



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

MICORRIZE NEGLI ECOSISTEMI FORESTALI
Ruolo nei cicli biogeochimici e possibilità di impiego nel
biorisanamento dell'inquinamento da metalli pesanti

Mycorrhizae in forest ecosystems: role in biogeochemical cycles
and potential use in bioremediation of heavy metal pollution

TIPO TESI: compilativa

Studente:
DIEGO SCOCCIA

Relatore:
PROF. CRISTIANO CASUCCI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

“Buon numero 26”
Roberto Mercadini

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	7
CAPITOLO 1 LA RIZOSFERA	9
1.1 Struttura della rizosfera.....	9
1.2 Processi fisici e proprietà della rizosfera	11
1.3 Processi chimici della rizosfera.....	12
1.3.1 Movimento dei nutrienti: zone di impoverimento e zone di accumulo	12
1.3.2 Le rizodeposizioni.....	13
1.3.3 Il pH.....	14
1.3.4 L'alterazione dei minerali.....	15
1.3.5 Attività enzimatiche.....	15
1.4 Interazioni tra piante e microrganismi della rizosfera.....	16
1.4.1 Interazioni indifferenti.....	16
1.4.2 Interazioni dannose.....	16
1.4.3 Interazioni favorevoli.....	17
CAPITOLO 2 LE MICORRIZE	20
2.1 Ectomicorrize (ECM).....	24
2.1.1 Morfologia	24
2.1.2 Modalità di colonizzazione.....	27
2.2 Micorrize arbuscolari (AM).....	28
2.2.1 Generalità.....	28
2.2.2 Modalità di colonizzazione.....	29
2.2.3 Cenni sugli scambi nutrizionali nelle micorrize arbuscolari.....	32
CAPITOLO 3 LE MICORRIZE NEGLI ECOSISTEMI FORESTALI.....	34
3.1 Distribuzione globale.....	34

3.2 Diversità.....	36
3.3 Apporto di acqua e miglioramento dello stress idrico	37
3.4 Le micorrize nel ciclo del carbonio.....	39
3.4.1 Generalità sul ciclo del carbonio.....	39
3.4.2 La fotosintesi.....	40
3.4.3 La respirazione aerobia.....	40
3.4.4 Il ruolo delle micorrize nel ciclo del carbonio	42
3.5 Le micorrize nel ciclo dell'azoto	46
3.5.1 Generalità sul ciclo dell'azoto	46
3.5.2 L'importanza dell'azoto nelle piante e nelle foreste	48
3.5.3 Il ruolo delle micorrize nel ciclo dell'azoto	49
3.6 Micorrize nel ciclo del fosforo.....	52
3.6.1 Generalità sul ciclo del fosforo nel sistema suolo-pianta	52
3.6.2 Fosforo nelle foreste e ruolo delle micorrize	52
3.7 Reti micorriziche.....	55
3.8 Micorrize come agenti di biorisanamento.....	58
 CAPITOLO 4 MICORRIZE NEL BIORISANAMENTO DELL'INQUINAMENTO DA METALLI PESANTI.....	 59
4.1 Fonti di emissione e problemi forestali correlati.....	59
4.2 Effetti fitotossici dei metalli pesanti	62
4.3 Meccanismi di protezione dai metalli pesanti nelle micorrize.....	63
4.4 Casi studio.....	65
4.4.1 Articolo 1	65
4.4.2 Articolo 2	68
4.4.3 Articolo 3	72
4.4.4 Articolo 4	75
 CONCLUSIONI	 81
RINGRAZIAMENTI	83
BIBLIOGRAFIA	84

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 2.1 Tipologie di micorriza.....	23
Tabella 4.1 Contenuto di nutrienti in <i>P. halepensis</i>	71
Tabella 4.2 Effetti sulla crescita di <i>Nauclea orientalis</i>	73
Tabella 4.3 Effetti dell'inoculazione sul peso secco	73
Tabella 4.4 Effetti sull'assorbimento di fosforo	74
Tabella 4.5 Effetti dell'inoculazione sul Pb.....	74

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1.1 La rizosfera.....	9
Figura 1.2 Attività radicali primarie	11
Figura 1.3 Distribuzione del carbonio fissato	14
Figura 1.4 Gradienti di pH nella rizosfera	15
Figura 1.5 Interazioni nella rizosfera	18
Figura 2.1 Espansione dell'apparato radicale	21
Figura 2.2 Micorrize al microscopio.....	23
Figura 2.3 Struttura delle ectomicorrize	24
Figura 2.4 Microscopie	26
Figura 2.5 Strategie di esplorazione.....	27
Figura 2.6 Morfologia AM	29
Figura 2.7 Picchi di Ca.....	30
Figura 2.8 Colonizzazione delle AM	32
Figura 2.9 Scambio di N, P e C tra il fungo e la radice	33
Figura 3.1 Biomassa epigea della vegetazione micorrizica	34
Figura 3.2 Distribuzione delle piante micorriziche.....	35
Figura 3.3 Posizionamento dei pini.....	38
Figura 3.4 Densità delle micorrize.....	38
Figura 3.5 Ciclo biologico del carbonio.....	39
Figura 3.6 Fotosintesi.....	40
Figura 3.7 Respirazione cellulare.....	42
Figura 3.8 Flussi di carbonio nelle micorrize	42
Figura 3.9 Influenza sulla SO	45
Figura 3.10 Rappresentazione sintetica del ciclo dell'azoto. Di Greywolf.....	46
Figura 3.11 Assorbimento dell'azoto.....	50
Figura 3.12 Ciclo del fosforo nel sistema suolo-pianta.....	52
Figura 3.13 Assorbimento del fosforo derivato dall'acido fitico	54
Figura 3.14 Deplezioni di fosfato	55

Figura 3.15 Struttura topologica	56
Figura 4.1 Distribuzione globale delle aree minerarie	61
Figura 4.2 Reazione di chelazione	63
Figura 4.3 Meccanismi di tolleranza	64
Figura 4.4 Tasso di assorbimento di fosfato	66
Figura 4.5 Concentrazione di Cd negli aghi	67
Figura 4.6 Aspetti morfologici di <i>Pinus halepensis</i>	70
Figura 4.7 Massa secca	70
Figura 4.8 Peso secco di <i>L. leucocephala</i>	77
Figura 4.9 Effetti nel contenuto di manganese	78
Figura 4.10 Mn sulla superficie delle spore	79
Figura 4.11 Tossicità fogliare	80

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Le foreste costituiscono uno degli ecosistemi più importanti del pianeta, dato che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione del clima, nel ciclo dei nutrienti e nel favorire la biodiversità. Sono in grado di fissare il carbonio atmosferico riducendo l'anidride carbonica nell'atmosfera mitigando l'effetto serra e rappresentano l'habitat di milioni di specie vegetali e animali, costituendo un enorme sink di biodiversità. Tuttavia, la stabilità di questi essenziali ecosistemi è minacciata dalla crescente deforestazione, dall'inquinamento e dal cambiamento climatico. In questo contesto di crescente disturbo, un importante ruolo nella stabilizzazione delle foreste è ricoperto dalle simbiosi micorriziche o, più semplicemente, "micorrize". Le micorrize sono delle interazioni simbiotiche che si instaurano tra le radici di molte piante e determinati funghi, e queste relazioni offrono notevoli vantaggi alle piante e ne aumentano la resistenza a diversi fattori di stress. Lo scopo della tesi è quello di indagare, attraverso la revisione di numerosi articoli presenti in letteratura, il ruolo ricoperto dalle micorrize in ambiente forestale.

Il rapporto tra la pianta e il fungo si verifica in una particolare zona del suolo, strettamente aderente alle radici, chiamata rizosfera. La rizosfera presenta caratteristiche particolari, perciò il primo capitolo approfondisce i processi fisico-chimici e biologici che coinvolgono questa parte di suolo alla base dell'interazione pianta-fungo. Il secondo capitolo è volto ad introdurre alcune generalità sulle micorrize, analizzando le principali tipologie e descrivendo il modo in cui si formano. Vengono trattate particolarmente le ectomicorrize (EC o ECM) e le micorrize vescicolari-arbuscolari (AM), ovvero le due tipologie di gran lunga più diffuse a livello globale. Il terzo capitolo approfondisce il ruolo ecologico delle micorrize negli ambienti forestali per esporre in quali modi sono in grado di contribuire alla stabilità delle foreste a livello globale. Viene discusso il ruolo che hanno le micorrize nella riduzione dello stress idrico, nei principali cicli biogeochimici (carbonio, azoto e fosforo), nella formazione di reti di comunicazione tra gli alberi e nella riduzione dell'inquinamento. Tra le varie forme di inquinamento, una che sta acquisendo una crescente importanza è l'accumulo di metalli pesanti nell'ambiente; il quarto capitolo è incentrato sulla possibilità di impiegare le micorrize nella bonifica e riforestazione di terreni soggetti ad accumulo di metalli pesanti. Vengono

esposti i principali meccanismi attraverso cui le micorrize favoriscono lo sviluppo delle piante in terreni inquinati e vengono presentati quattro casi studio che mostrano risultati promettenti nell'ottica di un possibile loro impiego nella riforestazione di terreni inquinati.

Questa tesi intende fornire una panoramica sulle attuali conoscenze sulle micorrize in contesti forestali, sottolineando il loro potenziale ecologico e la loro importanza nella resilienza delle foreste, sempre più minacciate da fattori di disturbo.

Capitolo 1

LA RIZOSFERA

Il termine “rizosfera” (dal greco “rhizo” = radice, e “sphaira” = sfera) è stato coniato dallo scienziato tedesco Hiltner nel 1904 per definire “la zona di suolo adiacente alle radici delle leguminose che presentano alti livelli di attività batterica”. Successivamente tale definizione è stata rivista più volte ed oggi il termine “rizosfera” indica la parte di suolo a stretto contatto con le radici in cui le proprietà fisiche, chimiche e biologiche sono state modificate dalla crescita ed attività radicale e dai microrganismi associati, noti come microbioma radicale.

1.1 Struttura della rizosfera

In generale la rizosfera può essere suddivisa in tre parti principali:

- Endorizosfera: è la parte che comprende il tessuto radicale colonizzato o potenzialmente colonizzabile dai microrganismi;
- Ectorizosfera: è la parte di suolo a stretto contatto con la radice;
- Rizoplano: è la superficie radicale sulla quale aderiscono le particelle del suolo e i microrganismi. Consiste di epidermide, strato corticale e strato polisaccaridico mucillaginoso. È la linea di demarcazione tra endo ed ectorizosfera.

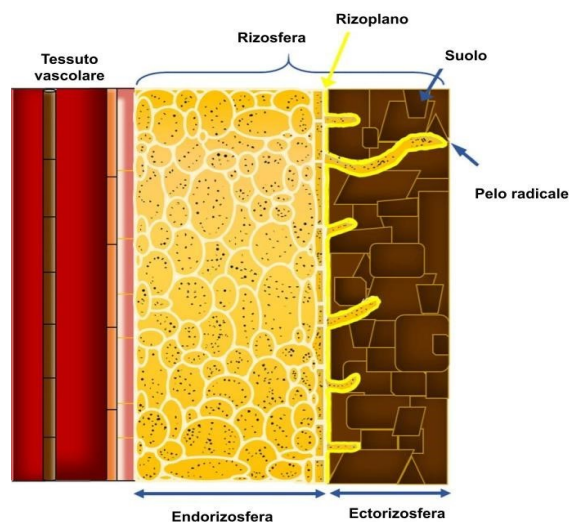


Figura 1.1 Schematizzazione dei livelli della rizosfera. *Modificato da Scavo et al., 2019.*

La rizosfera presenta una dinamica complessa che coinvolge i movimenti di acqua e nutrienti, le dinamiche delle popolazioni microbiche e della sostanza organica e l'alterazione dei minerali del suolo. Al suo interno si verificano scambi di energia, nutrienti e segnali molecolari che la rendono profondamente diversa dal cosiddetto suolo "bulk", ovvero quello non influenzato dall'attività radicale. I pori del suolo rizosferico possono contenere molti batteri e altri microrganismi in numero molto maggiore rispetto al suolo bulk, dato che attorno alla radice riescono a proliferare maggiormente nutrendosi di cellule vegetali distaccate, proteine e zuccheri rilasciati dalle radici. Per quanto riguarda l'architettura, questa è strettamente correlata a quella del sistema radicale. Varierà quindi (I) tra specie e genotipi di una data specie e (II) in risposta all'ambiente, ad esempio con la proliferazione delle radici in zone ricche di nutrienti. L'estensione della rizosfera, tuttavia, non è propriamente misurabile in quanto non presenta un limite netto, ma è definita dai gradienti dei nutrienti e dall'attività microbica. Perciò, l'estensione della rizosfera varia in base al nutriente che viene studiato; ad esempio, nel caso di nutrienti scarsamente mobili come il fosfato, solo una frazione molto piccola del suolo può essere considerata rizosfera. Inoltre, il volume totale della rizosfera varia in base all'architettura radicale e alla sovrapposizione delle zone di impoverimento di radici vicine tra loro. Infatti, in caso di elevato geotropismo positivo e quindi morfologia radicale più agglomerata (ad esempio nelle radici fascicolate), si osserva una notevole sovrapposizione delle zone di impoverimento che causa una diminuzione del volume della rizosfera anche del 30%. L'estensione spaziale della rizosfera dipende anche da una serie di caratteristiche anatomiche e morfologiche delle radici. Infatti, la superficie radicale non è liscia ma presenta peli radicali che possono estendersi fino a diversi millimetri dalla superficie, aumentando così considerevolmente la superficie di scambio e, sostanzialmente, il volume della rizosfera. Bisogna anche tenere conto che molte funzioni delle radici legate ai processi biochimici, chimici e fisici che si verificano nella rizosfera non sono distribuite uniformemente lungo le radici. L'apice radicale, in particolare, spesso si comporta in modo diverso rispetto ad altre zone. Oltre ai gradienti radiali, le radici possono quindi creare ulteriori gradienti in senso longitudinale. Questa differenza è evidente quando si considera la distribuzione dell'assorbimento di acqua lungo il sistema radicale, che spesso è molto più intenso nelle porzioni apicali rispetto a quelle più vecchie. Inoltre, se ci riferiamo all'assorbimento di acqua, è bene ricordare che in questo caso non si manifesta solamente un gradiente in senso spaziale, ma anche in senso temporale, dato che il tasso di assorbimento dell'acqua varia nell'arco della giornata ed è massimo a mezzogiorno e nullo di notte.

1.2 Processi fisici e proprietà della rizosfera

I processi fisici che si verificano nella rizosfera sono di gran lunga i meno documentati, nonostante possano avere importanti conseguenze per il movimento di acqua e soluti verso e dalla radice, così come sull'habitat dei microrganismi che vi risiedono. Le funzioni primarie delle radici, come la crescita e l'assorbimento dell'acqua, modificano direttamente le caratteristiche fisiche della rizosfera. La crescita delle radici può esercitare forze notevoli che finiscono per alterare proprietà fisiche come la densità apparente, la porosità e la resistenza del suolo, influenzando quindi la formazione degli aggregati ed alterandone la capacità di trattenere aria e acqua. L'assorbimento di acqua da parte delle radici provoca rapide variazioni nel potenziale idrico del suolo rizosferico, influenzando così il flusso d'acqua verso la pianta. Inoltre, questi cambiamenti nel contenuto idrico del suolo rizosferico hanno un impatto sulle attività dei microrganismi residenti, che spesso dipendono da condizioni specifiche di umidità. Un altro aspetto cruciale è la produzione di mucigel, una sostanza gelatinosa a composizione prevalentemente polisaccaridica, secreta dalle radici. Il mucigel forma un continuum tra la radice e il suolo, influenzando proprietà come la viscosità e la tensione superficiale, modificando così le interazioni tra il suolo e l'acqua. Questa sostanza non solo migliora la struttura del suolo circostante promuovendo la formazione di aggregati stabili, ma riduce anche l'attrito tra le radici e le particelle del suolo, facilitando la penetrazione radicale. Il mucigel, oltre ad influenzare le caratteristiche fisiche del suolo, ha un ruolo importante nei processi chimici che avvengono nella rizosfera, aiutando a mobilizzare nutrienti poco mobili come il fosforo e il ferro, rendendoli più accessibili per le piante. Ha anche la capacità di legarsi a metalli a formare complessi stabili. Questa proprietà può essere vantaggiosa per limitare l'assorbimento di metalli tossici come l'alluminio, ma può ridurre la disponibilità di micronutrienti essenziali come il rame.

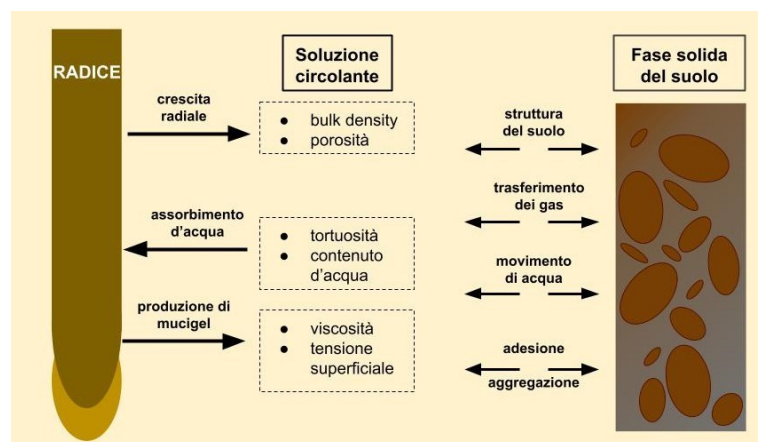


Figura 1.2 Schema riassuntivo delle attività radicali primarie e relative modificazioni indotte nelle proprietà fisiche della rizosfera. *Modificato da Hinsinger et al., 2005.*

1.3 Processi chimici della rizosfera

Rispetto ai processi fisici, i processi chimici che si verificano nella rizosfera sono stati documentati in modo più completo, soprattutto negli ultimi tre decenni. È ormai riconosciuto che le funzioni biologiche chiave delle radici delle piante, come l'assorbimento, la respirazione e l'essudazione, possono alterare notevolmente molte proprietà chimiche nella rizosfera, tra cui: le concentrazioni di nutrienti, elementi tossici (ad esempio l'alluminio) e inquinanti, concentrazioni di composti complessanti/chelanti, pH e potenziale redox, pressioni parziali di O₂ e CO₂, ecc.

1.3.1 Movimento dei nutrienti: zone di impoverimento e zone di accumulo

Gli elementi nutritivi possono entrare in contatto con la superficie assorbente delle radici per:

- Flusso di massa:

Nel suolo è presente un flusso unidirezionale della soluzione circolante verso la radice, innescato dalla tensione che si genera a livello fogliare in seguito alla traspirazione e propagato fino alla radice, gli elementi solubili vengono così trascinati verso la superficie radicale. L'entità del flusso dipende, quindi, anche dall'intensità di traspirazione della pianta.

- Intercettazione:

La crescita dinamica operata dalla radice le permette di esplorare regioni di suolo sempre nuove e nel percorso può intercettare elementi nutritivi. Naturalmente, solo una piccola percentuale (<10%) dei soluti prelevati dalla pianta dal suolo entra in contatto con la radice attraverso questa modalità.

- Diffusione:

In questo caso il movimento dei nutrienti avviene spontaneamente seguendo un gradiente di concentrazione.

Quindi, nel suolo, è presente un flusso di nutrienti diretto verso la superficie radicale. La radice, tuttavia, è in grado di assorbire solamente una quantità limitata di nutrienti, con una capacità di assorbimento variabile da 10^{-10} a $10^{-9} \frac{\text{moli}}{\text{min}}$, a seconda del nutriente che si prende in considerazione. Ne deriva che, se l'apporto di un determinato nutriente tramite il flusso supera

la capacità di assorbimento della radice o, al contrario, è inferiore ad essa, sulla superficie radicale si vengono a creare delle zone di impoverimento o di accumulo di tale nutriente:

- Zone di impoverimento:

Quando la capacità di assorbimento da parte della radice è superiore rispetto alla quantità del nutriente che arriva alla superficie radicale, si vengono a creare delle zone di impoverimento di tale nutriente a ridosso della radice. Dato che ogni nutriente ha un coefficiente di diffusione diverso, l'estensione di queste zone varia a seconda dello ione che viene preso in considerazione. Ad esempio, le zone di impoverimento del nitrato sono molto più estese rispetto a quelle del potassio e del fosfato.

- Zone di accumulo:

Analogamente, nel caso di nutrienti che si trovano nella soluzione circolante in quantità maggiori alla capacità di assorbimento della radice, si vengono a creare delle zone di accumulo adiacenti alla radice. Queste zone si formano specialmente nel caso di alberi in ecosistemi forestali. Ad esempio, gli ioni calcio e magnesio spesso presentano un flusso di massa maggiore della domanda della pianta con conseguente accumulo di questi ioni attorno alla radice.

1.3.2 Le rizodeposizioni

Il termine “rizodeposizione” è stato introdotto per la prima volta da Whipps e Lynch (1985) come "il materiale perso dalle radici delle piante, inclusi essudati solubili in acqua, secrezioni di materiali insolubili, lisati, radici fini morte e gas come CO₂ ed etilene". Più semplicemente, il termine “rizodeposizione” indica il rilascio da parte della radice di composti organici ed inorganici. Infatti, le radici rilasciano nel suolo notevoli quantità di sostanze, pari al 15-60% della produzione fotosintetica totale della pianta. Queste deposizioni includono cellule intere o loro frammenti, mucillagini ed essudati radicali propriamente detti. Gli essudati radicali, che costituiscono la parte più importante delle rizodeposizioni, sono classificati in due categorie in base al loro peso molecolare. Gli essudati a basso peso molecolare comprendono carboidrati semplici, amminoacidi, acidi organici, ormoni, vitamine, fenoli, ioni e altri metaboliti secondari che contengono carbonio. Quelli ad alto peso molecolare sono principalmente enzimi, mucillagini e proteine. Gli essudati possono essere classificati anche come attivi e passivi in base al ruolo che ricoprono e al modo in cui vengono secreti. Quelli passivi hanno funzioni ancora indefinite e vengono rilasciati passivamente dalla radice come materiali di scarto, costituiscono circa il 3-5% del carbonio fissato tramite la fotosintesi. Gli essudati attivi, invece, sono rilasciati attivamente dalla pianta per svolgere funzioni specifiche, come difesa e

lubrificazione. In generale, l'essudazione fornisce alcuni benefici alla pianta come la riduzione dell'attrito tra radice e terreno, la protezione contro il disseccamento radicale e il miglioramento della struttura del terreno. Inoltre, la rizodeposizione è strettamente legata alla salute della pianta, poiché gli essudati influenzano la composizione della comunità microbica radicale ed i processi ecologici, che a loro volta influenzano la disponibilità di nutrienti e la presenza di patogeni (come sarà approfondito in seguito).

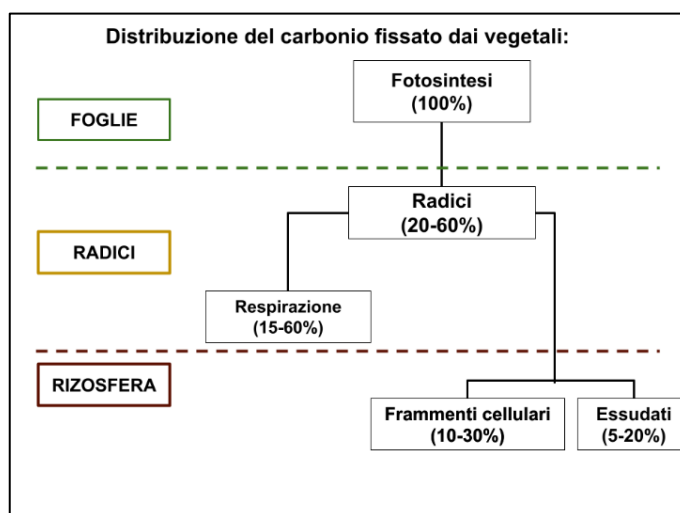


Figura 1.3 Stima della distribuzione del carbonio fissato tramite fotosintesi. Modificato da “*Fondamenti di chimica del suolo*”, R. Pinton, G. A. Sacchi, T. Mimmo, Pàtron Editore.

Va inoltre ricordato che, oltre ai composti organici, le radici rilasciano ioni inorganici come protoni, ossidrili, ioni potassio, nitrato ed altri. Questo rilascio, come verrà evidenziato nel paragrafo 1.3.3, influenza notevolmente il pH ed il potenziale redox del suolo radicale rispetto al suolo bulk.

1.3.3 Il pH

Il pH della rizosfera può variare considerevolmente rispetto al suolo bulk. Questo fatto può avere ripercussioni sulla disponibilità di elementi poco solubili come P e Fe o metalli pesanti come il Cd. L'assorbimento preferenziale di anioni o cationi da parte della radice è in grado di modificare il pH della rizosfera fino ad 1-2 unità. Variazioni di pH si verificano anche per l'attivazione di risposte adattative a stress abiotici, come le carenze nutrizionali.

- L'assorbimento di cationi comporta il rilascio di ioni H^+ nel suolo da parte delle cellule radicali, rilascio necessario a controbilanciare l'ingresso di cariche per mantenere il pH citoplasmatico intorno al neutro. Il rilascio di tali protoni acidifica l'ambiente.

- Viceversa, nel caso di assorbimento di anioni, si assiste ad una alcalinizzazione del suolo dovuta al rilascio di ioni OH^- e HCO_3^- .

Un esempio di questi processi si verifica con l'assorbimento dell'azoto in forma ammoniacale NH_4^+ , che determina il rilascio di protoni che acidificano il suolo circostante. L'entità dell'acidificazione (o alcalinizzazione, se consideriamo anioni come il nitrato NO_3^-) varia da specie a specie e dipende anche dalla presenza di simbiosi e dal tipo di suolo.

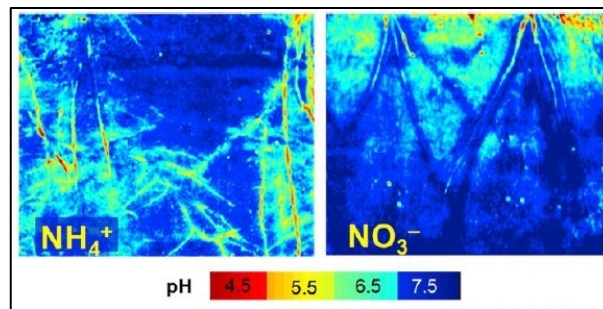


Figura 1.4 Gradienti di pH nella rizosfera in base alle fonti di azoto in *Lolium multiflorum*. Modificato da Kuzyakov e Razavi, 2019.

1.3.4 L'alterazione dei minerali

I cambiamenti nelle proprietà chimiche della soluzione del suolo nella rizosfera influenzano anche un'ampia gamma di reazioni all'interfaccia tra la fase liquida e quella solida del suolo. Molte di queste reazioni sono coinvolte nell'alterazione dei minerali del suolo e nei processi di formazione del suolo (pedogenesi). Gli essudati radicali di alcune specie di abete (*Picea glauca* e *Abies lasiocarpa*) riescono ad alterare minerali primari come la clorite e la mica trasformandole in vermiculite e smectite. Allo stesso modo, è stato osservato che anioni organici e protoni rilasciati da specie erbacee come la colza possono causare l'alterazione di minerali argillosi come la mica trasformandola in vermiculite (Fondamenti di chimica del suolo, Patron editore, 2017).

1.3.5 Attività enzimatiche

I processi biochimici che si verificano nella rizosfera hanno anche un impatto considerevole sul funzionamento del suolo. Ad esempio, gli enzimi extracellulari come fosfatasi, proteasi e arilsulfatasi mostrano una maggiore attività nella rizosfera rispetto al suolo bulk e possono avere un effetto importante sul ciclo di nutrienti come fosforo, azoto e zolfo. Solo alcuni di questi vengono effettivamente rilasciati dalle radici delle piante, mentre i simbionti delle radici come i funghi ectomicorrizici e molti altri microrganismi della rizosfera svolgono un ruolo chiave in questo senso (come verrà esposto in seguito). Ad esempio, piante in carenza di

fosforo rilasciano quantità rilevanti di fosfatasi acide, ma una quantità molto maggiore di fitasi ed altre fosfatasi acide è rilasciata dai microrganismi, permettendo l'idrolisi del fosforo organico.

1.4 Interazioni tra piante e microrganismi della rizosfera

La maggiore quantità di carbonio e nutrienti nella rizosfera rispetto al suolo bulk determina un notevole aumento della microfauna (anche di 100 volte rispetto alla quantità del suolo bulk) e delle comunità microbiche radicali (da 5 a 50 volte). Quindi, durante lo sviluppo, la pianta si trova a interagire con numerosi microrganismi, con effetti molto variabili. Possiamo distinguere tre tipi di interazioni:

- Interazioni indifferenti;
- Interazioni dannose;
- Interazioni favorevoli.

1.4.1 Interazioni indifferenti

La maggior parte dei microrganismi non ha effetti diretti sulla pianta; quindi, si tratta effettivamente di interazioni indifferenti. Tuttavia, molti di essi sono responsabili di attività di decomposizione e mineralizzazione, perciò hanno comunque un'influenza, seppur indiretta, sulla pianta. Inoltre, questi microbi, definiti anche "commensali", influenzano la dinamica delle altre comunità microbiche, anche quelle benefiche (come sarà evidenziato nel paragrafo 1.4.3).

