

Al contrario, il sistema sperimentale da noi adottato (Giovannetti *et al.*, 2001), oltre a consentire determinazioni piu' accurate a causa della elevatissima purezza del materiale fungino raccolto, permette di visualizzare il micelio extraradicale intatto e di valutare la sua reale estensione attraverso la determinazione diretta della densita' ifale e dell'area occupata dalle ife esterne. Cio' ha consentito di stabilire che la maggiore estensione del micelio esterno non era dovuta a una maggiore ampiezza dell'area occupata dalla rete micorrizica extraradicale, bensì allo sviluppo di una rete miceliare piu' fitta nella quale la densita' ifale passava da circa 2 mm di ife/mm² alla concentrazione ambientale di CO₂ a circa 3 mm di ife/mm² a livelli elevati di CO₂ (Tabb. 15, 17 e 18). Tale osservazione potrebbe far ipotizzare un effetto morfogenetico sullo sviluppo extraradicale del fungo, consistente in una maggiore ramificazione delle ife, ma tale aspetto non e' stato adeguatamente indagato nel presente lavoro.

In un precedente esperimento condotto con la stessa metodologia a concentrazioni ambientali di CO₂ (Giovannetti *et al.* 2001), le piantine di *P. cerasifera* micorrizate con *G. mosseae* avevano prodotto una rete miceliare extraradicale la cui densita' era leggermente piu' elevata (2.6 mm ife/mm²) dopo soltanto 1 settimana; tuttavia in tale esperimento la percentuale di colonizzazione delle piante utilizzate era notevolmente piu' alta (64%) e cio' potrebbe aver influito sulla rapida ricrescita del micelio extradicale a partire dalle ife intraradicali. D'altra parte, altri lavori condotti con concentrazioni ambientali di CO₂, che usavano lo

stesso modello sperimentale, hanno mostrato che la densità ifale può essere influenzata dalle differenti specie fungine utilizzate e perfino da differenti isolati geografici appartenenti alla stessa specie (Avio *et al.*, 2006).

2.2 - Quantificazione “time-course” della colonizzazione micorrizica in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO₂

Attraverso la realizzazione di un esperimento “time-course”, abbiamo indagato sull’effetto della maggiore disponibilità di CO₂ sullo sviluppo intraradicale del fungo *G. mosseae* in radici di Mr.S. 2/5. I risultati dei nostri esperimenti mostrano che l’incremento della disponibilità di C atmosferico non influisce significativamente sulla colonizzazione radicale da parte del fungo micorrizico, dal momento che la percentuale della lunghezza delle radici infette non è risultata statisticamente differente in risposta alle variazioni di CO₂ in nessuno degli esperimenti “time-course” effettuati, almeno nel breve periodo preso in considerazione. La presenza di una maggiore disponibilità di CO₂ è risultata avere una certa significatività sulla lunghezza totale delle radici micorrizzate solo nella prova principale dell’esp. 2B (Tab. 18), sebbene con un valore di significatività piuttosto ridotto ($p=0.039$). Ciò potrebbe essere dovuto al differente stadio di sviluppo della relazione fungo/pianta ospite nei diversi esperimenti condotti; infatti, mentre nell’esp. 2A la percentuale di micorrizzazione risultava inizialmente più alta e pressoché costante nel corso della prova, nell’esp. 2B tale parametro aumentava significativamente nel tempo passando dal 24% al 35% alla concentrazione ambientale di CO₂ e da 29 a 42% a concentrazione elevata. In altre parole nel secondo esperimento la colonizzazione radicale da parte del fungo sembrerebbe essere in una fase di sviluppo più attiva rispetto a quella del primo esperimento, nel quale, inoltre, il livello di partenza di colonizzazione micorrizica era già più elevato. Questo differente stadio fisiologico della relazione fungo-pianta potrebbe avere determinato risposte lievemente differenti tra i due esperimenti per quanto riguarda l’influenza della maggiore disponibilità di CO₂ sulla colonizzazione intraradicale.

In precedenti lavori condotti per valutare l’influenza della CO₂ atmosferica sulla colonizzazione micorrizica i risultati ottenuti sono stati molto variabili: l’aumento della concentrazione di CO₂ incrementava significativamente la

colonizzazione micorrizica in alcune prove condotte in vaso o in suolo (Morgan *et al.*, 1994; Olesniewicz & Thomas, 1999; Rillig *et al.*, 1999) mentre in altri casi non ha avuto effetto (Jongen *et al.*, 1996; Sanders *et al.*, 1998; Staddon *et al.*, 1998; Cavagnaro *et al.*, 2007). Naturalmente le risposte possono variare a seconda della pianta ospite e del fungo utilizzati (Monz *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 2005) o a seconda delle condizioni nutrizionali (Klironomos *et al.*, 1996; Rillig *et al.*, 1998). Alcuni autori ritengono che, almeno in alcuni casi, tali risposte apparentemente contraddittorie possono essere state determinate dall'aver confrontato piante di differente sviluppo (Staddon & Fitter, 1998; Fitter *et al.*, 2000) dato che, la presenza di concentrazioni differenti di CO₂ influisce sullo sviluppo vegetativo della pianta. Quando sono stati condotti esperimenti "time-course" ed e' stato considerato l'accrescimento della pianta, i risultati ottenuti hanno mostrato che la differente disponibilita di C non influenzava significativamente la colonizzazione micorrizica (Staddon *et al.*, 2004; Cavagnaro *et al.*, 2007), analogamente a quanto e' emerso nelle nostre prove.

La mancanza di un effetto significativo della maggiore disponibilita' di carbonio sulla colonizzazione micorrizica intraradicale puo' significare che il maggiore flusso di carbonio, oltre che utilizzato per la crescita fungina dentro i tessuti radicali, dal momento che la lunghezza radicale aumentava nel tempo, e' diretto principalmente alla ricostruzione del micelio extraradicale.

2.3 - Determinazione della biomassa fungina intra ed extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO₂

I risultati ottenuti dimostrano che l'incremento della concentrazione atmosferica di CO₂ influisce sulla produzione di biomassa fungina intra ed extraradicale. Il presente lavoro e' il primo nel quale l'effetto della differente disponibilita' di CO₂ sullo sviluppo del fungo MA viene valutato in termini di biomassa, dal momento che nei numerosi lavori riportati in letteratura l'accrescimento fungino viene normalmente valutato come lunghezza delle radici infette o di estensione del micelio extraradicale prodotto. D'altra parte, la determinazione diretta della biomassa fungina mediante misurazione del peso secco del micelio e' spesso

impraticabile, come nel caso del micelio intraradicale, o comunque molto difficile a causa degli scarsi quantitativi ottenibili e cio' rende indispensabile l'utilizzo di opportuni marcatori. La scelta qui effettuata di stimare la biomassa fungina mediante la determinazione del contenuto di glucosamina risulta appropriata dal momento che nel nostro sistema sperimentale non ci sono interferenze dovute ad altri organismi (altri funghi, artropodi) che potrebbero falsare i quantitativi rilevati ed inoltre presenta il vantaggio di poter quantificare tutta la biomassa fungina presente, sia vitale che morta.

