



Simbiosi e associazioni simbiotiche

Marinella Rodolfi

Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri
Sezione di Micologia
Università degli Studi di Pavia



I funghi

- Competono con le Piante e superano il Regno degli Animali in termini di diversità di specie (80.000 specie fungine descritte; stima: 800 nuove specie/anno e Mycota della Terra costituita da oltre 1.600.000 specie)
- Sono il “Quinto Regno”

Aspergillus clavatus - nanica (1000x)

I Funghi cosa sono???

Sistematica evoluzionistica

■ Fino al 1969:
Classificazione tradizionale dei Tre Regni
"Procarioti" - "Animali" - "Piante"
(i Funghi sono inclusi nel Regno "Piante")

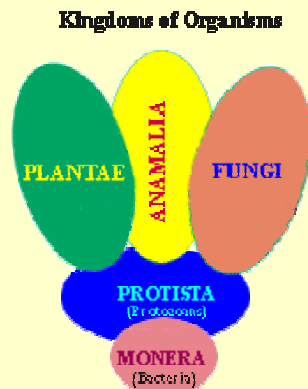
- Whittaker (1969): accettò la distinzione dei Procarioti in un Regno (rinominato "MONERA") e divise gli Eucarioti in 4 Regni:

"Protisti" (Eucarioti Unicellulari = Protozoi-alghe unicell.)

"Funghi" (assorbono)

"Piante" (fotosintetizzano)

"Animali" (ingeriscono)





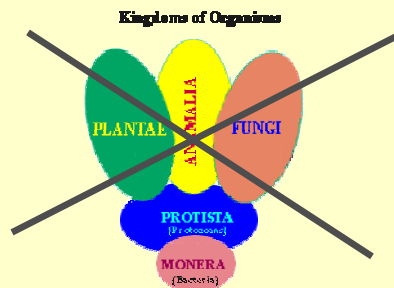
Dagli anni 1980: Sistematica filogenetica!!!

Studio dell'evoluzione degli organismi in termini di gruppi monofiletici (che includono l'organismo progenitore e tutti i suoi discendenti)



Classificazione Filogenetica (basata sulle relazioni evoluzionistiche avvenute fra organismi viventi) e suddivisione in *taxa* (gruppo di organismi corrispondenti a 1 unica linea monofiletica)

- 1) Riconosciuto come "artificiale" il sistema di classificazione a 5 Regni
- 2) Sviluppo ed applicazione di tecniche molecolari
- 3) Scoperta di nuovi *taxa* (anche fossili)

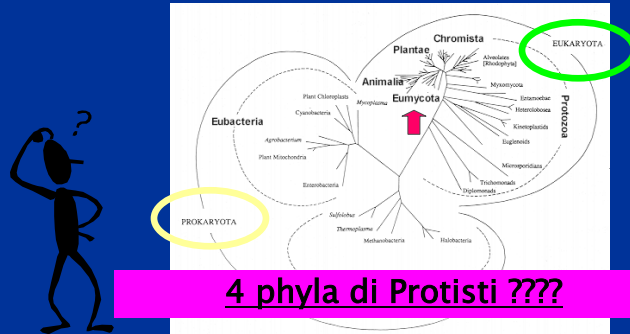


I Regni oggi...

Le forme di vita sulla Terra sono raggruppate in 2 "domains",
1 eucariotico e 1 procariotico

Kingdoms: Bacteria, Archaea

Kingdoms: Fungi, Animalia, Plantae, Chromista (Algae + Stramenopila), Protozoa (cellular + plasmodial slime moulds)