1.4.2 Interazioni dannose

Alcuni componenti degli essudati radicali, come amminoacidi e zuccheri, sono in grado di stimolare direttamente i patogeni. Nonostante siano noti alcuni batteri e virus in grado di infettare le radici di alcune piante, nella maggior parte dei casi questi sono legati all'ambiente ipogeo, poiché non riescono a sopravvivere nel suolo per lunghi periodi e necessitano di una ferita per infettare la pianta. I principali patogeni nel suolo sono in realtà nematodi e funghi:

- I nematodi sono animali invertebrati eucarioti, simili a vermi. Per la maggior parte si nutrono di batteri, ma alcuni possono parassitare le piante. Questi possono essere ectoparassiti migratori che si nutrono all'esterno della radice, endoparassiti migratori che si muovono dentro la radice o endoparassiti sedentari, che trovano un sito di alimentazione e vi rimangono.

- I funghi e gli oomiceti sono i più importanti patogeni trasmessi nel suolo. Gli oomiceti in realtà sono geneticamente più correlati alle alghe che ai funghi, ma i meccanismi di parassitismo e le malattie che causano sono simili a quelle dei funghi, perciò vengono spesso trattati insieme. Per quanto riguarda questi patogeni, quando si trovano nel suolo sono quasi esclusivamente necrotrofici, ovvero uccidono il tessuto ospite e non hanno bisogno che le cellule siano vive per ottenere nutrienti. L'effetto principale di queste patologie è il marciume radicale, che porta alla morte delle radici nutritive e dei peli radicali. Questo porta ad un arresto nella crescita della pianta, disseccamento e carenze nutrizionali.

1.4.3 Interazioni favorevoli

- Il microbiota radicale e la salute delle piante

La diversità dei microbi associati alle radici delle piante è enorme, dell'ordine di decine di migliaia di specie: in un grammo di suolo rizosferico si possono trovare fino a 10^{11} cellule microbiche appartenenti ad oltre 30.000 specie diverse. Questa complessa comunità microbica strettamente legata alle piante viene denominata anche “secondo genoma della pianta”, ed è fondamentale per la loro salute. Infatti, i microrganismi nei suoli sono in competizione tra loro per le risorse, competizione particolarmente intensa nella rizosfera, dove i microbi competono per ottenere le sostanze nutritive rilasciate dalle radici; tanto più elevata è la competizione e tanto maggiore sarà la difficoltà per un patogeno di proliferare abbastanza da riuscire ad infettare la pianta. Oltre a questo effetto diretto sulla proliferazione dei microbi nocivi, si è scoperto che molti microrganismi benefici presenti nel suolo radicale possono aumentare la capacità difensiva della pianta anche nelle parti aeree. Questo fenomeno, noto come “resistenza sistemica indotta” (ISR), è uno stato in cui il sistema immunitario della pianta attiva le difese fisico-chimiche in modo rapido. Ad ogni modo, è importante tenere presente che l'efficacia di questi microrganismi benefici è influenzata anche dalla composizione delle restanti comunità microbiche nel suolo. Questo perché, per avere un effetto significativo, i microrganismi che sopprimono gli agenti patogeni devono essere presenti in numero sufficientemente elevato, ma la loro proliferazione è influenzata dalle altre comunità microbiche, come i microrganismi commensali, che possono limitarne l'espansione. Inoltre, le piante sono in grado di selezionare e modellare attivamente il loro microbiota rizosferico: sembrerebbe che, a partire dal serbatoio di diversità microbica che si rinviene nel suolo bulk, le radici della pianta selezionino microrganismi specifici, come suggerito anche dal fatto che specie vegetali diverse sullo stesso terreno tendono a selezionare microrganismi simili. Questo

processo di selezione è controllato dalle piante attraverso la secrezione attiva di composti che stimolano o inibiscono in modo specifico alcune specie microbiche. Inoltre, le piante sono in grado di richiamare microrganismi benefici in situazioni di necessità, come durante un attacco di un patogeno. Un esempio di questo fenomeno è stato descritto da Rudrappa et al. (2008) in uno studio su *Arabidopsis thaliana*, dove si è osservato che a seguito di un'infezione fogliare da parte di un batterio patogeno (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), è stata notevolmente aumentata la colonizzazione radicale da parte del batterio benefico *Bacillus subtilis* FB17. Ulteriori ricerche hanno suggerito che questa attività selettiva sia da attribuire alla produzione di ormoni legati alla difesa, come l'acido jasmonico e l'acido salicilico, che mediano la composizione degli essudati radicali e, di conseguenza, quella del microbiota associato alle radici. Per concludere, è evidente che l'interazione tra piante e microbi radicali rappresenti un aspetto fondamentale per la salute e la difesa delle piante. La capacità delle piante di selezionare e modulare il proprio microbiota rizosferico, non solo per promuovere la crescita ma anche per attivare meccanismi di difesa contro i patogeni, sottolinea l'importanza di approfondire la comprensione di queste dinamiche complesse.

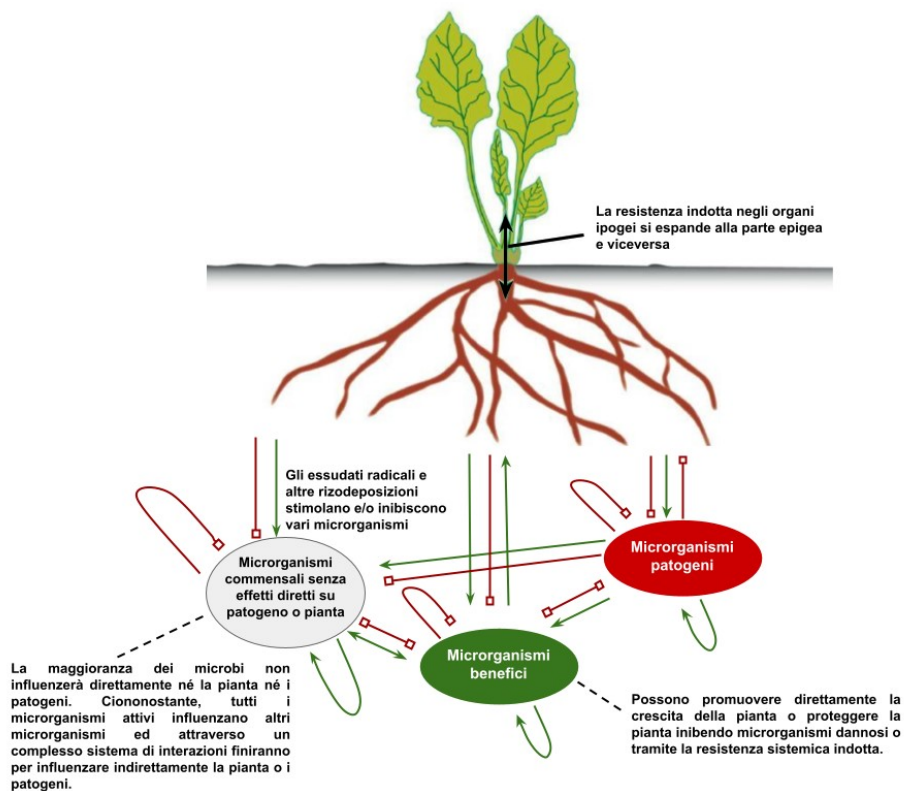


Figura 1.5 Schema riassuntivo delle interazioni nella rizosfera. Le piante sono in grado di influenzare la composizione e l'attivazione del loro microbioma radicale attraverso l'essudazione di composti che stimolano (freccie verdi) o inibiscono (freccie rosse). Viceversa, un'ampia gamma di patogeni trasmessi dal suolo è in grado di influenzare la salute delle piante. Prima di riuscire ad infettare la radice, questi microrganismi dannosi sono in

competizione con molti altri microbi nella rizosfera sia per i nutrienti che per lo spazio. In questa competizione, i microbi benefici limitano il successo del patogeno attraverso la produzione di composti, il consumo di micronutrienti o stimolando il sistema immunitario della pianta. La maggior parte dei microbi potrebbe non influenzare direttamente né la pianta né il patogeno poiché occupano nicchie ecologiche diverse (commensali), ma è probabile che influenzino ogni altro organismo in qualche misura attraverso una complessa rete di interazioni. *Modificato da Berendsen et al., 2012.*

- Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

I PGPR sono dei batteri che colonizzano le radici delle piante e favoriscono la loro crescita. La crescita è agevolata grazie a meccanismi come la fissazione dell'azoto atmosferico, la produzione e il rilascio di siderofori, la solubilizzazione del fosfato, il rilascio di fitormoni ed altri. I PGPR migliorano la crescita anche in modo indiretto, riducendo o prevenendo gli effetti nocivi di funghi e nematodi. Questa protezione avviene tramite la produzione di sostanze come cianuro, antibiotici o enzimi litici extracellulari. In generale, in base alla funzione che ricoprono, possiamo distinguere i seguenti rizobatteri:

- Bioprotettori: sopprimono i patogeni tenendo sotto controllo le malattie delle piante;
- Biofertilizzanti: migliorano l'assorbimento dei nutrienti da parte della pianta;
- Biostimolanti: producono fitormoni.

- Fissazione dell'azoto ad opera dei rizobi

Si tratta di una simbiosi tra piante leguminose e specie di *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Questi batteri sono in grado di infettare la radice ed indurre la formazione di noduli radicali all'interno dei quali i batteri fissano l'azoto, ovvero convertono l'azoto atmosferico (N₂), inutilizzabile dalla pianta, in ammoniaca, che viene usata dalla pianta come fonte di azoto. È un processo che non avviene in modo casuale, ma è molto specifico e si innesca a seguito di una comunicazione tra la leguminosa e rizobi svolta attraverso recettori e fattori di segnalazione (fattori NOD). Pur essendo un processo importante, è legato principalmente al settore dell'agricoltura, dato che le leguminose arboree in Italia sono quasi del tutto assenti.

- Le micorrize

Per micorrizza si intende un'associazione simbiotica tra un fungo e una pianta superiore, localizzata a livello dell'apparato radicale. Si tratta di un'interazione di tipo mutualistico, in cui sia la pianta che il fungo traggono benefici. Le micorrize sono trattate in modo approfondito nel Capitolo 2, interamente dedicato ad esse.

Capitolo 2

LE MICORRIZE

Come già accennato nel precedente capitolo, uno dei processi di simbiosi più importanti negli ecosistemi forestali è la simbiosi micorrizica. Il termine “micorriza” deriva da due parole greche: “*mycos*”, che significa fungo, e “*rhiza*”, che significa radice; quindi, il significato letterale di micorriza è “fungo della radice”. Sebbene spesso venga usato per indicare un tipo di fungo, in realtà il termine si riferisce alla relazione tra i funghi e le radici delle piante ospiti, piuttosto che al fungo in sé. Si tratta di una simbiosi mutualistica, ovvero una stretta relazione di convivenza tra due organismi che portano avanti il loro ciclo vitale traendo entrambi benefici reciproci. Generalizzando, questa simbiosi si traduce in uno scambio nutrizionale: il fungo assorbe nutrienti inorganici dal suolo, come fosfati e azoto, e li trasferisce alla pianta. In cambio, la pianta fornisce al fungo zuccheri semplici prodotti dalla fotosintesi e vitamine attraverso gli essudati radicali. Si stima che oltre l’80% delle piante vascolari presenti una forma di interazione micorrizica. Le piante micorrizzate risultano spesso più resistenti e adattabili, grazie ai numerosi vantaggi forniti dal fungo, tra cui:

- Maggiore assorbimento di acqua:

Le ife fungine aumentano enormemente la superficie esplorata dalle radici; perciò, riescono ad assorbire molta più acqua rispetto a quella che potrebbe assorbire un apparato radicale non colonizzato, permettendo alla pianta di raggiungere riserve idriche più lontane o più profonde. Ne deriva che la pianta può resistere meglio a condizioni di siccità;

- Maggiore assorbimento di azoto:

Poiché molti terreni sono carenti di azoto, i funghi, più efficaci delle piante nell'assorbirlo, rappresentano un importante alleato. L'azoto è indispensabile per la formazione di proteine, acidi nucleici e clorofilla;

- Maggiore assorbimento di fosforo:

Le piante possiedono dei sistemi poco efficienti per l’assorbimento del fosforo nel suolo, mentre il fungo può accelerare il processo anche del 600%. Il fosforo è essenziale per la crescita delle radici, il metabolismo e la maturazione dei frutti;

- Maggiore assorbimento di potassio:
Il potassio migliora l'assorbimento di acqua da parte della radice, facilita la traspirazione fogliare ed interviene nel metabolismo dei carboidrati. Va detto che, rispetto a fosforo ed azoto, il potassio è spesso presente in abbondanza nelle cellule vegetali;
- Costituzione di reti nutrizionali:
I funghi (in particolare quelli ectomicorrizici) sono in grado di sviluppare un micelio extraradicale molto esteso, che permette di creare delle vere e proprie reti nutrizionali che favoriscono il trasferimento di nutrienti dalle piante morte a quelle vive.
- Aumento della resistenza in condizioni di contaminazione da metalli pesanti:
In molti casi i funghi riescono a chelare o accumulare nelle ife metalli pesanti come Cd, Pb, Ni, Hg, Cr ecc... evitandone l'assorbimento da parte della pianta;
- Riduzione dell'incidenza di malattie:
Le micorrize possono agire come una barriera fisica per i patogeni presenti nel suolo e stimolano la produzione di sostanze di difesa;
- Aumento della resistenza in ambienti ad alta salinità:
Indirettamente, le micorrize migliorano la capacità delle piante di tollerare terreni salini aumentando l'assorbimento di acqua, resa meno disponibile a causa dell'elevato contenuto di sali, e favorendo l'ingresso di ioni di potassio (K^+), cruciali per mantenere l'equilibrio osmotico;



Figura 2.1 Espansione dell'apparato radicale di *Pinus sylvestris* ad opera del fungo *Suillus bovinus*. Da Read, 1991.

In base alla morfologia, all'ospite e alla modalità di colonizzazione si possono identificare sette tipi principali di micorrize:

- Ectomicorrize (EM o ECM):

Note anche come micorrize ecotrofiche, le loro cellule fungine formano dei fasci che avvolgono la parete esterna delle radici e penetrano scarsamente all'interno dei tessuti radicali. Sono associate soprattutto ad alberi forestali (in particolare *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae* e *Myrtaceae*) e predominano nelle foreste boreali e temperate. Le ectomicorrize tendono ad avere una bassa specificità: la stessa specie di pino può associarsi con più di 40 specie fungine. Questa caratteristica fa sì che i miceli di ectomicorrize possano interconnettere gli apparati radicali anche di alberi di specie diverse, creando reti di nutrienti.

- Micorrize arbuscolari (AM):

Rientrano nella categoria delle cosiddette “endomicorrize”, sono di gran lunga le micorrize più diffuse, colonizzando il 70-90% di tutte le specie di piante terrestri. A differenza di quelle delle ectomicorrize, le ife fungine delle micorrize arbuscolari penetrano profondamente nei tessuti radicali, invadendo le cellule corticali e formando delle strutture chiamate vescicole e arbuscoli.

- Ectendomicorrize:

Si tratta di micorrize particolari in quanto condividono caratteristiche tipiche delle micorrize arbuscolari ma anche delle ectomicorrize. Tenzialmente sono più simili alle ectomicorrize ma presentano una maggiore capacità di penetrazione intracellulare. Queste micorrize si possono formare con le radici di molte specie di gimnosperme ed angiosperme.

- Micorrize arbutoidi:

Presentano una penetrazione intracellulare ma anche un mantello e il reticolo di Hartig, tipico delle ectomicorrize. Si trovano in piante dell'ordine *Ericales*, come i generi *Arbutus* e *Arctostaphylos*, e coinvolgono funghi basidiomiceti.

- Micorrize monotropoidi:

Le micorrize monotropoidi si formano tra le piante della famiglia *Monotropaceae* ed uno specifico sottoinsieme di funghi della famiglia delle *Russulaceae*. I funghi formano un mantello e il reticolo di Hartig. Le piante colonizzate sono principalmente organismi parassiti senza clorofilla, ma gli stessi funghi possono formare anche associazioni ectomicorriziche con alcune piante provviste di clorofilla, determinando un flusso di nutrienti dalla pianta autotrofa a quella parassitaria eterotrofa.

- Ericoidi:

Le cellule della corteccia vengono avvolte dalle ife fungine. Sulla superficie radicale cresce un sottile strato di ife ma non si assiste alla formazione di un vero e proprio

mantello. Sono tipiche di piante con radici esili che vivono in brughiere con terreni poveri, in cui i nutrienti vengono resi disponibili alla pianta dalla componente fungina. Si formano tra funghi ascomiceti del genere *Hymenoscyphus* e piante dei generi *Calluna*, *Rhododendron* e *Vaccinium*.

- Delle orchidee:

I semi delle *Orchidaceae* sono piccoli e privi di sostanze di riserva; perciò, riescono a germinare solamente a seguito dell'instaurarsi di una simbiosi micorrizica. Le *Orchidaceae* formano micorrize soprattutto con Basidiomiceti, raramente con Ascomiceti.

Tipo di micorriza	Arbuscolare	Ecto-	Ectendo-	Arbutoide	Monotropoide	Ericoide
Taxa fungini	Glomero-	Basidio- Asco- Zygo-	Basidio- Asco-	Basidio-	Basidio-	Asco-
Taxa vegetali	Briofite Pteridofite Gimnosp. Angiosp.	Gimnosp. Angiosp.	Gimnosp. Angiosp.	Ericales	Monotropaceae	Ericales Briofite
Colonizz. intracellulare	+	-	+	+	+	+
Mantello	-	+	+/-	+/-	+	-
Reticolo di Hartig	-	+	+	+	+	-
Vescicole	+/-	-	-	-	-	-
Aclorofillia	-	-	-	-	+	-

Tabella 2.1 Caratteristiche delle principali tipologie di micorriza (+ = presente; - = assente).

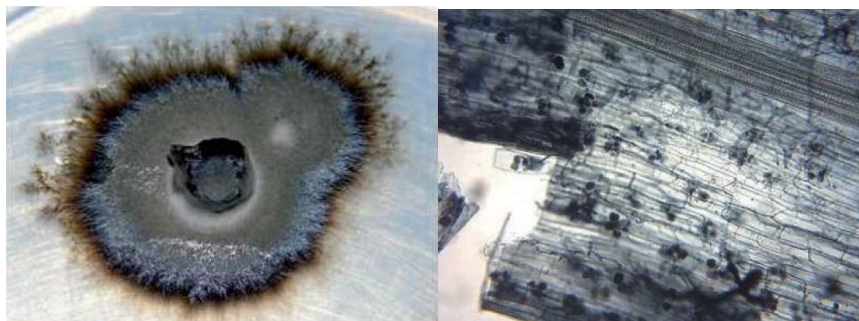


Figura 2.2 Sinistra: un fungo ericoide isolato da *Woolsia pungens*. **Destra:** Micorriza arbuscolare al microscopio, cellule corticali della radice di *Linum usitatissimum* colonizzate da arbuscoli. Da “*Biologia dei microrganismi*”, Zanichelli, 2018.

2.1 Ectomicorrize (ECM)

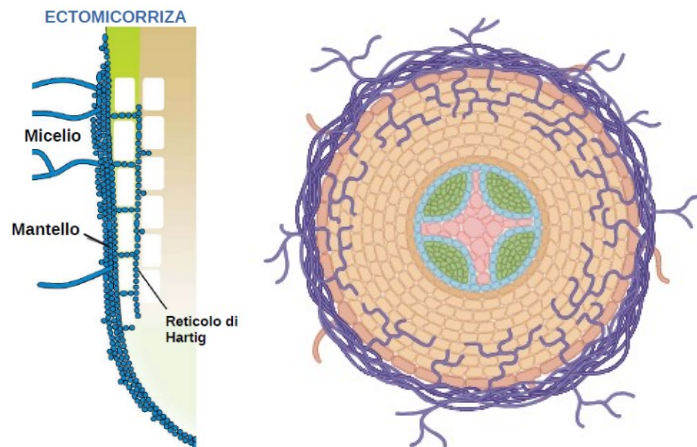


Figura 2.3 Sinistra: schematizzazione delle strutture di colonizzazione radicale nelle ectomicorrize. **Modificato da P. Bonfante et al., 2010. Destra:** schematizzazione di una sezione trasversale di una radice ectomicorrizzata. *Creato con Biorender.com.*

2.1.1 Morfologia

In alcuni casi la morfologia dell'ectomicorriza può essere influenzata dalla combinazione pianta-fungo: ad esempio, il fungo ascomicete *Wilcoxina mikolae* produce ectomicorrize quando colonizza piante dei generi *Abies*, *Picea* e *Tsuga*, mentre in semenzali di *Pinus* e *Larix* produce ectendomicorrize. I funghi ectomicorrizici, a differenza di quelli arbuscolari, non sono simbionti obbligati (hanno la capacità di crescere anche isolati in piastra Petri). Inoltre, non penetrano le pareti cellulari della pianta ospite, ma entrano in contatto con la pianta formando una densa guaina di ife attorno all'apice radicale, detta mantello. Successivamente, il fungo entra nella radice tra le pareti cellulari, lungo le lamelle mediane, tramite la crescita delle ife verso l'interno, formando in questo modo il reticolo di Hartig. Questo è una complessa rete di ife fungine che rappresenta il sito di scambio di nutrienti tra il fungo e la pianta ospite. In pratica, le pareti fungine e quelle delle cellule vegetali si fondono e lo scambio avviene tramite esse. Quindi, sostanzialmente, le radici ectomicorriziche sono costituite da tre elementi principali: (I) il mantello, una guaina di ife fungine che avvolge la radice, (II) il reticolo di Hartig, una rete intricata di ife che crescono nella radice, (III) un sistema di ife che crescono verso l'esterno e si connettono sia con il terreno che con i corpi fruttiferi del fungo, aumentando inoltre la superficie di scambio. La formazione di una ectomicorriza dipende da vari processi coordinati, alcuni dei quali si verificano nel fungo ed altri nella pianta ospite. Dal lato della pianta, il processo coinvolge modificazioni architetturali a livello di organi e tessuti, come l'aumento di formazione di apici radicali e la soppressione dei peli radicali, ma anche

differenziazioni cellulari che consistono nella riorganizzazione della parete cellulare e del citoscheletro. Sul fronte fungino, invece, si assiste alla formazione di tessuti specializzati con una notevole modificazione della morfogenesi delle ife. La maggior parte della massa del fungo si trova all'esterno della radice. Di seguito sono descritte in modo più dettagliato le componenti principali delle ectomicorrize:

- Mantello:

La radice viene avvolta da un fitto strato pseudoparenchimatoso di ife noto come mantello (Figura 2.3; Figura 2.4), che sopprime lo sviluppo dei peli radicali della pianta ospite. La guaina non è fitta in modo costante, ma la sua struttura varia da una più stratificata ad una più lasca, ed in alcuni casi mostra una disposizione delle ife piuttosto aperta. Anche se non è ben chiaro se siano prodotti principalmente dalla pianta o dal fungo, ciò che è certo è che in corrispondenza di questa struttura si assiste ad un notevole scambio di fitormoni, soprattutto citochinine. L'accumulo di citochinine determina l'aumento della superficie radicale tramite la riduzione della crescita in corrispondenza dell'apice ma una notevole stimolazione della ramificazione laterale.

- Reticolo di Hartig:

Si forma in genere 2-4 giorni dopo il mantello ed è costituito dalla crescita di ife fungine verso l'interno della radice della pianta ospite, in direzione perpendicolare all'asse primario della radice, occupando lo spazio apoplastico tra le cellule (Figura 2.3; Figura 2.4). Spesso, in questa fase, vengono prodotti enzimi che modificano la pectina delle pareti cellulari, in modo da allentare l'adesione tra le cellule vegetali e favorire l'inserimento delle ife. Questo permette di creare contatti tra le cellule fungine e quelle della radice, consentendo lo scambio di sostanze. Inoltre, le ife che fanno parte del reticolo presentano una membrana molto ripiegata, caratteristica che aumenta la superficie di scambio. In corrispondenza di questi contatti il fungo rilascia nello spazio apoplastico acqua e nutrienti come fosforo, potassio e azoto. La profondità a cui le ife penetrano la radice dipende in buona parte dalla specie della pianta ospite: nelle gimnosperme le ife possono arrivare anche all'endoderma, mentre nella maggior parte delle angiosperme si fermano all'epidermide.

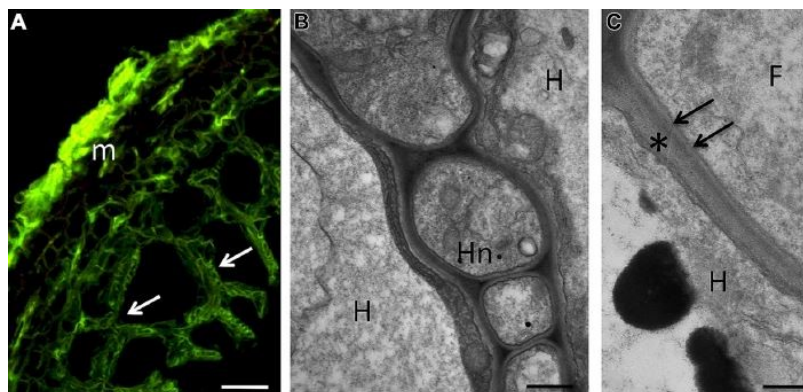


Figura 2.4 (A) Immagine in microscopia confocale di una sezione di una radice ectomicorrizica tra nocciolo e *Tuber melanosporum*. Sono visibili il mantello (m) in verde e il Reticolo di Hartig (indicato dalle frecce) che circonda le cellule dell'epidermide e le cellule corticali esterne. (B) Reticolo di Hartig (Hn) in una ectomicorrizza sviluppata. Le pareti cellulari delle ife sono a contatto con le pareti delle cellule vegetali dell'ospite (H). (C) Ingrandimento della zona di contatto tra la pianta (indicata con l'asterisco) e le pareti cellulari fungine (indicate con le frecce). F=fungo; H=cellula ospite. Da Balestrini & Bonfante, 2014.

- Micelio extraradicale:

Il micelio extraradicale consiste di un insieme di ife fungine filamentose che si sviluppano al di fuori della radice. Questa struttura svolge diverse funzioni cruciali, come la produzione di enzimi e l'assorbimento di nutrienti dal suolo. Inoltre, il micelio esplora il terreno, permettendo al fungo di raggiungere e colonizzare nuovi apici radicali. La morfologia e il comportamento del micelio extraradicale variano notevolmente a seconda della specie di fungo; sono state individuate quattro strategie diverse di esplorazione (Figura 2.5):

- Di contatto: i funghi producono un mantello liscio e poche ife di esplorazione che sono spesso a stretto contatto con i substrati circostanti;
- A breve distanza: viene emanato un notevole volume di ife, ma queste non formano rizomorfe (micelio con struttura simile alle radici delle piante);
- A media distanza: le ectomicorrize di questa categoria formano rizomorfe e si dividono nelle tre sottocategorie "a frangia", "a tappeto" e "lisce";
- A lunga distanza: ectomicorrize con poche rizomorfe ma molto lunghe e differenziate.

Il micelio extraradicale può estendersi anche per diversi metri, connettendo numerose piante e determinando la formazione di reti miceliari comuni che permettono la comunicazione pianta-pianta.

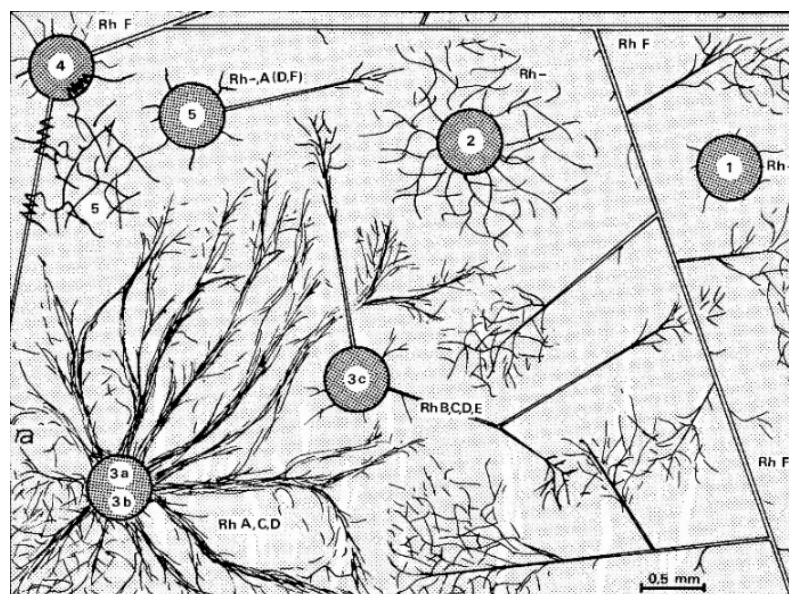


Figura 2.5 Rappresentazione schematica delle varie strategie di esplorazione, rappresentate come una sezione trasversale della ectomicorriza e del micelio extraradicale. (1) Esplorazione di contatto, (2) A breve distanza, (3) A media distanza, (4) A lunga distanza. Rh = rizomorfe; - = rizomorfe assenti. Da R. Agerer, 2001.

- Corpi fruttiferi (non sempre presenti):

Differentemente dalla maggioranza dei funghi micorrizici arbuscolari, quelli ectomicorrizici si riproducono sessualmente producendo corpi fruttiferi o sporocarpi, che sono delle strutture pluricellulari al cui interno vengono prodotte le spore. Spesso i corpi fruttiferi assumono forme ben conosciute come i funghi epigei o i tartufi.

