



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.**

**Laurea di primo livello in Biotecnologie**

Elaborato di Laurea

**Un sistema *in vitro* per lo studio dell'interazione *Glomus intraradices* – embrione somatico di *Daucus carota***

**Tutor: Prof.ssa Barbara Baldan  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Carla Usai**

**ANNO ACCADEMICO 2007/2008**



# INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>2</b>
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Colture cellulari</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Coltura da semi</b>	<b>7</b>
<b>2.3 Sistemi <i>in vitro</i> per lo studio della simbiosi micorrizica</b>	<b>7</b>
<b>2.3.1 Co-coltura su terreno solido</b>	<b>7</b>
<b>2.3.2 Colorazione con Trypan blue in lactoglicerolo</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 Co-coltura in mezzo liquido</b>	<b>9</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Il sistema di co-coltura su terreno solido rivela la presenza di contatti ifa-radice in misura maggiore per le plantule originatesi da embrioni a torpedine</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Il sistema di co-coltura in liquido può fornire un riscontro per i risultati ottenuti dal sistema con terreno solido</b>	<b>17</b>
<b>3.3 I calli ottenuti da ipocotili di <i>Daucus carota</i> sembrano mostrare corpi embriogenici</b>	<b>18</b>
<b>4. CONCLUSIONI</b>	<b>20</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>21</b>



## ABSTRACT

Questo lavoro di tesi è stato incentrato sullo studio della simbiosi micorrizica, usando come sistema sperimentale embrioni somatici di *Daucus carota* e spore di *Glomus intraradices*. Questa simbiosi mutualistica, ampiamente diffusa in natura, ha lo scopo di stabilire uno scambio di nutrienti tra i due simbionti.

È stato messo a punto un sistema *in vitro* per studiare le tappe caratteristiche della fase simbiotica: i due organismi vengono messi a contatto in piastre contenenti terreno solido, e il procedere dell'interazione (riconoscimento, formazione di appressori e arbuscoli) è monitorato periodicamente mediante una colorazione specifica per il micelio fungino e con la successiva osservazione al microscopio ottico. Nella fase precedente (presimbiotica), le spore germinano e le ife si accrescono cercando il contatto con una radice ospite di cui percepiscono la presenza grazie a segnali, parzialmente identificati, rilasciati dalla pianta. Anche il fungo rilascia molecole segnale, di natura ancora ignota, che inducono nelle cellule vegetali una trasduzione del segnale mediata dal  $\text{Ca}^{2+}$ . Un ulteriore obiettivo di questo lavoro è stato proprio la messa a punto di un sistema di contatto in terreno liquido in modo da poter raccogliere il mezzo di co-coltura contenente i segnali scambiati tra i due organismi negli stadi precoci dell'interazione.

## 1. INTRODUZIONE

Le micorrize arbuscolari (AM) sono il tipo più diffuso di simbiosi mutualistica; esse si stabiliscono tra funghi micorrizici arbuscolari e il 90% delle piante terrestri <sup>1</sup> quali Angiosperme, Gimnosperme, Pteridofite e alcune Briofite <sup>2</sup>. Queste associazioni avvengono negli ecosistemi terrestri da più di 460 milioni di anni e hanno un grande impatto sull'assunzione del fosforo da parte delle piante <sup>2</sup>, trattandosi di un'endosimbiosi in cui il fungo si insedia nelle cellule corticali delle radici da cui ottiene carboidrati, e in cambio trasferisce nutrienti minerali rari o poco solubili dal terreno come rame, zinco ed in primo luogo fosforo <sup>3</sup> (fondamentale per varie funzioni basilari della cellula e maggior nutriente limitante la produttività dei vegetali <sup>4</sup>). È proprio in caso di bassa disponibilità di questo minerale che la pianta accentua la sua capacità di stabilire simbiosi arbuscolo-micorriziche <sup>4</sup>.

I funghi micorrizici arbuscolari sono simbionti e biotrofi obbligati, in quanto è proprio il carbonio che essi ottengono dalle piante a consentirne la crescita e il completamento del ciclo vitale: ricevono dalla pianta il 100% del carbonio da essi utilizzato, facendo così aumentare il flusso di carbonio verso le radici fino a raggiungere il 20% dei fotosintati totali. Parallelamente le piante ricevono tutto il fosforo che utilizzano dal loro partner simbiotico fungino <sup>2</sup>. Oltre alla maggiore capacità nell'acquisizione dei minerali, è stato osservato che la colonizzazione delle radici da parte di funghi AM protegge le piante dai patogeni, dallo stress salino in ambienti aridi e semiaridi e da una moderata siccità <sup>4</sup>.

Tutti i funghi AM appartengono al phylum dei Glomeromycota (suddiviso in quattro generi), e quando non sono associati con una pianta si trovano nel suolo in forma di spore quiescenti (fase asimbiotica). In seguito alla germinazione le ife si allungano nel suolo alla ricerca di radici ospiti. Una volta stabilito il contatto, il fungo forma un appressorio sulla superficie delle radici che consente l'ingresso nei tessuti radicali. L'interazione pianta-fungo è accompagnata da variazioni della morfologia cellulare di entrambi i simbionti, al fine di creare nuove interfacce che permettano lo scambio di fosfati e carbonio <sup>2</sup>.

La simbiosi AM è un'associazione altamente compatibile e, in concentrazioni di fosfato limitanti, lo sviluppo intraradicale del fungo può estendersi per più dell'80% della lunghezza delle radici. Il fungo mantiene inoltre un micelio extraradicale (in continuità con le ife interne) che si estende per diversi cm dalla radice ed ha il ruolo di acquisire i fosfati, iniziare la colonizzazione di altre radici e, in molte specie, è anche un sito di sporulazione <sup>2</sup>.

Sono state notate similarità nelle interfacce arbuscolo-corticali con le interfacce endosimbiotiche di altre associazioni pianta-microorganismo <sup>2</sup>. È stato ipotizzato che la simbiosi che le leguminose stabiliscono con i batteri del genere *Rhizobium* si sia evoluta a partire dalla più antica simbiosi micorrizica, e questa idea è supportata da evidenze di similarità negli eventi molecolari. L'osservazione che un certo numero di mutanti difettivi per la nodulazione siano anche difettivi per le micorrize, indica l'esistenza di geni essenziali per entrambe le simbiosi; è stato inoltre osservato che alcuni geni indotti durante lo sviluppo dei noduli sono indotti anche durante la simbiosi micorrizica, ma la loro funzione non è ancora chiara <sup>5</sup>. I geni coinvolti sono chiamati collettivamente geni *SYM*, e hanno mostrato una parziale sovrapposizione nei programmi genetici per i due tipi di simbiosi <sup>6</sup>, soprattutto per quanto riguarda gli eventi di signalling "a valle"(ad esempio il

gene *SYM8* è necessario per la trasduzione del segnale in entrambe le associazioni), e si ipotizza che dopo i segnali iniziali i due pathways convergano in successivi eventi conservati <sup>5</sup>.

In molte simbiosi attuate dalle piante con microrganismi l'individuazione e l'attrazione del partner avvengono prima che si stabilisca un contatto diretto, e in alcuni casi un dialogo molecolare dà il via a eventi cruciali per gli stadi successivi dell'interazione <sup>2</sup>: prima dell'infezione i funghi AM riconoscono e rispondono al loro potenziale ospite <sup>3</sup>. È stato infatti osservato che composti (detti "branching factors") costitutivamente secreti dalle radici di specie ospiti, ma non dalle radici di specie non ospiti, sono in grado di stimolare e incentivare la ramificazione delle ife da spore germinanti dei generi *Gigaspora* e *Glomus* <sup>3</sup>; in realtà queste spore possono germinare e crescere anche in assenza di piante ospiti, ma solo in modo molto limitato <sup>7</sup>.