La determinazione preliminare del fattore di conversione del fungo *G. mosseae*, indispensabile per poter convertire il contenuto di GLC in quantita' di micelio, ha fornito il valore di 68.2 µg di glucosamina per mg di peso secco di fungo. Tale fattore risulta piu' elevato rispetto a quello di 40 µg/mg ottenuto con lo stesso fungo (Hepper, 1977) e ad altri ottenuti per differenti endofiti fungini che variavano tra 21 µg/mg e 33 µg/mg (Bethlenfalvay *et al.*, 1982; Vilarino *et al.*, 1993; Frey *et al.*, 1994). Il valore piu' alto ottenuto nel presente lavoro e' probabilmente dovuto alla maggiore omogeneita' e purezza del materiale fungino da noi raccolto, prodotto con un sistema sperimentale (Giovannetti *et al.*, 2001) che ha evitato la presenza di residui estranei di natura organica o inorganica. Inoltre, l'ottenimento del micelio necessario per la stima con lo stesso sistema sperimentale utilizzato per gli esperimenti con la CO₂, ha consentito di ottenere un fattore di conversione estremamente realistico ed affidabile, dal momento che il contenuto di chitina, e quindi di GLC, puo' variare non solo a seconda della specie fungina, ma anche in risposta a differenti caratteristiche ambientali (Appuhn & Joergensen, 2006).

I dati ottenuti mostrano che, in presenza di una concentrazione piu' elevata di CO₂, la biomassa fungina extraradicale prodotta dalle piante micorrizzate di Mr.S. 2/5 e' maggiore, sia in termini assoluti che per unita' di peso radicale. Questo significa che il fungo e' in grado di avvantaggiarsi molto rapidamente della maggiore disponibilita' di C dal momento che, nel breve periodo considerato, quando l'accrescimento delle piante non aveva ancora subito un significativo incremento in risposta alla differente concentrazione di CO₂, la quantita' di biomassa fungina extraradicale prodotta per unita' di peso secco e' risultata piu' elevata (Tab. 18).

Al contrario la biomassa fungina intradivale, pur essendo maggiore come contenuto totale per pianta, sebbene con una significatività molto bassa, non risultava statisticamente incrementata dalla maggiore disponibilità di C se tale quantitativo viene espresso per unità di peso radicale. Quindi, indipendentemente dalla crescita della pianta ospite e dalla colonizzazione micorrizica intradivale, il fungo MA è in grado di rispondere immediatamente all'incremento di CO₂ atmosferica, producendo una rete miceliare extradivale la cui biomassa è decisamente maggiore rispetto a quella prodotta alla concentrazione ambientale di CO₂. Considerando che il fattore di conversione da noi stimato comporta una valutazione che potremmo definire prudenziale rispetto a quella che sarebbe possibile effettuare con i fattori reperibili in letteratura (Hepper, 1977), tale risultato appare ancora più consistente, almeno in termini di quantitativi assoluti.

È opportuno sottolineare che, valutando la produzione di micelio extradivale in termini di biomassa, la stimolazione conseguente alla maggiore disponibilità di C appare ancora maggiore rispetto a quella rilevata considerando l'estensione del micelio esterno; infatti, mentre la lunghezza totale delle ife prodotte in presenza di elevati livelli di CO₂ aumentava di una percentuale variabile tra il 68 e il 97%, a seconda dell'esperimento considerato (tabb. 15, 17 e 18), la quantità di biomassa extradivale ottenuta con concentrazioni maggiori di CO₂ era circa 3 volte rispetto a quella prodotta alla concentrazione ambientale. Ciò presuppone una differenza di peso per unità di lunghezza ifale (specific fungal weight) di *G.mosseae* che risulterebbe essere 7.84 µg/m e 11.97 µg/m rispettivamente alle concentrazioni ambientale o elevata di CO₂; tali valori risultano comparabili, anche se comunque più elevati, rispetto a quelli reperibili in letteratura per lo stesso fungo (Bethlenfalvay & Ames, 1987) o per differenti popolazioni di funghi micorrizici (Miller *et al.*, 1995).

La valutazione dello sviluppo del fungo MA non solo in termini di estensione ma anche di biomassa ha permesso di verificare che l'influenza della CO₂ non si manifesta soltanto in senso quantitativo, ma che agisce anche in senso qualitativo, determinando una diversa distribuzione delle risorse tra la fase interna ed esterna dell'endofita fungina. Considerando, infatti, il rapporto ponderale tra biomassa extra ed intradivale possiamo osservare che mentre a concentrazioni ambientali di CO₂ il rapporto tra biomassa fungina prodotta dentro e fuori la radice è di circa 1:1, a livelli

piu' elevati di CO₂ la quantita' di biomassa fungina extraradicale prodotta per ciascuna unita' di biomassa intraradicale e' di circa 1.65. La maggiore disponibilita' di C, quindi, sembrerebbe essere utilizzata dal fungo non tanto per colonizzare maggiormente la radice bensì per esplorare meglio il terreno circostante. La possibile redistribuzione a favore della fase extraradicale del fungo in presenza di livelli piu' elevati di CO₂ risulta in accordo con quanto osservato da altri autori (Sanders et al. 1998, Staddon et al. 2004). D'altra parte il rapporto tra la biomassa fungina extraradicale e intraradicale puo' cambiare nel tempo o a seconda della fase di sviluppo della pianta ospite (Bethlenfalvay et al., 1982; Olsson et al., 1999; Fujiyoshi et al., 2000) ed e' pertanto possibile che anche le risposte all'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica possano variare a seconda dei tempi di esposizione.

Tutti questi dati confermano che il fungo *G. mosseae* e' in grado di rispondere in maniera molto rapida alle variazioni di CO₂ atmosferica, analogamente a quanto rilevato in studi condotti con il ¹⁴C (Johnson et al., 2002) e di avvantaggiarsi in modo consistente della maggiore disponibilita' di C attraverso la produzione piu' abbondante di reti micorriziche extraradicali; le risposte ottenute, tuttavia, non debbono essere generalizzate dal momento che specie fungine o vegetali diverse possono rispondere in maniera differente (Johnson et al., 2005).

Poiche' nei funghi MA, la maggior parte della biomassa totale e' costituita dal micelio extraradicale (Sanders et al., 1998; Olsson et al., 1999; Fujiyoshi et al., 2000), l'effetto dell'incremento della CO₂ atmosferica su tale fase di sviluppo del fungo deve essere adeguatamente considerato, sia in relazione alla possibilita' di formare reti piu' ampie ed estese, sia in relazione al potenziale ruolo di immobilizzazione di carbonio nel suolo da parte dei funghi micorrizici.