2.1.2 Modalità di colonizzazione

Per arrivare alla formazione di una micorriza, le ife fungine devono prima crescere fino a raggiungere le radici della pianta, poi avvolgere e penetrare la radice stessa per formare il reticolo di Hartig. Affinchè questo processo venga completato, sia la pianta che il fungo devono eseguire una precisa sequenza di espressione genica. Nella fase iniziale, la comunicazione tra i partner avviene tramite composti organici volatili prodotti esclusivamente durante la fase di interazione. Già da prima del contatto diretto tra pianta e fungo, si assiste anche ad un aumento dell'espressione dei geni relativi ai processi di secrezione e crescita apicale. Le piante ospiti, per stimolare la crescita delle ife verso la radice, possono rilasciare nella rizosfera metaboliti come citochinine, flavonoidi e fitormoni. Questi segnali possono essere percepiti dal fungo anche a distanze considerevoli, inducendo l'espressione di alcuni geni prima del contatto con l'ospite. Le molecole coinvolte nell'interazione tra i simbionti possono essere così classificate in base alle loro attività:

- Tropismo delle ife verso i tessuti ospiti (segnali rizosferici);
- Adesione ed invasione dei tessuti ospiti da parte delle ife (adesine, idrolasi);
- Induzione di processi organogenetici sia nelle cellule fungine che in quelle radicali (ormoni e segnali secondari);
- Facilitazione della sopravvivenza del fungo nonostante la risposta difensiva della pianta;
- Coordinazione dello scambio di carbonio e altri metaboliti (ad es. vitamine).

Quando le ife fungine entrano in contatto con le cellule radicali, devono crescere fino alle cellule epidermiche e moltiplicarsi a formare il mantello. La produzione del mantello avviene grazie alla sovraregolazione dei geni responsabili della crescita cellulare e di quelli legati alla sintesi e al funzionamento della membrana, come le idrofobine. Subito dopo il contatto si assiste ad un cambiamento nella sintesi proteica e nella trascrizione genica che consiste nella sovraregolazione dei geni responsabili della formazione di nuove membrane cellulari e nella produzione di proteine correlate alla simbiosi, dette ectomicorrizine, che vengono prodotte unicamente in questa fase. Dopo aver colonizzato la superficie della radice, il fungo deve riuscire a penetrare al suo interno così da formare il reticolo di Hartig. Questo si sviluppa dallo strato più interno del mantello, da cui si differenziano delle ife che si inseriscono negli spazi apoplastici delle cellule radicali, in direzione perpendicolare alla radice. A volte, in questa fase, la pianta può attivare una reazione difensiva, ma il fungo è in grado di sopprimerla nel giro di poche settimane. Una volta portata a termine la formazione del reticolo si stabilisce la simbiosi vera e propria ed iniziano gli scambi di nutrienti.

2.2 **Micorrize arbuscolari (AM)**

2.2.1 *Generalità*

I funghi arbuscolari sono i simbionti di piante più diffusi, dato che sono associati con più dell'80% delle piante terrestri. A differenza delle ectomicorrize, i funghi arbuscolari sono simbionti obbligati, ovvero non sono in grado di sopravvivere senza una pianta ospite, avendo perso le capacità saprofitiche nel corso dell'evoluzione. Infatti, sono in grado di assorbire i carboidrati esclusivamente tramite le cellule vegetali vive, perciò dipendono dalla pianta ospite. La loro simbiosi è caratterizzata dal fatto che il fungo penetra all'interno delle cellule radicali, a differenza delle ectomicorrize in cui il micelio si inserisce negli spazi tra di esse. All'interno delle cellule colonizzate si formano delle strutture dette arbuscoli, con funzione di

scambio, ed altre, chiamate vescicole, con funzione di stoccaggio (non sempre presenti). Tutte le micorrize arbuscolari appartengono al phylum *Glomeromycota*.

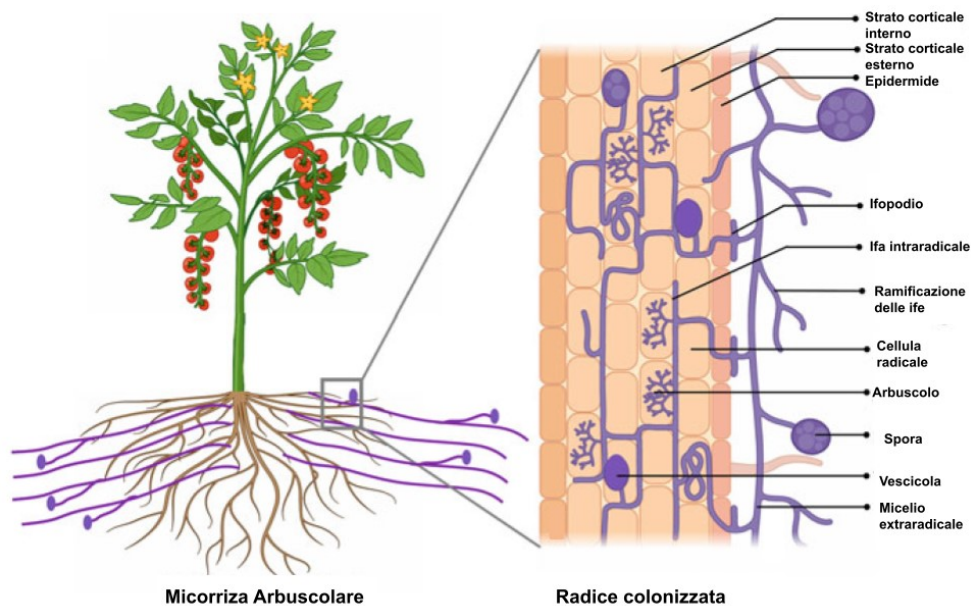


Figura 2.6 Schematizzazione della morfologia di una micorriza arbuscolare. Tradotto da G. J. Ahammed & R. Hajiboland, 2024.

2.2.2 Modalità di colonizzazione

2.2.2.1 Fase presimbiotica

Si assiste inizialmente alla germinazione di una spora dormiente, seguita subito dalla produzione di un piccolo micelio esplorativo. La germinazione non dipende dalla presenza di una pianta (le spore possono germinare anche *in vitro*), anche se alcuni essudati radicali la possono favorire. Dopo questo primo passo, attraverso il consumo delle riserve di trigliceridi e glicogeno, avviene la crescita di un tubetto germinativo. In questa fase, se il fungo non incontra un ospite, arresta la crescita e ritrae il citoplasma dell'ifa all'interno della spora, che torna ad essere dormiente e potrà riavviare in seguito il processo di germinazione (caratteristica distintiva del fatto che sono biotrofi obbligati e non possono sopravvivere senza un ospite). Se, invece, il tubetto germinativo si avvicina ad una radice, si assiste ad una notevole ramificazione delle ife, che serve a massimizzare la possibilità di contatto diretto tra i simbionti. Questo comportamento suggerisce la presenza di molecole di segnalazione negli essudati delle radici ospiti. In particolare, le molecole più importanti nella fase di pre-simbiosi sono gli strigolattoni, dei fitormoni rilasciati dalla radice che stimolano la ramificazione e il metabolismo del micelio presimbiotico e sono fondamentali per il riconoscimento della pianta da parte del fungo. Gli strigolattoni sono le molecole più importanti in questa fase, ma

intervengono anche altri segnali derivati da carotenoidi, tra cui i blumenoli e lo zaxinone. Il fungo, da parte sua, non resta passivo ma produce alcuni essudati, detti “fattori Myc”. Queste molecole bioattive, che non sono ancora state identificate completamente, aumentano l’espressione di alcuni geni della pianta (ad es. quelli che codificano le proteine che legano gli steroidi delle membrane cellulari) e inducono dei picchi di Ca^{2+} (i picchi di calcio sono il primo indicatore dell’interazione tra i due partner). La pianta risponde a questi segnali tramite delle modificazioni molecolari e fisiologiche sotto il controllo di un percorso di trasduzione del segnale, che prepara la pianta all’associazione, chiamato “percorso di simbiosi comune (SYM)”. Il SYM sembra essere coinvolto principalmente nelle prime fasi della colonizzazione. In questo percorso di segnalazione il fattore centrale è lo ione calcio Ca^{2+} ; perciò, in questa fase, oltre ad un generale aumento della concentrazione di calcio indotto dagli essudati fungini, si osserva una regolare oscillazione nella concentrazione di calcio vicino al nucleo delle cellule dei peli radicali che, come detto in precedenza, è l’indicatore dell’avvenuto contatto tra i simbionti. Una volta avvenuto questo riconoscimento tra la pianta e il fungo, la fase presimbiotica termina nel momento in cui un’ifa fungina tocca la superficie radicale e si instaura il primo contatto fisico, gli avvenimenti successivi rientrano nella fase simbiotica.

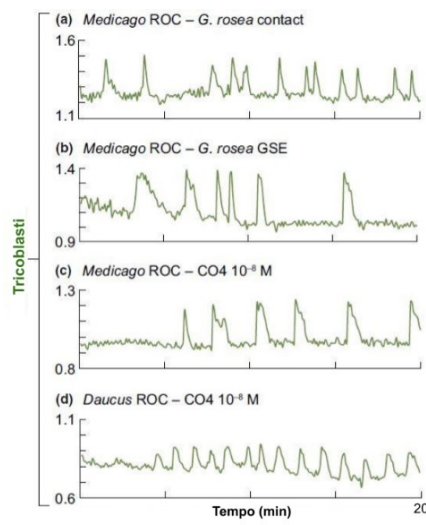


Figura 2.7 Picchi della concentrazione di calcio nucleare nei tricoblasti (cellule epidermiche radicali) in risposta a segnali fungini e batterici. Osservazione per un periodo di 20 minuti in *Medicago truncatula* e *Daucus carota*. (a) Cellule a contatto diretto con l’ifopodio fungino prima dell’infezione. (b) Cellule a contatto con gli essudati di una spora germinata di *Gigaspora rosea*. (c,d) Cellule a contatto con una soluzione 10^{-8} M di tetra-acetil chitotetraoso (CO_4), uno dei chitooligosaccaridi che fanno parte dei fattori Myc. Modificato da Barker D. G. et al., 2016.

2.2.2.2 Fase simbiotica

Dopo il contatto fisico, le ife fungine costituiscono una particolare struttura, detta “ifopodio”, che, attaccandosi all’epidermide della radice, funge da punto di ingresso per il fungo. Il fungo seleziona attentamente il punto di penetrazione nella radice, per cui le ife possono vagare per diversi centimetri sulla superficie radicale prima di trovare il punto adatto. Dopo aver selezionato il punto, le ife si ramificano improvvisamente, si appiattiscono sulla parete cellulare di alcune cellule epidermiche e si rigonfiano a formare l’ifopodio. Gli ifopodi aderiscono saldamente all’epidermide radicale e le loro pareti si inseriscono tramite diverse protrusioni negli strati esterni della parete cellulare vegetale. A questo punto la crescita del fungo si arresta per 4-6 ore, per riprendere nuovamente sviluppando l’ifa di penetrazione. Poi, le cellule epidermiche riorganizzano il proprio citoplasma per produrre una struttura specifica indispensabile perché il fungo porti a termine la penetrazione, detta “apparato di pre-penetrazione (PPA)”. Le cellule iniziano a costituire il compartimento in cui prenderà posto il fungo: il citoplasma assume una forma colonnare andando a delineare il futuro percorso dell’ifa attraverso la cellula. Una volta formato il PPA, il fungo riprende la sua crescita e penetra con l’apice di un’ifa attraverso la parete della cellula epidermica, facendosi strada lungo il percorso delineato dal PPA. Infine, si sviluppa una membrana, detta “membrana perifungina”, la cui sintesi indica la comparsa dell’interfaccia simbiotica, un compartimento intracellulare che permette al fungo di crescere senza rompere la cellula ospite. A questo punto l’ifa si rigonfia e ramifica a formare i caratteristici arbuscoli, che restano circondati dalla membrana perifungina, che d’ora in poi prende il nome di “membrana periarbuscolare”, la quale contiene alcuni trasportatori necessari per gli scambi nutrizionali tra il fungo e la pianta. Gli arbuscoli non sono strutture permanenti, ma hanno una durata di 4-5 giorni, al termine dei quali le pareti fungine collassano, l’arbuscolo si ritrae e la cellula vegetale torna alla forma che aveva prima della colonizzazione, pronta per accogliere un nuovo arbuscolo.

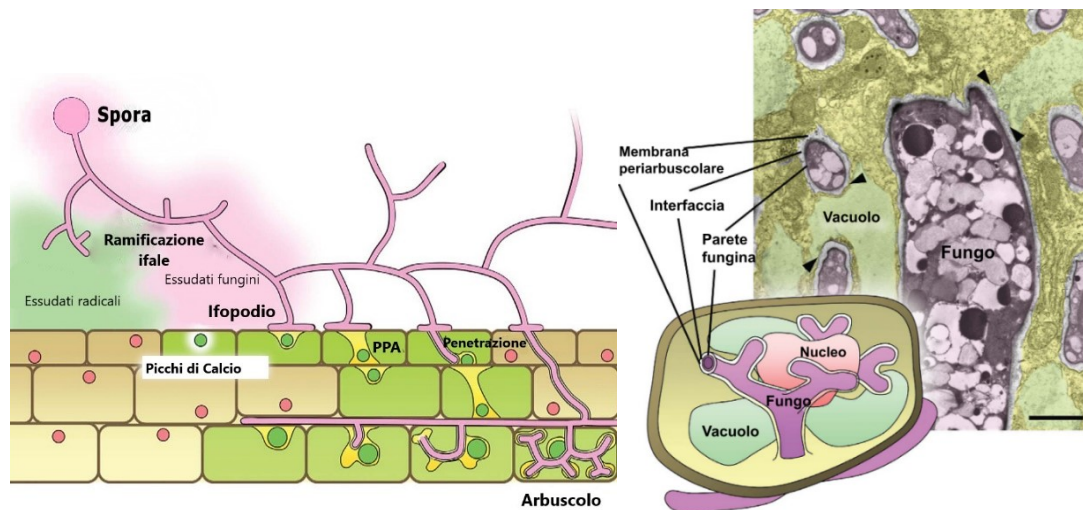


Figura 2.8 (Sinistra) Rappresentazione schematica del processo di colonizzazione radicale ad opera dei funghi micorrizici arbuscolari. La germinazione di una spora dormiente è seguita dalla produzione di un breve micelio di esplorazione. La percezione degli essudati radicali induce la ramificazione delle ife per aumentare la possibilità di contatto diretto tra i simbionti. Intanto, gli essudati fungini vengono percepiti dalla radice in cui innescano i picchi di calcio tramite l'attivazione del SYM. Il contatto pianta-fungo è seguito dall'adesione di un ifopodio alla superficie radicale, questo innescando l'assemblaggio dell'apparato di pre-penetrazione (PPA) nella cellula epidermica e in quella corticale sottostante. In seguito, avviene l'ingresso del fungo nella cellula seguendo il percorso tracciato dal PPA. Una volta completata la penetrazione, le ife si rigonfiano a formare i caratteristici arbuscoli, sede di scambio di acqua, carbonio, fosforo ed altri nutrienti. *Modificato da P. Bonfante & A. Genre, 2010. (Destra)* L'organizzazione di una cellula arbuscolata. In basso, una schematizzazione che mostra l'arbuscolo avvolto dalla membrana periarbuscolare ed il nucleo al centro delle ife. In alto, una microscopia elettronica di una cellula arbuscolata di *Daucus carota*. *Tradotto da P. Bonfante & A. Genre, 2010.*

2.2.3 Cenni sugli scambi nutrizionali nelle micorrize arbuscolari

Il presupposto perché la simbiosi micorrizica arbuscolare sia vantaggiosa per entrambi i componenti è lo scambio di nutrienti. Come detto in precedenza, i funghi arbuscolari sono simbionti obbligati e dipendono dalla pianta ospite per l'ottenimento del carbonio necessario a completare il ciclo vitale. In cambio del carbonio fornito dalla pianta, il fungo fornisce ad essa numerosi nutrienti che non è in grado di assorbire senza un aiuto esterno. Il trasferimento del carbonio avviene generalmente attraverso gli arbuscoli, la pianta fornisce carboidrati al fungo sotto forma di esosi che vengono successivamente scomposti nel micelio fungino in glicogeno e trealosio, forme di riserva che possono essere facilmente utilizzate. Maggiore è l'apporto di carbonio dalla pianta al fungo e maggiore è il trasferimento di fosforo dal fungo alla pianta. Infatti, uno dei più importanti nutrienti forniti dal fungo alla pianta è il fosforo. In realtà, le piante sono in grado di assorbire fosforo dal suolo in modo autonomo, ma il fungo lo

fa in modo molto più efficiente (fino a sei volte più velocemente), tanto che la pianta arriva a fornire al fungo fino al 30% degli zuccheri prodotti dalla fotosintesi pur di ottenere questo importante servizio. Un altro importante nutriente scambiato è l'azoto: il micelio extraradicale assorbe dal suolo l'azoto in forma inorganica (NH_4^+ e NO_3^-) e lo trasferisce al micelio intraradicale sotto forma di arginina e urea. Nell'arbuscolo viene rigenerato l'azoto in forma ammoniacale e trasferito alla radice.

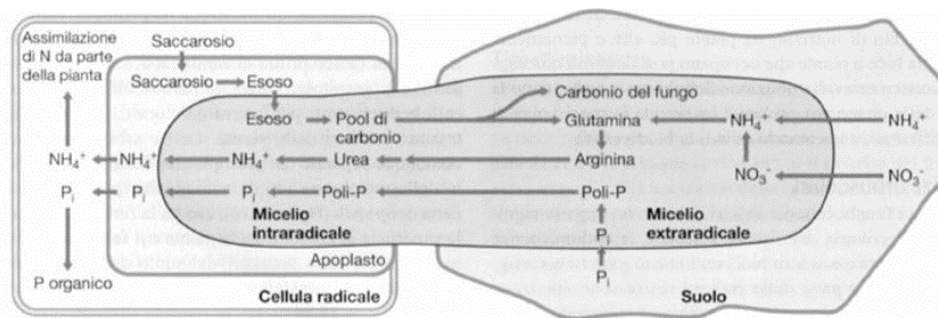


Figura 2.9 Scambio di N, P e C tra il fungo e la radice. Da "Biologia dei microrganismi", Brock.

Capitolo 3

LE MICORRIZE NEGLI ECOSISTEMI FORESTALI

Le foreste sono degli ecosistemi fondamentali per il pianeta, costituiscono un serbatoio di biodiversità e svolgono un ruolo essenziale nella regolazione del clima globale e nel mantenimento dei cicli dei nutrienti, e le micorrize ricoprono un ruolo cruciale nel loro funzionamento. Oltre a migliorare la nutrizione delle piante, le micorrize hanno un peso importante nel sequestro del carbonio e nella stabilizzazione del suolo, contribuendo alla resistenza e alla resilienza complessiva degli ecosistemi forestali a fronte di cambiamenti climatici ed altri stress abiotici e biotici. In questo capitolo vengono esposti alcuni dei ruoli centrali delle micorrize in questi ecosistemi così importanti per il pianeta, analizzandone la distribuzione globale nelle foreste, la diversità, il modo in cui migliorano la resistenza delle foreste allo stress idrico, l'importanza nei cicli biogeochimici forestali e nella costituzione di reti miceliari. Vengono trattate in modo più approfondito le ectomicorrize, particolarmente abbondanti nelle foreste europee e in generale quelle temperate e boreali, ma sono trattate anche le micorrize arbuscolari e le principali differenze in ambito forestale tra le due categorie.

3.1 Distribuzione globale

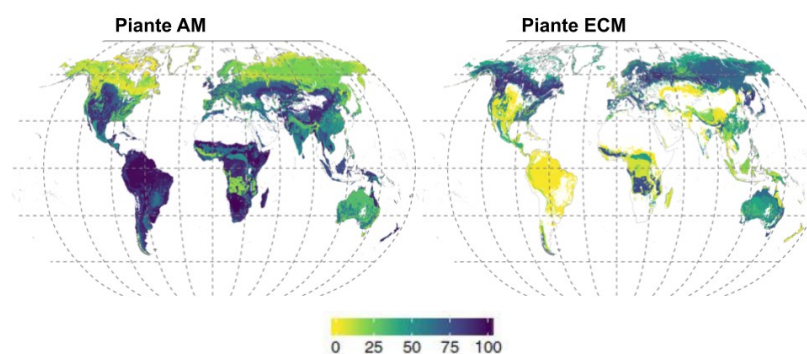


Figura 3.1 Percentuale della biomassa epigea della vegetazione micorrizica. *Modificato da Soudzilovskaia et al., 2019.*

Micorrize arbuscolari ed ectomicorrize presentano specie ospiti diverse, perciò la loro distribuzione segue quella globale della vegetazione. Il risultato è un gradiente latitudinale in cui alle latitudini più basse dominano le micorrize arbuscolari, che a latitudini elevate cedono

il posto alle ectomicorrize. Le micorrize arbuscolari sono predominanti nelle regioni tropicali e subtropicali, incluse le foreste pluviali tropicali, le savane e le praterie. Queste regioni includono gran parte del Sud America, dell'Africa centrale, del Sud-est asiatico e dell'Australia settentrionale (Figura 3.1). Le micorrize arbuscolari tendono a colonizzare principalmente piante erbacee e arbusti, ma esistono anche foreste a dominanza AM, come la maggior parte delle foreste equatoriali e tropicali. Le ectomicorrize, invece, prevalgono nelle regioni temperate e boreali; Thedersoo et al. (2012) hanno misurato la loro diversità specifica in relazione alla latitudine, individuando il picco di diversità a circa 4000 Km di distanza dall'equatore. Si trovano principalmente nelle foreste di conifere e nelle foreste decidue delle zone temperate, come in gran parte dell'Europa, del Nord America e della Siberia (Figura 3.1). Sono simbiotici delle tipiche piante forestali delle zone temperate come pini, abeti, querce, faggi, pioppi ecc...

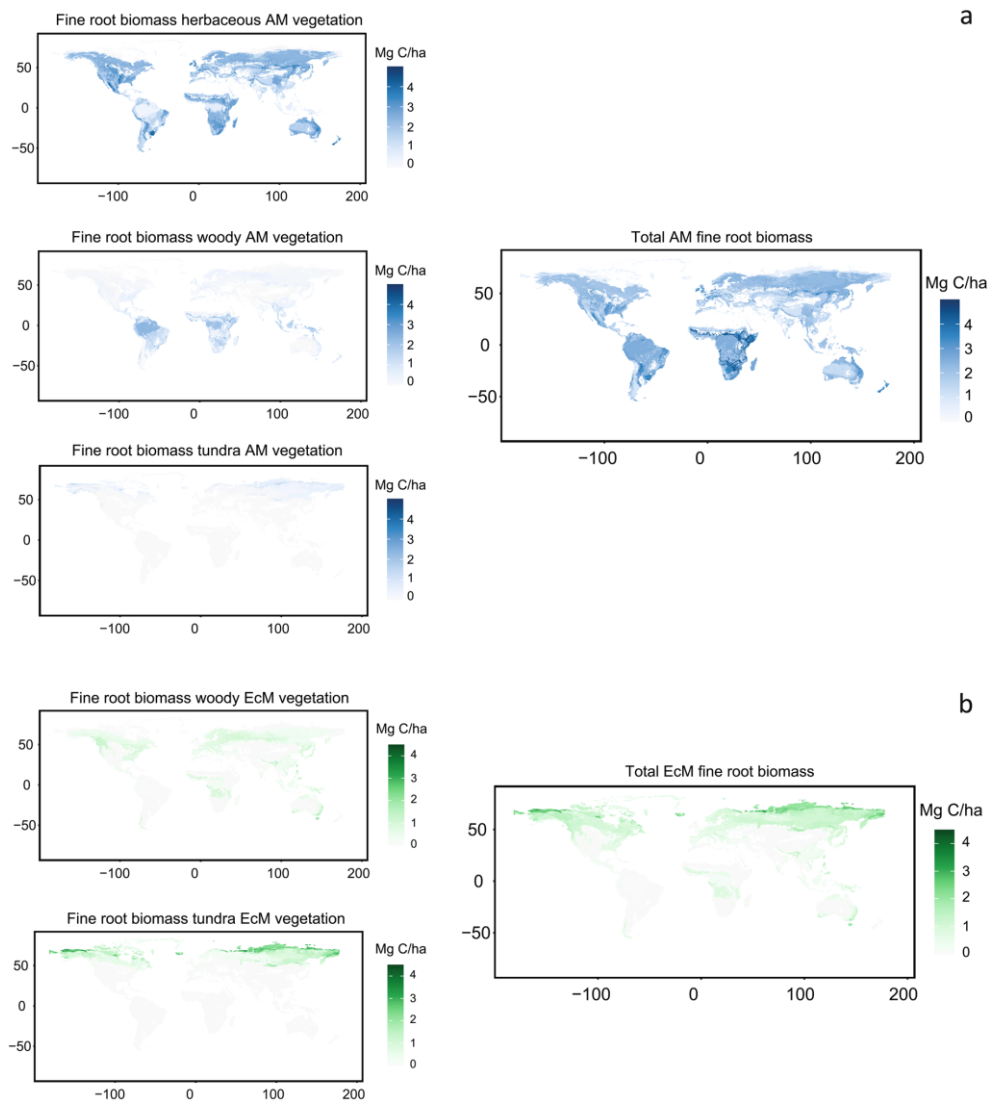


Figura 3.2 Distribuzione delle piante micorriziche (erbacee e legnose) a livello globale sulla base della quantità di biomassa radicale. *Da Barcelò et al., 2022.*

3.2 Diversità

Studiare la diversità delle micorrize nelle foreste è il primo passo per potersi avvicinare al loro studio a livello ecologico. Esaminare la diversità delle micorrize in una foresta, tuttavia, non è un compito semplice. Un metodo grossolano consiste nel conteggio dei corpi fruttiferi, tramite i comuni metodi di identificazione micologica. Tuttavia, non tutte le specie fungine ectomicorriziche producono corpi fruttiferi; perciò, un ulteriore metodo è quello della descrizione morfologica degli apici radicali e la classificazione in morfotipi. Nonostante ciò, spesso non è possibile identificare una specie solamente sulla base di caratteri morfologici. Metodi più recenti, sviluppati negli anni '90, si avvalgono della PCR (Polymerase Chain Reaction), una procedura che permette di amplificare, replicandolo ripetutamente, un tratto ben definito di DNA. Grazie all'utilizzo di tale metodo si è stimata la diversità globale delle ectomicorrize, che risulta molto elevata, con un numero totale stimato compreso tra 20.000 e 25.000 specie. Allo stesso modo, anche in ambiente forestale la diversità di ectomicorrize è ampia: ad esempio, in uno studio condotto da Bruns (1995), è stato osservato che sono presenti da 20 a 35 specie in circa 0,1 ha anche in piccole foreste monospecifiche. Ancora, in una singola foresta di pini e querce in Virginia sono state individuate 138 specie fungine ectomicorriziche diverse, di cui 45 ancora sconosciute (Palmer et al., 1993). Numeri così elevati lasciano intuire che ogni singola specie arborea può essere colonizzata contemporaneamente da diverse specie fungine, ed effettivamente questa possibilità sembra essere vantaggiosa per la pianta ospite. Ad esempio, uno studio condotto da Baxter e Dighton (2001) su piantine di *Betula pendula* in condizioni di scarsa fertilità ha mostrato miglioramenti nello stato nutrizionale in piante colonizzate contemporaneamente da otto specie fungine differenti rispetto a quelle colonizzate da una singola specie. Gli stessi ricercatori nel 2005 hanno osservato gli effetti in campo del tasso di diversità di funghi ectomicorrizici su *Pinus rigida*, notando una correlazione positiva tra la diversità dei funghi radicali ed il tasso di crescita delle piantine. In generale, su piante forestali, la diversità delle ectomicorrize favorisce la produttività e l'assorbimento di nutrienti da parte delle radici, particolarmente in condizioni di terreni poveri. Ciò si spiega col fatto che ogni specie fungina ha proprietà e capacità differenti ed ognuna riesce a trasferire elementi diversi con un'efficienza diversa: ad esempio, alcune possono traslocare il fosforo più velocemente, altre sono in grado di accedere più facilmente a nutrienti in forma organica, e così via. Perciò, avendo a disposizione un ampio spettro di simbionti fungini, la pianta è in grado di utilizzare diverse specie per diverse funzioni, selezionando quelle che sono più efficienti in ognuna di tali funzioni (vedasi, ad esempio, il paragrafo 3.5.3).

3.3 Apporto di acqua e miglioramento dello stress idrico

È noto che le ectomicorrize sono in grado di migliorare l'apporto idrico delle piante attraverso diversi meccanismi, diretti ed indiretti.

- Meccanismi diretti:

La maggior parte dei funghi ectomicorrizici forma una rete di ife molto estesa, che assorbe e trasporta acqua verso le radici delle piante. Il trasporto di acqua all'interno delle ife avviene contemporaneamente a quello dei carboidrati in arrivo dalla pianta, e questo può avvenire grazie ad una separazione spaziale all'interno delle ife, una sorta di compartimentazione simile alla struttura dei vasi nelle piante. Inoltre, le ectomicorrize possono migliorare la conduttività idraulica delle radici, specialmente in condizioni di stress idrico. Anche se in alcuni casi la conduttività risulta leggermente ridotta, il bilancio risulta comunque positivo per la notevole estensione dell'apparato radicale. In altre parole, anche se le singole radici possono essere leggermente meno efficienti nel trasportare acqua, la maggiore superficie di assorbimento compensa questa diminuzione.