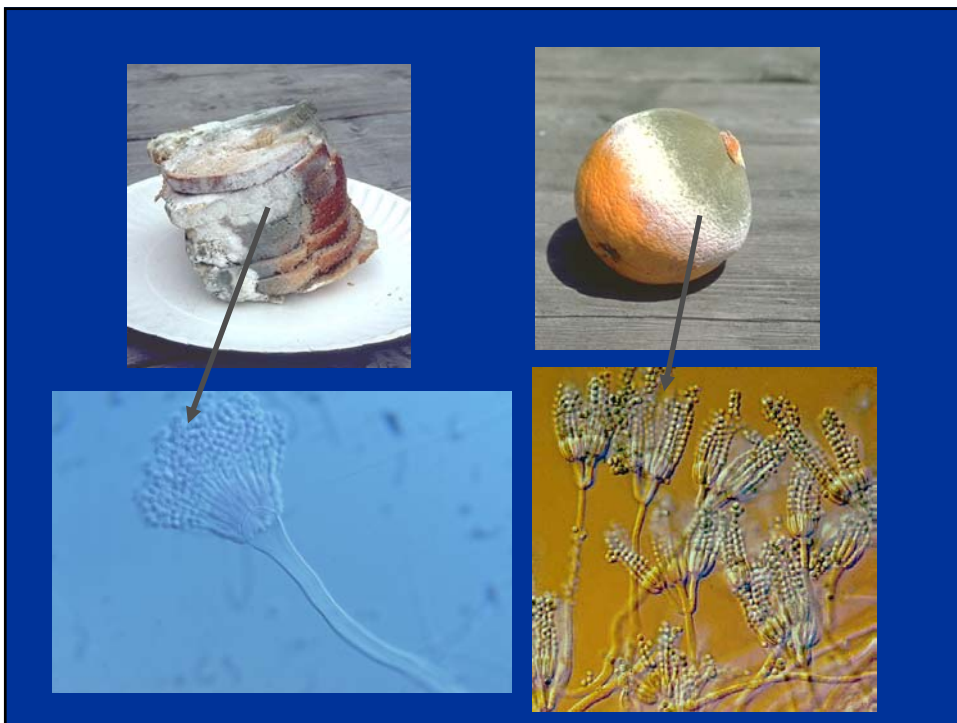
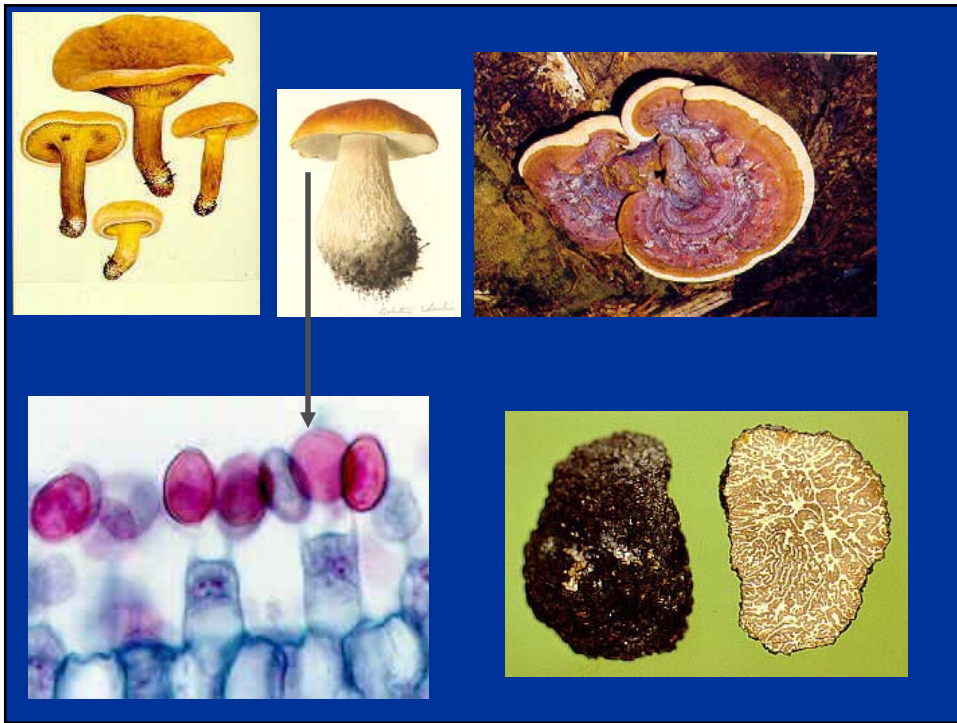