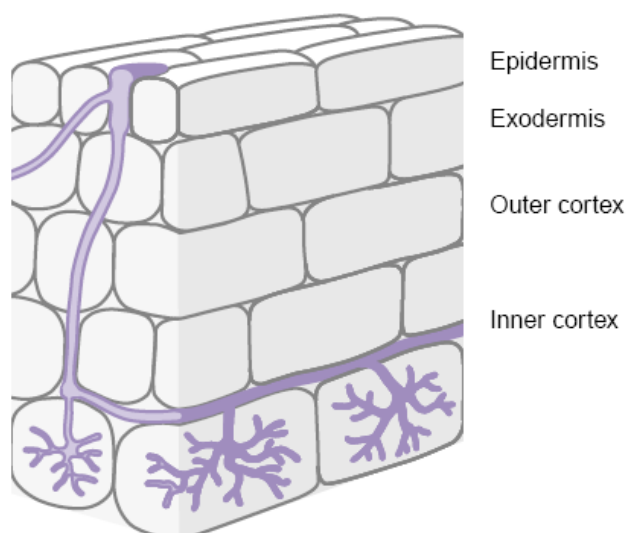
In seguito alla germinazione il fungo usa le riserve di triacilgliceroli e glicogeno contenute nella spora per la crescita che prosegue per qualche centimetro. In assenza di radici ospiti la crescita delle ife si arresta prima che le riserve della spora si siano esaurite, in modo che il fungo abbia altre opportunità di germinare e trovare una pianta ospite. In vicinanza delle radici di una pianta, invece, la crescita delle ife aumenta in maniera sostanziale fino al completo esaurimento delle riserve della spora, andando incontro ad un'intensa ramificazione in seguito alla percezione di sostanze essudate dalle radici della pianta ospite (fase presimbiotica). Si presume che la ramificazione sia volta a massimizzare le probabilità di contatto con la radice <sup>2</sup>. Sono quindi gli essudati radicali a provocare la transizione verso la fase presimbiotica, ed in particolare lo strigolattone 5-deossi-strigolo è stato individuato essere il componente con questa specifica funzione (è infatti in grado di indurre un'intensa ramificazione delle ife così come il sorgolattone, lo strigolo e l'analogo sintetico GR24) <sup>7</sup>.

Anche la pianta percepisce segnali provenienti dal fungo; si ipotizza che i funghi AM producano un segnale analogo al Nod factor, detto "Myc factor" di cui non è ancora nota la composizione, ma che si sa essere solubile, capace di diffondere attraverso membrane di diverso tipo, e con un peso molecolare inferiore a 3.5 kDa <sup>3</sup>. È stato inoltre dimostrato che spore AM rilasciano molecole prodotte costitutivamente che, una volta percepite dalle cellule di piante ospiti, inducono segnali mediati dal  $Ca^{2+}$  che portano a risposte specifiche della simbiosi AM; la molecola in questione (non ancora identificata) induce un rapido aumento della concentrazione citosolica di  $Ca^{2+}$  solo in piante ospiti, facendo ipotizzare che inizialmente non sia il fungo a discriminare tra potenziali ospiti e non ospiti, ma che sia la pianta a determinare la possibilità di iniziare la simbiosi percependo e rispondendo al segnale fungino. È possibile che questo sia un segnale coinvolto negli eventi precoci dell'instaurarsi della simbiosi (prima di un contatto fisico tra i due organismi) tra cui l'aumentata trascrizione di alcuni geni *SYM* codificanti per proteine attive nel pathway di segnalazione della simbiosi delle leguminose; due di tali prodotti genici agiscono a monte di un picco del  $Ca^{2+}$ , mentre un terzo agisce a valle costituendo l'ultimo passaggio condiviso tra le simbiosi attuate da *Rhizobium* e dai funghi AM <sup>8</sup>.

Esperimenti con *Medicago truncatula* hanno mostrato che l'espressione del gene *MtENOD11*, indotta durante la simbiosi AM, viene avviata nelle radici prima di un contatto diretto tra i due organismi; inoltre si è visto che tre specie di patogeni, posti nelle stesse condizioni e alla stessa distanza dalle radici rispetto al fungo

simbionte, non inducevano lo stesso effetto, indicando che l'espressione non è attivata in risposta a prodotti generici della crescita fungina e supportando l'ipotesi di una molecola segnale caratteristica di funghi AM<sup>3</sup>.

Dopo la colonizzazione della superficie della radice le ife solitamente penetrano in essa forzando il distacco delle pareti anticlinali di due cellule epidermiche adiacenti, e differenziano per formare l'arbuscolo (fase simbiotica); questa separazione, che avviene lungo la lamella mediana, è probabilmente facilitata da un'attività della pianta mediata dalla produzione e dal rilascio localizzato di enzimi pectolitici<sup>5,6</sup>. Il passaggio successivo consiste nell'attraversare le pareti delle cellule dell'epidermide e del parenchima corticale, ma senza penetrare nella membrana plasmatica, infatti la struttura fungina in formazione risulta avvolta da una struttura formata dalla pianta che comprende una membrana periarbuscolare in continuum con la membrana plasmatica. A dispetto della collocazione intracellulare del microsimbionte, i due citoplasmi restano quindi separati. La modificazione di queste strutture da parte della pianta dipende dall'attività dei geni *SYMRK* (*Symbiosis Receptor Kinase*)<sup>6</sup>.



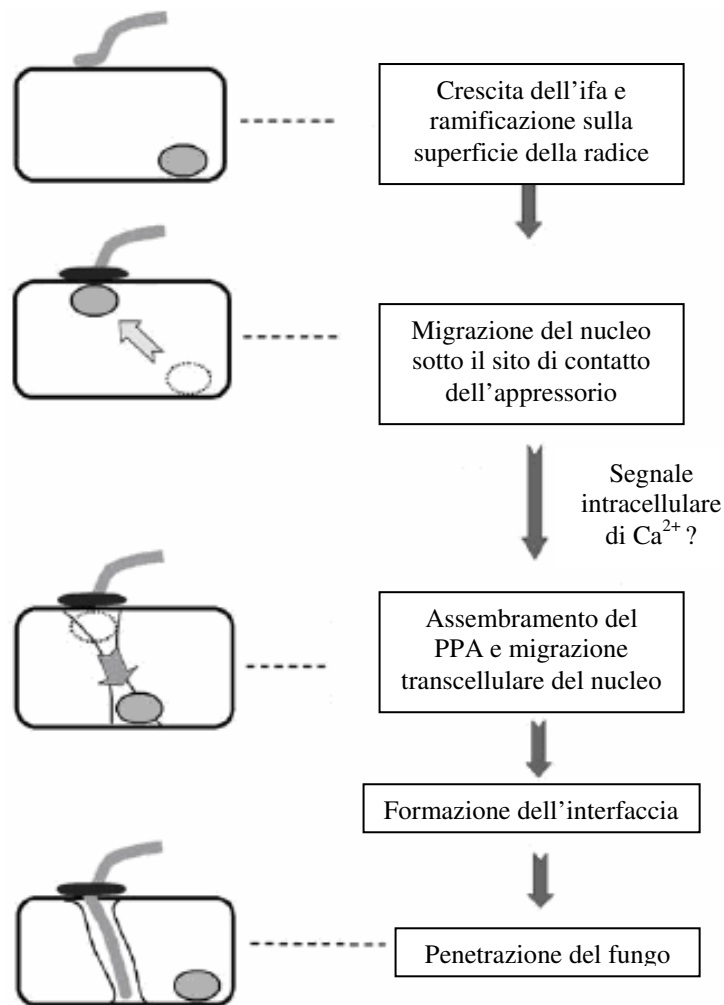
**Figura 1.1 Ingresso dell'ifa fungina nel parenchima corticale e formazione degli arbuscoli.**  
(da Parniske M., 2004)

La formazione dell'arbuscolo è accompagnata anche da alterazioni del citoscheletro delle cellule vegetali, in accordo con l'identificazione in *Zea mais* di un gene per la  $\beta$ -tubulina inducibile dalla micorrizza; inoltre l'espressione in *Nicotiana tabacum* del suo promotore fuso con un gene reporter ha indicato che questo gene è indotto solo nelle cellule in cui si sta sviluppando l'arbuscolo<sup>5</sup>.