CONCLUSIONI

Le ricerche svolte hanno permesso di evidenziare l'esistenza di un collegamento ifale, tra piante arboree contigue della stessa specie o di specie differenti, mediante la rete micorrizica extraradicale prodotta dai funghi micorrizici *G. mosseae* e *G. intraradices*. In presenza di tale sistema di interconnessione, la modificazione di determinati parametri ambientali a cui veniva sottoposta una pianta ha mostrato di poter influire significativamente sullo sviluppo di altre piante contigue; in particolare, l'accumulo di sostanza secca in piante cresciute in condizioni di illuminazione molto ridotta veniva significativamente aumentato dalla presenza, nello stesso microcosmo in cui si era sviluppata la comune rete micorrizica, di una pianta mantenuta in piena luce .

Le informazioni acquisite sulla base delle presenti indagini contribuiscono ad avvalorare l'ipotesi, sostenuta da altri autori (Francis & Read, 1984; Finlay & Read, 1986; Simard *et al.*, 1997b; Carey *et al.*, 2004), di un passaggio di fotosintetati attraverso la comune rete micorrizica, da una pianta donatrice" ad una "ricevente".

La possibile redistribuzione di risorse attraverso la fitta rete di ife che, in presenza di una gestione agronomica rispettosa degli equilibri naturali, e' in grado di realizzarsi nel terreno, rende estremamente importante lo studio di tutti quei fattori (ambientali, agronomici ecc.) che possono influire sulla formazione e la funzionalità delle reti micorriziche extraradicali presenti in un agroecosistema.

La maggiore estensione delle reti micorriziche extraradicali e la piu' elevata densita' della rete miceliare osservata in risposta all'incremento della concentrazione di CO₂ atmosferica, e' un dato estremamente interessante sia dal punto di vista agronomico, per i ben noti vantaggi determinati dal punto di vista quali-quantitativo sullo sviluppo della pianta ospite, che ambientale. Un maggiore accumulo nei tessuti fungini del carbonio sottratto all'atmosfera dalla pianta, infatti, potrebbe permettere, mediante i meccanismi precedentemente menzionati, una temporanea immobilizzazione di carbonio nel terreno e, conseguentemente, un rallentamento del

ciclo del carbonio, contribuendo in questo modo a limitare il progressivo aumento che questo gas-serra nell'atmosfera.

La sfida dell'agricoltura sostenibile che i Paesi di tutto il mondo devono affrontare mediante un ripensamento radicale delle tecniche agronomiche, dei metodi di sfruttamento del suolo, delle politiche agricole, degli atteggiamenti di agricoltori e consumatori, rappresenta un impegno responsabile e consapevole per poter garantire alle generazioni future la fruibilità del patrimonio ambientale e delle risorse naturali nella stessa misura in cui ne usufruiamo noi oggi.

BIBLIOGRAFIA

- Alberton O, Kuyper TW, Gorissen A. 2005.** Taking mycocentrism seriously: mycorrhizal fungal and plant responses to elevated CO₂. *New Phytologist* **167**(3): 859-868.
- Alexander T, Toth R, Meier R, Weber HC. 1989.** Dynamics of arbuscular development and degeneration in onion, bean and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhiza in grasses. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **67**: 2505-2513.
- Appuhn A, Joergensen RG. 2006.** Microbial colonisation of roots as a function of plant species. *Soil Biology & Biochemistry* **38**(5): 1040-1051.
- Avio L, Pellegrino E, Bonari E, Giovannetti M. 2006.** Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytologist* **172**(2): 347-357.
- Bago B, Azcon-Aguilar C, Goulet A, Piche Y. 1998a.** Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **139**(2): 375-388.
- Bago B, Azcon-Aguilar C, Piche Y. 1998b.** Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia* **90**(1): 52-62.
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2003.** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131**(3): 1496-1507.
- Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**(3): 949-957.
- Becard G, Piche Y. 1989.** New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **112**(1): 77-83.
- Bedini S, Avio L, Argese E, Giovannetti M. 2007.** Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agriculture Ecosystems & Environment* **120**(2-4): 463-466.
- Berta G, Fusconi A, Trotta A. 1993.** Va mycorrhizal infection and the morphology and function of root systems. *Environmental and Experimental Botany* **33**(1): 159-173.
- Berta G, Trotta A, Fusconi A, Hooker JE, Munro M, Atkinson D, Giovannetti M, Morini S, Fortuna P, Tisserant B, Gianinazzepearson V, Gianinazzi S. 1995.** Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant-growth and root-system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology* **15**(5): 281-293.

- Bethlenfalvay GJ, Ames RN. 1987.** Comparison of two methods for quantifying extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **51**: 834-837.
- Bethlenfalvay GJ, Pacovsky RS, Brown MS. 1981.** Measurement of mycorrhizal infection in soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **45**: 871-875.
- Bethlenfalvay MS, Brown MS, Pacovsky RS. 1982.** Relationship between host and endophyte development in mycorrhizal soybeans. *New Phytologist* **90**: 537-543.
- Bethlenfalvay MS, Brown MS, Pacovsky RS. 1982.** Relationship between host and endophyte development in mycorrhizal soybeans. *New Phytologist* **90**: 537-543.
- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Dominguez L, Sersic A, Leake JR, Read DJ. 2002.** Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **419**(6905): 389-392.
- Boddington CL, Bassett EE, Jakobsen I, Dodd JC. 1999.** Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. *Soil Biology & Biochemistry* **31**(3): 479-482.
- Bonfante-Fasolo P. 1987.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae - fungus-plant interactions at the cellular level. *Symbiosis* **3**(3): 249-268.
- Bonfante-Fasolo P. 1988.** Cell-to-cell interactions in mycorrhizal associations. *Phytoparasitica* **16**(2): 184-185.
- Bonfante P. 2006.** Le micorrize. In: Idelson-Gnocchi ed. *Microrganismi benefici per le piante*. Napoli: Iaccarino, M., 95-123.
- Carey EV, Marler MJ, Callaway RM. 2004.** Mycorrhizae transfer carbon from a native grass to an invasive weed: evidence from stable isotopes and physiology. *Plant Ecology* **172**(1): 133-141.
- Cavagnaro TR, Sokolow SK, Jackson LE. 2007.** Mycorrhizal effects on growth and nutrition of tomato under elevated atmospheric carbon dioxide. *Functional Plant Biology* **34**(8): 730-736.
- Ceulemans R, Janssens IA, Jach ME. 1999.** Effects of CO₂ enrichment on trees and forests: lessons to be learned in view of future ecosystem studies. *Annals of Botany* **84**(5): 577-590.
- Cheng XM, Baumgartner K. 2004.** Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. *Biology and Fertility of Soils* **40**(6): 406-412.
- Chiariello N, Hickman JC, Mooney HA. 1982.** Endomycorrhizal role for interspecific transfer of phosphorus in a community of annual plants. *Science* **217**(4563): 941-943.
- Covey RP, Koch BL, Larsen HJ. 1981.** Influence of vesicular arbuscular mycorrhizae on the growth of apple and corn in low phosphorous soil. *Phytopathology* **71**(7): 712-715.