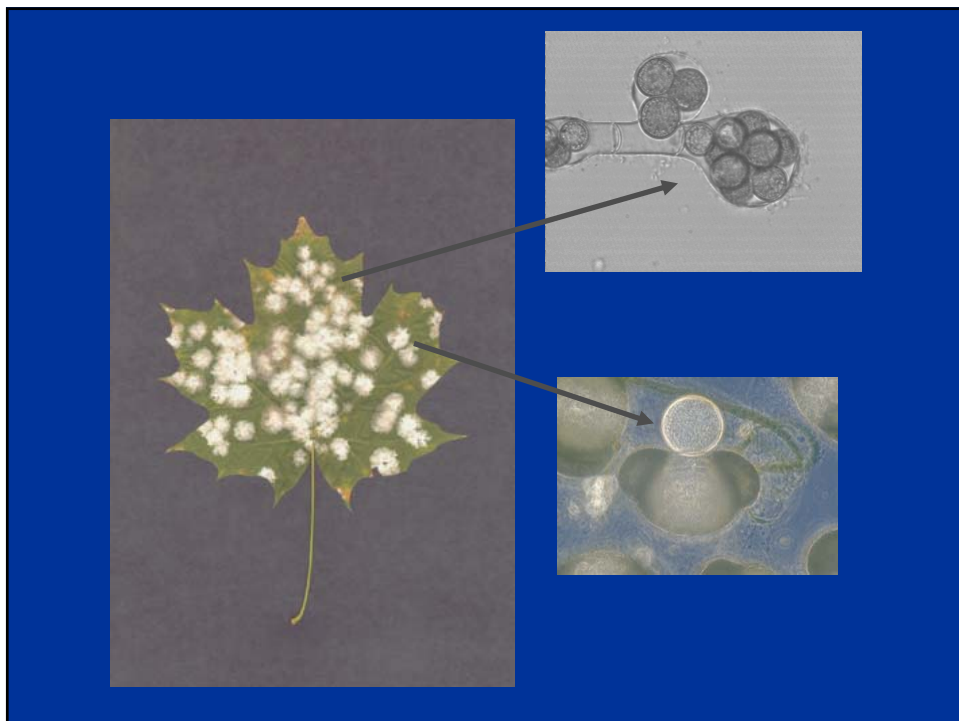
I funghi

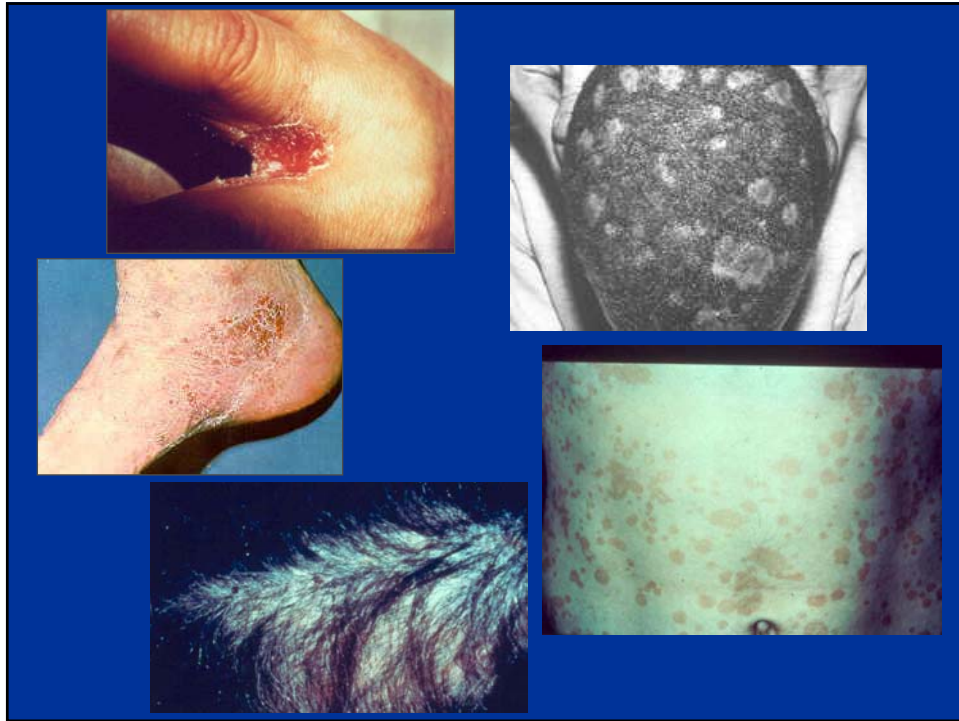
Sono una componente fondamentale degli ecosistemi:

- conducono il ciclo globale del carbonio
- operano il riciclo di minerali, detriti e rifiuti organici
- rivestono, come licheni, tutte le terre del pianeta che altrimenti sarebbero nude
- esercitano una potente azione come agenti di malattia e di deperimento di vegetali, animali e uomini
- i loro corpi fruttiferi e le loro forme estremamente versatili permettono un'elevata utilizzazione industriale; le loro strutture genetiche rendono possibili studi biologici di base
- provvedono alla vita delle foreste formando associazioni micorriziche

Aspergillus terreus (1000x)







Aspergillus flavus 1000X



La Riproduzione nei Funghi:

SESSUATA
Funghi perfetti o teleomorfi



ASESSUATA
Funghi imperfetti o
anamorfi

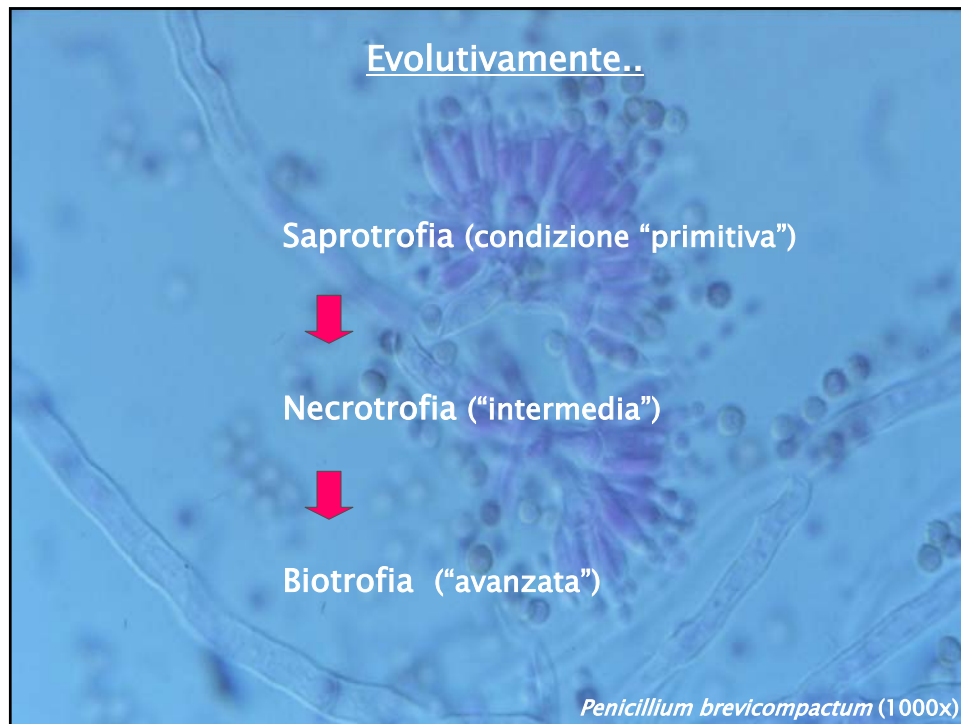
I modelli eco-nutrizionali dei funghi

SAPROTROFIA (il fungo si nutre di materiale organico non vivente, differente da quello ucciso per sua stessa azione)