La penetrazione dell'ifa nella radice può essere intercellulare o intracellulare. Studi condotti su *M. truncatula* con due diverse specie di *Gigaspora* hanno rivelato che le cellule epidermiche della radice rispondono alla formazione dell'appressorio con la creazione di strutture transienti guidate da movimenti dei nuclei all'interno delle cellule, consentendo il passaggio intracellulare dell'ifa. Inizialmente il nucleo si posiziona al di sotto del sito di contatto dell'appressorio e guida la riorganizzazione di microtubuli, microfilamenti e reticolo endoplasmatico a formare una struttura semiconica; un successivo allontanamento del nucleo

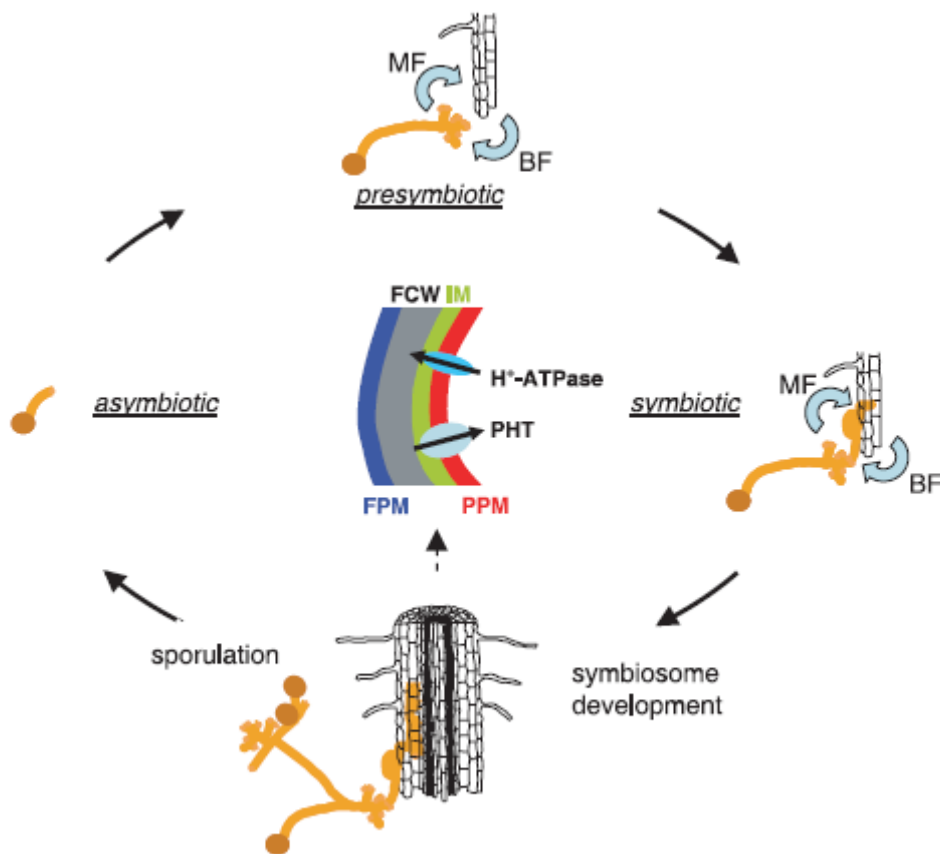


dall'appressorio è accompagnato dalla trasformazione della struttura semiconica in una colonna citoplasmatica, che definisce il percorso svolto dall'ifa per attraversare la cellula; pare che questa colonna, detta "apparato prearbuscolare", sia responsabile della sintesi della membrana periarbuscolare che previene il contatto diretto dell'ifa con il citoplasma della cellula vegetale<sup>9</sup>.



**Figura 1.2 Penetrazione intracellulare dell'ifa nell'epidermide con formazione dell'apparato prearbuscolare (PPA).** (adattato da Genre et al., 2005)

Considerando che lo scambio dei nutrienti avvenga proprio all'interfaccia costituita dalla membrana periarbuscolare, ci si può aspettare che durante la simbiosi siano indotti meccanismi di trasporto di membrana; in accordo con questa ipotesi in *Hordeum vulgare* sono stati identificati il cDNA di una ATPasi della membrana plasmatica, con la funzione putativa di fornire energia per i processi di trasferimento di nutrienti<sup>5</sup>, e trascritti relativi a trasportatori di fosfato inorganico<sup>4</sup>.



**Figura 1.3 Sviluppo di una simbiosi arbuscolare micorrizica.** MF=Myc factor; BF=Branching factor; FCW=Fungal cell wall; IM=interfacial matrix; FPM=Fungal plasma membrane; PPM=Plant plasma membrane; PHT=Phosphate transporter. (da Bucher M., 2007)

L'associazione micorrizica potrebbe avere un'importante applicazione nell'agricoltura, sfruttando lo stretto legame suolo-pianta creato dalla micorriza, il suo impatto sulla circolazione dei nutrienti, sulla nutrizione della pianta e sulla conservazione del suolo <sup>5</sup>. In realtà finora questo non è accaduto perché nei sistemi dell'agricoltura moderna il suolo è mantenuto costantemente ad alti livelli di fertilità, e la selezione tramite incrocio è solitamente condotta sotto queste condizioni; inoltre è possibile che gli attuali progetti di breeding volti ad ottenere resistenza alle malattie, in alcune specie di interesse agronomico abbiano effetti negativi sull'abilità della pianta di formare micorrize, e di conseguenza sulla loro capacità di assumere nutrienti in condizioni di basse concentrazioni di fosforo <sup>4</sup>. Bisogna inoltre considerare che i funghi AM sono in grado di attuare un'ampia varietà di interazioni in diverse condizioni ambientali dal mutualismo al parassitismo, che si realizza in particolare in presenza di un substrato ben fertilizzato con un alto contenuto di fosfati solubili (in questo caso il costo della simbiosi per il partner vegetale supera i benefici) <sup>4</sup>. In ogni caso solo una approfondita comprensione di come le micorrize funzionano in sistemi naturali complessi può consentire una loro appropriata gestione in agricoltura, silvicoltura e sistemi di risanamento ambientale <sup>4</sup>, come quelli riguardanti terreni contaminati da metalli pesanti (Mycorrhizoremediation) <sup>10</sup>.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Colture cellulari

Il sistema sperimentale usato in questo lavoro è costituito da cellule di carota (*Daucus carota*) ottenute da callo, mantenute in mezzo liquido B5F con saccarosio al 20% (p/V) e 2,4D alla concentrazione di 0.5 mg/l.

Le colture cellulari vengono rinnovate ogni 7 giorni trasferendo 2 ml di volume impaccato in terreno B5F fresco per un volume totale di 50 ml.

La linea cellulare utilizzata (SCO5) permette l'induzione dell'embriogenesi somatica diluendo la popolazione in assenza di ormoni (mezzo liquido B5<sup>-</sup>): in un volume totale di 50 ml è stato inoculato 1 ml di cellule di carota pari a 0,2 ml di volume impaccato (questo valore è stato ottenuto centrifugando un'aliquota di coltura per 2 min a 1600 rpm). Dopo 10 giorni è possibile osservare embrioni somatici nei vari stadi di sviluppo.

Le beute contenenti le cellule in B5F o B5<sup>-</sup> sono mantenute ad agitazione costante a 24°C con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

### 2.2 Coltura da semi

Parallelamente alle colture cellulari è stata allestita una coltura da semi di *D. carota*. I semi sono stati sterilizzati lavandoli una volta in Etanolo 75% per 10 min, due volte in ipoclorito di sodio 10% per 15 min e tre volte in H<sub>2</sub>O sterile, dopo di che sono stati sparsi con punte sterili su dischetti di carta imbibiti con acqua adagiati in capsule Petri; il tutto è stato svolto in condizioni di sterilità. Le scatole chiuse e parafilmate sono state conservate a 24°C avvolte in carta stagnola (al buio).

Dopo 15 giorni le plantule cresciute dai semi germinati sono state utilizzate per prelevare frammenti di ipocotili, ottenuti recidendo con un bisturi sterile appena sopra la radichetta e appena sotto i cotiledoni, e poi tagliando ulteriormente per ottenere dei piccoli cilindri. I frammenti così ottenuti sono stati adagiati in piastre contenenti ognuna 10 ml di B5<sup>-</sup> + agar 1,6% e 10 ml di B5F 2X (da 6 a 8 frammenti per piastra), allo scopo di ottenere calli da cui iniziare una linea embrogenica.

Una seconda coltura da semi è stata preparata successivamente cambiando alcune condizioni: la sterilizzazione è stata effettuata con ipoclorito di sodio al 5% invece che al 10%, e i dischi sono stati imbevuti con una quantità maggiore di H<sub>2</sub>O; tali variazioni sono volte a favorire ulteriormente la germinazione.