- Cox G, Tinker PB. 1976.** Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. 1. Arbuscule and phosphorus transfer - quantitative ultrastructural study. *New Phytologist* **77**(2): 371-&.
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernandez F, Delmas NS, Declerck S. 2005.** Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* **165**(1): 261-271.
- Douds DD, Johnson CR, Koch KE. 1988.** Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf p accumulation in a split-root va mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **86**(2): 491-496.
- Douds DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2000.** Application of in vitro methods to study carbon uptake and transport by am fungi. *Plant and Soil* **226**(2): 255-261.
- Ferrara V, Farruggia A. 2007.** *Clima: Istruzioni per l'uso. I fenomeni, gli effetti, le strategie.* Milano, Italia: Edizioni Ambiente.
- Finlay RD, Read DJ. 1986.** The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* **103**: 143-156.
- Fitter AH. 1991.** Costs and benefits of mycorrhizas - implications for functioning under natural conditions. *Experientia* **47**(4): 350-355.
- Fitter AH. 2006.** What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist* **172**(1): 3-6.
- Fitter AH, Graves JD, Watkins NK, Robinson D, Scrimgeour C. 1998.** Carbon transfer between plants and its control in networks of arbuscular mycorrhizas. *Functional Ecology* **12**(3): 406-412.
- Fitter AH, Heinemeyer A, Husband R, Olsen E, Ridgway KP, Staddon PL. 2004.** Global environmental change and the biology of arbuscular mycorrhizas: gaps and challenges. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **82**(8): 1133-1139.
- Fitter AH, Heinemeyer A, Staddon PL. 2000.** The impact of elevated CO₂ and global climate change on arbuscular mycorrhizas: a mycocentric approach. *New Phytologist* **147**(1): 179-187.
- Fortuna P. 1992.** Prospettive dell'impiego delle micorrize nel settore vivaistico. *Flortecnica* **3**: 11-14.
- Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Vitagliano C, Giovannetti M. 1996.** Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphate fertilization on shoot apical growth of micropropagated apple and plum rootstocks. *Tree Physiology* **16**(9): 757-763.
- Fortuna P, Citernesi S, Morini S, Giovannetti M, Loreti F. 1992.** Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of Mr.S 2/5 plum rootstock. *Agronomie* **12**(10): 825-829.

- Fortuna P, Morini S, Giovannetti M. 1998.** Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on in vivo root initiation and development of micropropagated plum shoots. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **73**(1): 19-28.
- Francis R, Read DJ. 1984.** Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature* **307**: 53-56.
- Frey B, Vilarino A, Schuepp H, Arines J. 1994.** Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Soil Biology & Biochemistry* **26**(6): 711-717.
- Friese CF, Allen MF. 1991.** The spread of va mycorrhizal fungal hyphae in the soil inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* **83**(4): 409-418.
- Fujiyoshi M, Nakatsubo T, Ogura S, Horikoshi T. 2000.** Estimation of mycelial biomass of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the annual legume *Kummerowia striata* by ergosterol analysis. *Ecological Research* **15**(2): 121-131.
- Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 1989.** Cellular and genetics aspects of interactions between hosts and fungal symbionts in mycorrhizas. . *Genome* **31**: 336-341.
- Gianinazzi S, Vosatka M. 2004.** Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **82**: 1264-1270.
- Gildon A, Tinker PB. 1983.** Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infections and heavy-metals in plants .2. The effects of infection on uptake of copper. *New Phytologist* **95**(2): 263-268.
- Giovannetti M 2000.** Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In: Y. KapulnikD. Douds eds. *Arbuscular mycorrhizae: Physiology and function*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 47-68.
- Giovannetti M 2006.** I funghi micorrizici come biofertilizzanti. In: Idelson-Gnocchi ed. *Microrganismi benefici per le piante*. Napoli (I): Iaccarino, M, 125-143.
- Giovannetti M, Avio L 2002.** Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. In: Elsevier ed. *Applied mycology and biotechnology*. Amsterdam (NL): Khachatourians, G.G., Arora, D.K., 275-310.
- Giovannetti M, Avio L, Sbrana C, Citernesi AS. 1993.** Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytologist* **123**(1): 115-122.
- Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS. 1999.** Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12): 5571-5575.

- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP. 2001.** The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* **151**(3): 717-724.
- Giovannetti M, Mosse B. 1980.** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* **84**: 489-500.
- Giovannetti M, Sbrana C. 1998.** Meeting a non-host: The behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza* **8**(3): 123-130.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Citernesi AS, Logi C. 1993b.** Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist* **125**(3): 587-593.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Strani P. 2004.** Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* **164**(1): 181.
- Giovannetti M, Sbrana C, Logi C. 1994.** Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **127**(4): 703-709.
- Giovannetti M, Sbrana C, Logi C. 2000.** Microchambers and video-enhanced light microscopy for monitoring cellular events in living hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226**(2): 153-159.
- Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L. 2003.** Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(1): 616-624.
- Giovannetti M, Tosi L, Dellatorre G, Zizzerini A. 1991.** Histological, physiological and biochemical interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Thielaviopsis basicola* in tobacco plants. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **131**(4): 265-274.
- Gollotte A, Gianinazzipearson V, Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Gianinazzi S. 1993.** Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a locus a myc-mutant of *Pisum sativum* L. *Planta* **191**(1): 112-122.
- Gooday GW. 1990.** The ecology of chitin degradation. *Advances in Microbial Ecology* **11**: 387-430.
- Graham JH, Hodge NC, Morton JB. 1995.** Fatty acid methyl-ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(1): 58-64.
- Graves JD, Watkins NK, Fitter AH, Robinson D, Scrimgeour C. 1997.** Intraspecific transfer of carbon between plants linked by a common mycorrhizal network. *Plant and Soil* **192**(2): 153-159.

- Grigera MS, Drijber RA, Wienhold BJ. 2007.** Increased abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in soil coincides with the reproductive stages of maize. *Soil Biology & Biochemistry* **39**(7): 1401-1409.
- Grime JP, Mackey JML, Hillier SH, Read DJ. 1987.** Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature* **328**: 420-422.
- Grimoldi AA, Kavanova' M, F.A. L, Schaufele R, Schnyder H. 2006.** Arbuscular mycorrhizal colonization on carbon economy in perennial ryegrass: Quantification by $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ steady-state labelling and gas exchange. *New Phytologist* **172**: 544-553.
- Harley JL, Smith SE. 1983.** *Mycorrhizas symbiosis*: Academic Press, London, UK.
- Harrison MJ. 1996.** A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant Journal* **9**(4): 491-503.
- Hart MM, Reader RJ. 2002.** Does percent root length colonization and soil hyphal length reflect the extent of colonization for all AMF? *Mycorrhiza* **12**(6): 297-301.
- Hart MM, Reader RJ. 2005.** The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiologia* **49**(3): 269-279.
- Hawkes CV, Hartley IP, Ineson P, Fitter AH. 2008.** Soil temperature affects carbon allocation within arbuscular mycorrhizal networks and carbon transport from plant to fungus. *Global Change Biology* **14**: 1181-1190.
- Heap AJ, Newman EI. 1980a.** The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizas on phosphorus transfer between plants. *New Phytologist* **85**(2): 173-179.
- Heap AJ, Newman EI. 1980b.** Links between roots by hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **85**(2): 169-&.
- Hepper CM. 1977.** A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *Soil Biol. Bioch* **9**(15-18).
- Ho I, Trappe JM. 1973.** Translocation of ^{14}C from *Festuca* plants to their endomycorrhizal fungi. *Nature* **244**: 30-31.
- Hoepfner EF, Koch BL, Covey RP. 1983.** Enhancement of growth and phosphorus concentrations in apple seedlings by vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**(2): 207-209.
- Hu SJ, Wu JS, Burkey KO, Firestone MK. 2005.** Plant and microbial N acquisition under elevated atmospheric CO_2 in two mesocosm experiments with annual grasses. *Global Change Biology* **11**(2): 213-223.
- Jacquelinet-Jeanmougin J, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. 1987.** Endomycorrhizas in the *Gentianaceae* .2. Ultrastructural aspects of symbiont relationships in *Gentiana lutea* L. *Symbiosis* **3**(3): 269-286.