NECROTROFIA (i tessuti invasi dal fungo sono dapprima portati alla morte e poi utilizzati come nutrimento saprotrofico)

BIOTROFIA (modello nutrizionale assolutamente dipendente dalla durata in vita delle cellule di cui si ciba il fungo; i biotrofi prendono nutrienti solo da cellule vive; nel caso in cui l'ospite morisse, essi stessi morirebbero o sarebbero costretti ad un periodo di inattività sotto forma di micelio vegetativo o propaguli fino a ritrovamento di un nuovo ospite vivo)

Penicillium brevicompactum (1000x)



Unicità della biotrofia = assenza di morte cellulare
(il biotrofo controlla il metabolismo del vegetale in modo da lasciare vive le cellule per tutto il tempo a lui necessario; la morte cellulare per stress nutrizionale sopraggiunge solo su volere del fungo)

Il fungo parassita biotrofo deve possedere

1. adattamenti finalizzati a mantenere in vita il proprio ospite
2. elevati gradi di specializzazione atti a proteggere relazioni biotrofiche durature

per riuscire ad evitare di condurre a morte cellulare il vegetale.

La SIMBIOSI è probabilmente all'origine dell'evoluzione



E' il "vivere insieme" (de Bary, 1879)

Associazione interspecifica di coesistenza
strettamente integrata e persistente



I primi organismi adattatisi alla terra
si sono evoluti in condizioni di
associazione e vita in comune con
altri organismi

ASSOCIAZIONI SIMBIOTICHE

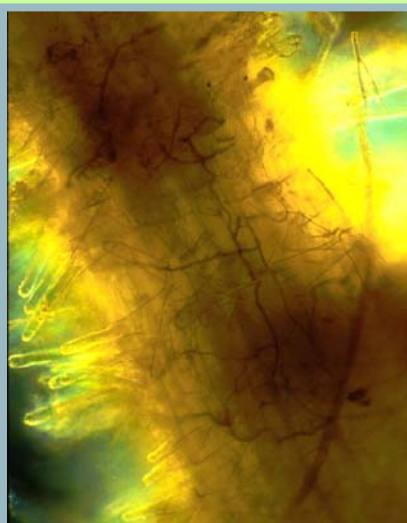
Simbiosi disarmoniche (antagonismo, competizione, mimetismo e mimismo,...)

Simbiosi neutre (commensalismo, inquilinismo, metabiosi, foresi,...)

Simbiosi armoniche (mutualistiche obbligate o facoltative)



ESEMPIO 1: Micorrize (radici di vegetali terrestri + funghi del suolo)



MICORRIZE



La simbiosi più diffusa in natura: più del 90 % delle specie vegetali, in condizioni naturali, è micorrizato.

Fossili confermano l'esistenza di endomicorrize 450 milioni di anni fa, contemporaneamente all'apparizione dei vegetali terrestri.

Fondamentali nel processo di colonizzazione dei continenti.
Permettono l'esistenza della vegetazione contemporanea.

Tipi di micorrize



1. Micorrize delle Orchidaceae



Primo tartufo bianco coltivato!



2. Ectomicorrize

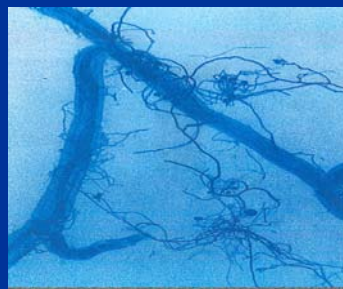
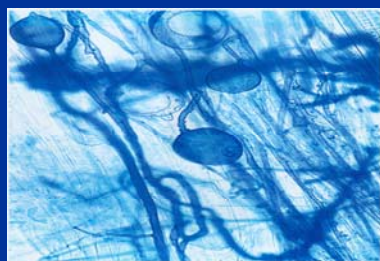
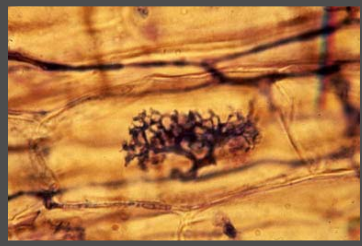
(le più evolute, comparse 150 milioni di anni fa, micorrizzano gran parte delle specie forestali, il fungo è spesso un Basidiomicete e raramente un Ascomicete, producono corpi fruttiferi macroscopici)



Tipi di micorrize

3. Endomicorrize

(o micorrize arbuscolari o VAM, comparse oltre 400 milioni di anni fa, le più diffuse in natura, micorizzano quasi tutti gli arbusti e tutte le specie coltivate, il fungo è uno Zigomicete, non producono corpi fruttiferi macroscopici)



Vantaggi delle micorrize...