### 2.3. Sistemi *in vitro* per lo studio della simbiosi micorrizica

#### 2.3.1 Co-coltura su terreno solido

Per studiare le interazioni tra gli embrioni somatici e le spore del genere *Glomus* è stato utilizzato M medium<sup>11</sup> con Phytigel (Sigma) 0.5% (p/V) che, in quanto povero di fosfati e sodio, costituisce un ambiente sfavorevole per entrambi gli organismi che sono quindi spinti ad attuare la simbiosi.

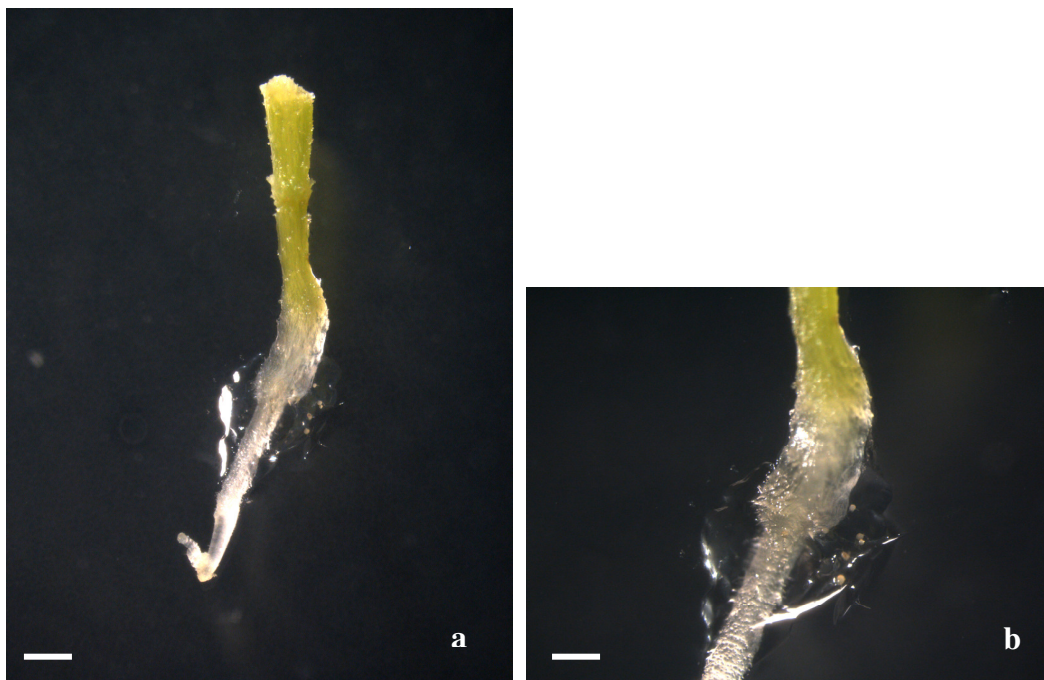
Sono state preparate 10 piastre (diametro 10 cm) ognuna contenente 20 ml di mezzo solido e circa 4 embrioni somatici o plantule cui sono state affiancate spore non germinate di *Glomus* (Fig. 2.3.1). Sono state inoltre allestite 2 piastre di

controllo: una contenente solo le plantule e una contenente solo spore fungine; in entrambi i casi sono stati utilizzati 20 ml di terreno solido.

Le spore di *Glomus intraradices* utilizzate sono state acquistate dalla ditta "Premiere Tech Biotechnologies" e conservate al buio a 4° C fino al momento dell'uso per prevenirne la germinazione.

Ogni piastra contiene embrioni in una singola fase (sfere, cuori, torpedini medie, torpedini avanzate, plantule medie e plantule grandi); gli embrioni sono stati selezionati manualmente utilizzando uno stereomicroscopio e sono stati posizionati nelle piastre con il medesimo orientamento dell'asse apico-basale.

Le piastre sono state poggiate orizzontalmente su un piano fino a quando le spore non hanno aderito alla superficie del terreno; in seguito sono state mantenute verticalmente con le radichette verso il basso e i cotiledoni verso l'alto.



**Figura 2.3.1** Plantula piastrata con spore di *Glomus intraradices*. a) barra = 1 mm; b) (particolare delle spore vicino alla radichetta) barra = 500 µm.

### **2.3.2. Colorazione con Trypan blue in lactoglicerolo**

Per rilevare l'avvenuto riconoscimento e il conseguente contatto tra i partners, si è proceduto con una colorazione con Trypan Blue specifica per le ife fungine. La colorazione prevede che frammenti di radici lunghi 0,5 - 1 cm (corrispondenti ai punti in cui sembra essere avvenuto il contatto pianta-fungo) siano prelevate sterilmente e incubate in KOH 2% (p/V) per 30 minuti a 90°C; vengono poi effettuati tre lavaggi con H<sub>2</sub>O distillata (ciascuno con 1 ml H<sub>2</sub>O per circa 3 minuti) cui segue un'incubazione in HCl 2% (v/v) per 15 minuti, e la colorazione vera e propria con Trypan Blue 0,05% (v/v) in lactoglicerolo (acido lattico, glicerolo e acqua in rapporto 1:1:1). Per la decolorazione le radici sono poste in glicerolo 50% (v/v) per 1 ora ad agitazione costante; il processo di decolorazione viene bloccato sostituendo il glicerolo con H<sub>2</sub>O milliQ.

L'osservazione dei campioni è effettuata con lo stereomicroscopio (Leica MZ75 con fotocamera digitale DCF480) e con il microscopio ottico (Leica DMR); le immagini sono acquisite con il programma IM500.

### **2.3.3 Co-coltura in mezzo liquido**

Per individuare lo stadio di sviluppo embrionale più incline a sviluppare la simbiosi è stato allestito un sistema in liquido, che consente lo studio di eventuali segnali solubili presenti nell'acqua di co-coltura.

Dischi di rete da filtrazione con un cut-off di 120  $\mu\text{m}$  tesi su piccoli telai di acciaio, sono stati posizionati all'interno di 9 beakers da 50 ml; nella retina sono stati praticati dei piccoli fori (5 o 6 per disco) in cui successivamente inserire le radici delle plantule o l'apice radicale degli embrioni; ogni beaker contiene 13 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ. Il tutto è stato sterilizzato in autoclave.

Dal flacone contenente le spore di *G. intraradices* sono stati prelevati 27 ml di sospensione, centrifugati a 1600 rpm per 5 min in modo da far adagiare le spore sul fondo della Falcon; 22 ml di surnatante sono stati prelevati e divisi in 2 Falcon poste in azoto liquido per congelarne e poi liofilizzarne il contenuto allo scopo di una successiva analisi al luminometro.

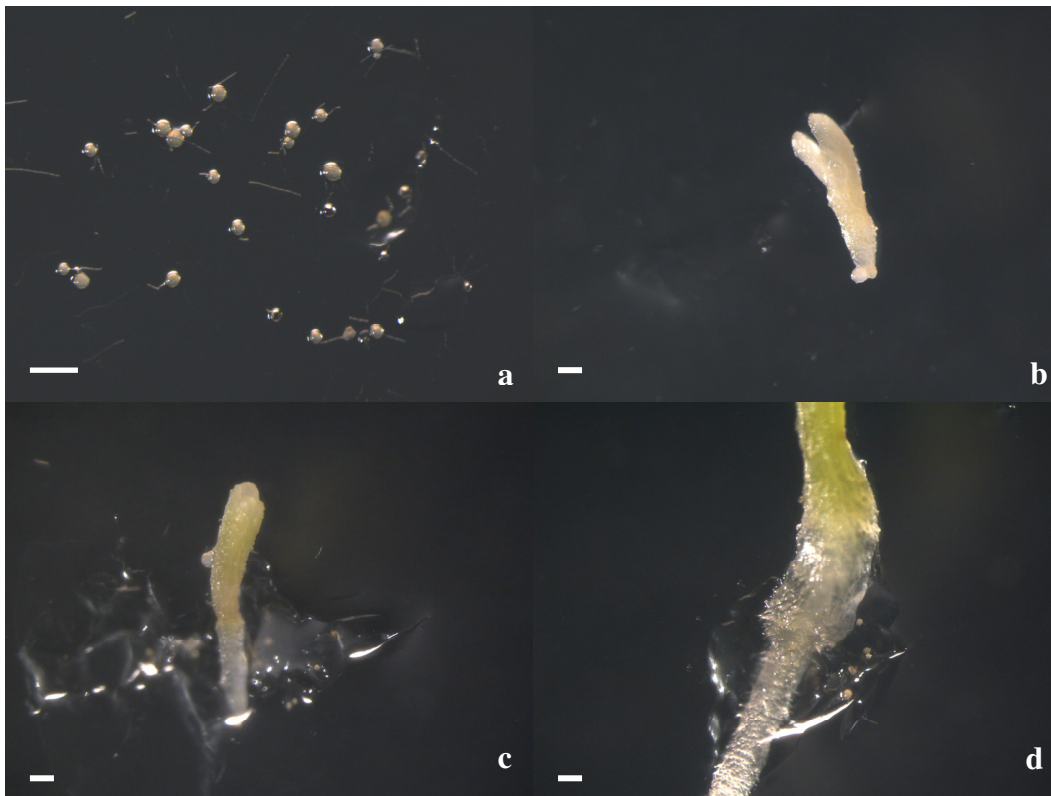
Nell'acqua di 6 dei 9 beakers sono stati posti 500  $\mu\text{l}$  di sospensione di spore; in 3 di questi sono stati posizionati embrioni nello stadio di torpedine, e in altri 3 sono state posizionate plantule in uno stadio già avanzato. I 3 beakers rimanenti sono stati utilizzati come controllo inserendo solo le plantule in assenza di spore. Sono state inoltre preparate 3 Falcon di controllo da 15 ml, ciascuna contenente 500  $\mu\text{l}$  di sospensione fungina in 13 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  sterile.