- Jakobsen I, Abbott LK, Robson AD. 1992.** External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytologist* **120**(3): 371-380.
- Jakobsen I, Rosendahl L. 1990.** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115**(1): 77-83.
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ. 2007a.** A medicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(5): 1720-1725.
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ. 2007b.** Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Transport properties and regulatory roles. *Plant Cell and Environment* **30**(3): 310-322.
- Jin H, Pfeiffer PE, Douds DD, Piotrowski E, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. 2005.** The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **168**(3): 687-696.
- Johnson CR. 1984.** Phosphorus nutrition on mycorrhizal colonization, photosynthesis, growth and nutrient composition of *Citrus aurantium*. *Plant and Soil* **80**(1): 35-42.
- Johnson D, Leake JR, Read DJ. 2002.** Transfer of recent photosynthate into mycorrhizal mycelium of an upland grassland: Short-term respiratory losses and accumulation of ¹⁴C. *Soil Biology and Biochemistry* **34**(10): 1521-1524.
- Johnson NC, Wolf J, Reyes MA, Panter A, Koch GW, Redman A. 2005.** Species of plants and associated arbuscular mycorrhizal fungi mediate mycorrhizal responses to CO₂ enrichment. *Global Change Biology* **11**(7): 1156-1166.
- Jones MD, Durall DM, Tinker PB. 1998.** Comparison of arbuscular and ectomycorrhizal eucalyptus coccifera: Growth response, phosphorus uptake efficiency and external hyphal production. *New Phytologist* **140**(1): 125-134.
- Jongen M, Fay P, Jones MB. 1996.** Effects of elevated carbon dioxide and arbuscular mycorrhizal infection on *Trifolium repens*. *New Phytologist* **132**(3): 413-423.
- Kabir Z, Koide RT. 2002.** Effect of autumn and winter mycorrhizal cover crops on soil properties, nutrient uptake and yield of sweet corn in Pennsylvania, USA. *Plant and Soil* **238**(2): 205-215.
- Kerr RA. 2001.** Climate change - a little sharper view of global warming. *Science* **294**(5543): 765-765.
- Kerr RA. 2007.** Global warming is changing the world. *Science* **316**(5822): 188-190.

- Klironomos JN, Allen MF, Rillig MC, Piotrowski J, Makvandi-Nejad S, Wolfe BE, Powell JR. 2005.** Abrupt rise in atmospheric CO₂ overestimates community response in a model plant-soil system. *Nature* **433**(7026): 621-624.
- Klironomos JN, Rillig MC, Allen MF. 1996.** Below-ground microbial and microfaunal responses to *artemisia tridentata* grown under elevated atmospheric CO₂. *Functional Ecology* **10**(4): 527-534.
- Klironomos JN, Ursic M, Rillig M, Allen MF. 1998.** Interspecific differences in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to *artemisia tridentata* grown under elevated atmospheric CO₂. *New Phytologist* **138**(4): 599-605.
- Koske RE. 1981.** Multiple germination by spores of *Gigaspora margarita*. *Trans Br Mycol Soc* **76**: 328-330.
- La Rue JH, McClellan WD, Peacock WL. 1975.** Mycorrhizal fungi and peach nursery nutrition. *Calif. Agric. May*: 7.
- Labidi S, Nasr H, Zouaghi M, Wallander H. 2007.** Effects of compost addition on extra-radical growth of arbuscular mycorrhizal fungi in *Acacia tortilis* ssp *raddiana* savanna in a pre-saharan area. *Applied Soil Ecology* **35**(1): 184-192.
- Lal R, Follett RF, Kimble J, Cole CV. 1999.** Managing us cropland to sequester carbon in soil. *Journal of Soil and Water Conservation* **54**(1): 374-381.
- Lammers PJ, Jun J, Abubaker J, Arreola R, Gopalan A, Bago B, Hernandez-Sebastia C, Allen JW, Douds DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. 2001.** The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. *Plant Physiology* **127**(3): 1287-1298.
- Leake JR. 1994b.** The biology of myco-heterotrophic (saprophytic) plants. *New Phytologist* **127**(2): 171-216.
- Lerat S, Gauci R, Catford JG, Vierheilig H, Piche Y, Lapointe L. 2002.** C-14 transfer between the spring *Ephemeral erythronium americanum* and sugar maple saplings via arbuscular mycorrhizal fungi in natural stands. *Oecologia* **132**(2): 181-187.
- Lerat S, Lapointe L, Gutjahr S, Piche Y, Vierheilig H. 2003a.** Carbon partitioning in a split-root system of arbuscular mycorrhizal plants is fungal and plant species dependent. *New Phytologist* **157**(3): 589-595.
- Lerat S, Lapointe L, Piche Y, Vierheilig H. 2003b.** Variable carbon-sink strength of different *glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **81**(8): 886-889.
- Li X-L, Eckhard G, Horst M. 1991.** Phosphorus depletion and pH decrease at the root-soil and hyphae-soil interfaces of a mycorrhizal white clover fertilized with ammonium. *New Phytologist* **119**: 397-404.