Amplificano la superficie radicale di circa 700 volte
(aumento delle potenzialità nutrizionali)



Radice di orzo:

- 500 Km
- Con micorrize: 150.000 Km

Radice di grano:

- 200 Km
- Con micorrize: 120.000 Km



Vantaggi delle micorrize...

Garantiscono un'elevata capacità di resistenza a stress idrici, squilibri termici e crisi da trapianto

Aumentano l'assorbimento e la velocità di afflusso dei nutrienti minerali (N, P, K, microelementi)

Inducono una resistenza ai patogeni della radice e del colletto; migliorano lo stato fitosanitario della pianta

Vantaggi delle micorrize...

Diminuiscono l'accumulo di nitriti e nitrati nelle parti edule delle piante e nel suolo

Aumentano le sostanze aromatiche e il grado zuccherino dei prodotti

Aumentano la biomassa organica nel terreno, con conseguente aumento di produttività dei suoli agrari negli anni successivi

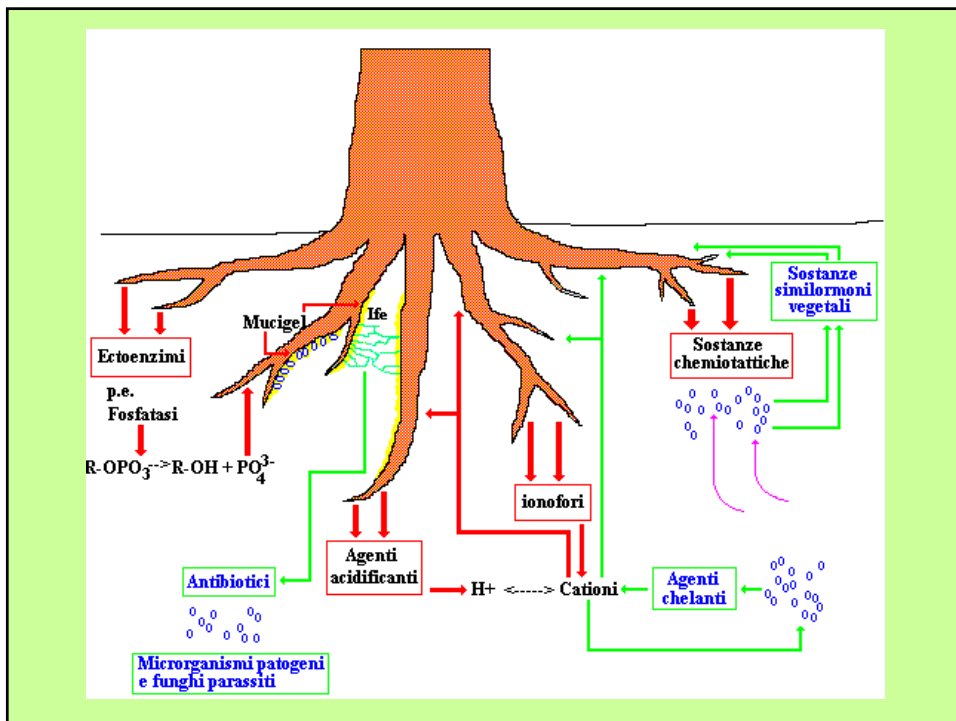


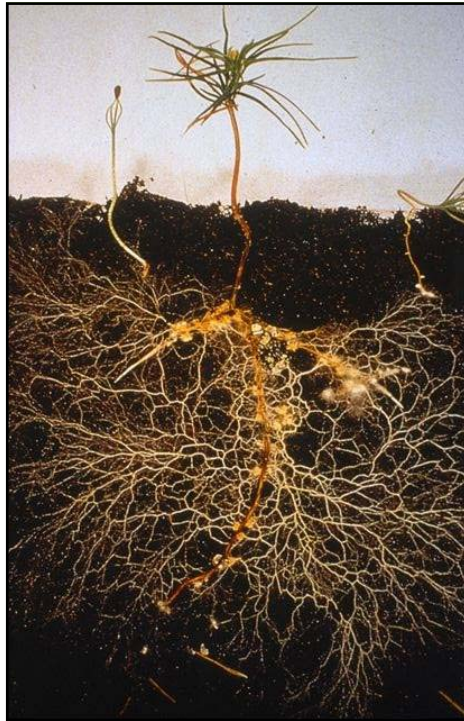
“Effetto Rizosfera”

Le radici delle piante stimolano la crescita microbica nelle loro vicinanze

Il numero dei microrganismi del suolo attorno a loro aumenta di 50–100 volte

Il complesso radici–suolo dove il fenomeno si verifica viene definito “rizosfera”





La rizosfera contiene circa:

10^{5-6} funghi

10^{7-8} attinomiceti

10^{8-9} batteri

10^{9-10} protozoi

10^{9-10} alghe

per grammo di suolo!

L'ottimizzazione del consorzio microbiologico della rizosfera

Piante più sane e resistenti alle malattie, con maggiore capacità di assorbimento radicale;

Maggiore resistenza agli attacchi dei nematodi;

Maggiore estensione dell'apparato radicale e delle sue potenzialità di assorbimento;

Esaltazione del profumo, della pigmentazione e delle qualità organolettiche della parti edule;

Arricchimento del terreno in biomassa organica, (maggiore uniformità dello sviluppo vegetale; incremento della produzione negli anni successivi).