- Meccanismi indiretti:

Un meccanismo indiretto, anche se non completamente compreso, è quello della produzione di enzimi antiossidanti nelle radici ectomicorriziche, dato che la siccità aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS possono inibire la funzionalità delle acquaporine, proteine canale deputate al trasferimento di acqua; quindi, la produzione di antiossidanti aiuta a ristabilire il normale funzionamento di tali proteine e con esso un corretto flusso d'acqua. Un ulteriore meccanismo indiretto è il miglioramento dell'assorbimento di nutrienti come N e P, essenziali per il corretto funzionamento fisiologico della pianta. Un migliore stato nutrizionale rende la pianta più resistente alla siccità, facilitando le funzioni vitali anche in carenza d'acqua.

In sintesi, si può affermare che l'infezione da parte delle ectomicorrize migliora notevolmente l'apporto idrico della pianta e la sua resistenza alla siccità; di seguito ne è riportato un caso particolarmente rappresentativo, descritto in uno studio di Akema e Futai (2004) su pini colpiti dalla cosiddetta "Pine Wilt Disease (PWD)". La PWD è una malattia causata dal nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, che viene trasportato dal coleottero *Monochamus*. È stata osservata la crescita di un popolamento di circa 4000 piantine di *Pinus thunbergii* su un pendio, in un'area di circa 1,4 ha. Nel 1979, a sei anni dall'impianto, il popolamento è stato colpito dalla PWD, portando alla morte del 70% delle piante in circa 10

anni. Analizzando la posizione degli alberi rimasti in vita, si è osservato che il tasso di sopravvivenza era notevolmente più alto negli alberi sulla parte superiore del pendio rispetto a quelli alla base (Figura 3.3).

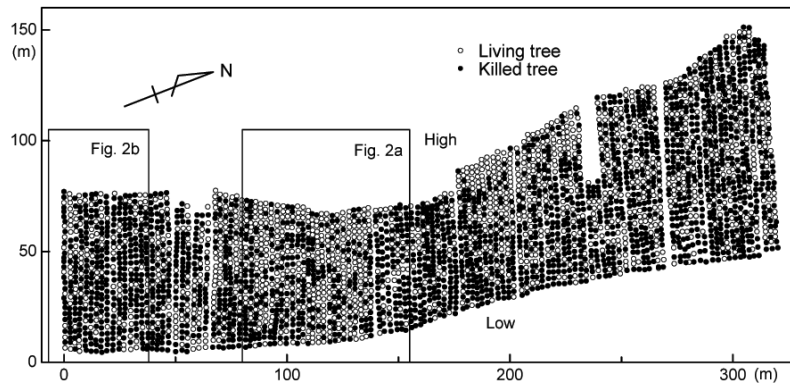


Figura 3.3 Il posizionamento dei pini rimasti in vita (cerchio vuoto) e di quelli morti (cerchio pieno). Da T. Akema & K. Futai, 2004.

Questo risultato è anomalo poiché l'avvizzimento del pino è favorito da condizioni di siccità, e lungo un pendio la parte superiore è sempre quella con una disponibilità idrica e nutrizionale nettamente minore; perciò, gli alberi in cima avrebbero dovuto essere quelli più colpiti. I ricercatori hanno ipotizzato che questo risultato fosse da attribuire al notevole supporto fornito dalla simbiosi micorrizica. Per confermare questa ipotesi, è stata esaminata la densità micorrizica lungo il pendio, a quattro altezze diverse.

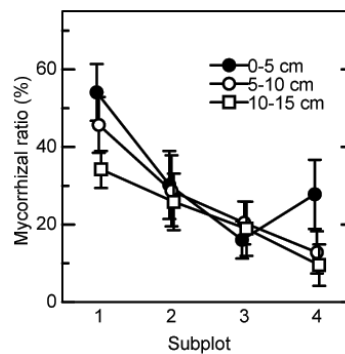


Figura 3.4 Densità delle micorrize a 4 altezze diverse (1 = parte alta; 4 = parte bassa). Da T. Akema & K. Futai, 2004.

Come mostrato nella Figura 3.4, la percentuale di micorrize era notevolmente maggiore nella parte superiore del pendio rispetto a quella inferiore. Quindi, nonostante le piante in cima fossero svantaggiate per la scarsità di acqua e nutrienti, il fatto di avere una simbiosi micorrizica ben sviluppata le ha favorite a tal punto da sopravvivere meglio alla malattia rispetto a quelle a valle che, sebbene fossero avvantaggiate in termini di disponibilità idrica e nutrienti, avevano una quantità inferiore di micorrize.

3.4 Le micorrize nel ciclo del carbonio

3.4.1 Generalità sul ciclo del carbonio

Le foreste hanno un ruolo di primaria importanza all'interno del ciclo del carbonio. Il ciclo del carbonio è un ciclo biogeochimico attraverso cui il carbonio viene scambiato tra la geosfera (che comprende sedimenti e combustibili fossili), l'idrosfera (mari e oceani), la biosfera (comprese le acque dolci) e l'atmosfera della terrestre. Tutte queste porzioni della Terra sono considerabili a tutti gli effetti serbatoi di carbonio (sinks). La principale riserva di carbonio organico è rappresentata dai suoli, che contengono circa 1.500 miliardi di tonnellate di carbonio (GtC), seguiti dall'atmosfera (circa 750 GtC) e dalla biomassa vegetale (circa 600 GtC). Il ciclo del carbonio può essere suddiviso in un ciclo biologico ed un ciclo geochimico. Quello biologico riguarda il passaggio del carbonio dalle piante agli animali e all'ambiente, mentre quello geochimico riguarda il passaggio del carbonio dalle rocce sedimentarie superficiali, all'atmosfera, alla biosfera e all'idrosfera. In sostanza, il ciclo biologico del carbonio è costituito da una serie di processi ciclici di riduzione e ossidazione del carbonio accoppiati a processi analoghi a carico dell'ossigeno. Il ciclo può essere considerato come una fonte di energia libera derivata dalla fotosintesi e di materiale organico derivato dai processi di riduzione dell'anidride carbonica.

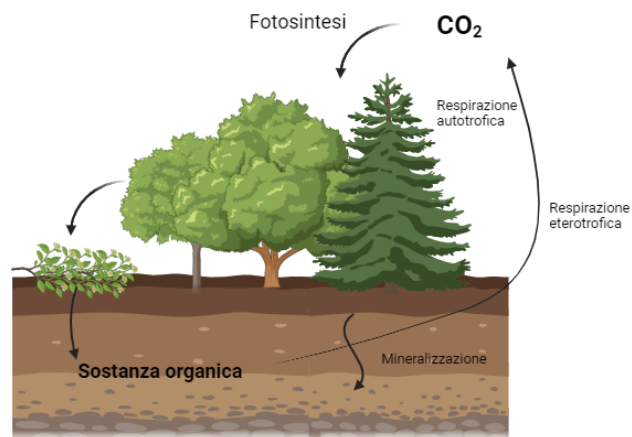
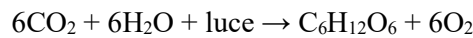


Figura 3.5 Rappresentazione del ciclo biologico del carbonio. Modificato da "Fondamenti di chimica del suolo", Pàtron editore. Creato con Biorender.com.

I processi fondamentali coinvolti nel ciclo biologico del carbonio sono la fotosintesi e la respirazione cellulare.

3.4.2 *La fotosintesi*

La fotosintesi è un processo ossidoriduttivo praticato dagli organismi fotoautotrofi in cui l'energia solare viene convertita in energia chimica, e la CO₂ in un composto organico, generalmente glucosio. Si compone di due fasi: la fase luminosa, che avviene di giorno, e la fase oscura, di notte. Il processo avviene nei cloroplasti, organelli cellulari caratteristici degli organismi vegetali costituiti da una doppia membrana esterna, una matrice amorfa detta "stroma" e un sistema di lamelle chiamate "tilacoidi". La fonte di energia è la luce solare, che viene assorbita da molecole di clorofilla riunite in dei complessi "antenna". Grazie all'energia fornita dalla luce solare, la fotosintesi permette di convertire 6 molecole di CO₂ e 6 molecole di ossigeno in una molecola di glucosio, secondo la reazione:



Quindi, si tratta della produzione di un composto organico (glucosio) a partire da un composto inorganico, con liberazione di ossigeno.

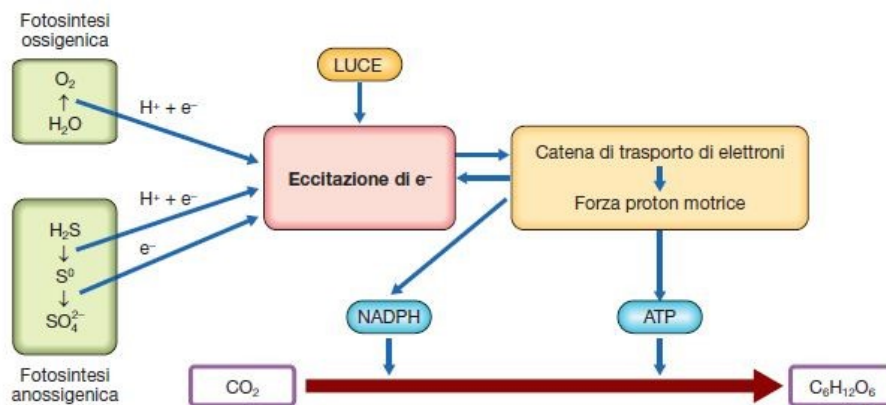


Figura 3.6 Schema riassuntivo del processo di fotosintesi. Da *"Biologia dei microrganismi"* di G. Dehò e E. Galli.

La Figura 3.6 riassume brevemente la dinamica della fotosintesi. L'acqua è necessaria perché tramite un processo detto "fotolisi" fornisce gli elettroni necessari alla fotosintesi. Gli elettroni vengono poi eccitati grazie alla luce catturata dalla clorofilla e vengono utilizzati, nel processo di fotofosforilazione, per produrre una molecola altamente energetica, l'ATP (adenosina trifosfato). L'energia racchiusa nelle molecole di ATP viene utilizzata nella fase oscura per la produzione di glucosio. Nel caso delle simbiosi micorriziche, una percentuale variabile degli zuccheri prodotti viene indirizzata al fungo, che non è in grado di produrli in modo autonomo.

3.4.3 *La respirazione aerobia*

La respirazione aerobia è il secondo processo fondamentale coinvolto nel ciclo biologico del carbonio e può essere considerata come la reazione opposta alla fotosintesi. Viene

utilizzata da molti microrganismi per produrre l'energia necessaria al proprio ciclo biologico. Avviene nei mitocondri e si tratta di un processo catabolico, ovvero di demolizione di molecole con liberazione di energia. La molecola di partenza è il glucosio, prodotto durante la fotosintesi, che viene ossidato completamente per produrre energia, contemporaneamente alla liberazione di acqua ed anidride carbonica. Per la completa demolizione del glucosio è necessaria la presenza dell'ossigeno, altrimenti si assiste ad una demolizione iniziale seguita da processi fermentativi. La respirazione aerobica può essere suddivisa in tre fasi:

- Glicolisi:

È un processo fermentativo (catabolismo anaerobico) di 10 tappe attraverso cui il glucosio viene degradato ad acido piruvico. In questa fase c'è un guadagno netto di energia pari a 8 molecole di ATP;

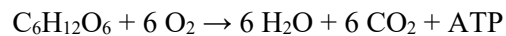
- Ciclo di Krebs:

È preceduto da una fase in cui l'acido piruvico prodotto nella glicolisi viene trasformato a formare l'acetil-CoA. L'acetil-CoA viene quindi sottoposto a un processo catabolico, il ciclo di Krebs (che avviene esclusivamente in presenza di ossigeno), attraverso cui viene completamente ossidato per produrre ulteriore energia sotto forma di ATP. Il guadagno di questa fase corrisponde a 30 molecole di ATP;

- Fosforilazione ossidativa:

Durante la glicolisi ed il ciclo di Krebs vengono prodotti due coenzimi altamente energetici, il NADH e il FADH₂, la cui energia viene utilizzata per la produzione di ATP. Questi coenzimi cedono elettroni ad una catena di trasporto che viene utilizzata per produrre una forza motrice protonica, a sua volta utilizzata per la sintesi di ATP grazie all'enzima ATP-sintetasi.

Andando a riassumere l'intero processo con una reazione, la respirazione aerobica può essere così rappresentata:



La resa totale della respirazione del glucosio consiste di 38 molecole di ATP (8 dalla glicolisi e 30 dal ciclo di Krebs).

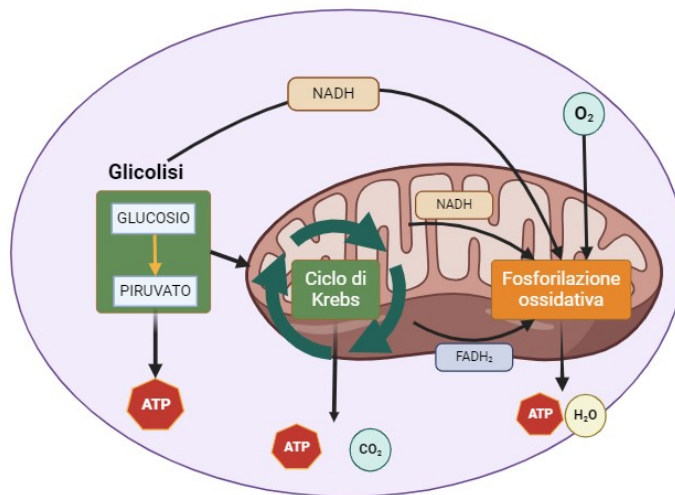


Figura 3.7 Schematizzazione delle fasi della respirazione cellulare. *Creato con Biorender.com.*

I funghi micorrizici ricavano l'energia necessaria al proprio ciclo biologico producendo ATP tramite la respirazione dei fotosintati che vengono forniti dalla pianta ospite.

3.4.4 Il ruolo delle micorrize nel ciclo del carbonio

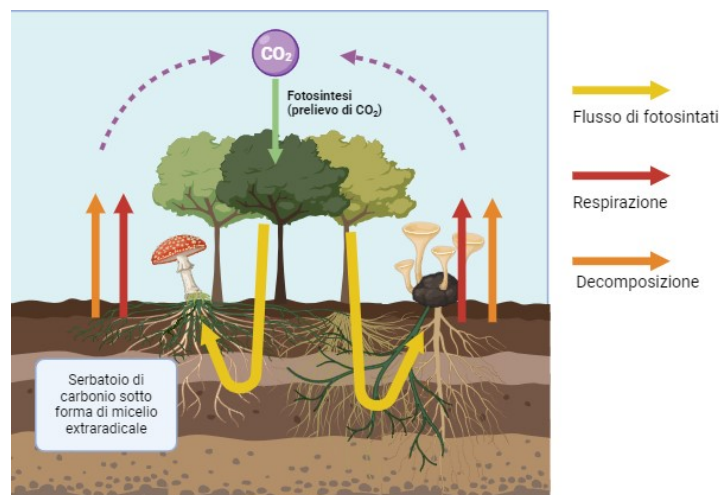


Figura 3.8 Principali flussi di carbonio nelle micorrize. *Creato con Biorender.com*

Dato che la convivenza tra funghi e piante si basa sulla cessione degli zuccheri prodotti dalla pianta al fungo, le micorrize giocano un ruolo importante nel ciclo del carbonio, particolarmente nel turnover della sostanza organica del suolo. La sostanza organica è costituita da un insieme di composti organici contenenti carbonio che si trovano nel suolo, includendo microrganismi, animali edafici, residui vegetali ed essudati radicali. Dato che contiene il doppio del carbonio di vegetazione ed atmosfera messe insieme, la sostanza organica del suolo è un'enorme riserva di carbonio. Le piante forestali forniscono fino a circa il 30% della propria produzione primaria netta di fotosintati ai funghi radicali; perciò, le

micorrize rappresentano un significativo canale di trasferimento di carbonio nel suolo. Secondo una stima di Hawkins H. J. et al. (2023), le comunità vegetali forniscono ai funghi micorrizici ogni anno 3,58 miliardi di tonnellate di carbonio, ovvero 13,12 Gt di CO₂ equivalente. Come termine di paragone, questa quantità corrisponde al 35,1% delle emissioni di CO₂ antropogeniche del 2023 (emissioni da combustione, industria, trasporti, edilizia...).

Gli zuccheri trasferiti ai funghi vanno a costituire un sink di carbonio nel suolo che può essere suddiviso in tre riserve principali: la biomassa fungina (e i processi metabolici associati), gli essudati fungini e la necromassa fungina.

- Biomassa fungina:

Parte del carbonio è impiegato dai funghi per la crescita delle ife e delle reti miceliari. Crescendo, queste reti spostano il carbonio dal suolo della rizosfera verso aree a minore attività respiratoria. Contemporaneamente, le ife in espansione aderiscono alle particelle del terreno, aiutando a stabilizzare aggregati che racchiudono e proteggono la sostanza organica del terreno dalla decomposizione. Le ectomicorrize hanno un ruolo più importante in questo processo rispetto alle micorrize arbuscolari perché le loro reti miceliari sono molto più estese (fino a 2000 metri per cm³ di suolo), arrivando a costituire in alcuni casi oltre il 30% della biomassa microbica totale del suolo. Questo è il motivo per cui sequestrano circa il triplo del carbonio rispetto alle AM, nonostante le piante ospite ricoprono la metà di superficie terrestre rispetto agli ospiti delle micorrize arbuscolari (Figura 3.2). Inoltre, le ife delle ectomicorrize possono vivere anche per mesi, mentre quelle arbuscolari hanno una vita nettamente inferiore.

Anche se i funghi ectomicorrizici sembrano essere in grado di produrre carbonio in modo autonomo, la loro capacità è talmente bassa che la quasi totalità della loro biomassa è rappresentata da carbonio fissato dalle piante. Naturalmente, anche i funghi hanno bisogno di energia e per ottenerla svolgono il processo di respirazione, che è il secondo modo, oltre alla decomposizione, attraverso cui i funghi restituiscono parte del carbonio al suolo e all'atmosfera. In generale i funghi possono contribuire alla respirazione del terreno in una percentuale fino al 14% per le micorrize arbuscolari e fino al 25% per le ectomicorrize, restituendo all'atmosfera fino al 19% del carbonio fornito dalle piante. Nonostante ciò, le ectomicorrize sembrano comunque sopprimere in qualche misura la respirazione del suolo, grazie alla competizione con gli altri decompositori liberi;

- Necromassa:

Quando il micelio muore, il carbonio fornito dalla pianta non va subito perso, ma entra a far parte della necromassa, che continua a svolgere un ruolo importante. Il micelio morto costituisce comunque un'impalcatura di materiale organico e, anche se non assorbe più il

carbonio, la necromassa contribuisce alla stabilizzazione degli aggregati di terreno. Maggiori sono la formazione e la dimensione di tali aggregati, maggiore è la protezione del carbonio organico dalla decomposizione. Secondo alcuni studi la necromassa fungina contribuisce più della massa fungina vivente alla costituzione di riserve di carbonio organico nel terreno (Frey S. D., 2019; Schweigert et al., 2015). Inoltre, la possibilità che un fungo venga decomposto dopo la morte è influenzata dalla sua composizione chimica. Ad esempio, le micorrize arbuscolari lasciano grandi quantità di chitina nel terreno, ma questa non è recalcitrante quanto altri composti prodotti dai funghi ECM, come la melanina. La melanina è una grande molecola non idrolizzabile che impedisce la decomposizione dei residui fungini; perciò, i funghi ectomicorrizici hanno un turnover più lento rispetto a quelli arbuscolari e sono correlati all'accumulo di humus a lungo termine;

- Essudati fungini:

Come detto in precedenza, anche le ife micorriziche rilasciano essudati, tra cui zuccheri ed acidi organici. Tali essudati vengono utilizzati e immobilizzati da altri microrganismi e successivamente questo carbonio può andare a costituire complessi organo-minerali. L'associazione della materia organica con i minerali del suolo determina la ritenzione a lungo termine della sostanza organica, costituendo quindi uno stock di carbonio particolarmente stabile. In generale, i funghi possono contribuire maggiormente alla formazione di complessi organo-minerali nel suolo rispetto a quanto fanno le piante. Un altro ruolo che sembrano avere gli essudati fungini, in particolar modo quelli delle micorrize arbuscolari, è l'aumento dell'alterazione dei silicati. I prodotti dell'alterazione possono precipitare nel suolo e sequestrare carbonio atmosferico nella formazione di minerali carbonatici secondari.

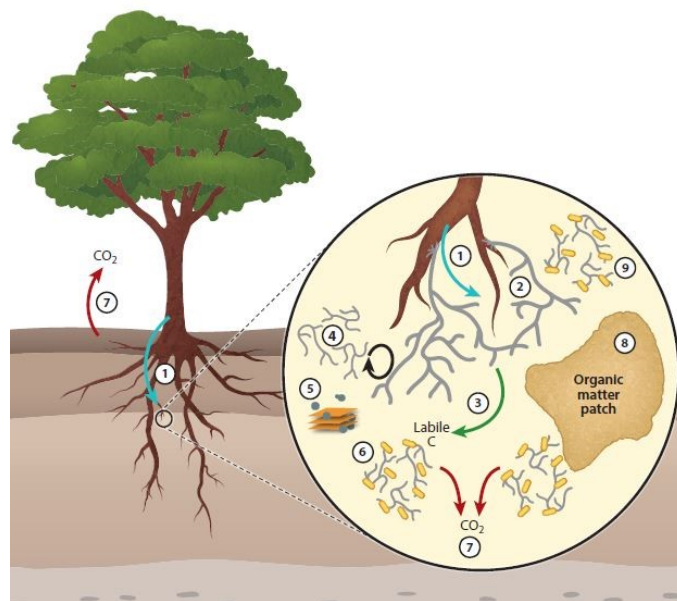


Figura 3.9 I meccanismi attraverso cui i funghi micorrizici influenzano la sostanza organica del suolo (SOM). (1) I funghi micorrizici sono un importante canale di trasferimento dei fotosintati nel suolo, alimentando (2) la produzione di biomassa fungina vivente e (3) l'essudazione di carbonio. (4) Il turnover ifale contribuisce al pool di necromassa microbica. Gli essudati micorrizici e la necromassa ifale possono (5) stabilizzarsi attraverso interazioni con minerali e aggregati del suolo e/o (6) stimolare le attività dei saprotrofi liberi per decomporre la SOM; quest'ultima porta alla (7) perdita di C dal suolo attraverso la respirazione eterotrofica. (8) I funghi micorrizici possono ulteriormente stimolare il decadimento della SOM attraverso reazioni di ossidazione enzimatica. (9) Possono anche inibire la degradazione attraverso la competizione con i decompositori liberi. L'effetto complessivo dei funghi micorrizici sull'immagazzinamento della SOM è determinato dall'equilibrio tra i processi di formazione, stabilizzazione e mobilizzazione della SOM mediati dal fungo. *Da S. D. Frey, 2019.*

In sintesi, i funghi micorrizici svolgono un ruolo centrale nel ciclo globale del carbonio, trasferendo ogni anno una quantità di carbonio equivalente a circa 13 miliardi di tonnellate di CO₂. Considerando l'impatto significativo delle micorrize sui movimenti del carbonio nel suolo, sarebbe opportuno includerle nelle politiche di conservazione ambientale e di gestione del cambiamento climatico.

3.5 Le micorrize nel ciclo dell'azoto

3.5.1 Generalità sul ciclo dell'azoto

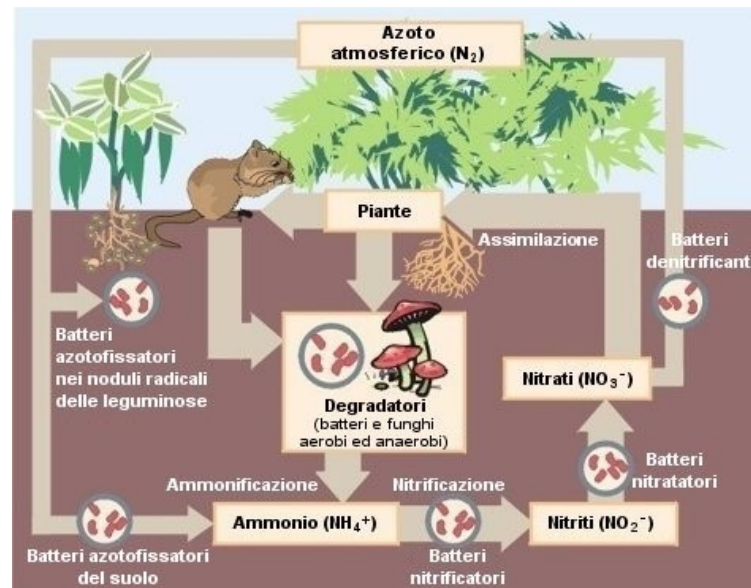
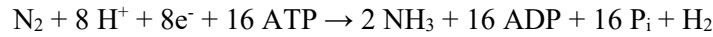


Figura 3.10 Rappresentazione sintetica del ciclo dell'azoto. Di Greywolf.

Il ciclo dell'azoto è un ciclo biogeochimico che comprende i movimenti dell'azoto attraverso l'atmosfera, il terreno e gli esseri viventi. L'azoto (N) è presente in diversi stati di ossidazione nell'aria, nel suolo, nell'acqua e in tutti gli esseri viventi. La forma più stabile è quella gassosa (N_2), principale costituente dell'atmosfera terrestre. L'azoto è costituente di composti fondamentali per la vita come amminoacidi, nucleotidi, coenzimi, e partecipa a numerosi processi metabolici. Di seguito sono descritti brevemente i passaggi più importanti del ciclo dell'azoto nelle foreste:

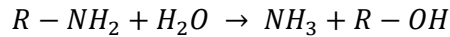
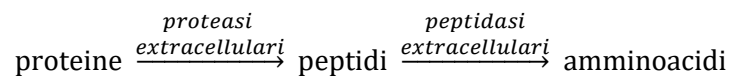
- Fissazione dell'azoto:

È rappresentata da qualsiasi processo chimico in cui l'azoto atmosferico (N_2) viene trasformato in forma ammoniacale. Dato che l'azoto molecolare è un composto molto stabile, è necessaria molta energia per rompere il legame tra i due atomi di N per poterli trasformare in ammonio. In natura la fissazione può avvenire nell'atmosfera, grazie all'energia fornita dai fulmini (fissazione atmosferica), o nel suolo (fissazione biologica). La fissazione biologica avviene ad opera di microrganismi del terreno che sono in grado di ridurre l'azoto molecolare ad ammoniaca. I microrganismi fissatori di azoto possono essere liberi nel terreno (fissano una piccola parte di azoto) o simbiotici di piante superiori (fissano la maggior parte dell'azoto). Reazione di azotofissazione:



- Mineralizzazione (ammonificazione):

La mineralizzazione è un processo di degradazione di sostanze organiche provenienti da organismi morti da parte di batteri e funghi. Se la sostanza organica che viene mineralizzata è azotata, il processo prende il nome di ammonificazione. Il processo prevede l'idrolisi delle proteine ad amminoacidi ad opera di enzimi proteolitici, successivamente gli amminoacidi vengono deamminati e viene liberata ammoniaca (NH_3) nel terreno.



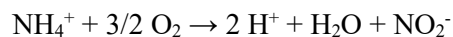
($\text{R} - \text{NH}_2$) = amminoacido;

($\text{R} - \text{OH}$) = residuo organico dopo la rimozione del gruppo amminico.

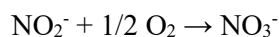
Può essere considerata come una sorta di respirazione in cui ad essere respirati sono i composti azotati. La mineralizzazione può compiersi in tempi molto variabili, da settimane ad anni, a seconda della stabilità del materiale organico di partenza. La quantità di azoto che viene mineralizzata dipende dal rapporto C/N del materiale organico di partenza: si ottiene tanta più ammoniaca quanto minore è il rapporto C/N (ad esempio, le foglie hanno un basso rapporto e determinano la produzione di grandi quantità di ammoniaca).

- Nitrificazione:

La nitrificazione è l'ossidazione dell'ammoniaca (NH_3) e ioni ammonio (NH_4^+) in ioni nitrito (NO_2^-) e successivamente ioni nitrato (NO_3^-). Una grande parte dell'azoto nel suolo si trova in forma ammoniacale NH_3 o NH_4^+ derivante dalla degradazione di proteine, urea o acido urico e tossica per tutti gli organismi viventi. Si compone di due fasi, la *nitrosazione*:



e la *nitratizzazione* (ossidazione del nitrito a nitrato):



In suoli forestali la nitrificazione viene condotta principalmente da batteri autotrofi, per i quali l'energia dipende dall'ossidazione di ammonio.

- Denitrificazione:

La denitrificazione consiste nella riduzione di nitrato (NO_3^-) ad azoto molecolare gassoso (N_2), attraverso gli intermedi nitrito (NO_2^-) e protossido di azoto (N_2O). I prodotti gassosi che si formano vengono dispersi nell'atmosfera, quindi la denitrificazione permette all'azoto di tornare nel ciclo. In generale, nei suoli forestali, la denitrificazione è scarsa a causa dell'elevata acidità e della scarsa presenza di nitrato, ma è comunque presente. Il processo è svolto da batteri detti denitrificanti.

3.5.2 L'importanza dell'azoto nelle piante e nelle foreste

L'azoto è, dopo il carbonio, l'ossigeno e l'idrogeno, l'elemento più abbondante nei vegetali, che lo assumono dal suolo essenzialmente in forma ammoniacale (NH_4^+) e/o nitrica (NO_3^-). Una volta assorbito dalla pianta, l'azoto possiede una funzione "plastica", come costituente degli aminoacidi e quindi delle proteine. Infatti, la bassa disponibilità di azoto è un fattore limitante importante per la crescita e lo sviluppo degli alberi e il suo utilizzo efficiente determina in larga misura lo sviluppo vascolare e la produzione di biomassa.