- Logi C, Sbrana C, Giovannetti M. 1998.** Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(9): 3473-3479.
- Lussenhop J, Treonis A, Curtis PS, Teeri JA, Vogel CS. 1998.** Response of soil biota to elevated atmospheric CO₂ in poplar model systems. *Oecologia* **113**(2): 247-251.
- Mader P, Edenhofer S, Boller T, Wiemken A, Niggli U. 2000.** Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biology and Fertility of Soils* **31**(2): 150-156.
- Malloch DW, Pirozynski KA, Raven PH. 1980.** Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **77**(4): 2113-2118.
- Martins MA. 1993.** The role of the external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in the carbon transfer process between plants. *Mycol. Res.* **97**(7): 807-810.
- Medina A, Probanza A, Manero FJG, Azcon R. 2003.** Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). *Applied Soil Ecology* **22**(1): 15-28.
- Menge JA. 1978.** Mycorrhizal fungi increased growth and reduce transplant injury in avocado. *Calif. Agric.* **April**: 6-7.
- Miller RM, Jastrow JD. 1990.** Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biology & Biochemistry* **22**(5): 579-584.
- Miller RM, Miller SP, Jastrow JD, Rivetta CB. 2002.** Mycorrhizal mediated feedbacks influence net carbon gain and nutrient uptake in *Andropogon gerardii*. *New Phytologist* **155**(1): 149-162.
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD. 1995.** External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* **103**(1): 17-23.
- Monz CA, Hunt HW, Reeves FB, Elliott ET. 1994.** The response of mycorrhizal colonization to elevated CO₂ and climate-change in *Pascopyrum smithii* and *Bouteloua gracilis*. *Plant and Soil* **165**(1): 75-80.
- Morgan JA, Knight WG, Dudley LM, Hunt HW. 1994.** Enhanced root-system c-sink activity, water relations and aspects of nutrient acquisition in mycotrophic *Bouteloua gracilis* subjected to CO₂ enrichment. *Plant and Soil* **165**(1): 139-146.

- Morini S, Fortuna P, Giovannetti M, Loreti F. 2003.** Effects of mycorrhizal fungi on growth and CO₂ assimilation of micropropagated plantlets of fruit tree rootstocks. *Italus Hortus*. 2003; 10(4, Supplemento): 207-212.
- Morton JB, Benny GL. 1990.** Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*) - a new order, *Glomales*, 2 new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and 2 new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Mosse B, Hayman DS, Arnold DJ. 1973.** Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. V. Phosphate uptake by three plant species from P-deficient soils labelled with ³²P. *New Phytologist* 72: 809-815.
- Muller J, Dulieu H. 1998.** Enhanced growth of non-photosynthesizing tobacco mutants in the presence of a mycorrhizal inoculum. *Journal of Experimental Botany* 49(321): 707-711.
- Nakano-Hylander A, Olsson PA. 2007.** Carbon allocation in mycelia of arbuscular mycorrhizal fungi during colonisation of plant seedlings. *Soil Biology and Biochemistry* 39(7): 1450-1458.
- Nelsen CE, Safir GR. 1982.** The water relation of well-watered mycorrhizal and non-mycorrhizal onion plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci* 107(2): 271-274.
- Neumann E, George E. 2005.** Extraction of extraradical arbuscular mycorrhizal mycelium from compartments filled with soil and glass beads. *Mycorrhiza* 15(7): 533-537.
- Newman EI, Devoy CLN, Easen NJ, Fowles KJ. 1994.** Plant species that can be linked by VA mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 126: 691-693.
- Newman EI, Reddel P. 1987.** The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist* 106: 745-751.
- Nilsson LO, Giesler R, Baath E, Wallander H. 2005.** Growth and biomass of mycorrhizal mycelia in coniferous forests along short natural nutrient gradients. *New Phytologist* 165(2): 613-622.
- Ohtomo R, Saito M. 2005.** Polyphosphate dynamics in mycorrhizal roots during colonization of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* 167(2): 571-578.
- Ojala JC, Jarrell WM, Menge JA, Johnson ELV. 1983.** Influence of mycorrhizal fungi on the mineral-nutrition and yield of onion in saline soil. *Agronomy Journal* 75(2): 255-259.
- Olesniewicz KS, Thomas RB. 1999.** Effects of mycorrhizal colonization on biomass production and nitrogen fixation of black locust (*Robinia pseudoacacia*) seedlings grown under elevated atmospheric carbon dioxide. *New Phytologist* 142(1): 133-140.
- Olsson PA, Baath E, Jakobsen I, Soderstrom B. 1995.** The use of phospholipid and neutral lipid fatty-acids to estimate biomass of

- arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Mycological Research* **99**: 623-629.
- Olsson PA, Hansson MC, Burleigh SH. 2006.** Effect of p availability on temporal dynamics of carbon allocation and *Glomus intraradices* high-affinity p transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4115-4120.
- Olsson PA, Johansen A. 2000.** Lipid and fatty acid composition of hyphae and spores of arbuscular mycorrhizal fungi at different growth stages. *Mycological Research* **104**: 429-434.
- Olsson PA, Johnson NC. 2005.** Tracking carbon from the atmosphere to the rhizosphere. *Ecology Letters* **8**(12): 1264-1270.
- Olsson PA, Larsson L, Bago B, Wallander H, van Aarle IM. 2003.** Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. *New Phytologist*(159).
- Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I, Baath F. 1999.** Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. *Soil Biology & Biochemistry* **31**(13): 1879-1887.
- Olsson PA, van Aarle IM, Allaway WG, Ashford AE, Rouhier H. 2002.** Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. *Plant Physiology* **130**(3): 1162-1171.
- Olsson PA, Wilhelmsson P. 2000.** The growth of external am fungal mycelium in sand dunes and in experimental systems. *Plant and Soil* **226**(2): 161-169.
- Pacovsky RS, Bethlenfalvay GJ. 1982.** Measurement of the extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil by chitin determination. *Plant and Soil* **68**: 143-147.
- Pang PC, Paul EA. 1980.** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on ¹⁴C and ¹⁵N distribution in nodulated fababeans. *Canadian Journal of Soil Science* **60**: 241-250.
- Pearson JN, Jakobsen I. 1993.** Symbiotic exchange of carbon and phosphorus between cucumber and three arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **124**: 481-488.
- Pfeffer PE, Douds DD, Becard G, Shachar-Hill Y. 1999.** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **120**(2): 587-598.
- Pfeffer PE, Douds DD, Jr., Bucking H, Schwartz DP, Shachar-Hill Y. 2004.** The fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* **163**(3): 617-627.
- Phillips J, Hayman D. 1970.** Improved procedure for clearing roots and staining parasites and vesicular-arbuscularmycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158-161.
- Pons F, Gianinazzepearson V, Gianinazzi S, Navatel JC. 1983.** Studies of VA mycorrhizae *in vitro* - mycorrhizal synthesis of axenically