BIOREMEDIATION
(“Biorimedio” o “Biorisanamento”)



Se “bonificare” = rendere buono, rendere migliore, risanare...

...interventi di risanamento caratterizzati dall'azione di elementi non solo chimici ma anche biologici permettono l'attuazione di azioni di biorisanamento.

Tali tecniche tendono quindi ad eliminare l'inquinamento in modo naturale

“Phytoremediation”

- Fitoestrazione con piante iperaccumulatrici di metalli
- Fitovolatilizzazione (trasformazione di Hg e Se in composti volatili)
- Fitostabilizzazione (trasformazione di metalli in ioni non biodisponibili)
- Fitodegradazione

+ “Biostimolazione”

Aumento dell'attività dei microrganismi indigeni e uso di inoculi microbici selezionati

**= Efficaci azioni di biorisanamento in
suoli impoveriti o inquinati**

**ESEMPIO 2:
I funghi endofiti delle graminacee**



Ecologicamente, per molti microrganismi eterotrofi le piante rappresentano un habitat preferenziale, diversificato nello spazio e nel tempo, potenzialmente disponibile e alternativo all'utilizzazione di residui vegetali o di altri substrati organici del terreno, ove la competizione è massima.

L'associazione con le piante rappresenta, per il microrganismo, un adattamento che risponde ad esigenze trofiche ed ecologiche primarie!



Il concetto di coevoluzione

Le più intime simbiosi, stabilite da funghi parassiti e mutualistici con piante ed animali, sono necessariamente il risultato di un elevato processo di coevoluzione.

E' a tutt'oggi accettato che i funghi siano coevoluti con tutte le forme viventi, dai virus all'uomo.

"Niente si è evoluto in isolamento" (Greenwood, 1981).

COEVOLUZIONE

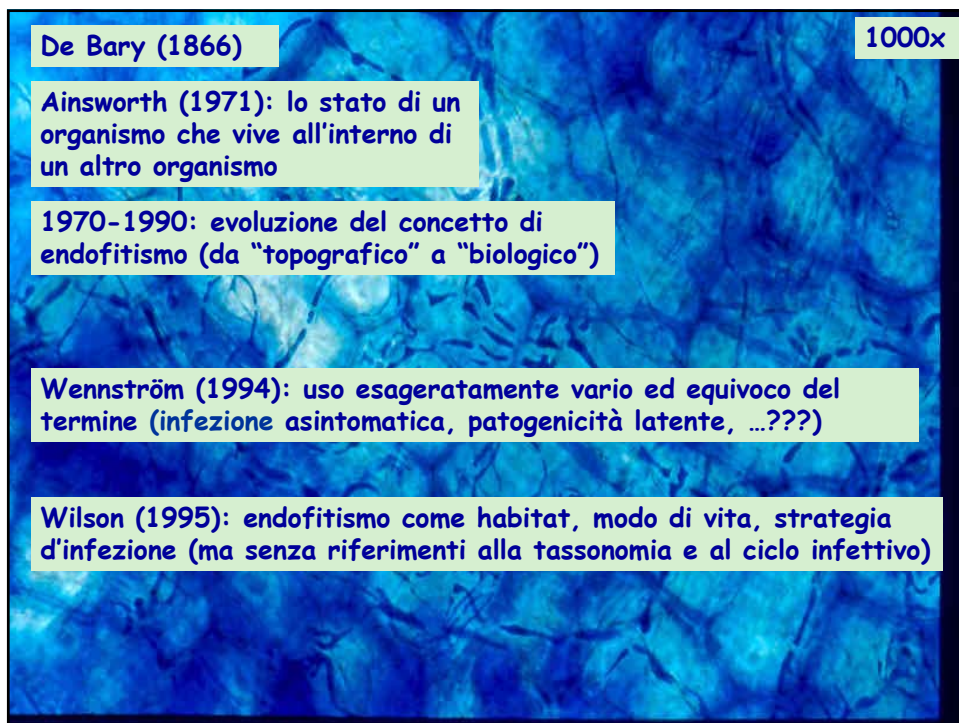
= in/diretta interazione di due o più unità che si evolvono producendo una risposta evoluzionistica in ciascuna (van Valen, 1983).