I beakers sono stati coperti con carta stagnola lasciando scoperta parte della superficie laterale in modo da consentire il passaggio della luce. I beakers e le tre Falcon sono mantenuti a 24°C con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Dopo 15 giorni l'acqua di co-coltura, filtrata con una rete con un cut-off di 55  $\mu\text{m}$  in modo da escludere le spore, è stata raccolta in 12 Falcon da 15 ml. I campioni sono stati rapidamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C per liofilizzarne successivamente il contenuto.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 Il sistema di co-coltura su terreno solido rivela la presenza di contatti ifa-radice in misura maggiore per le plantule originatesi da embrioni a torpedine

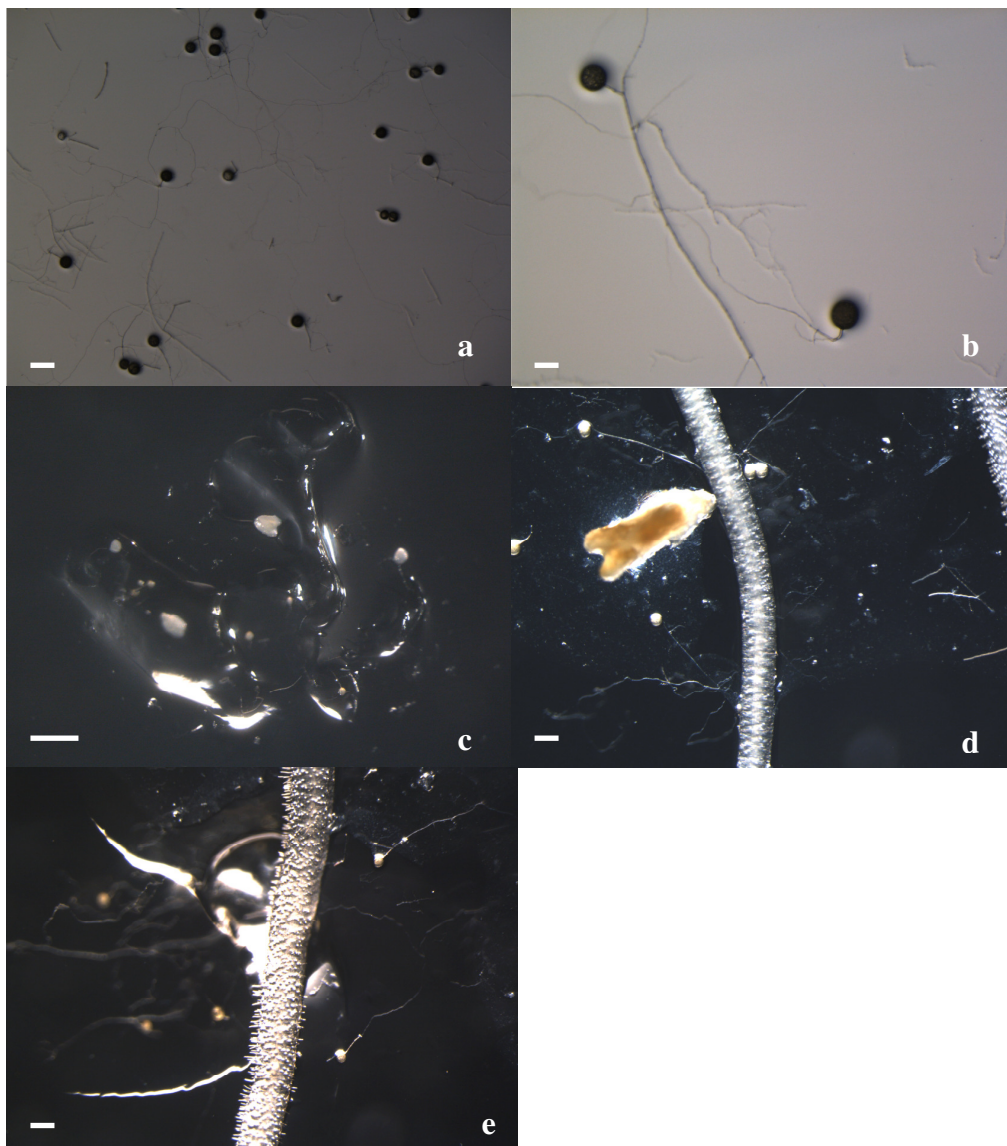
Uno dei sistemi *in vitro* per lo studio della simbiosi micorrizica ha previsto l'allestimento di una co-coltura dei due partners su terreno solido. Le 10 piastre contengono circa quattro embrioni ciascuna, ed in prossimità di questi sono stati posizionati piccoli quantitativi di spore non germinate (Fig. 3.1.1).



**Figura 3.1.1. Condizione di partenza della co-coltura in terreno solido.** a) spore di controllo: barra = 500  $\mu\text{m}$ ; b) torpedini di controllo: barra = 300  $\mu\text{m}$ ; c) torpedini con *Glomus*: barra = 200  $\mu\text{m}$ ; plantule con *Glomus*: barra = 500  $\mu\text{m}$ .

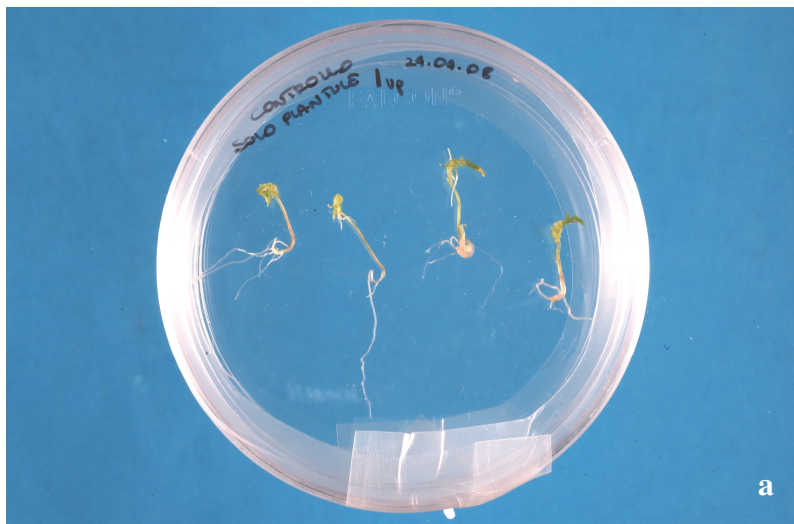
Il monitoraggio dello stato del sistema a diversi intervalli di tempo ci ha permesso di seguire lo sviluppo dell'interazione embrione-fungo.

Dopo 15 giorni dalla preparazione delle piastre, l'osservazione allo stereomicroscopio consente di vedere che le spore posizionate vicino agli embrioni hanno germinato, e che le ife si stanno sviluppando in direzione delle radichette; le spore di controllo mostrano invece una scarsa germinazione (Fig. 3.1.2).