- propagated wild cherry (*Prunus avium* L.) plants. *Plant and Soil* **71**(1-3): 217-221.
- Poole I, Lawson T, Weyers JDB, Raven JA. 2000.** Effect of elevated CO₂ on the stomatal distribution and leaf physiology of *Alnus glutinosa*. *New Phytologist* **145**(3): 511-521.
- Powell VL. 1975.** Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* **75**: 563-566.
- Purin S, Rillig MC. 2007.** The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin: limitations, progress, and a new hypothesis for its function. *Pedobiologia* **51**(2): 123-130.
- Read D. 1997.** The ties that bind. *Nature* **388**: 517-518.
- Read DJ. 1991.** Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**(4): 376-391.
- Read DJ. 1998.** Plants on the web. *Nature* **396**: 22-23.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000.** Glomalean fungi from the ordovician. *Science* **289**(5486): 1920-1921.
- Ride JP, Drysdale RB. 1972.** A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiological Plant Pathology* **2**: 7-15.
- Rillig MC. 2004.** Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes *Ecology Letters* **7**: 740-754.
- Rillig MC, Allen MF, Klironomos JN, Field CB. 1998.** Arbuscular mycorrhizal percent root infection and infection intensity of bromus hordeaceus grown in elevated atmospheric CO₂. *Mycologia* **90**(2): 199-205.
- Rillig MC, Field CB, Allen MF. 1999.** Soil biota responses to long-term atmospheric CO₂ enrichment in two california annual grasslands. *Oecologia* **119**(4): 572-577.
- Rivera-Becerril F, Calantzis C, Turnau K, Caussanel J-P, Belimov A, Gianinazzi S, R.J. S, Gianinazzi-Pearson V. 2002.** Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stree by arbuscular mycorrhizas in three pisum sativuml. Genotypes. *Journal Experimental Botany* **53**: 1177-1185.
- Robinson D, Fitter A. 1999.** The magnitude and control of carbon transfer between plants linked by a common mycorrhizal network. *Journal of Experimental Botany* **50**(330): 9-13.
- Saito M. 1995.** Enzyme-activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* becker-and-hall. *New Phytologist* **129**(3): 425-431.
- Sanders IR. 1999.** Evolutionary genetics - no sex please, we're fungi. *Nature* **399**(6738): 737-739.
- Sanders IR, Streitwolf-Engel R, van der Heijden MGA, Boller T, Wiemken A. 1998.** Increased allocation to external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi under CO₂ enrichment. *Oecologia* **117**(4): 496-503.

- Sbrana C, Giovannetti M, Vitagliano C. 1994.** The effect of mycorrhizal infection on survival and growth renewal of micropropagated fruit rootstocks. *Mycorrhiza* **5**(2): 153-156.
- Schellenbaum L, Berta G, Ravolanirina F, Tisserant B, Gianinazzi S, Fitter AH. 1991.** Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant-species (*Vitis vinifera* L.). *Annals of Botany* **68**(2): 135-141.
- Schmitz O, Danneberg G, Hundeshagen B, Klingner A, Bothe H. 1991.** Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters. *Journal of Plant Physiology* **139**(1): 106-114.
- Schreiner RP, Mihara KL, McDaniel H, Bethlenfalvay GJ. 1997.** Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant and Soil* **188**: 199-209.
- Schubert A, Cammarata S 1986.** Effect of inoculation with different endophytes on growth and nutrition of grapevine plants grown in pots. *Mycorrhizae: Physiology and genetics*. Paris: INRA, 327-331.
- Schubert A, Cravero MC, Mazzitelli M. 1987a.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae in field- and pot-grown kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Advances in Horticultural Science* **1**: 80-82.
- Schubert A, Marzachi C, Mazzitelli M, Cravero MC, Bonfante-Fasolo P. 1987b.** Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol. & Schenck. *New Phytologist* **107**: 183-190.
- Schussler A, Martin H, Cohen D, Fitz M, Wipf D. 2006.** Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* **444**(7121): 933-936.
- Schussler A, Schwarzott D, Walker C. 2001.** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413-1421.
- Selosse M-A, Richard F, He XH, Simard SW. 2006.** Mycorrhizal networks: *Des liaisons dangereuses?* *Trends in Ecology & Evolution* **21**(11): 621-628
- Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG. 1995.** Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* **108**(1): 7-15.
- Simard SW, Durall DM. 2004.** Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*. 2004; **82**(8): 1140-1165.
- Simard SW, Jones MD, Durall DM, Perry DA, Myrold DD, Molina R. 1997a.** Reciprocal transfer of carbon isotopes between ectomycorrhizal *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii*. *New Phytologist* **137**(3): 529-542.

- Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997b.** Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature London* **388**(6642): 579-582.
- Smith FA, Jakobsen I, Smith SE. 2000.** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **147**(2): 357-366.
- Smith ML, Bruhn JN, Anderson JB. 1992.** The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature* **356**: 428-431.
- Smith SE, Read DJ. 1997.** *Mycorrhizal symbiosis*: Academic Press, London, UK
- Snellgrove RC, Splittstoesser WE, Stribley DP, Tinker PB. 1982.** The distribution of carbon and the demand of the fungal symbiont in leek plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* **92**: 75-87.
- Solaiman MZ, Ezawa T, Kojima T, Saito M. 1999.** Polyphosphates in intraradical and extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12): 5604-5606.
- Staddon PL, Fitter AH. 1998.** Does elevated atmospheric carbon dioxide affect arbuscular mycorrhizas? *Trends in Ecology and Evolution* **13**(11): 455-458.
- Staddon PL, Fitter AH, Graves JD. 1999.** Effect of elevated atmospheric CO₂ on mycorrhizal colonization, external mycorrhizal hyphal production and phosphorus inflow in *Plantago lanceolata* and *Trifolium repens* in association with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Global Change Biology* **5**(3): 347-358.
- Staddon PL, Graves JD, Fitter AH. 1998.** Effect of enhanced atmospheric CO₂ on mycorrhizal colonization by *Glomus mosseae* in *Plantago lanceolata* and *Trifolium repens*. *New Phytologist* **139**: 571-580.
- Staddon PL, Gregersen R, Jakobsen I. 2004.** The response of two *Glomus* mycorrhizal fungi and a fine endophyte to elevated atmospheric CO₂, soil warming and drought. *Global Change Biology* **10**(11): 1909-1921.
- Staddon PL, Heinemeyer A, Fitter AH 2002.** Mycorrhizas and global environmental change: research at different scales. In. *Plant and Soil*. 2002; 244(1/2): 253-261: Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- StArnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA. 1996.** Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**: 328-332.
- Steinberg PD, Rillig MC. 2003.** Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalins. *Soil Biol. Biochem.* **35**: 191-194.