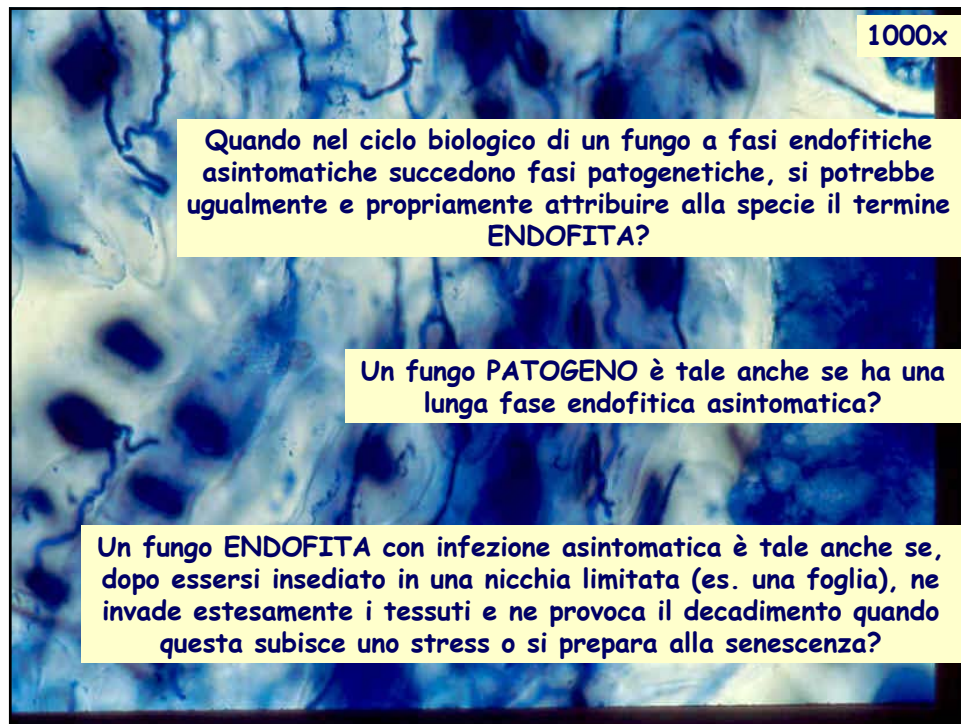
Avviene durante un *continuum* simbiotico tra cellule di organismi pluricellulari, tra elementi biologici, fisici e chimici, tra sequenze nucleotidiche di un genoma.

E' dinamica, esiste nell'arco di millenni, non di decenni.

Sia interazioni fortemente negative (antagonistiche) che positive (mutualistiche) garantiscono la forza selettiva necessaria allo sviluppo coevoluzionistico (Southwood, 1985).

E' la principale causa dei processi che hanno reso organismi differenti fra loro capaci di usufruire di tutte le risorse di un habitat.





I funghi endofiti

Complessità biologica ed ecologica

Diversità di composizione in specie e di distribuzione all'interno e tra gli ospiti

Reciproci effetti ecologici finalizzati al benessere del fungo, del suo ospite e dell'intera comunità vegetale



Studi ad ampio raggio (analisi di comunità, analisi anatomiche-istologiche e microbiologiche, studi di biodiversità, di ecologia delle popolazioni e di biologia evoluzionistica).

La distribuzione dei funghi endofiti nei vegetali

Evidenziati in vegetali di ordini, famiglie e generi a distribuzione mondiale e caratteristici di habitat molto diversi fra loro.

Isolati da tutte le specie di fanerogame sudiate, da muschi, epatiche e felci.

E' ammissibile supporre che tutte le piante viventi possano ospitare funghi endofiti.

In particolare, tra tutte le famiglie vegetali studiate, tre (*Coniferae*, *Ericaceae*, *Gramineae*) risultano essere state maggiormente indagate.

I Funghi Endofiti delle Graminacee

- Sono completamente contenuti negli spazi intercellulari del tessuto vegetale dell'ospite
- Hanno una biologia differente da quella di qualsiasi altro gruppo fungino
 - Possono instaurare complesse interazioni con il vegetale ospite
 - Sono caratterizzati da una grande variabilità a livello di riproduzione e propagazione

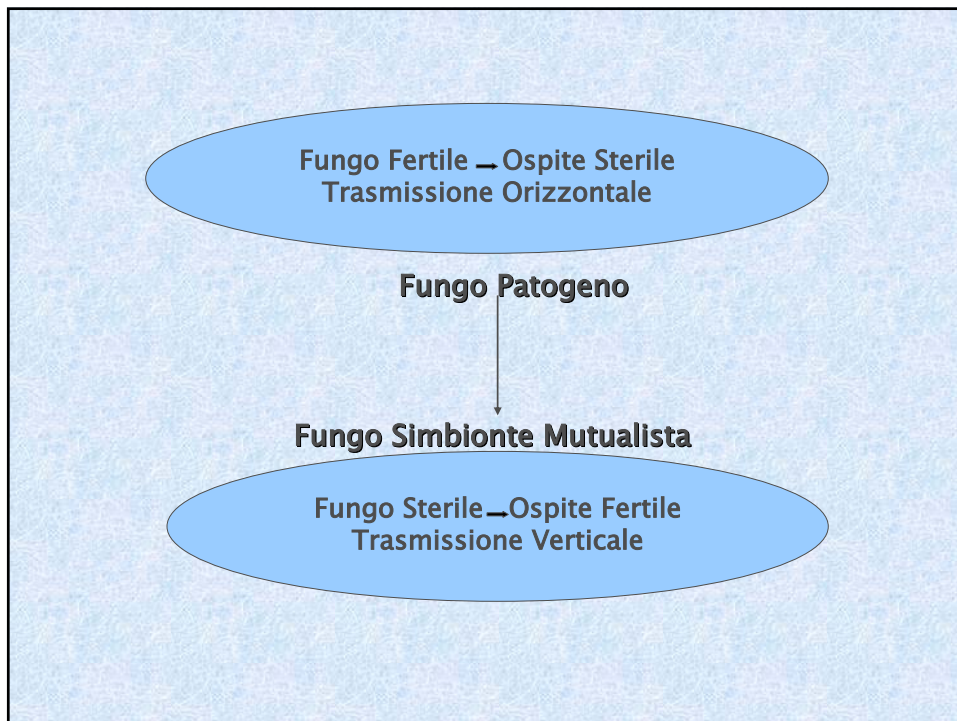
Ipotesi del Miglioramento (Boucher *et al.*, 1982)