**Figura 3.1.2 Stato della co-coltura dopo 15 giorni.** a) spore di controllo: barra = 190 µm; b) controllo spore (particolare di a): barra a = 90 µm; c) cuori con *Glomus*: barra = 500 µm; d) torpedini con *Glomus*: barra = 190 µm ; e) torpedini avanzate con *Glomus*: barra = 190 µm.

Ad una nuova osservazione condotta dopo 25 giorni dall'allestimento, le plantule di controllo (Fig. 3.1.3 a) sembrano essere cresciute meno rispetto a quelle piastrate con le spore di *Glomus* (Fig. 3.1.3 b,c,d), probabilmente perché non hanno potuto fruire dei benefici della simbiosi.

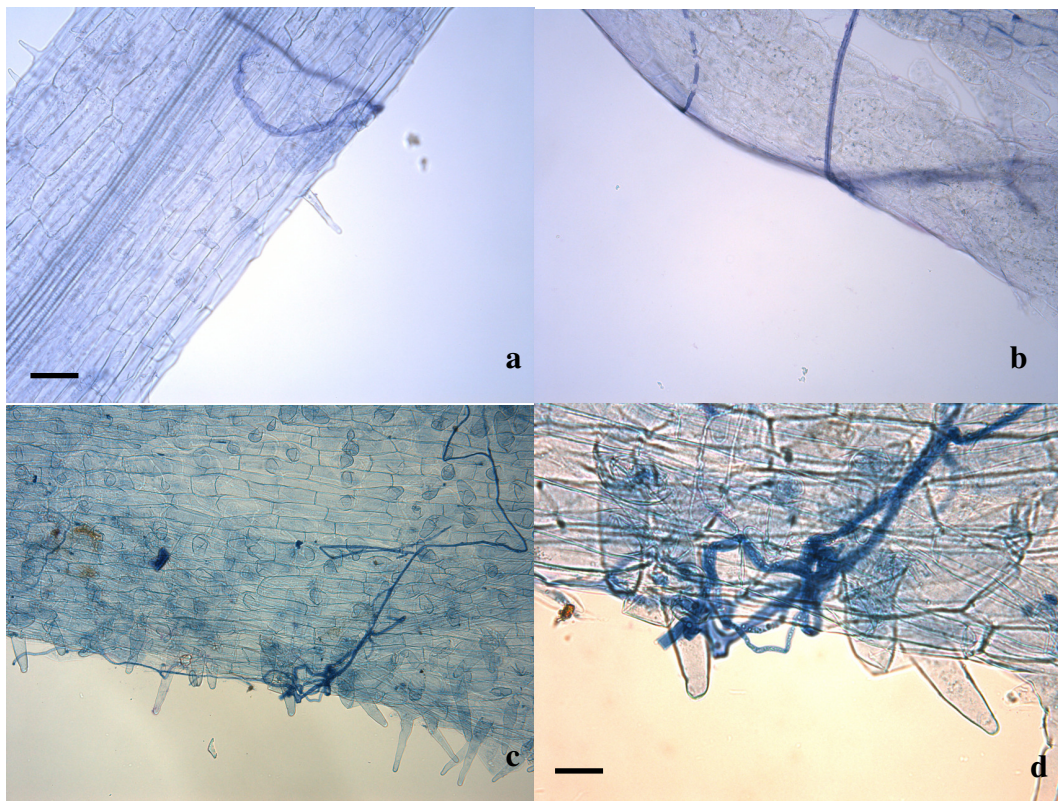






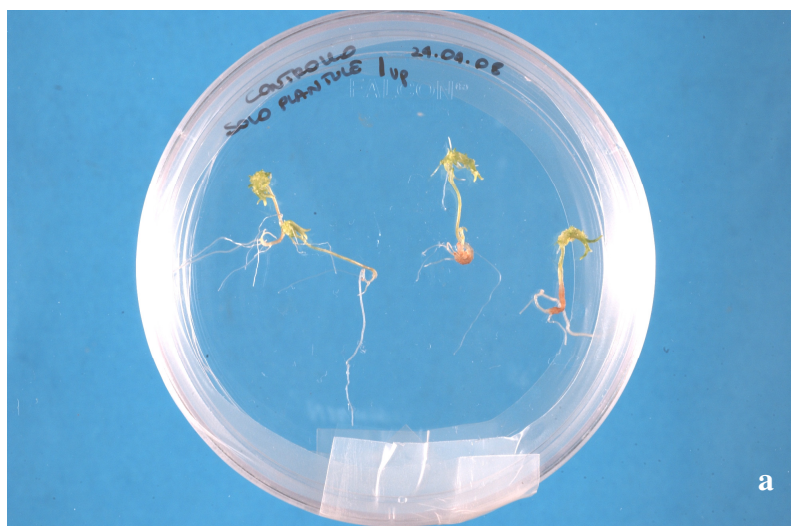
**Figura 3.1.3. (continua da pag.12) Fotografie delle piastre contenenti le plantule cresciute a partire dagli embrioni somatici dopo 25 giorni dall'allestimento. a) plantule di controllo; b) plantule grandi con *Glomus*; c) sfere con *Glomus*; d) torpedini avanzate con *Glomus*.**

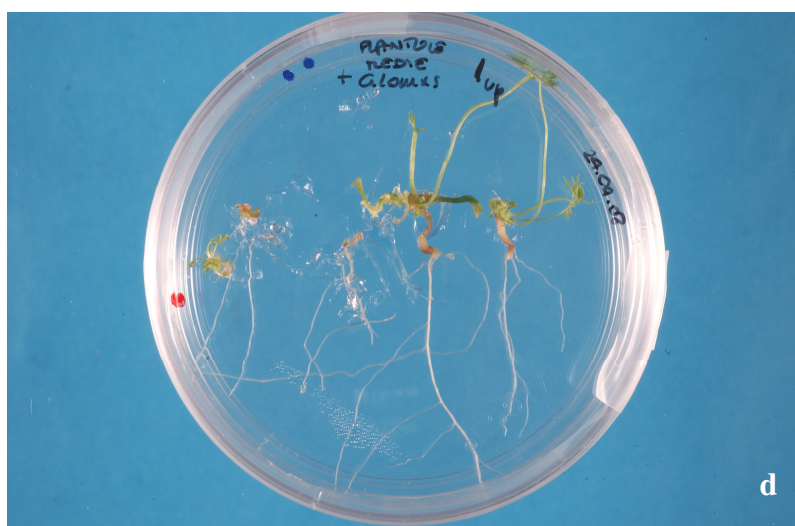
Nelle piastre contenenti i due simbionti si può vedere che le ife hanno proseguito la loro crescita verso le radichette, stabilendo in qualche caso dei primi contatti superficiali (Fig. 3.1.4). Per individuare la formazione di eventuali appressori è stata effettuata la colorazione con Trypan blue in lactoglicerolo specifica per il micelio fungino; l'osservazione al microscopio ottico dei frammenti di radice colorati ha rivelato la presenza di appressori in particolare nelle radici sviluppatesi dalle torpedini avanzate (Fig. 3.1.4 d).