Un altro aspetto rilevante è il ruolo dell'azoto nella fotosintesi, in quanto è un costituente essenziale della clorofilla, la molecola responsabile di catturare l'energia luminosa nel processo fotosintetico. Il contenuto di azoto fogliare è uno dei parametri utilizzati per misurare la capacità fotosintetica di una pianta: maggiore è la quantità di azoto disponibile, più alta è la fotosintesi e, di conseguenza, maggiore è la crescita e la produzione di biomassa. D'altra parte, una carenza di azoto determina una riduzione del contenuto di clorofilla e a sintomi di clorosi (sbiancamento fogliare). Oltre a supportare la fotosintesi, l'azoto influenza una vasta gamma di processi fisiologici e metabolici nelle piante. Ad esempio, favorisce l'assorbimento di altri nutrienti essenziali, come il fosforo e il potassio, migliorando l'efficienza complessiva del metabolismo della pianta. Il fosforo, a sua volta, è essenziale per la sintesi degli acidi nucleici e la produzione di energia (tramite ATP), mentre il potassio regola l'equilibrio idrico e altri processi biologici. Ancora, l'azoto è coinvolto nella produzione di fitormoni come le citochinine, che regolano processi di crescita e divisione cellulare, promuovendo lo sviluppo armonioso delle piante.

Tuttavia, un eccesso di N nel terreno può avere effetti negativi. Un apporto eccessivo in genere induce un prolungamento del ciclo vegetativo, ostacolando il processo di lignificazione (rendendo le piante più vulnerabili ai parassiti e agli agenti atmosferici) e determinando un ritardo nella maturazione dei frutti. Questo squilibrio si manifesta anche con un'eccessiva produzione vegetativa a scapito della produzione dei frutti, determinando la produzione di

foglie più grandi e di colore verde scuro e uno sviluppo sproporzionato tra apparato epigeo e ipogeo. Quindi, in sintesi, l'azoto gioca un ruolo multifunzionale e di primaria importanza nello sviluppo degli alberi, condizionando direttamente la crescita, la fisiologia, e la produttività. Nelle foreste, l'azoto influenza particolarmente la produttività primaria netta, ovvero la quantità totale di biomassa prodotta tramite la fotosintesi e quindi di carbonio sequestrato dall'atmosfera, perciò, è un responsabile indiretto del contributo forestale al contenimento del riscaldamento globale. È, inoltre, un componente fondamentale dei cicli dei nutrienti e favorisce la resilienza e resistenza del bosco a stress ambientali (in particolar modo la siccità) e patogeni.

3.5.3 *Il ruolo delle micorrize nel ciclo dell'azoto*

- Funghi ectomicorrizici:

I funghi ECM sono altamente efficienti nell'approvvigionamento di azoto e possono soddisfare fino all'80% del fabbisogno delle piante. Molti secernono esoenzimi ossidativi e idrolitici, grazie ai quali ottengono l'accesso alle forme organiche di N accumulate nella sostanza organica del suolo. Sono in grado di utilizzare non solo amminoacidi liberi, ma anche composti contenenti azoto ad alto peso molecolare (ad es. le proteine) come fonti di azoto, idrolizzandoli in singoli amminoacidi, che poi vengono trasportati alle piante. Quindi, in caso di scarsità di azoto nel suolo, il fungo fornisce alla pianta ospite una fonte di azoto che sarebbe indisponibile senza la partecipazione del simbionte fungino. L'uso di N a partire dai composti ad alto peso molecolare è più costoso per le piante, poiché devono traslocare al fungo non solo il carbonio necessario alla biomassa, ma anche quello necessario alla produzione di esoenzimi. L'attività enzimatica dei funghi ectomicorrizici è stata sottovalutata in passato, ma studi in campo hanno evidenziato un'attività enzimatica persino superiore a quella dei saprotrofi (Philips L. A. et al., 2013). Probabilmente ciò è dovuto alla possibilità dei funghi micorrizici di ottenere carbonio facilmente dalla pianta ospite, che permette al fungo di concentrare le proprie risorse nell'assorbimento di N, mentre i microrganismi a vita libera sono molto più dipendenti dal carbonio presente nella materia organica del suolo. Quindi, nonostante i funghi ectomicorrizici partecipino alla decomposizione della sostanza organica, il loro assorbimento di azoto dalla materia organica limita la decomposizione della SO da parte dei saprotrofi liberi, che mobilitano maggiormente l'azoto. Gli enzimi chiave nel processo di decomposizione della sostanza organica ad opera dei funghi sono le proteasi, che consentono la depolimerizzazione dei complessi proteici della SO del suolo e rappresentano fino al 13% della quantità totale di esoenzimi. Per quanto riguarda il trasferimento dell'azoto dal fungo alla

pianta, il micelio extraradicolare assorbe l'azoto sotto forma di ioni ammonio NH_4^+ o amminoacidi. Questi vengono trasformati in arginina ed altri amminoacidi, che vengono trasferiti alla radice dove vengono scomposti a produrre nuovamente ioni NH_4^+ . È stato osservato che, con l'aumento della disponibilità di N nel terreno, la biomassa e biodiversità delle specie fungine diminuiscono, probabilmente come risultato di una minore dipendenza per la nutrizione azotata della pianta ospite dalla simbiosi micorrizica. In generale, la struttura della comunità fungina ectomicorrizica varia in funzione della disponibilità di N nel terreno, a dimostrazione del fatto che le piante ospiti possono selezionare attivamente i propri simbionti in base alle proprie necessità e alle capacità funzionali dei simbionti, per esempio la capacità di utilizzare composti organici ad alto peso molecolare per l'approvvigionamento di azoto (come anticipato nel paragrafo 3.2).

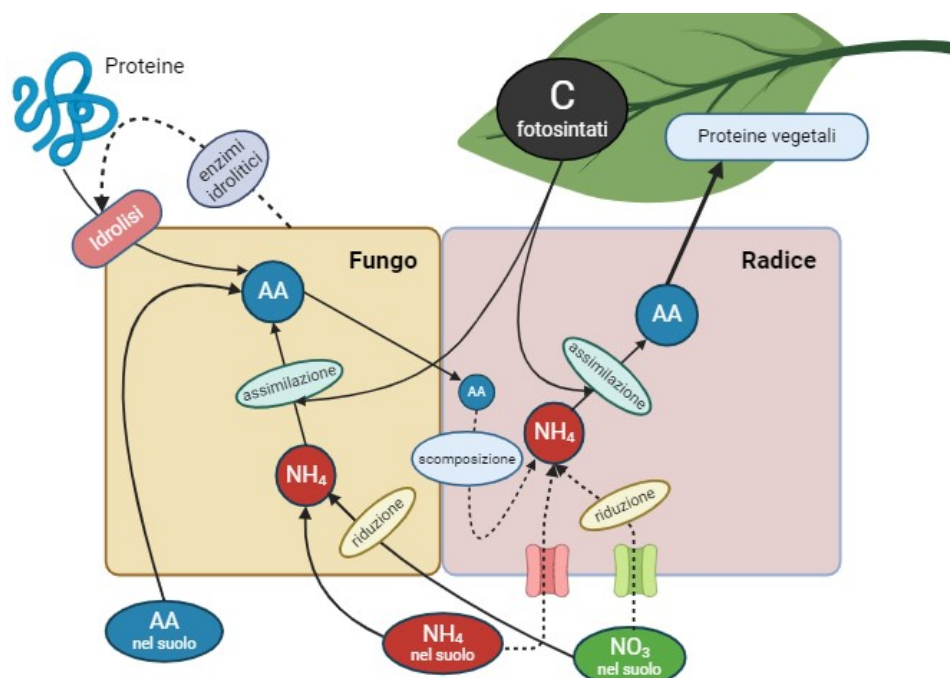


Figura 3.11 Schema semplificato dell'assorbimento di azoto da parte di una pianta colonizzata da un fungo ectomicorrizico. *Creato con Biorender.com.*

- Funghi arbuscolari:

A differenza di quelli ectomicorrizici, i funghi arbuscolari non hanno la capacità di secernere nel suolo enzimi idrolitici in grado di decomporre composti organici ad alto peso molecolare. Perciò, per l'assorbimento di azoto, dipendono principalmente dall'azoto inorganico rilasciato dai microrganismi saprotrofi. Nelle foreste dominate da micorrize arbuscolari, i terreni contengono molti più composti inorganici azotati ed hanno una maggiore attività di mineralizzazione e nitrificazione rispetto a quelle a dominanza ectomicorrizica.

- Differenze nei cicli dell'azoto tra ECM e AM:

Gli alberi associati a micorrize arbuscolari utilizzano principalmente l'azoto inorganico, come l'ammonio e il nitrato. Le foreste a dominanza di micorrize arbuscolari tendono ad avere un ciclo dell'azoto più rapido e "aperto". Un ciclo dell'azoto aperto è caratterizzato da un maggiore movimento di azoto tra suolo e atmosfera, con un rapido ricambio di azoto inorganico (nitrato e ammonio). Queste foreste presentano, mediamente, concentrazioni di azoto inorganico nel suolo maggiori del 40,2% rispetto a quelle delle foreste ectomicorriziche (in particolare, concentrazioni di NO_3^- maggiori del 62,8% e quelle di NH_4^+ maggiori del 18,6%). Anche la mineralizzazione dell'azoto e i tassi di nitrificazione sono generalmente più alti rispetto alle foreste ectomicorriziche, con un tasso di mineralizzazione maggiore del 55,6% e quello di nitrificazione maggiore del 161%; quindi, l'azoto organico viene convertito più rapidamente in forme inorganiche. Tuttavia, la rapida conversione dell'azoto organico in forme inorganiche può portare ad una maggiore lisciviazione dei nitrati, soprattutto in ambienti umidi e piovosi (in cui le micorrize arbuscolari dominano). Le foreste ectomicorriziche utilizzano prevalentemente azoto organico poiché, come detto in precedenza, i funghi ectomicorrizici possiedono esoenzimi in grado di decomporre la materia organica ad alto peso molecolare, rendendola disponibile per le piante. In generale, il ciclo dell'azoto nelle foreste ECM è più lento e si osservano tassi di nitrificazione e mineralizzazione inferiori rispetto a quelli delle foreste AM. Inoltre, le foreste ectomicorriziche tendono a produrre una lettiera con un elevato contenuto di lignina ed un alto rapporto C/N, determinando una decomposizione più lenta ed un maggiore stoccaggio di carbonio nel suolo (in media circa il 42% in più). L'elevata competizione per l'azoto tra i funghi ectomicorrizici e i decompositori liberi rendono il ciclo più "chiuso", con minori perdite per lisciviazione. In un ciclo chiuso, l'azoto viene trattenuto maggiormente all'interno dell'ecosistema e viene riciclato più efficacemente. Ciò significa che gran parte dell'azoto presente nel sistema viene immobilizzato nella biomassa delle piante o nel suolo e, dato che la conversione di NH_4^+ in NO_3^- è lenta, si riduce la perdita di azoto per lisciviazione. Nell'ottica della conservazione ambientale e contenimento del riscaldamento globale, dato che le foreste AM hanno un ciclo dell'azoto più aperto, possono avere tassi maggiori di emissione di protossido di azoto (N_2O), che agisce da gas serra. Le foreste ECM tendono ad emetterne meno e a trattenere maggiori quantità di azoto nel terreno, riducendo anche il possibile inquinamento delle acque per la lisciviazione di azoto in eccesso. In generale, le foreste ectomicorriziche tendono ad avere un impatto ambientale minore, ma in ambienti poveri di azoto soffrono di scarsa produttività.

3.6 Micorrize nel ciclo del fosforo

3.6.1 Generalità sul ciclo del fosforo nel sistema suolo-pianta

Il ciclo del fosforo descrive i movimenti e le trasformazioni del fosforo attraverso la litosfera, l'idrosfera e la biosfera. In ambiente forestale, gli apporti di fosforo al suolo derivano da materiale organico animale e vegetale, che viene mineralizzato in forma di ioni fosfato dai microrganismi. Gli apporti di ioni fosfato possono derivare anche dalla degradazione delle rocce fosfatiche ad opera di acidi organici prodotti da microrganismi. Il fosforo mobilizzato è così disponibile per l'assorbimento delle piante, che lo restituiscono al suolo in seguito alla decomposizione. Gli ioni fosfato possono essere subito immobilizzati a seguito della mineralizzazione, a causa del forte adsorbimento sulle superfici colloidali inorganiche come ossidi di ferro e di alluminio e silicati di alluminio (allofane), e questo rappresenta spesso il processo più importante per la ritenzione del fosforo nel suolo e per la biodisponibilità di fosforo nel suolo. Per tale motivo, piante e microrganismi possiedono sistemi attivi che permettono loro di ottenere il fosforo anche quando questo è fortemente ritenuto nel suolo.

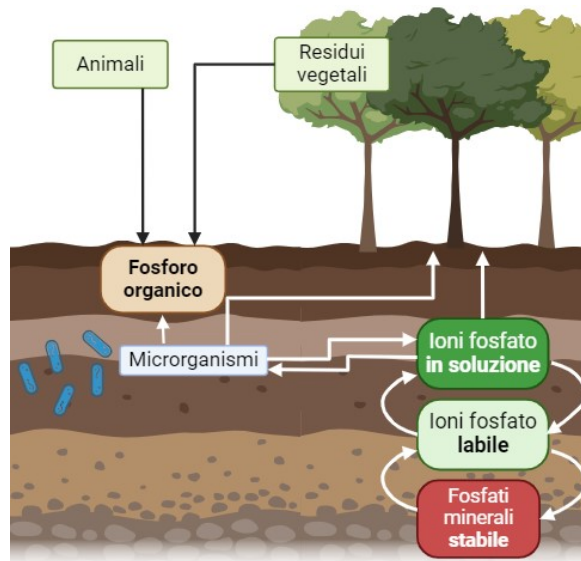


Figura 3.12 Ciclo del fosforo nel sistema suolo-pianta. Modificato da “*Fondamenti di chimica del suolo*”, Patron Editore. Creato con Biorender.com.

3.6.2 Fosforo nelle foreste e ruolo delle micorrize

Il fosforo è uno dei macronutrienti più importanti per la crescita arborea, svolgendo funzioni essenziali in molti processi cellulari. È un componente di acidi nucleici, fosfolipidi, ATP ed è coinvolto nel controllo di reazioni enzimatiche e nella regolazione delle vie metaboliche. Tuttavia, la sua disponibilità nei suoli forestali è spesso scarsa, rendendolo un fattore limitante per la produttività delle foreste. Le piante possono assorbire fosforo sotto

forma di ioni fosfato H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} , ma la presenza di fosfato inorganico nei suoli è piuttosto bassa (1-10 μM), dato che ha una forte tendenza a legarsi con cationi e argille formando complessi insolubili indisponibili alle piante. Per tale motivo, le piante ricorrono ad interazioni ecologiche che permettono loro di sopperire al loro fabbisogno di fosforo, soprattutto tramite le micorrize, che possono esplorare anche i pori più piccoli del terreno, inaccessibili alle radici delle piante. Gran parte del fosforo presente nel suolo si trova invece in forma organica, in composti come inositol-fosfati, acidi nucleici e fosfolipidi.

- Ectomicorrize:

I funghi ECM possono produrre enzimi per catalizzare l'idrolisi di alcune forme organiche di fosforo nel suolo (fosfatasi). Producono anche composti che hanno un ruolo nell'alterazione dei minerali causando la mobilizzazione di ioni fosfato. Tali composti possono essere acidi organici a basso peso molecolare (come acido citrico ed acido malico), siderofori e cationi. Un altro metodo con cui possono mobilizzare il fosforo è tramite la produzione di molecole in grado di chelare i cationi che insolubilizzano il fosfato (soprattutto il Ca).

Tra i composti organici del fosforo, uno particolarmente importante è l'acido fitico, che viene utilizzato come sostanza di riserva nei vegetali, soprattutto nei semi, in cui viene idrolizzato al momento della germinazione. Per accedere ai gruppi fosfato presenti nell'acido fitico, piante e microrganismi devono produrre fitasi, enzimi che ne catalizzano l'idrolisi. Tuttavia, le piante sono in grado di mobilizzare i fosfati tramite la secrezione di fitasi solo in piccolissime quantità e nemmeno i funghi ectomicorrizici sono in grado di aumentare la nutrizione fosfatica della pianta tramite questo meccanismo. I batteri presenti nella rizosfera, invece, sono in grado di mobilizzare il fosfato ma, essendo molto più competitivi di piante e funghi e ad assorbire il fosforo, questo viene subito immobilizzato nuovamente. Tuttavia, sembra possibile che i predatori di tali batteri siano in grado di migliorare la nutrizione fosfatica delle piante tramite re-mineralizzazione del pool di fosforo microbico e la riduzione della competizione tra piante e batteri (Figura 3.13).

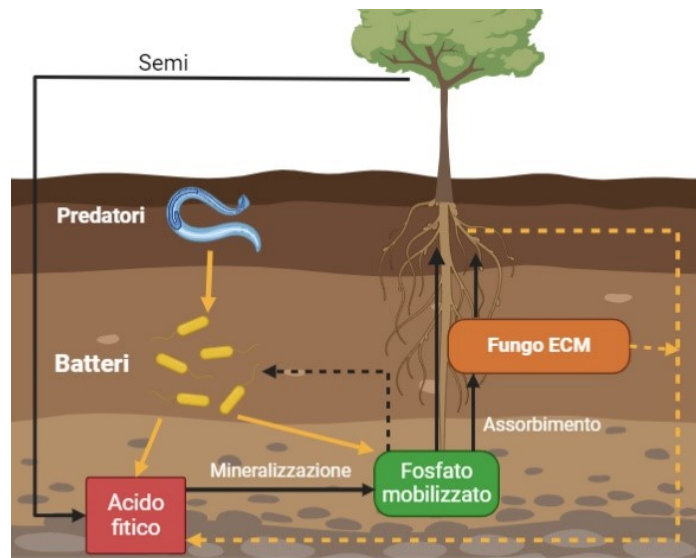


Figura 3.13 Assorbimento del fosforo derivato dall'acido fitico. Le frecce gialle indicano un controllo biologico, le frecce nere indicano i flussi di fosforo. *Modificato da Becquer et al., 2014.*

Ad ogni modo, una volta che il fosforo viene mineralizzato (a partire dal fitato o da qualsiasi altro composto organico), questo deve essere assorbito dal fungo e traslocato all'interno del micelio extra-radiale fino alle radici ectomicorriziche. Va detto che le radici della pianta ospite sono in grado di assorbire autonomamente il fosforo inorganico, ma lo fanno in modo molto meno efficiente. Per ottimizzare la capacità assorbente del fosfato inorganico del micelio, viene mantenuta una bassa concentrazione intracellulare del P_i tramite la sua aggiunta in polifosfati. Il fosforo viene quindi rilasciato nello spazio apoplastico e viene assorbito dalla cellula ospite grazie all'impiego di trasportatori attivi.

- Micorrize arbuscolari:

Anche le micorrize arbuscolari sembrano in grado di produrre acidi organici e fosfatasi acide che, seppur in misura minore rispetto alle ectomicorrize, acidificano l'ambiente e mobilizzano gli ioni fosfato, traslocandoli verso la radice sotto forma di polifosfato. Sono inoltre in grado di reclutare attivamente i batteri solubilizzanti il fosforo. Le AM acquisiscono il fosfato inorganico tramite un simporter H^+/P_i o tramite un simporter Na^+/P_i . Una volta entrato nel citoplasma, il fosfato viene trasformato in ATP nei mitocondri e polimerizzato in polifosfato. Il polifosfato viene traslocato nel micelio intraradicale e giunge fino agli arbuscoli. Negli arbuscoli il polifosfato è idrolizzato da una polifosfatasi fungina a formare nuovamente P_i , che viene rilasciato nello spazio periarbuscolare. A questo punto, le cellule vegetali, tramite un trasportatore attivo "micorriza-indotto" presente nella membrana periarbuscolare, assorbono il fosfato inorganico in modo che possa essere utilizzato dalla pianta.

Per quanto riguarda le differenze nel ciclo del fosforo tra foreste a dominanza arbuscolare e foreste ECM, in quelle ectomicorriziche il fosforo viene utilizzato principalmente in forme organiche, mentre in quelle arbuscolari si assiste ad un utilizzo di fosforo prevalentemente inorganico. Per osservarne le differenze in campo, Rosling et al. (2015) hanno condotto uno studio in foreste temperate americane. Sono state effettivamente trovate concentrazioni di fosforo organico più elevate nelle foreste ECM rispetto a quelle AM, e ciò sembra dovuto alle attività enzimatiche più elevate nelle ECM. Inoltre, sono state osservate anche variazioni temporali, con un calo autunnale del fosfato inorganico ed un aumento di quello organico in entrambe le tipologie di foresta. Probabilmente il fosforo organico è stato assimilato dalle piante nella stagione di crescita e successivamente trasformato in fosforo organico da piante e microrganismi. Tuttavia, il ciclo del fosforo nelle foreste micorriziche deve essere ulteriormente studiato per comprendere meglio le dinamiche di questo importante nutriente.

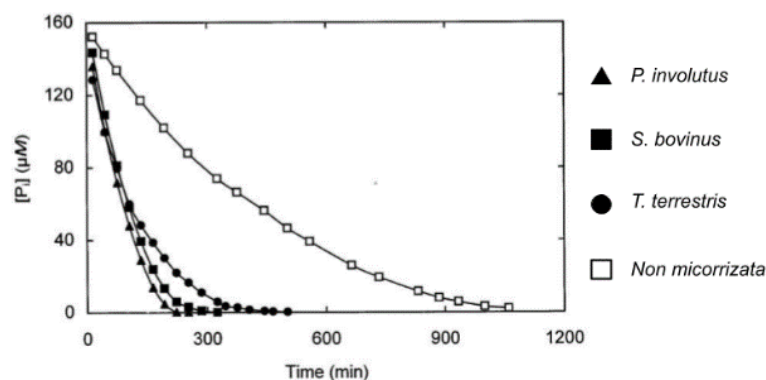


Figura 3.14 Esempio delle deplezioni di fosfato inorganico in semenzali di *Pinus sylvestris*. Si nota come la colonizzazione da parte dei funghi aumenti notevolmente la velocità di assorbimento del fosforo. *Modificato da Van Tichelen & Colpaert, 2000.*

3.7 Reti micorriziche

Vedere l'associazione micorrizica esclusivamente come un'interazione tra una sola pianta e un solo fungo è utile per comprenderne i meccanismi alla base, ma non rispecchia ciò che succede realmente negli ecosistemi naturali. Infatti, la maggior parte delle piante è colonizzata da diversi funghi contemporaneamente ed i funghi in genere non sono ospite-specifici, riuscendo a colonizzare nello stesso momento diverse piante ospiti e formando reti ampie anche oltre 10 metri. Di conseguenza, le piante sono interconnesse da reti micorriziche (o miceliari) dette "Wood-Wide-Webs" o "Common mycorrhizal networks (CMNs)". Le CMN sono tuttora scarsamente studiate in campo a causa della difficoltà nello studio in campo senza distruggere i miceli e nel distinguere i miceli micorrizici da quelli saprotrofi. In generale, si

pensa che in molte foreste temperate si possano formare reti ectomicorriziche tra gli alberi e reti micorriziche arbuscolari tra le piante erbacee.

- Funzioni e struttura:

Tramite queste reti avvengono scambi di nutrienti come C e N tra le piante, ma vengono trasferiti anche segnali chimici, ad esempio per segnalare l'attacco di un patogeno. In linea di massima, le piante che investono maggiori quantità di carbonio nelle reti micorriziche sono quelle che ricevono indietro la maggiore quantità di nutrienti, anche se non sempre questo criterio viene rispettato. Ad esempio, il lino può investire poco carbonio nella rete miceliare e ricevere indietro fino al 90% di P e N, mentre altre specie come il sorgo traslocano la maggior parte del carbonio ottenendo pochi vantaggi in termini di efficienza di assorbimento dei nutrienti.

Le reti micorriziche sembrano avere una struttura organizzativa "topologica senza scala", come evidenziato da Beiler et al. (2009) in uno studio su foreste di abete di Douglas (Figura 3.15). In questo tipo di rete, esistono piante "hub", ossia individui particolarmente connessi che giocano un ruolo centrale nella circolazione dei nutrienti, ed altre piante meno connesse. Ne deriva che la rimozione di un individuo dalla comunità può avere effetti estremamente variabili in base all'importanza dell'individuo nella rete.

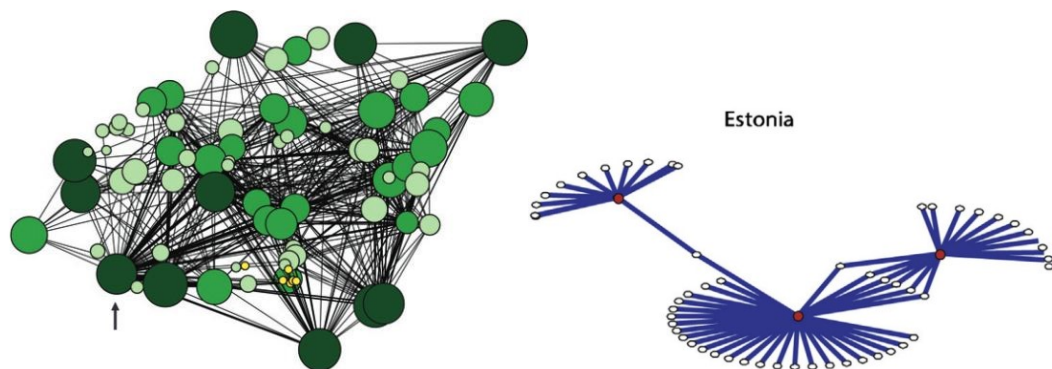


Figura 3.15 (Sinistra) Modello spaziale di rete che mostra i collegamenti tra gli abeti di Douglas e le micorrize *Rhizopogon vesiculosus* e *Rhizopogon vinicolor*. I cerchi rappresentano gli alberi (nodi), la dimensione è proporzionale al diametro del tronco e il colore diventa più scuro all'aumentare dell'età dell'albero. La freccia indica l'albero più connesso, collegato ad altri 47 alberi. Si nota che gli alberi più grandi e vecchi sono quelli più connessi. Da Beiler et al., 2009. **(Destra)** Modello spaziale di una foresta a dominanza di *Pinaceae* in Estonia. Cerchi rossi = piante ospiti; cerchi bianchi = funghi. Da Bahram et al., 2014.

Dato che la competizione per le risorse è tra le principali forze che controllano la convivenza di specie vegetali e la composizione delle comunità vegetali, le reti miceliari possono influenzare la diversità e la struttura delle comunità vegetali avvantaggiando alcune

specie più di altre o mediandone il trasferimento di nutrienti. Ad esempio, due piante possono fornire carbonio in modo diseguale ad un fungo che condividono e ricevere da esso risorse in quantità diverse, con un beneficio per una pianta rispetto all'altra. Inoltre, le CMN sono importanti per l'insediamento delle piante nella vegetazione perenne, facilitando il reclutamento dei semenzali: collegandosi alle reti micorriziche le piantine nel sottobosco possono competere più efficacemente con le altre specie. Ad esempio, Dickie et al. (2002), in uno studio condotto su *Quercus rubra*, *Quercus montana* e *Acer rubrum* hanno osservato che le piantine in contatto con gli alberi adulti tramite una rete miceliare hanno una maggiore sopravvivenza rispetto a quelle isolate. Ciò si spiega col fatto che le piantine hanno subito accesso ad un sistema di assorbimento dei nutrienti senza spese, dato che viene fornita e mantenuta dalla vegetazione adulta circostante e, per tale motivo, riescono a crescere più rapidamente.

- Limiti nello studio e controversie:

Nonostante l'importanza teorica delle reti micorriziche, il loro studio è ancora estremamente complesso e presenta diversi limiti. In molti casi, i risultati ottenuti sono parziali o contrastanti; perciò, la nostra comprensione del loro funzionamento è estremamente ridotta e costituita in buona parte da ipotesi da verificare.

In particolare, Karst et al., (2013) hanno pubblicato un'analisi in cui vengono smentite, o quantomeno ridimensionate, le affermazioni più comuni sulle reti micorriziche. Ad esempio, è vero che possono esistere le CMNs nelle foreste, ma le prove a sostegno del fatto che le CMN sono molto diffuse sono limitate, dato che sono stati condotti troppo pochi studi in campo. Anche per quanto riguarda il trasferimento dei nutrienti attraverso le reti i dati in possesso sono parziali, dato che in 26 studi esaminati il trasferimento può essere, almeno in parte, spiegato da altri fenomeni (movimento dei nutrienti nella soluzione circolante, cambiamento della comunità fungina del suolo...). Ciò non significa che il trasferimento tramite le CMN non avvenga, ma andrebbe confermato con ulteriori studi in campo con metodi di valutazione migliori ed in ambienti diversi.

Quindi, certamente le reti micorriziche rappresentano un'importante scoperta nel campo dell'ecologia, potenzialmente in grado di rivoluzionare la nostra comprensione delle dinamiche tra piante e funghi negli ecosistemi. Tuttavia, la loro reale importanza e il loro funzionamento sono ancora in gran parte ipotetici e necessitano di ulteriori studi. È essenziale continuare a indagare con nuovi approcci e metodi per ottenere una comprensione più precisa del ruolo delle CMN nel trasferimento di nutrienti e nella competizione tra le specie vegetali, evitando di trarre conclusioni premature o sovrastimate.