- Thomson Bd, Robson AD, Abbott LK. 1990.** Mycorrhizas formed by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* on subterranean clover in relation to soluble carbohydrate concentrations in roots. *New Phytologist* **114**: 217-225.
- Timmer LW, Leyden RF. 1978.** Stunting of citrus seedlings in fumigated soils in Texas and its correction by phosphorus fertilization and inoculation with mycorrhizal fungi. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **103**(4): 533-537.
- Tinker PB, Durall DM, Jones MD. 1994.** Carbon use efficiency in mycorrhizas - theory and sample calculations. *New Phytologist* **128**(1): 115-122.
- Tisdall JM, Oades J. 1979.** Stabilization of soil aggregates by the roots systems of ryegrass. *Aust J Soil Res* **17**: 429-441.
- Tisserant B, Gianinazzepearson V, Gianinazzi S, Golotte A. 1993.** In planta histochemical staining of fungal alkaline-phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research* **97**: 245-250.
- Tosi L, Giovannetti M, Zizzerini A, Sbrana C. 1993.** Interactions between *Plasmopara helianthi* and arbuscular mycorrhizal fungi in sunflower seedlings susceptible and resistant to downy mildew. *Phytopath. Medit.* **32**: 106-114.
- Toth R, Miller RM. 1984.** Dynamics of arbuscule development and degeneration in a *Zea mays* mycorrhiza. *American Journal of Botany* **71**(4): 449-460.
- Treseder KK, Allen MF. 2000.** Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO₂ and nitrogen deposition. *New Phytologist* **147**(1): 189-200.
- Treseder KK, Turner KM, Mack MC. 2007.** Mycorrhizal responses to nitrogen fertilization in boreal ecosystems: potential consequences for soil carbon storage. *Global Change Biology* **13**(1): 78-88.
- Tubiello FN, Fischer GI. 2007.** Reducing climate change impacts on agriculture: global and regional effects of mitigation, 2000-2080. *Technological Forecasting and Social Change* **74**(7): 1030-1056.
- Vierheilig H, Bago B, Lerat S, Piche Y. 2002.** Shoot-produced, light-dependent factors are partially involved in the expression of the arbuscular mycorrhizal status of AM host and non-host plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* **165**(1): 21-25.
- Vilarino A, Arines J, Schuepp H. 1993.** Extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium from sand samples. *Soil Biol. Bioch* **25**(1): 99-100.
- Watkins NK, Fitter AH, Graves JD, Robinson D. 1996.** Carbon transfer between C-3 and C-4 plants linked by a common mycorrhizal network,

- quantified using stable carbon isotopes. *Soil Biology & Biochemistry* **28**(4-5): 471-477.
- Whittingham J, Read DJ. 1982.** Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems .3. Nutrient transfer between plants with mycorrhizal interconnections. *New Phytologist* **90**(2): 277-284.
- Willson TC, Paul EA, Harwood RR. 2001.** Biologically active soil organic matter fractions in sustainable cropping systems. *Applied Soil Ecology* **16**(1): 63-76.
- Wright DP, Read DJ, Scholes JD. 1998a.** Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, cell and environment* **21**: 881-891.
- Wright DP, Scholes JD, Read DJ. 1998b.** Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* l. *Plant Cell and Environment* **21**(2): 209-216.
- Wright SF, Upadhyaya A. 1996.** Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* **161**(9): 575-586.
- Wu BY, Nara K, Hogetsu T. 2001.** Can C-14 labeled photosynthetic products move between *Pinus densiflora* seedlings linked by ectomycorrhizal mycelia? *New Phytologist* **149**(1): 137-146.
- Zhu Y-G, Miller RM. 2003.** Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant systems. *Trends in Plant Science* **8**(9): 407-409.

INDICE

INTRODUZIONE	3
1 - Lo sviluppo sostenibile in agricoltura	3
2 - Il contributo delle micorrize nell'agricoltura sostenibile	4
3 - La simbiosi micorrizica: caratteristiche anatomiche, biochimiche e fisiologiche	7
4 - Le micorrize arbuscolari	10
4.1 - Il ciclo vitale dei funghi micorrizico-arbuscolari	11
4.1.1 - La fase presimbiotica	12
4.1.2 - La fase simbiotica	13
4.2 - La classificazione dei funghi micorrizici arbuscolari	16
4.3 - Gli scambi metabolici tra i due simbionti	17
4.4 - La rete micorrizica extraradicale	23
4.4.1 - La produzione di comuni reti micorriziche extraradicali	27
5 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO ₂ atmosferica sullo sviluppo intra e extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari	32
6 - La valutazione quantitativa della biomassa fungina	38
7 - Gli agroecosistemi arborei : micorrize e gestione sostenibile	43
SCOPO DEL LAVORO	47
MATERIALI E METODI	49
1 - Studio della formazione e della funzionalita' nelle piante arboree da frutto di reti micorriziche extraradicali intra o interspecifiche	49
1.1- Esperimento 1A. Visualizzazione e osservazione delle modalita' di realizzazione di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti, utilizzando un sistema bidimensionale <i>in vivo</i> (metodo "sandwich")	51
1.2 -Esperimento 1B. Valutazione dei tempi di formazione nel terreno di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti	53

1.3 - Esperimento 1C. Verifica della funzionalita' della rete micorrizica come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale	55
1.4 - Determinazione del contenuto di glucosamina intraradicale	57
2 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO ₂ atmosferica sullo sviluppo intra ed extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari	61
2.1 - Esperimento 2A. Valutazione "time-course dell'estensione e della struttura della rete micorrizica extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO ₂	61
2.2 - Determinazione del fattore di conversione del fungo <i>G. mosseae</i> per la valutazione della biomassa fungina	63
2.3 - Esperimento 2B. Valutazione "time-course" dell'estensione della rete micorrizica extraradicale e determinazione della biomassa fungina intra ed extraradicale con 2 differenti concentrazioni di CO ₂	63
RISULTATI	67
1 - Studio della formazione e della funzionalita' nelle piante arboree da frutto di reti micorriziche extraradicali intra o interspecifiche	67
1.1 - Esperimento 1A . Visualizzazione e osservazione delle modalita' di realizzazione di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti	67
1.2 - Esperimento 1B. Valutazione dei tempi di formazione nel terreno di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti	70
1.3 - Esperimento 1C. Verifica della funzionalita' della rete micorrizica come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale	71
2 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO ₂ atmosferica sullo sviluppo intra ed extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari	89
2.1 - Esperimento 2A. Valutazione "time-course dell'estensione e della struttura della rete micorrizica extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO ₂	89
2.2 - Determinazione del fattore di conversione del fungo <i>G. mosseae</i> per la valutazione della biomassa fungina	92
2.3 - Esperimento 2B - Valutazione "time-course" dell'estensione della rete micorrizica extraradicale e determinazione della biomassa fungina intra ed extraradicale con 2 differenti concentrazioni di CO ₂	93

DISCUSSIONE	101
1 - Studio della formazione e della funzionalita' nelle piante arboree da frutto di reti micorriziche extraradicali intra o interspecifiche	101
1.1 - Visualizzazione dell'esistenza e delle modalita' di realizzazione di una comune rete micorrizica tra piante arboree della stessa specie o di specie differenti	101
1.2 - Verifica della funzionalita' della comune rete micorrizica extraradicale come sistema di interconnessione tra le specie presenti nella comunita' vegetale	102
2 - Influenza dell'incremento della concentrazione di CO ₂ atmosferica sullo sviluppo intra ed extraradicale di funghi micorrizici arbuscolari	106
2.1 - Estensione e densita' della rete micorrizica in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO ₂	107
2.2 - Quantificazione "time-course" della colonizzazione micorrizica in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO ₂	109
2.3 - Determinazione della biomassa fungina intra ed extraradicale in presenza di differenti concentrazioni atmosferiche di CO ₂	110
CONCLUSIONI	115
BIBLIOGRAFIA	117
ALLEGATI	133