**Figura 3.1.4 Colorazione con Trypan blue in lactoglicerolo (torpedini avanzate) dopo 25 giorni. a,b c) barra = 50 µm; d) barra = 20 µm.**

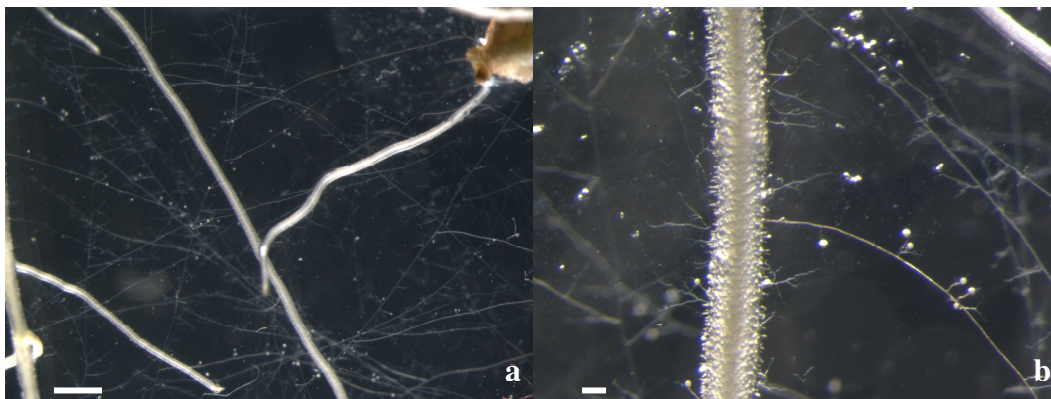
Dopo 6 settimane notiamo che le plantule di controllo (fig. 3.1.5 a) hanno radici molto meno ramificate rispetto a quelle cresciute in presenza del fungo (Fig. 3.1.5 b,c,d), probabilmente perché non hanno avuto la possibilità di sopperire alle basse concentrazioni di minerali nel terreno di coltura instaurando un rapporto simbiotico. Ciò sembra confermare quanto riportato in letteratura per altri sistemi pianta-micorriza: è stato dimostrato che la presenza del fungo (Glomeromycota) ha un effetto positivo sulla formazione di radici laterali provocando un aumento della ramificazione dell'apparato radicale in diverse specie vegetali <sup>2</sup>.





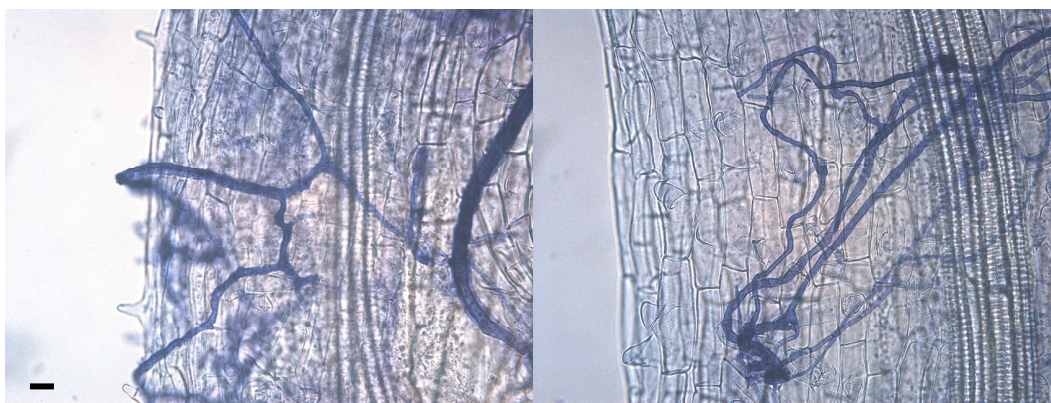
**Figura 3.1.5 (continua da pag.14) Fotografie delle piastre contenenti le plantule cresciute dagli embrioni dopo 6 settimane dall'allestimento. a) plantule di controllo; b) torpedini con *Glomus*; c) torpedini avanzate con *Glomus*; d) plantule medie con *Glomus*.**

L'osservazione allo stereomicroscopio (Fig. 3.1.6) mostra contatti ifa-radice nelle piastre con cuori, torpedini e plantule medie. Inoltre nella piastra contenente torpedini e *Glomus* le ife formano una rete molto fitta con ramificazioni che presentano spore terminali; queste spore (misurate allo stereomicroscopio) hanno un diametro pari a circa un mezzo rispetto a quelle usate per la co-coltura (una media di 30  $\mu\text{m}$  contro i circa 80  $\mu\text{m}$  delle spore seminate). La formazione di nuove spore può essere intesa come indice dell'avvenuta simbiosi, da cui anche il partner fungino riceve benefici nella forma di un maggiore apporto di derivati del carbonio (bisogna ricordare che l'M medium costituisce un ambiente sfavorevole anche per il fungo).



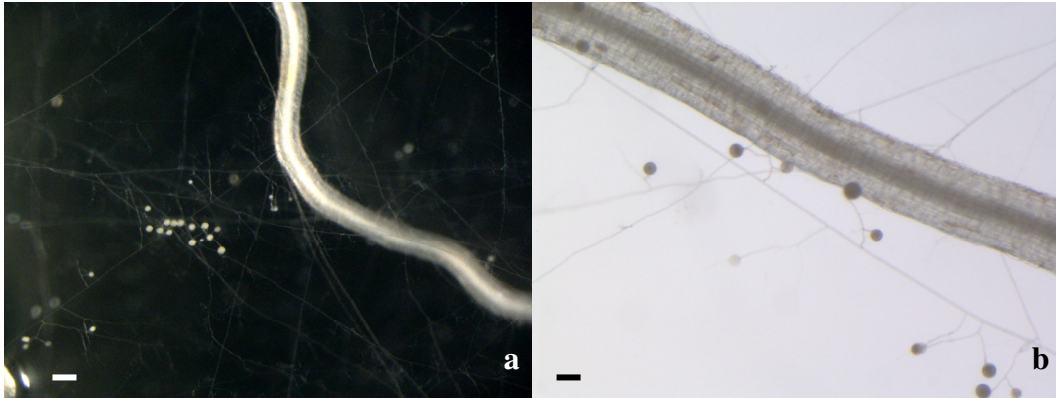
**Figura 3.1.6.** Stato della co-coltura dopo 6 settimane nella piastra contenente torpedini e *Glomus*; da notare le piccole spore alle estremità delle ife secondarie. a) barra = 550  $\mu\text{m}$ ; b) barra = 100  $\mu\text{m}$ .

La colorazione con il Trypan blue in lactoglicerolo di frammenti prelevati da questa piastra (Fig. 3.1.7) ha messo in evidenza un numero elevato di appressori sulle radici e una colonizzazione molto più marcata rispetto alle osservazioni precedenti, ma non sono state individuate formazioni arbuscolari.



**Figura 3.1.7.** Colorazione con Trypan blue in lactoglicerolo (torpedini avanzate con *Glomus*) dopo 6 settimane. Notare il groviglio di ife che avvolge le radici e i numerosi appressori; barra = 20  $\mu\text{m}$ .

Misurando nuovamente le spore dopo altri 12 giorni (Fig. 3.1.8), si vede che queste hanno raggiunto le dimensioni di quelle che erano state seminate (hanno un diametro medio di 79,5  $\mu\text{m}$ ).

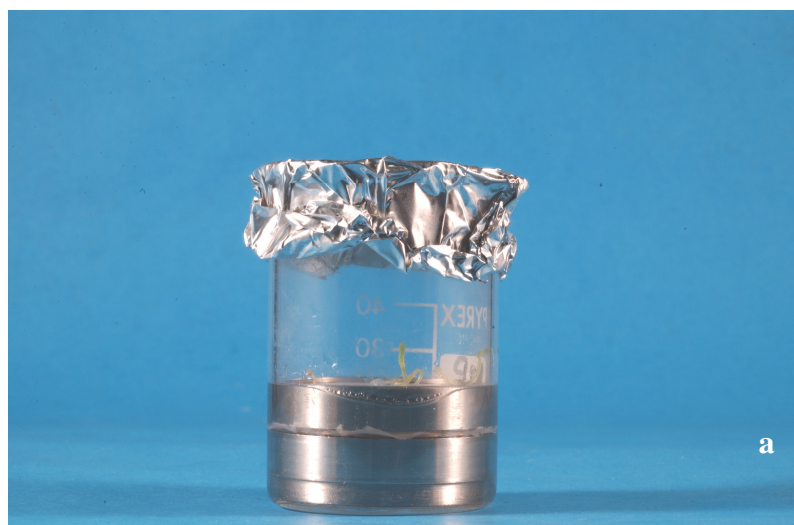


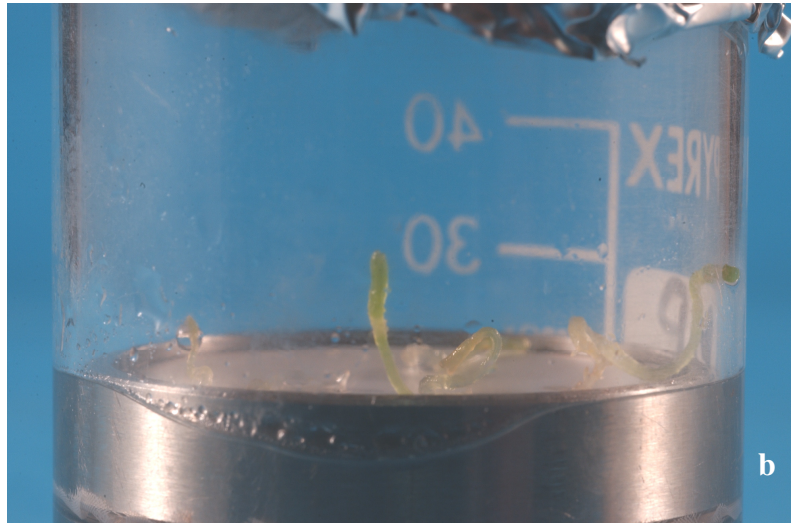
**Figura 3.1.8. Stato della co-coltura dopo 52 giorni nella piastra contenente torpedini e *Glomus*.** a) barra: 250  $\mu\text{m}$ ; b) barra: 100  $\mu\text{m}$ .