3.8 Micorrize come agenti di biorisanamento

Per “biorisanamento” si intende un processo attraverso cui dei microrganismi vengono impiegati per rimuovere o limitare sostanze inquinanti in un determinato ambiente. I funghi micorrizici hanno la possibilità di degradare, assorbire o bloccare inquinanti presenti nel suolo, come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Gli IPA sono degli inquinanti derivati dalla combustione di combustibili fossili ed altri composti, e destano particolare preoccupazione perché hanno azione cancerogena, mutagena e teratogena, e le micorrize sembrano essere efficaci nel loro trattamento. Ad esempio, Shi et al. (2022) hanno condotto una meta-analisi di 45 articoli riguardanti l'utilizzo di micorrize arbuscolari nel risanamento di terreni inquinati da IPA, osservando che in ogni caso il loro impiego ha ridotto la concentrazione residua di IPA nel terreno, con una riduzione del 48% rispetto al terreno di controllo non micorrizzato nel caso con l'effetto maggiore. Tra gli altri inquinanti ambientali, le micorrize sembrano avere un'azione efficace nel trattamento di terreni inquinati da metalli pesanti, cui è dedicato il Capitolo 4.

Capitolo 4

MICORRIZE NEL BIORISANAMENTO DELL'INQUINAMENTO DA METALLI PESANTI

Tra i problemi ambientali derivati dalla continua crescita delle attività antropiche, l'inquinamento da metalli pesanti è diventato un tema di crescente rilevanza. I metalli pesanti possono essere definiti in diversi modi; una delle definizioni più comuni classifica come metalli pesanti tutti gli elementi chimici la cui densità è maggiore di 5 g/cm³, mentre più recentemente il termine "metallo pesante" è stato spesso utilizzato per indicare qualsiasi metallo, metalloide o semimetallo che sia potenzialmente tossico per l'ambiente e per gli organismi viventi. Tra i metalli pesanti nelle piante, alcuni elementi come zinco, rame e manganese sono micronutrienti, ovvero elementi necessari al corretto svolgimento delle funzioni biologiche della pianta, ma ad elevate concentrazioni possono essere tossici. Altri, come cadmio, arsenico, piombo, mercurio e nichel non sono nutrienti e sono tossici per molti organismi. I metalli pesanti destano particolare preoccupazione rispetto ad altri inquinanti a causa della loro elevata persistenza ambientale e dei potenziali rischi ecologici. La loro elevata persistenza è dovuta al fatto che non sono degradabili tramite processi fisici; perciò, vanno incontro a processi di bioaccumulo e bioamplificazione, impattando significativamente nei sistemi biologici.

4.1 **Fonti di emissione e problemi forestali correlati**

Nonostante questi contaminanti siano rilasciati anche da processi naturali (attività vulcanica, incendi...), la maggior parte dei metalli pesanti origina da attività antropiche. Di seguito sono esposte le principali fonti:

- Fonti agricole:

Nei terreni agricoli i fertilizzanti inorganici e organici sono le fonti più importanti di metalli pesanti. L'impiego di fertilizzanti fosfatici, fertilizzanti a base di nitrati, calce, letame, fanghi di depurazione determina accumulo di metalli pesanti nel terreno. Anche diversi pesticidi sono fonti di inquinamento da metalli pesanti;

- Fonti industriali:

Le più importanti fonti industriali di metalli pesanti sono l'estrazione mineraria e la raffinazione dei metalli (trasporto, fusione e riciclaggio del metallo). Le miniere possono emettere diversi metalli pesanti a seconda del tipo di estrazione. Ad esempio, l'estrazione dell'oro determina elevate emissioni di mercurio (Hg) nell'ambiente, mentre le miniere di carbone sono fonti di As, Cd, Fe, ecc. Per quanto riguarda la raffinazione dei metalli, questa emette metalli pesanti sotto forma di particolato o vapore. I vapori di As, Cd, Cu, Pb, Sn e Zn possono combinarsi con l'acqua atmosferica a formare un aerosol che può essere trasportato dal vento a grandi distanze o può precipitare tramite le piogge contaminando suolo e corpi idrici. Un'altra fonte di emissione è rappresentata dalle centrali elettriche: l'energia fornita dal carbone e dalla combustione del petrolio determina contemporaneamente l'emissione di Cu, Zn, Cs, Ni, Se e B;

- Acque reflue:

I reflui domestici costituiscono una fonte di emissione di metalli nei corpi idrici; particolarmente inquinanti sono le acque reflue non trattate o trattate solo meccanicamente. Nelle aree ad elevata densità di popolazione i reflui costituiscono un serio problema di contaminazione da metalli pesanti di fiumi, laghi e aree costiere;

- Altre fonti:

Altre fonti di metalli pesanti includono l'incenerimento dei rifiuti, le discariche e i trasporti. L'incenerimento dei rifiuti determina l'emissione di Zn, Pb, Al, Sn, Fe e Cu. I trasporti contribuiscono in modi diversi: la combustione del diesel rilascia Fe, Pb, V e Ni, il consumo degli pneumatici rilascia Ni e Zn, il catalizzatore rilascia Al.;

Come detto, l'attività mineraria e la lavorazione dei metalli sono le principali fonti di inquinamento da metalli pesanti. Negli ultimi decenni queste due attività sono aumentate in modo significativo, a causa della crescente domanda di risorse alimentata dalla crescita demografica e dallo sviluppo economico di paesi come India e Cina. Con la crescente industrializzazione è aumentata, infatti, la domanda di materiali come acciaio, rame e litio. Oltre allo sviluppo dell'industria, si è assistito ad un enorme aumento dell'utilizzo di strumenti elettrici ed elettronici; questa "transizione digitale" ha aumentato sostanzialmente la domanda di litio, cobalto, terre rare ed altri metalli, tutti elementi impiegati in smartphone, computer, batterie ecc. Contemporaneamente, la transizione ecologica ha accresciuto la domanda di metalli impiegati nella costruzione di turbine eoliche, pannelli solari e batterie come rame, nichel e litio.

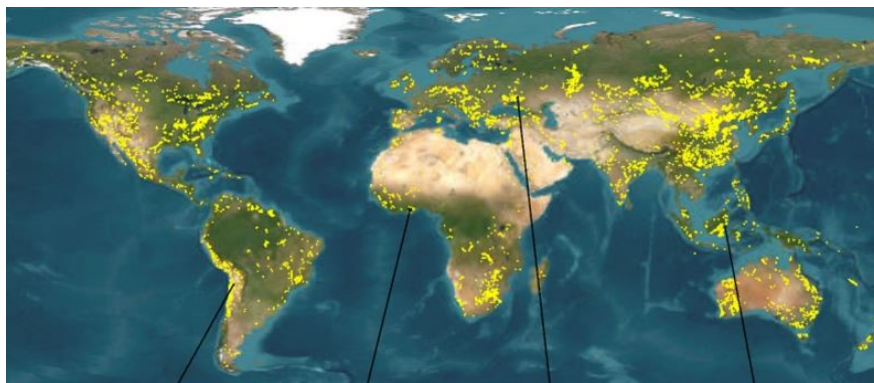


Figura 4.1 Distribuzione globale delle aree minerarie. Da Tang & Werner, 2023.

L'aumento delle attività minerarie ha comportato impatti molto negativi sull'ambiente e sulle comunità locali: oltre all'inquinamento, queste attività determinano deforestazione e perdita di biodiversità, e le comunità che dipendono dall'economia mineraria si ritrovano ad affrontare gravi conseguenze ambientali. A sottolineare quanto questo problema sia in aumento negli ultimi anni, quasi il 63% (circa 8600 Km²) della deforestazione causata dall'espansione delle attività minerarie negli ultimi 20 anni è avvenuta dopo il 2010 ed il 37% solamente nel periodo 2001-2010. Le miniere causano una deforestazione diretta (ovvero strettamente legata all'area mineraria), ed una deforestazione indiretta (ovvero nei dintorni dell'area mineraria) dovuta alla costruzione delle infrastrutture di lavorazione e di trasporto. La deforestazione avviene nei luoghi in cui sono presenti i giacimenti, ma la maggior parte di essa è dovuta alla domanda di paesi terzi piuttosto che a quella dei paesi produttori. Infatti, la domanda di Cina, Europa ed USA contribuisce al 44% della deforestazione globale legata alle miniere, e l'85% della deforestazione causata dalla domanda europea è localizzata all'estero. Per questo motivo, gli sforzi per la riforestazione dovrebbero essere in parte anche responsabilità dei paesi consumatori, nonostante la perdita avvenga in altri paesi. Attualmente l'attività mineraria è la quarta causa di deforestazione a livello globale, ma le tendenze di aumento di tale attività suggeriscono che questa potrebbe presto acquisire un ruolo sempre più cruciale nella perdita di foreste.

Naturalmente ogni giacimento minerario prima o poi si esaurisce, lasciando il territorio, oltre che privo del valore iniziale, completamente perturbato a livello ambientale e per tale motivo è necessario prevedere degli interventi di riqualificazione dei siti post-minerari. Ampie porzioni di siti post-minerari potrebbero essere rimboschite, dato che il ripristino forestale permette lo sviluppo di un ecosistema stabile e sostenibile a lungo termine. Tuttavia, il successo della riforestazione dipende dall'adattabilità delle specie arboree ai terreni minerari,

che presentano proprietà chimiche e fisiche altamente mutevoli e sono soggetti ad accumulo di metalli pesanti ad effetto fitotossico.

4.2 Effetti fitotossici dei metalli pesanti

I metalli pesanti accumulati nei siti post-minerari producono spesso effetti tossici nelle piante, rendendo difficoltose le riforestazioni di tali zone. Di seguito sono descritti i principali effetti fitotossici dei metalli più presenti nelle aree minerarie.

- *Zinco (Zn)*: Lo zinco è un micronutriente essenziale ma, ad elevate concentrazioni, è tossico per le piante. L'eccesso di zinco inibisce diverse funzioni metaboliche, causa clorosi nelle foglie giovani, limita la crescita di radici e germogli. Uno studio condotto da Langer et al. (2008) ha osservato che una concentrazione di $68,5 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ di suolo determina una riduzione della crescita del pioppo grigio del 50% rispetto a terreni con basse concentrazioni di zinco.
- *Cadmio (Cd)*: Le piante cresciute in terreni con elevati livelli di cadmio mostrano clorosi, inibizione della crescita, imbrunimento delle punte radicali. Il cadmio interferisce con l'assorbimento, il trasporto e l'utilizzo di diversi elementi, oltre che dell'acqua. Uno studio di Jiali et al. (2013) condotto sul pioppo grigio ha osservato un'inibizione della fotosintesi risultante in una minore fissazione del carbonio, oltre che l'induzione di stress ossidativo.
- *Mercurio (Hg)*: Il mercurio può legarsi alle proteine canale che trasportano acqua, determinando la chiusura degli stomi e l'ostruzione del flusso d'acqua. Determina inoltre stress ossidativo.
- *Cromo (Cr)*: Concentrazioni maggiori di $100 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ di suolo inibiscono la germinazione dei semi. Un eccesso di cromo determina anche una inibizione della fotosintesi a causa del danneggiamento dei cloroplasti.
- *Piombo (Pb)*: Il piombo inibisce la germinazione e riduce la crescita radicale e fogliare di molti alberi, in particolar modo il pino d'Aleppo (*Pinus halepensis*).
- *Nichel (Ni)*: L'eccesso di nichel causa diverse alterazioni fisiologiche e sintomi fitotossici come clorosi e necrosi in diverse piante, oltre che un ridotto assorbimento di acqua.

L'effetto fitotossico dei metalli pesanti rappresenta una sfida nel rimboschimento di siti post-minerari ed in generale di terreni inquinati, dato che questi contaminanti possono ostacolare la crescita delle piante in diversi modi. È necessario, per tale motivo, adottare

strategie che permettano di accelerare i processi di rimboschimento in modo da garantire un ripristino ambientale veloce e duraturo. Esistono diversi metodi di risanamento del suolo che permettono di renderlo più adatto al rimboschimento e, tra questi, uno che sembra essere promettente è il biorisanamento tramite l'uso di micorrize.

4.3 Meccanismi di protezione dai metalli pesanti nelle micorrize

Le micorrize possono mediare la tolleranza delle piante ospiti ai metalli pesanti attraverso numerosi meccanismi, alcuni dei quali comuni ad ectomicorrize e micorrize arbuscolari ed altri esclusivi di una sola categoria. Di seguito sono elencati i principali meccanismi:

- Chelazione intracellulare:

Tra i composti prodotti dai funghi, le metallotioneine rivestono una particolare importanza. Si tratta di proteine a basso peso molecolare che sono in grado di legarsi fortemente agli ioni metallici; perciò, sono in grado di chelare alcuni metalli pesanti rendendoli indisponibili alla pianta (Articolo 3). Inoltre, sono coinvolte direttamente nella detossificazione dei radicali liberi accumulati sotto stress ossidativo. Inoltre, lo stress provoca una sovraregolazione dei geni responsabili della biosintesi del glutatione, un composto in grado di complessare gli ioni metallici. La chelazione dei metalli da parte delle metallotioneine e la formazione dei complessi Metallo-glutatione limitano il trasferimento dei metalli alla pianta ospite;

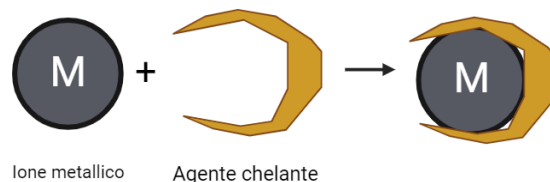


Figura 4.2 Schematizzazione della reazione di chelazione. Una sostanza, detta agente chelante, lega uno ione metallico tramite legami coordinativi, formando un complesso molto stabile. Il metallo risulta bloccato come se fosse stretto tra le chele di un granchio, da ciò deriva il termine “chelazione”. *Creata con Biorender.com.*

- Aumento delle difese contro lo stress ossidativo:

L'eccessiva concentrazione di metalli pesanti causa danni cellulari inducendo stress ossidativo. Le piante sono in grado di produrre enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi o la catalasi, che riducono lo stress. Le micorrize sono in grado di aumentare la produzione di tali enzimi ed in generale migliorano l'efficienza delle attività antiossidanti;

- Miglioramento dello stato nutrizionale delle piante ospiti:

Come esposto nel precedente capitolo, le micorrize aumentano l'assorbimento di azoto e fosforo, oltre ad altri nutrienti. Un maggiore assorbimento di N e P aumenta la tolleranza

contro lo stress ossidativo ed in generale migliora la resistenza delle piante all'eccessiva concentrazione di metalli pesanti (Articolo 3, Articolo 4). Ad esempio, piante con un elevato contenuto di fosforo sono in grado di tollerare meglio il cadmio, dato che il fosforo ne riduce significativamente la traslocazione verso le foglie (Articolo 1).

- Accumulo sulla parete cellulare:

La parete cellulare fungina presenta diversi costituenti, come chitina e melanina, che hanno un'elevata capacità di legame verso gli ioni metallici. Queste componenti permettono alle ife e alle spore di adsorbire e ritenere sulla parete grandi quantità di metalli che vengono resi indisponibili alla pianta ospite (Articolo 4);

- Compartimentalizzazione dei metalli pesanti:

Diverse specie fungine sono in grado di accumulare ed isolare significative quantità di metalli pesanti all'interno del vacuolo.

- Barriera fisica:

Soprattutto nelle ectomicorrize, il micelio extraradicale ed il mantello costituiscono una prima barriera contro gli ioni metallici tossici e possono diminuire l'esposizione delle piante ospiti;

- Produzione di glomalina:

Le micorrize arbuscolari producono essudati contenenti glomalina, una proteina in grado di sequestrare Cu, Cd, Fe, Pb, Zn e Cr (Articolo 3).

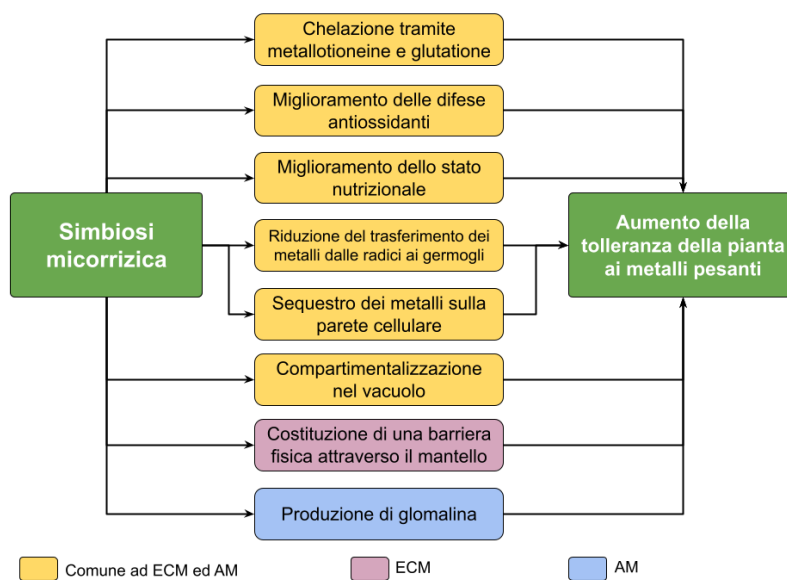


Figura 4.3 Principali meccanismi attraverso cui la simbiosi micorrizica aumenta la tolleranza delle piante ai metalli pesanti.

4.4 Casi studio

Lo scopo del capitolo è quello di analizzare e comprendere se le micorrize possono avere effettivamente un ruolo nel biorisanamento dei terreni inquinati da metalli pesanti ed in quale misura possono essere utili. Al fine di raggiungere tale scopo sono stati analizzati alcuni studi che analizzano quantitativamente i benefici forniti da alcuni funghi a piante forestali in condizioni di stress da metalli pesanti. Vengono di seguito presentati quattro articoli che mostrano risultati promettenti ed analizzano i meccanismi attraverso cui vengono protette le piante. Dei quattro studi, due si concentrano su funghi ectomicorrizici che possono essere impiegati nelle zone temperate, mentre due sono incentrati su funghi arbuscolari utilizzabili in zone tropicali-equatoriali.

4.4.1 Articolo 1

Titolo: Cd-tolerant *Suillus luteus*: A fungal insurance for pines exposed to Cd

Autori: Erik Krznanic, Nathalie Verbruggen, Jan H.L. Wevers, Robert Carleer, Jaco Vangronsveld, Jan V. Colpaert.

Scopo dello studio: Lo studio analizza gli effetti dell'inoculazione di piantine di *Pinus sylvestris* con specifiche popolazioni del fungo ectomicorrizico *Suillus luteus* tolleranti al cadmio. Lo scopo è comprendere se l'inoculazione con il fungo può ridurre lo stress da cadmio nella pianta ospite nella prospettiva di impiegare popolazioni di *Suillus luteus* nella riforestazione di terreni inquinati da Cd.

Materiali e metodi:

Materiale fungino: Sono stati impiegati 48 isolati di *Suillus luteus* appartenenti a sei popolazioni differenti. Tre popolazioni sono state raccolte in una zona del Limburgo del Nord (Olanda) con terreni contaminati da Zn, Cd e Pb a causa delle deposizioni atmosferiche di alcune fonderie, le altre tre sono state raccolte in siti non contaminati. L'inquinamento da cadmio nei siti di raccolta è stato valutato analizzando il Cd nella soluzione circolante nel suolo.

Inoculazione dell'ospite e trattamento: I funghi sono stati inoculati su piantine di *Pinus sylvestris* di 6 settimane. L'inoculazione è avvenuta portando a stretto contatto l'apparato radicale delle piantine con micelio fresco e vitale, coltivato in mezzo agarizzato. Le piantine sono state inoculate con un isolato Cd-tollerante (raccolto nel terreno inquinato) o con uno non tollerante e sono state cresciute in condizioni controllate, irrigate con la stessa soluzione di nutrienti. Dopo 4 settimane, le radici ed i substrati erano tutti colonizzati dal micelio e sono stati iniziati i trattamenti di cadmio. La soluzione di nutrienti è stata arricchita con diverse

concentrazioni di cadmio, aggiunto in forma di $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (Cadmio solfato 8/3-idrato). Sono stati applicati 5 livelli: 0, 1, 5, 10 e 20 μM Cd. Il trattamento è durato 8 settimane, a metà delle quali è stata misurata la capacità di assorbimento del fosfato di ogni pianta tramite metodi non invasivi.

Capacità di assorbimento di nutrienti sotto stress da Cd: L'assorbimento è stato misurato su tutti gli individui a 4 ed 8 settimane dall'inizio del trattamento. Le misurazioni sono state non-distruttive ed hanno mantenuto l'integrità del sistema fungo-radice.

Raccolta ed analisi: Dopo 8 settimane di trattamento, le piante sono state raccolte. La biomassa fungina attiva è stata stimata a partire dalla concentrazione di ergosterolo estratto da sottocampioni di radici e substrato liofilizzati. Il materiale vegetale è stato essiccato, pesato e polverizzato.

Risultati e discussione:

Capacità di assorbimento di nutrienti: I tassi di assorbimento sono stati valutati utilizzando come marcatori gli assorbimenti netti di fosfato (P_i) ed ammonio. All'aumentare dello stress da Cd, l'assorbimento di P_i nelle piante associate con popolazioni sensibili al cadmio è calato velocemente, mentre le piante associate a funghi tolleranti sono riuscite a mantenere un assorbimento elevato (Figura 4.4). Lo stesso è avvenuto analizzando l'assorbimento di ammonio: a differenza di quelli inoculati con funghi sensibili al Cd, gli individui colonizzati dal fungo tollerante sono stati in grado di mantenere un elevato assorbimento anche ad elevate concentrazioni di cadmio.

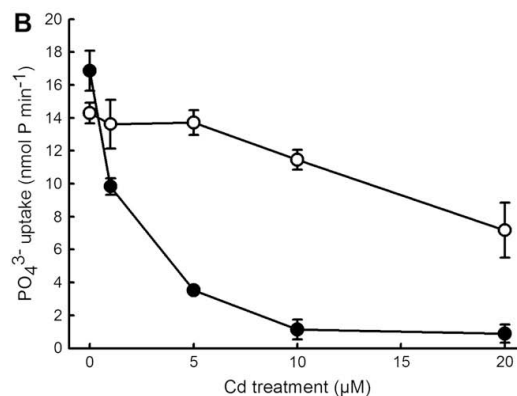


Figura 4.4 Tasso di assorbimento di fosfato ($\text{nmol P}_i \text{ min}^{-1}$) nei semenzali di *Pinus sylvestris* trattati con Cd ed inoculati con il fungo *Suillus luteus*. Sono confrontati genotipi del fungo tolleranti al cadmio (cerchi vuoti) e genotipi sensibili (cerchi pieni). Il grafico mostra l'assorbimento dopo 8 settimane di trattamento. Da Krznanic et al., 2008.

Crescita di piante e funghi: Dopo 8 settimane di trattamento non sono state rilevate differenze significative nella biomassa dei germogli, mentre sono state misurate differenze significative nella biomassa radicale, soprattutto a concentrazioni $>5 \mu\text{M}$ Cd. La crescita del

fungo ha differito notevolmente nelle diverse popolazioni: la crescita è stata fortemente ridotta dall'aumento di cadmio nelle popolazioni sensibili, mentre quelle resistenti hanno mostrato una crescita costante.

Assorbimento di cadmio: La concentrazione di Cd nelle radici è aumentata all'aumentare dell'esposizione da Cd e la concentrazione radicale è stata notevolmente maggiore rispetto a quella negli aghi. Nei test *in vitro*, era stato osservato che il fungo Cd-sensibile accumulava più cadmio rispetto a quello tollerante. Nelle radici colonizzate, invece, a concentrazioni di 5, 10 e 20 μM Cd, la quantità di cadmio nelle radici associate al fungo sensibile è risultata in qualche modo maggiore rispetto a quella nelle radici associate al fungo tollerante. I ricercatori ritengono che ciò sia possibile a causa della biomassa fungina nettamente inferiore negli individui inoculati dal fungo sensibile. Piante associate al fungo tollerante hanno trasferito agli aghi quantità di Cd significativamente inferiori quando esposte ad elevate concentrazioni di Cd (Figura 4.5).

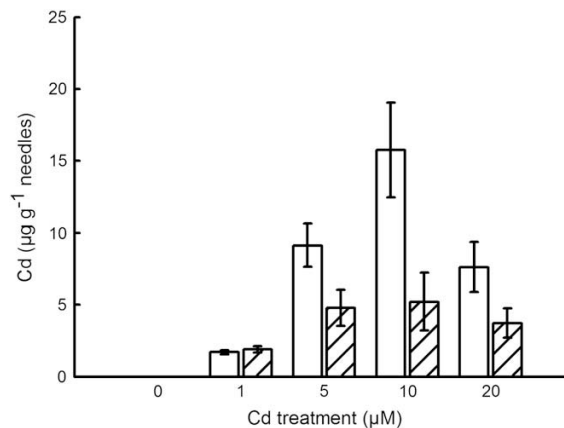


Figura 4.5 Concentrazione di Cd negli aghi. Le colonne vuote si riferiscono alle popolazioni di *Suillus luteus* sensibili, quelle tratteggiate si riferiscono alle popolazioni tolleranti. Da Krznanic et al., 2008.

Discussione:

Il Cd nel suolo innesca la tolleranza al Cd in Suillus luteus: In precedenti studi è stato osservato che livelli tossici di Zn hanno innescato l'evoluzione di una tolleranza specifica allo zinco nei funghi *Suillus*. Allo stesso modo, questo studio ha evidenziato come in terreni con livelli tossici di cadmio si sono evolute popolazioni fungine tolleranti al Cd.

Il Suillus luteus adattato al Cd migliora la fitotossicità negli individui di pino: Le piantine di pino inoculate con un isolato di *S. luteus* tollerante hanno mostrato una capacità di assorbimento di nutrienti significativamente migliorata quando esposte a concentrazioni tossiche di Cd. Le piante inoculate col fungo sensibile al Cd hanno accumulato significativamente più Cd negli aghi rispetto a quelle inoculate con il fungo tollerante.

Confrontando entrambi i ceppi fungini, il ceppo tollerante sembra la soluzione migliore per ridurre il trasferimento di Cd alla pianta ed aumentare l'assorbimento di nutrienti ad elevate concentrazioni di cadmio. Queste due caratteristiche dovrebbero, in linea teorica, accelerare la crescita delle piante. Tuttavia, l'effetto differenziale dei trattamenti di Cd nella crescita è stato relativamente piccolo. Le piante legnose, però, reagiscono lentamente ai cambiamenti delle condizioni ambientali come le concentrazioni tossiche di nutrienti; quindi, solo dopo lunghi periodi di esposizione sarebbe possibile rilevare elevate differenze nella crescita (per gli effetti di un maggiore periodo di esposizione, vedasi l'Articolo 2).

Funghi Suillus, predestinati per evolvere la tolleranza ai metalli pesanti? Oltre a questo studio, esistono prove che i funghi del genere *Suillus* sono altamente adattabili ai metalli pesanti nell'ambiente. Sono state precedentemente isolate popolazioni in una miniera di rame che hanno evoluto tolleranza al Cu ed altre vicino ad una fonderia di zinco che hanno sviluppato tolleranza allo Zn.

Conclusioni:

I test *in vitro* hanno mostrato che *Suillus luteus* isolato da suoli contaminati da Cd è in grado di crescere bene anche a livelli tossici di Cd, confermando che livelli eccessivi di cadmio possono innescare l'evoluzione della tolleranza nel fungo. Successivamente, la relazione dose-risposta ha mostrato che i semenzali di pino inoculati con l'isolato tollerante sono stati in grado di mantenere un elevato assorbimento di nutrienti e limitare il trasferimento di Cd agli aghi anche ad elevate concentrazioni di Cd. L'esistenza di popolazioni di *Suillus luteus* tolleranti al Cd, allo Zn ed al Cu apre possibilità al loro impiego per la bonifica di siti industriali e minerari. La riforestazione con alberi inoculati con funghi tolleranti ai metalli pesanti potrebbe essere vantaggiosa nell'accelerare il processo di stabilizzazione ambientale e ripristino della copertura vegetale nelle aree soggette ad accumulo di metalli pesanti.

4.4.2 Articolo 2

Titolo: Effects of Ectomycorrhizal Fungi and Heavy Metals (Pb, Zn e Cd) on Growth and Mineral Nutrition of *Pinus halepensis* Seedlings in North Africa.

Autori: Hachani C., Lamhamedi M. S., Cameselle C., Gouveia S., El Abidine A. Z., Khasa D. P. & Béjaoui Z.

Scopo dello studio: Lo scopo dello studio è stato quello di testare l'ipotesi secondo cui i funghi ectomicorrizici possono aumentare la capacità dei semenzali di *Pinus halepensis* di superare gli effetti negativi sulla crescita determinati dall'azione di metalli pesanti (Pb, Zn e Cd) contenuti in un terreno proveniente da un sito minerario. Viene anche esaminata la capacità dei funghi ECM di migliorare la nutrizione minerale delle piante ospiti conferendo

indirettamente una maggiore tolleranza ai metalli pesanti. Lo studio è stato condotto nell'ottica di migliorare la qualità delle piantine che vengono prodotte nei vivai con l'obiettivo di aumentare il tasso di sopravvivenza e di crescita delle piantine nella riforestazione di siti contaminati.

Materiali e metodi:

Disegno sperimentale e condizioni di crescita: L'esperimento è un disegno a blocchi completamente randomizzato, con quattro blocchi composti da quattro trattamenti: piantine non micorrizzate + terreno non contaminato (NM-NC) (Controllo), piantine micorrizzate + terreno non contaminato (M-NC), piantine non micorrizzate + terreno contaminato (NM-C) e piantine micorrizzate + terreno contaminato (M-C). In ogni blocco sono state utilizzate 20 piantine per ognuno dei 4 trattamenti, per un totale di 320 piantine.

Campionamento e analisi fisico-chimiche dei suoli contaminati e dei suoli di controllo: I campioni di terreno contaminato sono stati raccolti nei pressi del sito minerario abbandonato "Jebel Ressay", nella Tunisia del nord. Sono stati misurate le concentrazioni di Pb, Zn e Cd nei vari campioni, ed il campione con la concentrazione più bassa (prossima allo zero) è stato utilizzato nei test di controllo come terreno non contaminato.

Campionamento, misurazione del peso secco ed analisi dei tessuti dei semenzali dei pini micorrizzati: Il materiale vegetale era costituito da piantine di *P. halepensis* di 9 mesi divise in due classi: piantine non micorrizzate e piantine micorrizzate dal genere *Rhizopogon sp.* Su tre campioni per ogni classe sono state misurate le concentrazioni iniziali di nutrienti minerali (N, P, K, Ca, Mg, Fe) e metalli pesanti (Pb, Zn, Cd) nei germogli e nelle radici. Dopo 12 mesi di crescita le piantine sono state raccolte e lavate, sono stati separati germogli e radici che sono stati essiccati per determinare la massa secca dei germogli (SDM) e la massa secca delle radici (RDM). L'effetto dei metalli pesanti sulle piantine è stato valutato tramite il fattore di bioaccumulo (BAF) e il fattore di traslocazione (TF), calcolati secondo le formule:

$$BAF = \frac{\text{concentrazione di metalli pesanti nella pianta}}{\text{concentrazione di metalli pesanti nel suolo}}$$

$$TF = \frac{\text{concentrazione di metalli pesanti nei germogli}}{\text{concentrazione di metalli pesanti nelle radici}}$$

Risultati:

Proprietà fisico-chimiche del suolo: Le analisi dei metalli pesanti hanno mostrato concentrazioni significativamente più elevate di Pb e Zn rispetto al controllo. Anche il cadmio era presente in concentrazione elevata nel terreno contaminato, mentre in quello di controllo era inferiore ai limiti di rilevamento. Nel terreno contaminato è stata misurata una elevata

concentrazione di Ca, che ha raggiunto i 252 mg g⁻¹, superando le concentrazioni di Pb, Zn e Cd.

Crescita e morfologia dei semenzali: La presenza di ectomicorrize ha promosso la crescita dei semenzali e ha avuto effetti positivi sulla performance dei semenzali cresciuti in terreno contaminato (Figura 4.6). Nel terreno contaminato da metalli pesanti la massa secca delle radici (RDM) è stata significativamente ridotta rispetto al controllo. Dopo 12 mesi, la riduzione della RDM nelle piante non micorrizzate (NM-C) è stata del 56% rispetto al controllo (NM-NC) (Figura 4.7a). Al contrario, non è stata rilevata una differenza significativa nella RDM tra le piantine micorrizzate (M-C) rispetto al controllo (NM-NC). Allo stesso modo, la massa secca dei germogli (SDM) è stata ridotta del 55% nelle piantine non micorrizzate in terreno contaminato (NM-C) rispetto al controllo. Invece, la SDM ha mostrato un aumento del 46% per le piantine micorrizzate in terreno di controllo (M-NC), mentre non è stata notata una differenza significativa rispetto al controllo (NM-NC) (Figura 4.7b).



Figura 4.6 Aspetti morfologici di *Pinus halepensis* non micorrizzato (NM) e micorrizzato (M) dopo 12 mesi di crescita in suolo di controllo (NC) e contaminato (C). Da Hachani et al., 2020.

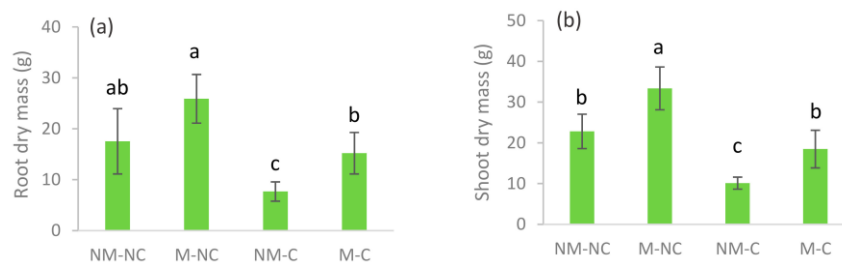


Figura 4.7 Massa secca radicale (a) e massa secca dei germogli (b). Da Hachani et al., 2020.

Contenuto dei nutrienti minerali: Le piantine micorrizzate hanno mostrato un contenuto di azoto nei germogli significativamente più elevato rispetto a quelle non micorrizzate. Sono stati registrati valori più elevati di N, K, Ca e Mg nelle radici delle piante micorrizzate rispetto a quelle non micorrizzate. L'effetto della contaminazione sul contenuto di elementi nei germogli

è stato più pronunciato nelle piantine non micorrizzate rispetto a quelle micorrizzate. Rispetto al controllo, NM-C ha mostrato contenuti di elementi inferiori, rispettivamente: -36% N, -56% P, -41% K, -28% Fe. Nelle radici, l'esposizione ai metalli pesanti ha ridotto il contenuto di N (-61%), P (-60%), K (-59%), Mg (-45%), Fe (-43%) rispetto al controllo. In presenza di contaminazione, invece, le piantine micorrizzate hanno mostrato riduzioni meno pronunciate: -18% N, -36% Fe rispetto al controllo.

		Mineral Nutrient Contents (mg.Seedling ⁻¹)					
	Treatment	N	P	K	Ca	Mg	Fe
Shoots	NM-NC	178.18 ± 17.87 c	25.37 ± 10.48 b	148.60 ± 26.36 b	187.66 ± 33.11 b	51.18 ± 11.75 b	7.22 ± 0.57 a
	M-NC	477.84 ± 12.39 a	49.69 ± 9.11 a	220.79 ± 16.32 a	258.20 ± 21.59 a	72.43 ± 5.63 a	7.57 ± 1.49 a
	NM-C	114.07 ± 7.65 d	11.20 ± 1.69 c	87.36 ± 3.84 c	185.38 ± 14.58 b	43.21 ± 4.79 b	5.22 ± 0.31 b
	M-C	266.11 ± 5.05 b	32.01 ± 4.39 b	115.44 ± 18.81 b	264.79 ± 15.25 a	54.56 ± 7.75 b	5.47 ± 0.10 b
Roots	NM-NC	143.71 ± 9.69 b	16.20 ± 2.12 b	109.32 ± 13.23 ab	335.64 ± 50.63 b	48.84 ± 9.76 a	50.95 ± 4.48 b
	M-NC	205.14 ± 19.08 a	23.06 ± 4.55 a	128.73 ± 26.61 a	382.70 ± 44.75 b	54.06 ± 9.73 a	75.83 ± 15.49 a
	NM-C	54.78 ± 1.72 d	6.40 ± 0.29 c	45.10 ± 3.73 c	348.78 ± 36.38 b	26.59 ± 2.45 b	29.14 ± 16.42 c
	M-C	117.16 ± 4.36 c	19.24 ± 0.93 ab	90.54 ± 7.74 b	711.18 ± 135.02 a	44.43 ± 6.55 a	32.71 ± 3.24 c

Tabella 4.1 Contenuto di nutrienti minerali (mg/semenzale) in germogli e radici delle piantine di *P. halepensis* micorrizzate e non micorrizzate dopo 12 mesi di esposizione a Pb, Zn e Cd. Da Hachani et al., 2020.

Contenuto di metalli pesanti: Dopo un anno di crescita si sono riscontrati valori maggiori di Pb, Zn e Cd nelle radici rispetto ai germogli, soprattutto in M-C ed NM-C. Sono stati misurati aumenti significativi del contenuto di Pb, Zn e Cd nei germogli di M-C e NM-C rispetto al controllo. I valori del fattore di traslocazione (TF) hanno mostrato che le piante di *P. halepensis* hanno accumulato Pb, Zn e Cd nelle radici piuttosto che nelle foglie. La micorrizzazione ha ridotto la traslocazione di Zn e Cd nelle radici rispettivamente del 31% e 44% rispetto a NM-C.

Discussione e conclusioni:

I metalli pesanti presenti nel terreno contaminato hanno causato una diminuzione nella crescita delle piante di *P. halepensis* rispetto al controllo. Questo effetto è stato meno pronunciato in presenza di funghi ectomicorrizici, che hanno migliorato la crescita delle radici e dei germogli dei semenzali. Questo miglioramento può essere spiegato dalla produzione di acidi organici, dalla maggiore assimilazione di carbonio e dal maggiore assorbimento di acqua e minerali. Alti livelli di Pb, Zn e Cd hanno mostrato un cambiamento significativo nell'assorbimento di nutrienti minerali in *P. halepensis* tra le piantine micorrizzate e quelle di controllo. L'azoto nelle radici e nei germogli dei pini micorrizzati era più alto rispetto a quelli non micorrizzati. L'associazione con ectomicorrizze influenza la capacità di adsorbimento di Pb, Zn e Cd, dai risultati emerge che il contenuto di Pb, Zn e Cd era molto più alto rispetto ai germogli, mentre le piante M-C avevano concentrazioni più elevate di Zn e Cd. Lo studio non ha mostrato effetti significativi sul contenuto di Pb nelle radici, ma questo potrebbe essere dovuto all'elevata concentrazione iniziale di calcio nel suolo: il Ca potrebbe aver saturato i

canali ionici che vengono generalmente utilizzati dal Pb per attraversare le membrane cellulari. La presenza di ectomicorrize ha inoltre ridotto i fattori di traslocazione e di bioaccumulo, il che dimostra che le ectomicorrize possono migliorare il potenziale di fitostabilizzazione di *P. halepensis*. In conclusione, questo studio ha mostrato che l'uso delle micorrize potrebbe essere un approccio promettente per migliorare la crescita e l'acquisizione di nutrienti nelle piantine di *P. halepensis*, ciò ne può favorire l'impiego nei programmi di riforestazione di siti contaminati da metalli pesanti in zone semi-aride.

4.4.3 Articolo 3

Titolo: Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improves *Nauclea orientalis* L. growth and phosphorus uptake in gold mine tailing soil media

Autori: Tuheteru F. D., Arif A., Husna, Mansur I., Tuheteru E. J., Basrudin, Albasri, Hadijah M. H., Karepesina S.

Scopo dello studio: Nel tentativo di migliorare le condizioni colturali dei terreni post-minerari delle miniere d'oro, è stato svolto questo esperimento di rivegetazione in serra utilizzando funghi micorrizici arbuscolari (AMF) e terreni residui di una miniera d'oro. Gli obiettivi erano valutare la crescita iniziale, l'assorbimento di fosforo e l'eventuale riduzione di Pb in piante di *Nauclea Orientalis* inoculate con funghi AM indigeni su terreni inquinati dall'estrazione di oro. I tre funghi utilizzati sono *Glomus aggregatum*, *Glomus sp.* e *Acaulospora delicata*.

Materiali e metodi:

Lo studio è stato condotto per sette mesi (gennaio-luglio 2017) in serra, a Kendari (Indonesia).

Substrato e germinazione: Le analisi del terreno di coltura hanno mostrato un contenuto di metallo pari a 1,546 mg/Kg Mn, 3,23% Fe, 14 mg/Kg Cr, 60 mg/Kg (HNO₃-HClO₄)-AAS Pb, 0,61 mg/Kg Hg. I semi sono stati seminati in contenitori di mica contenenti un substrato di sabbia sterile e coltivati per 60 giorni.

Preparazione dell'inoculo e inoculazione con i funghi AM: I funghi utilizzati sono stati *Glomus sp.*, *Glomus aggregatum* e *Acaulospora delicata* isolati dalla rizosfera di *Pericopsis mooniana*. Gli inoculi di fungo contenevano spore e radici colonizzate dal fungo che sono state propagate per 3 mesi in un terreno di coltura. Sono stati inoculati 5 grammi di inoculo per ogni piantina di *N. Orientalis* di 60 giorni in sacchetti contenenti terreno di coltura originario della miniera. Le piantine non inoculate sono state utilizzate come controllo.

Disegno sperimentale: È stato utilizzato un disegno completamente randomizzato composto dai trattamenti: controllo, *Glomus sp.*, *G. aggregatum* e *A. delicata*. Ogni trattamento è stato replicato 9 volte.

Raccolta dei dati: Il peso secco delle piantine, comprese radici e germogli, è stato ottenuto essiccando le piante a 70°C per 24 ore e poi pesandole. Il fattore di trasporto (TF) del piombo è stato calcolato come:

$$TF = \frac{\text{concentrazione di metallo nei germogli}}{\text{concentrazione di metallo nella radice}}$$

La dipendenza micorrizica (MD) è stata calcolata come segue:

$$MD (\%) = \frac{(\text{peso secco pianta micorrizzata} - \text{peso secco pianta non micorrizzata})}{\text{peso secco pianta micorrizzata}} \cdot 100$$

Risultati e discussione:

Colonizzazione dei funghi AM: Le piantine erano colonizzate maggiormente da *A. delicata* che ha mostrato il tasso di colonizzazione maggiore (89%), seguita da *G. aggregatum* (86%) e *Glomus sp.* (77%).

Crescita dei semenzali: La colonizzazione fungina ha aumentato la crescita in altezza e diametro e la lunghezza delle foglie a 12 settimane dal trapianto rispetto al controllo (Tabella 4.2). Non ci sono state differenze significative tra i tre funghi.

Treatment	Height (cm) ^a	Diameter (mm) ^b	Leaf length (cm) ^c	Leaf width (cm) ^d
Control	4.93±0.895 c	1.88±0.583 b	1.67±0.396 b	1.00±0.175 c
<i>Glomus sp.</i>	7.83±0.636 a	2.91±0.240 a	8.82±0.407 a	3.57±0.058 a
<i>G. aggregatum</i>	8.73±0.233 ab	2.71±0.234 a	7.46±0.905 a	2.79±0.203 b
<i>A. delicata</i>	10.07±0.061 a	2.76±0.242 a	7.38±0.682 a	2.70±0.238 b

Tabella 4.2 Effetto dell'inoculazione con funghi AM sulla crescita di *Nauclea orientalis* a 12 settimane su suolo minerario. Da Tuheteru et al., 2020.

Peso secco delle piante: L'inoculazione con ogni fungo ha aumentato il peso secco totale. Non sono state rilevate differenze significative tra i tre diversi funghi nel peso secco dei germogli, per quanto riguarda le radici, la colonizzazione da parte di *Glomus sp.* e *G. aggregatum* ne ha aumentato il peso secco rispetto al controllo, mentre *A. delicata* non lo ha aumentato.

Treatment	Dry Weight (g)		
	Root ^a	Shoot ^b	Total ^c
Control	0.09±0.007 c	0.246±0.028 b	0.33±0.032 b
<i>Glomus sp.</i>	0.19±0.039 a	0.466±0.027 a	0.66±0.035 a
<i>G. aggregatum</i>	0.18±0.007 ab	0.443±0.058 a	0.62±0.059 a
<i>Acaulospora delicata</i>	0.12±0.015 bc	0.420±0.066 a	0.54±0.081 a

Tabella 4.3 Effetti dell'inoculazione sul peso secco. Da Tuheteru et al., 2020.

Contenuto di P e assorbimento delle piante: L'inoculazione con *A. delicata* ha aumentato significativamente la concentrazione di P nei germogli rispetto agli altri trattamenti, mentre *Glomus sp.* e *G. aggregatum* hanno aumentato significativamente il P nelle radici rispetto al controllo e alle piante inoculate con *A. delicata* (Tabella 4.4).

Treatments	P content (mg/g) ^a		P uptake (mg/plant) ^b	
	Root	Shoot	Root	Shoot
Control	1.27±0.016 bc	1.11±0.029 bc	0.11±0.010 b	0.27±0.025 b
<i>Glomus sp.</i>	1.52±0.038 a	1.09±0.007 c	0.29±0.052 a	0.52±0.033 a
<i>G. aggregatum</i>	1.33±0.020 b	1.16±0.006 b	0.24±0.007 a	0.52±0.069 a
<i>A. delicata</i>	1.21±0.035 c	1.26±0.008 a	0.11±0.014 b	0.53±0.079 a

Tabella 4.4 Effetto dell'inoculazione sull'assorbimento di fosforo (P) di *Nuclea orientalis*. Da Tuheteru et al., 2020.

Contenuto di Pb, assorbimento e fattore di trasporto: Il contenuto e l'assorbimento di Pb più elevati si sono verificati nelle piante non inoculate (controllo), mentre l'inoculazione con i funghi AM ha ridotto la concentrazione di Pb sia nelle radici che nei germogli (Tabella 4.5).

Treatments	Pb content (mg/g) ^a		TF	Pb uptake (mg/plant) ^b		Reduction of Pb by mycorrhiza (%)	
	Root	Shoot		Root	Shoot	Root	Shoot
Control	0.102±4.27 a	34.3±5.94 a	0.34	8.80±0.47 a	8.73±2.27 a		
<i>Glomus sp.</i>	0.025±1.63 bc	9.43±1.13 b	0.37	4.83±0.66 b	4.40±0.61 b	-75	-73
<i>G. aggregatum</i>	0.014±0.95 c	8.17±0.74 b	0.56	2.60±0.26 c	3.63±0.62 b	-86	-76
<i>A. delicata</i>	0.027±5.20 b	9.73±0.45 b	0.36	3.13±0.39 c	4.07±0.58 b	-74	-72

Tabella 4.5 Effetti dell'inoculazione sul Pb: contenuto, assorbimento e fattore di trasporto su *N. orientalis* a 12 settimane di crescita. Da Tuheteru et al., 2020.

Conclusioni:

I funghi micorrizici arbuscolari hanno dimostrato di essere in grado di formare una simbiosi con piantine di *Nauclea orientalis* dopo 12 settimane di crescita in un substrato di un terreno post-minerario di una miniera d'oro. In questo studio, funghi AM locali come *Glomus sp.* e *G. aggregatum* hanno migliorato la crescita e l'assorbimento di fosforo nelle piantine di *N. orientalis* di 3 mesi nel substrato post-minerario. I funghi hanno anche ridotto il contenuto di Pb nei tessuti vegetali. La riduzione di Pb è stata presumibilmente dovuta a meccanismi di produzione di glomalina da parte delle ife e delle spore. Un altro probabile meccanismo di detossificazione del Pb è indiretto, dovuto all'aumento dell'assorbimento di fosforo. Un maggiore assorbimento di fosforo determina una maggiore riserva di energia che può essere impiegata sotto forma di ATP per produrre composti chelanti i metalli come le metallotioneine. I risultati di questo studio e di diverse review in letteratura hanno indicato che i funghi micorrizici arbuscolari sono necessari per lo sviluppo di piante in condizioni di stress

ambientale ed i ricercatori ritengono che sia importante inoculare le piante in vivaio o in serra con funghi AM adatti per aumentare il tasso di successo nella fase di piantagione in campo. In definitiva, si ritiene che i funghi micorrizici arbuscolari locali abbiano la potenzialità di essere sviluppati come biofertilizzanti per supportare programmi di riforestazione e ripristino ecosistemico su terreni post-minerari o inquinati da metalli pesanti, ma sono necessarie ricerche di scala maggiore (test in campo).

4.4.4 Articolo 4

Titolo: Attenuation of Manganese-Induced Toxicity in *Leucaena leucocephala* Colonized by Arbuscular Mycorrhizae

Autori: Garcia K. G. V., Filho P. F. M., Pinheiro J. I., do Carmo J. F., de Araújo Pereira A. P., Martins C. M., de Abreu M. G. P., de Souza Oliveira Filho J.

Scopo dello studio: Lo scopo dello studio è stato quello di (i) valutare l'efficacia di alcuni funghi micorrizici arbuscolari nel promuovere lo sviluppo e attenuare la tossicità da manganese in piantine di *Leucaena leucocephala* coltivate a livelli crescenti di Mn e (ii) impiegare la microscopia ottica a scansione e la spettroscopia EDX per indagare la capacità delle strutture fungine di accumulare Mn, che potrebbe essere uno dei meccanismi che riducono lo stress da Mn nella pianta.

Materiali e metodi:

Area di studio, suolo sperimentale, piante e funghi: L'esperimento è stato condotto in serra, nel Dipartimento di scienze del suolo all'università del Creará, a Fortaleza (Brasile). È stato utilizzato un terreno con una quantità di Mn molto bassa, che lo rende adatto a valutare correttamente le risposte a dosi crescenti di manganese. La pianta utilizzata è *Leucaena leucocephala*, scelta perché in precedenza ha mostrato risultati promettenti nella riforestazione di aree degradate dall'attività mineraria. Sono state impiegate tre specie di funghi AM come fonte di inoculo: *Claroideoglossum etunicatum*, *Acaulospora scrobiculata* e *Diversispora sp.*, un fungo arbuscolare nativo estratto da un terreno con elevata concentrazione di Mn. I funghi sono stati coltivati utilizzando piante di mais come pianta ospite.

Disegno sperimentale e conduzione: Il terreno è stato distribuito in vasi da 1,5 L, ognuno contenente 1,2 Kg di suolo. È stato fertilizzato e, dopo la fertilizzazione, sono state aggiunte dosi crescenti di Mn per simulare situazioni che vanno da bassa ad elevata disponibilità di Mn. Le dosi utilizzate sono state: 0, 100, 200 e 400 mg/Kg, forniti in forma di cloruro manganoso ($MnCl_2 \cdot H_2O$). Dopo aver fatto germinare i semi di *L. leucocephala*, le piantine sono state trasferite nei vasi contenenti il terreno con il trattamento corrispondente e sono state inoculate con 40 g di terreno contenente frammenti di radici di mais colonizzate dai funghi AM. È stato

utilizzato un disegno sperimentale completamente randomizzato, nella disposizione 4x4: (i) quattro diverse dosi di Mn (0, 100, 200 e 400 mg/Kg) e (ii) quattro inoculi diversi (controllo – non inoculato, *C. etunicatum*, *A. scrobiculata* e *Diversispora sp.*), ognuno con 4 repliche, costituendo 64 unità sperimentali.

Determinazioni analitiche: Le analisi sono state eseguite a 60 giorni dall'impianto: i germogli sono stati posti in sacchetti di carta e fatti essiccare in un forno a 65°C per ottenere la massa secca. Anche le radici, dopo essere state lavate, sono state essiccate allo stesso modo. Sono stati anche osservati i sintomi visivi della tossicità del Mn sulle foglie, costituiti da clorosi, comparsa di macchie marroni e necrosi fogliare. La percentuale di tossicità fogliare (LTP) è stata quantificata tramite la seguente formula:

$$LTP = \frac{n^{\circ} \text{ di foglie con sintomi}}{n^{\circ} \text{ totale di foglie}} \cdot 100$$

Il Mn sulle spore è stato valutato tramite microscopia elettronica a scansione con la tecnica di spettroscopia EDX

Risultati e discussione:

Peso secco di germogli e radici: L'analisi ha mostrato una differenza significativa nelle dosi di Mn e nell'inoculazione con i funghi AM per la massa secca dei germogli (SDM) e per la massa secca delle radici (RDM). L'andamento della SDM ha seguito un modello quadratico, con un aumento fino ad un certo livello di Mn, seguito da una regressione (Figura 4.8a). Le piantine inoculate con il fungo nativo, *C. etunicatum* e *A. scrobiculata* hanno mostrato incrementi della SDM rispettivamente di 1,53 g, 1,49 g e 0,96 g fino ad una dose stimata di Mn rispettivamente di 138,88 mg/Kg, 160 mg/Kg e 115,38 mg/Kg, con una tendenza a diminuire oltre questi valori. Il controllo ha mostrato un incremento massimo di SDM di 0,62 g fino alla dose stimata di Mn di 152,17 g/Kg, con riduzione oltre tale valore. La RDM ha seguito un modello quadratico con un incremento massimo di 0,86 g alla dose stimata di 65 mg/Kg di Mn, con riduzione dopo tale valore (Figura 4.8b). Inoltre, l'RDM era significativamente più elevato quando le piante erano inoculate con il fungo nativo o con *C. etunicatum*, con incrementi rispettivamente del 30,9 % e 23,6% rispetto al controllo, mentre *A. scrobiculata* ha mostrato risultati simili al controllo (Figura 4.8c).

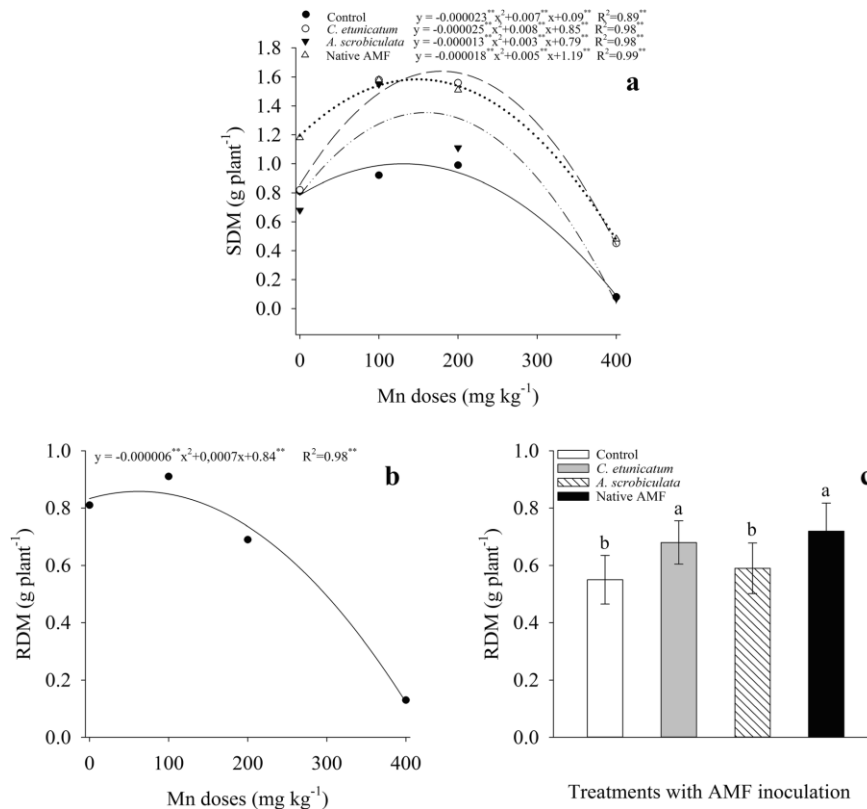


Figura 4.8 Peso secco delle piantine di *L. leucocephala*, effetto dell'interazione tra dosi crescenti di Mn e inoculazione con funghi AM. **(a)** andamento del peso secco dei germogli in funzione del Mn, **(b)** andamento del peso secco radicale in funzione del Mn, **(c)** effetti dei diversi funghi sul peso secco radicale. Da Garcia et al., 2020.

Abbondanza delle spore nel suolo e colonizzazione micorrizica: L'abbondanza di spore (SPA) è aumentata all'aumentare della dose di manganese secondo un andamento quadratico, con un incremento massimo alla dose stimata di 111,9 mg/Kg di Mn, con regressione oltre tale valore. I valori di SPA più elevati sono stati osservati nel trattamento con *C. etunicatum* (1197,18 spore / 100 g di terreno), seguito dal trattamento con il fungo nativo (1180 spore / 100 g di terreno), che differiva significativamente dal trattamento con *A. scrobiculata* (797,81 spore / 100 g di terreno). Per quanto riguarda la colonizzazione micorrizica (MC), la disponibilità di Mn sembra essere stata determinante in tutti i trattamenti, dato che l'aumento delle dosi di Mn ha causato riduzioni significative di MC. D'altro canto, è stato osservato che comunque la simbiosi era efficiente o lo sviluppo delle piante non era limitato, indicando che i benefici forniti dai funghi non sono sempre correlati alla percentuale di colonizzazione micorrizica.

Contenuti di fosforo e manganese: Il contenuto di P nei germogli e il contenuto di Mn in germogli e radici sono stati influenzati significativamente dalle dosi di Mn e dall'inoculazione. Il contenuto di P nei germogli è aumentato in funzione delle dosi di Mn applicate al terreno

secondo un modello lineare crescente. Il contenuto di P nei germogli era significativamente più alto quando le piante erano inoculate con *C. etunicatum* o fungo nativo, con aumenti rispettivamente del 34,4% e del 21,8% rispetto al controllo, mentre i risultati per *A. scrobiculata* erano simili a quelli riscontrati nel controllo. I contenuti di Mn nei germogli e nelle radici sono aumentati in funzione delle dosi crescenti di Mn al terreno in tutti i trattamenti secondo un modello quadratico. Tuttavia, nei germogli, tutte le piante inoculate con i funghi hanno mostrato una diminuzione del contenuto di Mn rispetto al controllo, con maggiore intensità nei trattamenti con *C. etunicatum* e il fungo nativo. Alla massima dose di Mn applicata al terreno, il controllo ha mostrato contenuti di Mn oltre i 2500 mg/Kg, mentre nelle piante inoculate si sono riscontrati valori minori, ad esempio il trattamento col fungo nativo ha ridotto il contenuto di oltre 900 mg/Kg (Figura 4.9c). Nelle radici si è verificato un comportamento inverso, ovvero si è riscontrato un maggiore contenuto di Mn nelle radici di piante inoculate rispetto al controllo. I trattamenti con fungo nativo, *C. etunicata* e *A. scrobiculata* hanno indotto aumenti del contenuto radicale di Mn rispettivamente del 154,07%, 148,21% e 124,92%, rispetto al controllo (Figura 4.9d). Va sottolineato che, oltre l'aggiunta al terreno di 200 mg/Kg di Mn al terreno, tutti i trattamenti hanno mostrato un contenuto di Mn nei germogli superiore ai valori considerati tossici per la maggior parte delle piante (400 mg/Kg). Tuttavia, le piante inoculate hanno mostrato una maggiore tolleranza in rapporto alla gravità dei sintomi di tossicità da parte del Mn, rispetto al controllo.