Il fatto che questa intensa ramificazione delle ife e la formazione di spore terminali nel micelio extraradicale non siano visibili nelle piastre in cui erano stati collocati embrioni somatici nelle altre fasi, suggerisce che lo stadio embrionale di torpedine sia il più ricettivo all'avvio e allo sviluppo di una simbiosi micorrizica arbuscolare di tipo mutualistico.

### **3.2 Il sistema di co-coltura in liquido può fornire un riscontro per i risultati ottenuti dal sistema in terreno solido.**

Il sistema in mezzo liquido (Fig. 3.2.1) ha lo scopo di individuare eventuali segnali solubili scambiati tra la pianta e il fungo presenti nell'acqua di co-coltura; questo è reso possibile dal fatto che le radichette e gli apici radicali di plantule ed embrioni somatici sono immersi nell'acqua in cui si trovano le spore, o comunque sono a contatto con il liquido.



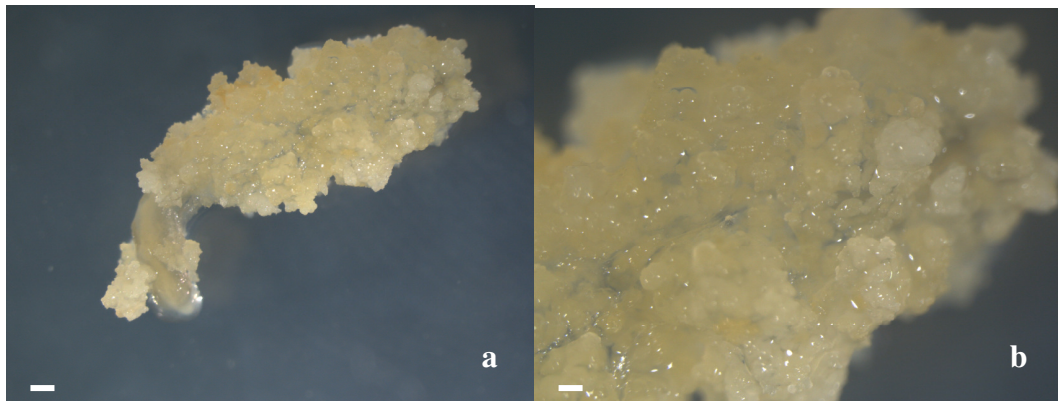


**Figura 3.2.1 (continua da pag. 17) a) Sistema di co-coltura in mezzo liquido contenente plantule e *Glomus*; b) particolare.**

Il tempo a nostra disposizione non è stato però sufficiente per procedere con la liofilizzazione del mezzo di co-coltura e con la successiva analisi al luminometro di cellule trasformate con equorina messe a contatto con tali mezzi. Ciò avrebbe potuto rilevare la generazione di transienti di  $Ca^{2+}$ , ritenuto il mediatore della trasduzione del segnale in questo tipo di simbiosi. Recentemente è stato infatti dimostrato che, in un sistema cellulare, questo ione è coinvolto nella trasduzione di segnali contenuti nel mezzo di germinazione di spore di *Gigaspora margarita*<sup>8</sup>.

### **3.3. I calli ottenuti da ipocotili di *Daucus carota* sembrano mostrare corpi embriogenici**

Parallelamente ai due sistemi di co-coltura *in vitro* è stata allestita una coltura da semi di *D. carota*; dalle plantule ottenute sono stati recisi frammenti di ipocotili successivamente piastrati su terreno solido contenete B5F per indurre la formazione di calli. L'osservazione allo stereomicroscopio ha consentito di valutare l'andamento del processo di sdifferenziamento. Sono stati ottenuti calli gialli dalla consistenza friabile; dopo 2 settimane alcuni di essi sembrano già presentare corpi embriogenici (Fig. 3.3.1).



**Figura 3.3.1** Calli ottenuti da frammenti di ipocotili di plantule di *D. carota*. Le zone più chiare e traslucide potrebbero costituire corpi embriogenici. a) barra = 500  $\mu$ m; b) barra = 1,25 mm.

La disponibilità di una linea embriogenica è fondamentale per poter proseguire questo studio, in quanto le cellule mantenute in coltura potrebbero subire modificazioni inficiando l'attendibilità dei risultati ottenuti. Si potrà testare l'effettiva embriogenicità cercando di ottenere embrioni somatici una volta che la linea cellulare si sarà stabilizzata, e in seguito a successivi passaggi in mezzo liquido.

#### 4. CONCLUSIONI

Questo studio *in vitro* della simbiosi micorrizica arbuscolare suggerisce che lo stadio di sviluppo embrionale più adatto per portare a compimento l'interazione mutualistica tra *Glomus intraradices* e *Daucus carota* sia quello riconducibile alla fase di torpedine. Si può giungere a questa conclusione osservando che, per quanto riguarda il sistema su terreno solido, solo nelle piastre contenenti embrioni in fase torpedine cresciuti in presenza di spore fungine, è visibile un'intensa ramificazione delle ife del micelio extraradicale con la formazione di nuove spore. Il micelio extraradicale è infatti un sito di sporulazione il cui utilizzo, in un mezzo stressante quale è l'M medium da noi utilizzato, può essere ricondotto con alta probabilità all'approvvigionamento di fotosintati da parte del macrosimbionte.

I risultati fin qui ottenuti non sono però sufficienti per affermare che lo stadio a torpedine sia effettivamente il più ricettivo, ma questa deduzione potrà essere confermata o confutata dall'analisi al luminometro di cellule di soia, esprimenti la fotoproteina  $\text{Ca}^{2+}$ -sensibile equorina, incubate con i mezzi raccolti dopo cocoltura tra *Glomus* e gli stadi embrionali scelti. Infatti le misure dell'eventuale aumento della concentrazione citosolica di  $\text{Ca}^{2+}$  potrebbero fornire caratteristiche cinetiche utili a discriminare il tipo di transienti generati dai due mezzi considerati.

Gli embrioni somatici ottenuti da colture cellulari si sono dimostrati adatti per svolgere questo tipo di studio, ma è necessario tenere presente che le cellule in coltura sono soggette a modificazioni, per cui è preferibile rinnovarle periodicamente allestendo nuove linee embriogeniche.



## 5. BIBLIOGRAFIA

1. **Oldroyd G.E.D., Harrison M.J., Udvardi M. (2005)** Peace talks and trade deals. Keys to long-term harmony in Legume-Microbe Symbiosis. *Plant Physiology* **137**:1205-1210
2. **Harrison M.J. (2005)** Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **59**:19-42
3. **Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Dénarié J., Barker D.G., Bécard G. (2003)** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131**:952-962
4. **Bucher M. (2007)** Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* **173**: 11-26
5. **Harrison M.J. (1998)** Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 360-365
6. **Parniske M. (2004)** Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 414-421
7. **Akiyama K., Matzusaki K., Hayashi H. (2005)** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**:824-827
8. **Navazio L., Moscatiello R., Genre A., Novero M., Baldan B., Bonfante P., Mariani P. (2007)** A diffusible signal from Arbuscular Mycorrhizal Fungi elicits a transient cytosolic Calcium elevation in host plant cells. *Plant Physiology* **144**:673-681
9. **Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P., Barker D.G. (2005)** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The plant cell* **17**:3489-3499
10. **Khan A.G. (2007)** Mycorrhizoremediation – an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* **7**: 503-514
11. **Bécard G., Fortin J.A. (1988)** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108**:211-218