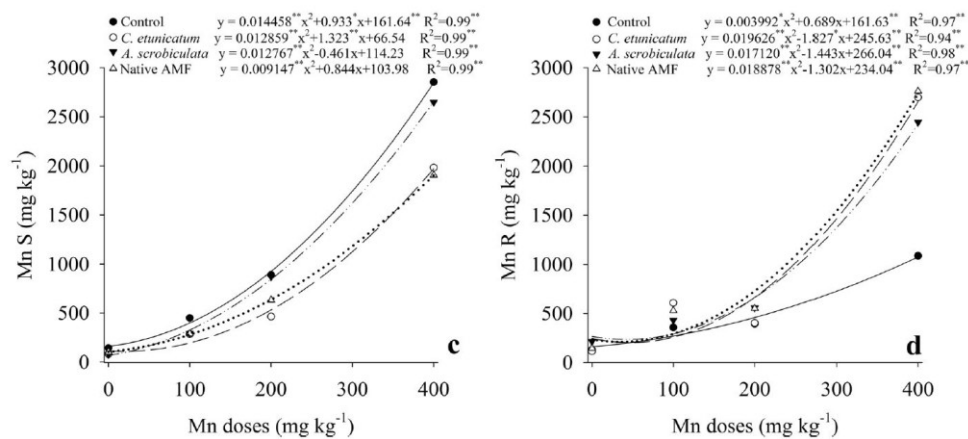


Figura 4.9 Effetti dell'inoculazione nel contenuto di manganese (c) nei germogli e (d) nelle radici. Da Garcia et al., 2020.

In questo caso, i ricercatori credevano che la riduzione del contenuto di Mn nei germogli delle piante inoculate fosse correlata alla ritenzione e immobilizzazione di Mn sulla superficie delle spore e in altre strutture fungine, come le vescicole. Per testare questa ipotesi, è stata utilizzata la microscopia elettronica a scansione (SEM) associata alla spettroscopia EDX, per poter rilevare le percentuali di Mn sulla superficie delle spore.

Manganese sulla superficie delle spore: Tramite SEM e spettroscopia EDX lo studio ha dimostrato per la prima volta che le spore dei funghi AM sono in grado di accumulare Mn sulla propria superficie in condizioni di eccesso di Mn nel terreno. Nei terreni che hanno ricevuto 400 mg/Kg di Mn (la dose massima), le percentuali di Mn sulla superficie delle spore variavano a seconda della specie fungina, corrispondenti al 3,8%, 2,81% e 0,6% per i trattamenti rispettivamente con fungo nativo, *C. etunicatum* e *A. scrobiculata* (Figura 4.10a).

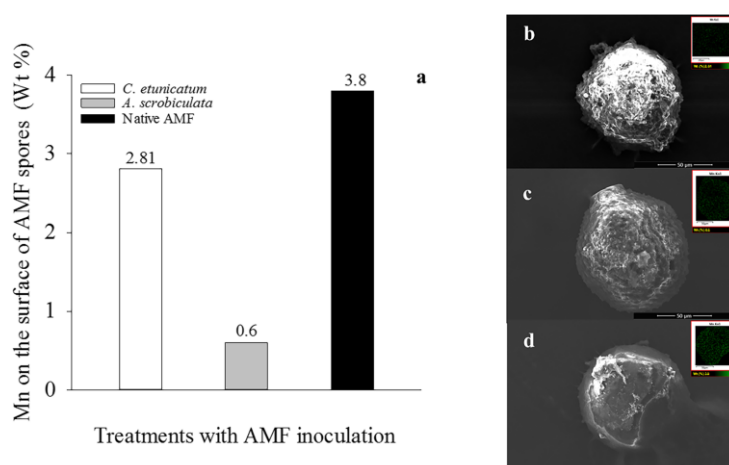


Figura 4.10 (a) Percentuale di Mn sulla superficie delle spore ottenuta con microscopia elettronica a scansione e spettroscopia EDX. Spore estratte da terreno trattato con 400 mg/Kg Mn. **(b)** *C. etunicatum*, **(c)** *A. scrobiculata*, **(d)** fungo nativo. Da Garcia et al., 2020.

Le diverse percentuali suggeriscono che diverse specie di funghi AM possono indurre diversi livelli di tolleranza. È stato anche osservato che le percentuali più elevate si sono misurate sulle spore del fungo nativo; questa caratteristica può essere correlata al maggiore adattamento del fungo al manganese, dato che è stato isolato da un'area con un'elevata concentrazione di questo elemento. Gli autori riportano che secondo Sánchez-Castro et al. (2017), le specie autoctone di funghi micorrizici arbuscolari isolate da siti contaminati da metalli pesanti possono svolgere un ruolo importante nella riforestazione di queste aree. Ritengono inoltre che l'accumulo di Mn sulla superficie delle spore possa essere un meccanismo che conferisce tolleranza a *L. leucocephala*, dato che ha determinato direttamente un migliore sviluppo della pianta, un maggiore incremento nutrizionale di fosforo e una riduzione del contenuto di Mn nei germogli e nella percentuale di tossicità fogliare.

Percentuale di tossicità fogliare: I principali sintomi di tossicità fogliare da Mn erano caratterizzati da formazione di macchie marroni, clorosi e necrosi. La percentuale di tossicità fogliare (LTP) è stata influenzata significativamente dalle dosi di Mn e dall'inoculazione con i funghi. Alla massima dose di Mn applicata al terreno, i trattamenti con il fungo nativo, *C. etunicatum* e *A. scrobiculata* hanno ridotto la LTP rispettivamente del 65,15%, 34,74% e

26,47% rispetto al controllo. Nonostante la colonizzazione micorrizica sia diminuita alle dosi più elevate di Mn, la simbiosi era comunque efficace e attenuava i sintomi di tossicità nelle foglie. Questa risposta è associata al miglioramento della nutrizione fosfatica e alla capacità delle spore di accumulare Mn, determinando una minore traslocazione di Mn alle foglie, migliorando la tolleranza di *L. leucocephala*.

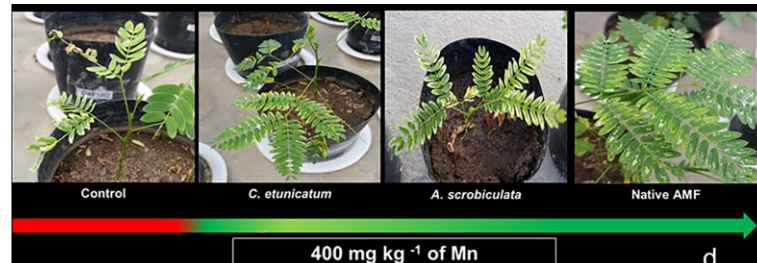


Figura 4.11 Sintomi di tossicità fogliare nelle piantine trattate con il livello più elevato di Mn. Da Garcia et al., 2020.

Conclusioni:

L'inoculazione delle piantine di *Leucaena leucocephala* con funghi micorrizici arbuscolari attenua la tossicità indotta dal manganese e agevola la crescita della pianta. È stato mostrato per la prima volta che le spore accumulano Mn sulla loro superficie, agendo come una barriera per ridurre la traslocazione di Mn alle foglie ed aumentare la tolleranza della pianta. L'efficienza dei meccanismi di protezione, tuttavia, dipende dalla specie fungina: il fungo nativo e *Claroideoglossum etunicatum* sono stati i più efficienti nell'aumentare la tolleranza della pianta. I ricercatori ritengono che sia importante l'introduzione di popolazioni di funghi micorrizici arbuscolari, tra cui anche funghi indigeni, nei progetti di bonifica e riforestazione dei suoli contaminati da manganese.

CONCLUSIONI

Le foreste costituiscono un elemento essenziale per il funzionamento del nostro pianeta ma sono minacciate da fattori di disturbo come il cambiamento climatico e l'inquinamento. Le complesse interazioni che si sviluppano tra piante e microrganismi, in particolar modo le simbiosi tra radici e funghi micorrizici, rivestono un ruolo essenziale per la salute e la resilienza di questi ecosistemi. Infatti, come esposto nella tesi, le micorrize agevolano le piante in molti processi biologici, determinando una maggiore resistenza a stress di vario tipo. È emerso che le differenti tipologie di micorrize sono distribuite in modo diverso a livello globale, rispecchiando la distribuzione delle piante ospiti, e che ogni specie è in grado di favorire la pianta ospite in modo diverso. Sono essenziali nel migliorare l'apporto idrico nella pianta e la sua resistenza alla siccità. Rivestono un ruolo importante nel ciclo del carbonio e nella sua stabilizzazione nel suolo, trasferendo nel suolo ogni anno una quantità di carbonio pari a circa 13 miliardi di tonnellate di CO₂ equivalente. Sono coinvolte anche nel ciclo dell'azoto, influenzandone l'assorbimento da parte delle piante e, quindi, la produttività primaria netta. Sono emerse differenze nel ciclo dell'azoto tra le foreste a dominanza ectomicorrizica e quelle a dominanza arbuscolare, con le foreste ECM che tendono ad avere un ciclo dell'azoto più chiuso e perciò trattengono più azoto nel terreno, emettendo minori quantità di protossido di azoto. Nel ciclo del fosforo le micorrize hanno un ruolo fondamentale, dato che i suoli forestali tendono a soffrire di carenza di P. I funghi micorrizici riescono a migliorare l'assorbimento di fosforo delle piante permettendo alle radici di raggiungere i pori più piccoli del terreno, inoltre sono in grado di utilizzare anche il fosforo organico, che è indisponibile alle piante, e lo trasferiscono alla pianta. In tal senso, le foreste ectomicorriziche sembrano utilizzare maggiormente il fosforo organico rispetto alle foreste a dominanza arbuscolare. È stata poi trattata la capacità delle micorrize di mettere in comunicazione gli apparati radicali degli alberi per creare delle reti di comunicazione, dette "reti miceliari comuni (CMN)". Tuttavia, nonostante la scoperta delle CMN abbia la potenzialità di rivoluzionare la nostra comprensione dell'ecologia forestale, molti studi sono contrastanti e la loro importanza è ancora da dimostrare. Infine, è stato esaminato il ruolo delle micorrize nella bonifica di terreni inquinati da metalli pesanti. Questo tipo di inquinamento è in crescita negli ultimi

decenni e la riforestazione è una soluzione per il ripristino degli ecosistemi in ambienti inquinati. Tuttavia, la riforestazione su terreni inquinati da metalli pesanti può risultare difficoltosa, dato che questi inquinanti hanno un effetto fitotossico che limita la crescita dei semenzali. Per questo motivo sono stati analizzati quattro studi sperimentali che esplorano la possibilità di impiegare le micorrize nei programmi di riforestazione per ridurre lo stress da metalli pesanti nelle piante ed aumentare le possibilità di riuscita della riforestazione. Questi studi mostrano risultati promettenti, mostrando che alcuni funghi cresciuti su terreni inquinati sono in grado di sviluppare una resistenza all'agente inquinante. La resistenza può essere estesa anche alla pianta ospite migliorandone l'assorbimento di nutrienti, aumentandone la crescita e riducendone i sintomi di tossicità, e alcune specie fungine sono più efficaci di altre proteggere le piante. I risultati mostrano che le micorrize potrebbero essere un valido alleato per agevolare la riforestazione e la bonifica di siti inquinati da metalli pesanti, ma sono necessari ulteriori esperimenti su scala maggiore.

Alla luce di questo elaborato, le micorrize rivestono un ruolo fondamentale negli ecosistemi forestali e nei movimenti globali dei nutrienti ed instaurano interazioni particolarmente complesse con le piante ospiti. La comprensione di tali interazioni potrebbe essere fondamentale in futuro nell'ottica di conservazione ambientale.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto il Prof. Casucci per la sua disponibilità e per avermi accompagnato nella stesura della tesi.

Grazie a Rachele per aver sempre creduto in me molto più di quanto abbia mai fatto io. Quando le cose si fanno buie sei come una nazione di sole.

Grazie a Davis, Filippo, Michele e tutti gli amichetti per ogni momento meraviglioso trascorso insieme.

Vorrei anche ringraziare tutti quelli che in passato mi hanno aiutato pur non essendo tenuti a farlo, in particolare il Prof. Paglialunga e la Prof. Pistolesi.

Grazie a tutta la mia famiglia.

Grazie a babbo e mamma per avermi sempre dato fiducia e per avermi concesso il lusso di sbagliare per trovare la mia strada. Per me siete un esempio e il vostro coraggio mi meraviglia ogni giorno.

Grazie a Matteo e Alessia, con cui ho condiviso ogni momento ancora prima di nascere, e così sarà sempre. Nelle cose scure come nelle cose chiare noi ci andremo insieme, come tre cavalieri.

BIBLIOGRAFIA

McNear Jr., D. H., 2013. *The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between*. Nature Education Knowledge 4(3):1.

Fondamenti di chimica del suolo, 2017. Patron Editore, cap. 7, pp. 125-159.

Hinsinger P., Gobran G. R., Gregory P. J., Wenzel W. W., 2005. *Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from rootmediated physical and chemical processes*. New phytologist.

Séguin V., Gagnon C., Courchesne F., 2004. *Changes in water extractable metals, pH and organic carbon concentrations at the soil-root interface of forested soils*. Plant and Soil.

Hinsinger P., Vetterlein D., Bengough A. G., Young I., 2009. *Rhizosphere: Biophysics, biogeochemistry and ecological relevance*. Plant and soil.

Kuzyakov Y., Razavi B., 2019. *Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity*. Soil Biology and Biogeochemistry.

Prashar P., Sachdeva S., Kapoor N., 2013. *Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.

Berendsen R. L., Pieterse C. M. J., Bakker P. A. H. M., 2012. *The rhizosphere microbiome and plant health*. Trends in Plant Science.

Steinberg C., Moenne-Loccoz Y., Alabouvette C., 2009. *The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms*. Plant and Soil.

Rudrappa T., Czymmek K. J., Paré P. W., Bais H. P., 2008. *Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria*. Plant Physiology.

Dehò G., Galli E., 2019. *Biologia dei microrganismi, cap. 22, pp. 656-658*. Zanichelli.

Madigan M. T., Martinko J. M., Bender K. S., Buckley D. H., Stahl D. A., 2016. *Brock. Biologia dei microrganismi, cap 22.5, pp. 726-729*. Pearson.

Varma A., Hock B., 2013. *Mycorrhiza - Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*, pp. 51. Springer Berlin Heidelberg.

Varma A., Tuteja N., Prasad R., 2017. *Mycorrhiza - Function, Diversity, State of the Art*, pp 103-111. Springer international publishing.

Siddiqui Z. A. et al. (eds), 2008. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Cap 11: *Ectomycorrhizae and their Importance in Forest Ecosystems*, pp. 241-286 a cura di Futai K., Taniguchi T., Kataoka R.

Siddiqui Z. A. et al. (eds), 2008. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Cap 1: *Mycorrhizae: An Overview*, pp. 1-25 a cura di Siddiqui Z. A., Pichtel J.

Giron D., Frago E., Glevarec G., Pieterse C. M. J., Dicke M., 2012. *Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence*. Functional ecology, 2012.

Balestrini R., Bonfante P., 2014. *Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism*. Frontiers in Plant Science, June 2014, Art. 237.

Agerer R., 2011. *Exploration types of ectomycorrhizae – A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance*. Mycorrhiza (2001) 11: pp. 107-114.

Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C., Lapeyrie F., 2001. *Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes*. *New Phytologist* (2001) 151: pp. 145-154.

Ahammed G. J., Hajiboland R., 2024. *Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Higher Plants*. Springer Nature, 2024. Cap. 4: *Signaling Events During the Establishment of Symbiosis Between Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Roots*. pp. 67-98.

Barker D. G., Chabaud M., Russo G., Genre A., 2016. *Nuclear Ca²⁺ signalling in arbuscular mycorrhizal and actinorhizal endosymbioses: on the trail of novel underground signals*. *New Phytologist* (2017) 214: pp. 533-538.

Ahammed G. J., Hajiboland R., 2024. *Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Higher Plants – Fundamentals and Applications*. Springer Nature, 2024. Cap. 1: *Introduction to Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Higher Plant Symbiosis: Characteristic Features, Functions and Applications*. Pp. 1-18.

Soudzilovskaia N.A., van Bodegom P.M., Terrer C. et al., 2019. *Global mycorrhizal plant distribution linked to terrestrial carbon stocks*. *Nature Communications*, 2019. N. 10.

Barceló M., van Bodegom P.M. & Soudzilovskaia N.A., 2022. *Fine-resolution global maps of root biomass carbon colonized by arbuscular and ectomycorrhizal fungi*. *Scientific Data*, 2023. N. 10.

Rinaldi A., Comandini O., Kuyper T., 2008. *Ectomycorrhizal fungal diversity: Separating the wheat from the chaff*. *Fungal Diversity* 33 (2008).

Tedersoo L., Bahram M., Toots M., Diédhiou A. G., Winkel T. W., Kjølner R., Morris M. H., Nara K., Nouhra E., Peay K. G., Pölme S., Ryberg M., Smith M. E., Kõljalg U., 2012. *Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi*. *Molecular Ecology*, 2012. N. 21, pp. 4160-4170.

Palmer J.G., Miller O.K., Gruhn C., 1993. *Fruiting of ectomycorrhizal basidiomycetes on unburned and prescribed burned hard-pine/hardwood plots after drought-breaking rainfalls on the Allegheny Mountains of southwestern Virginia*. *Mycorrhiza* 4, pp. 93–104 (1994).

Baxter, J. W. & Dighton, J., 2001. *Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host–symbiont culture conditions*. *New Phytologist* 152. Pp 139–149.

Baxter, J. W. & Dighton, J., 2005. *Phosphorus source alters host plant response to ectomycorrhizal diversity*. *Mycorrhiza*, 2005.

Bruns, T.D, 1995. *Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi*. *Plant Soil* 170, pp. 63–73.

Siddiqui Z. A., Akhtar M. S., Futai K., 2008. *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*. Springer Nature. Cap. 11, pp. 241-286: *Ectomycorrhizae and their Importance in Forest Ecosystems*. A cura di K. Futai, T. Taniguchi, R. Kataoka.

Courty P. E. et al., 2009. *The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts*. *Soil Biology & Biochemistry*, 2010, N. 42. Pp. 679-698.

Akema T., Futai K., 2003. *Ectomycorrhizal development in a pinus thunbergii stand in relation to location on a slope and effect on tree mortality from pine wilt disease*. *Journal of Forest Research*, 2005. Vol. 10 pp. 93-99.

Lehto T., Zwiazek J. J., 2010. *Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review*. *Mycorrhiza* (2011) 21. Pp. 71-90.

Dehò G., Galli E. *Biologia dei microrganismi*, Casa editrice Ambrosiana, 2019. Cap. 5-6, a cura di A. M. Sanangelantoni & D. Zannoni.

Sequi P., Ciavatta C., Milano T. *Fondamenti di chimica del suolo*, Pàtron editore. Cap. 4: *Sostanza organica del suolo*, a cura di L. Celi, T. Miano, N. Senesi, pp. 83-93.

Heidi-Jayne Hawkins, Rachael I.M. Cargill, Michael E. Van Nuland, Stephen C. Hagen, Katie J. Field, Merlin Sheldrake, Nadejda A. Soudzilovskaia, E. Toby Kiers, 2023. *Mycorrhizal mycelium as a global carbon pool*. *Current Biology* N. 33. Pp. 560-573.

IEA - International Energy Agency, 2024. *CO₂ emissions in 2023*.

Kleber, Markus & Eusterhues, Karin & Keiluweit, Marco & Mikutta, Christian & Mikutta, Robert & Nico, Peter, 2015. *Mineral–Organic Associations: Formation, Properties, and Relevance in Soil Environments*. *Advances in Agronomy*. 130. Pp 1-140.

Ekblad A., Wallander H., Godbold D.L. et al., 2013. *The production and turnover of extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi in forest soils: role in carbon cycling*. *Plant Soil*, 2013, N. 366. Pp. 1–27.

Frey. S. D., 2019. *Mycorrhizal Fungi as Mediators of Soil Organic Matter Dynamics*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2019. N. 50. Pp 237-259.

Schweigert M., Herrmann S., Miltner A., Fester T., Kästner M., 2015. *Fate of ectomycorrhizal fungal biomass in a soil bioreactor system and its contribution to soil organic matter formation*. *Soil Biology and Biochemistry*. N. 88, 2015. Pp. 120-127.

Verbruggen, E. Struyf, S. Vicca, 2020. *Can arbuscular mycorrhizal fungi speed up carbon sequestration by enhanced weathering?*. *Plants People Planet*, 2021, N. 3. Pp. 445-453.

Liu Y., Li X., Y. Kou. *Ectomycorrhizal Fungi: Participation in Nutrient Turnover and Community Assembly Pattern in Forest Ecosystems*. *Forests*, 2020. N. 11, 453.

Sequi P., Ciavatta C., T. Milano. *Fondamenti di chimica del suolo*, Pàtron editore. Cap. 10: Elementi chimici del suolo, a cura di C. Ciavatta, G. M. Beone, C. E. Gessa, pp. 191-197.

Fathi A., 2022. *Role of nitrogen (N) in plant growth, photosynthesis pigments, and N use efficiency: A review*. *Agrisost*. N. 28. Pp. 1-8.

Cánovas F., Cañas R., de la Torre F., Pascual M., Castro-Rodríguez V., Avila C., 2018. *Nitrogen Metabolism and Biomass Production in Forest Trees*. *Frontiers in Plant Science*, 2018. 9. 1449.

Makarov M., 2019. *The role of Mycorrhiza in Transformation of Nitrogen Compounds in Soil and Nitrogen nutrition of Plants: A Review*. *Eurasian Soil Science*, 2019. Vol. 52, pp. 193-205.

Nygren, Pekka & Fernandez, Maria P. & Harmand, Jean-Michel & Leblanc, Humberto, 2012. *Symbiotic dinitrogen fixation by trees: An underestimated resource in agroforestry systems?*. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. N. 94. Pp 123-160.

Pena, R., Tibbett, M., 2024. *Mycorrhizal symbiosis and the nitrogen nutrition of forest trees*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024. Vol. 108. Art. 461.

Phillips L., Ward V., Jones M., 2013. Ectomycorrhizal fungi contribute to soil organic matter cycling in sub-boreal forests. *The ISME journal*, 2013. N. 8. 195.

Lin G., McCormack M. L., Ma C., Guo D., 2016. *Similar below-ground carbon cycling dynamics but contrasting modes of nitrogen cycling between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal forests*. *New Phytologist*, 2017, N. 213, pp. 1440-1451.

Becquer A., Trap J., Irshad U., Ali M. A., Claude P., 2014. *From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association*. *Frontiers in Plant Science*, 2014. Vol. 5. Art. 548.

Van Tichelen K. K. & Colpaert J. V., 2000. *Kinetics of phosphate absorption by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine seedlings*. *Physiologia Plantarum*, 2000. N. 110, pp. 96-103.

Pang f., Li Q., Solanki M. K., Wang z., Xing Y.-X., Dong D.-F., 2024. *Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms*. *Frontiers in Microbiology*, 2024.

Read D. J. & Perez-Moreno J., 2002. *Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance?*. *New Phytologist*, 2003. N. 157. Pp. 475-492.

Hoffland E. et al., 2004. *The role of fungi in weathering*. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2004. Pp. 258-264.

Ferrol N., Azcón-Aguilar C., Pérez-Tienda, 2018. *Review: Arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition: An overview on the mechanisms involved*. *Plant Science*, 2018. N. 280. Pp. 441-447.

Rosling A., Midgley M. G., Cheeke T., Urbina H., Fransson P., Phillips R. P., 2015. *Phosphorus cycling in deciduous forest soil differs between stands dominated by ecto- and arbuscular mycorrhizal trees*. *New Phytologist*, 2016. N. 209. Pp. 1184-1195.

Van der Heijden M. G. A., Martin F. M., Selosse M.-A., Sanders I. R., 2014. *Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future*. *New Phytologist*, 2015. N. 205. Pp. 1406-1423.

Simard S. & Austin M., 2010. *The Role of Mycorrhizas in Forest Soil Stability with Climate Change*.

Dickie I. A., Koide R. T., Steiner K. C., 2001. *Influence of established trees on mycorrhizas, nutrition, and growth of *Quercus rubra* seedlings*. *Ecology monographs*, 72(4), 2002, pp. 505-521.

Beiler K. J., Durall D. M., Simard S. W., Maxwell S. A., Kretzer A. M., 2009. *Architecture of the wood-wide web: *Rhizopogon* spp. genets link multiple Douglas-fir cohorts*. *New Phytologist*, 2020. N. 185. Pp. 543-553.

Bahram M., Harend H., Tedersoo L., 2014. *Network perspectives of ectomycorrhizal associations*. *Fungal Ecology*, 2014. Vol. 7. Pp. 70-77.

Karst J., Jones M. D., Hoeksema J. D., 2022. *Positive citation bias and overinterpreted results lead to misinformation on common mycorrhizal networks in forests*. *Nature Ecology & Evolution*, 2023. N. 7. Pp. 501-511.

Shi Y., Wang S., Guo J., Xu Z., Wang S., Sang Y., 2022. *Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on the phytoremediation of PAH-contaminated soil: A meta-analysis*. *Chemosphere* N. 307, 2022.

Angon P. B., IslamMd. S., KC Shreejana, Das A., Anjum N., Poudel A., Suchi S. A., 2023. *Sources, effects and present perspectives of heavy metals contamination: Soil, plants and human food chain*. *Heliyon* 10, 2024.

Ghannem S., El Ayari T., Ahmed R. B., Touaylia S., 2023. *The Impact of Metal Pollution on Biodiversity*. *Advances in Biology*, Vol. 4, 2023.

Nagajyoti P. C., Lee K. D., Sreekanth T. V. M., 2010. *Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review*. *Environmental Chemistry Letters*, 2010. Pp. 199-216.

Tang L. & Werner T. T., 2023. *Global mining footprint mapped from high-resolution satellite imagery*. *Communications Earth & Environment*, 2023.

Kramer M. et al., 2023. *Extracted forests – unearthing the role of mining-related deforestation as a driver of global deforestation*.

Pietrzykowski M., 2019. *Tree species selection and reaction to mine soil reconstructed at reforested post-mine sites: Central and eastern European experiences*. *Ecological Engineering*, 2019.

Langer I., Krpata D., Fitz W. J., Wenzel W. W., Schweiger P. F, 2008. *Zinc accumulation potential and toxicity threshold determined for a metal-accumulating *Populus canescens* clone in a dose–response study*. *Environmental pollution* 157, 2009. Pp. 2871-2877.

Jiali H. et al., 2013. *A Transcriptomic Network Underlies Microstructural and Physiological Responses to Cadmium in Populus x canescens*. Plant Physiology, 2013, vol. 62. Pp. 424-439.

Eetika C. & Mondem S. R., 2022. *Role of Ectomycorrhizal Symbiosis Behind the Host Plants Ameliorated Tolerance Against Heavy Metal Stress*. Frontiers in Microbiology 13, 2022.

Zhi-Bin L. et al., 2013. *The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants*. Environmental and Experimental Botany 108, 2014. Pp. 47-62.

Vinay K., Shiv K. D., 2020. *Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors*. Environmental Science and Pollution Research 28, 2021.

Ferrol N., Tamayo E., Vargas P., 2016. *The heavy metal paradox in arbuscular mycorrhizas: from mechanisms to biotechnological applications*. Journal of Experimental Botany, Vol. 67, N. 22, Pp. 6253-6265, 2016.

Krznaric E., Verbruggen N., Wevers J. H.L., Carleer R., Vangronsveld J., Colpaert J. V., 2008. *Cd-tolerant Suillus luteus: A fungal insurance for pines exposed to Cd*. Environmental Pollution 157, 2009. Pp. 1581-1588.

Hachani C., Lamhamedi M. S., Cameselle C., Gouveia S., El Abidine A. Z., Khasa D. P., Béjaoui Z., 2020. *Effects of Ectomycorrhizal Fungi and Heavy Metals (Pb, Zn, and Cd) on Growth and Mineral Nutrition of Pinus halepensis Seedlings in North Africa*. Microorganisms 8, 2020, 2033.

Tuheteru F. D., Arif A., Husna, Mansur I., Tuheteru E. J., Basrudin, Albasri, Hadijah M. H., Karepesina S., 2020. *Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation improves Nauclea orientalis L. growth and phosphorus uptake in gold mine tailing soil media*. Journal of Degraded and Mining Lands Management, vol. 7, 2020. Pp. 2193-2200.

Garcia K. G. V., Filho P. F. M., Pinheiro J. I., do Carmo J. F., de Araújo Pereira A. P., Martins C. M., de Abreu M. G. P., de Souza Oliveira Filho J., 2019. *Attenuation of Manganese-*

Induced Toxicity in Leucaena leucocephala Colonized by Arbuscular Mycorrhizae. Water Air Soil Pollution, 2020.