"Gli effetti nocivi causati dal parassita sul suo ospite si attenuano nel tempo fino al momento in cui l'ospite trae beneficio dall'essere infettato"

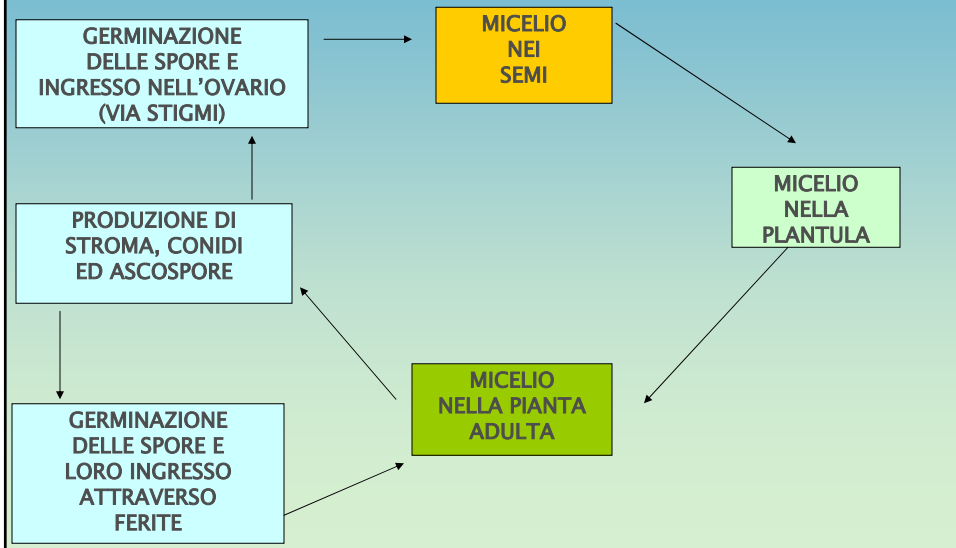
- Tale processo coevolutivo si impone con successo solo quando entrambi i partners traggono vantaggio dall'associazione aumentando così il proprio grado di "fitness"

L'associazione endofitica è ecologicamente vincente

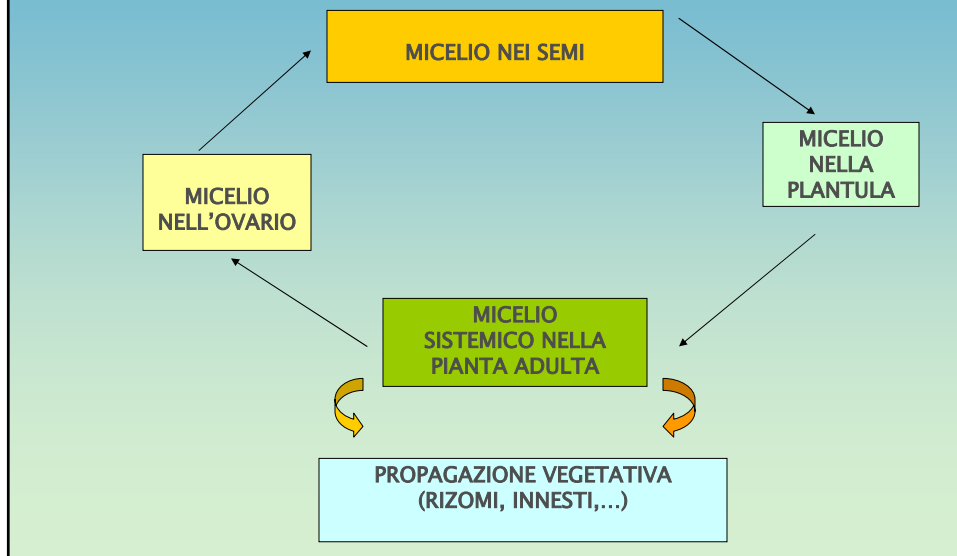
1) L'adattamento coevolutivo della riproduzione dei due partners ha portato ad una correlazione inversa tra la sessualità del fungo e dell'ospite (il fungo sporifica rendendo l'ospite sterile; il fungo è sterile quando l'ospite è fertile)



TRASMISSIONE ORIZZONTALE



TRASMISSIONE VERTICALE



L'associazione endofitica è ecologicamente vincente

- 2) I fito-ormoni prodotti dall'associazione endofitica modificano la biologia dei vegetali ospiti permettendo loro nuove risposte fisiologiche, morfologiche ed ecologiche

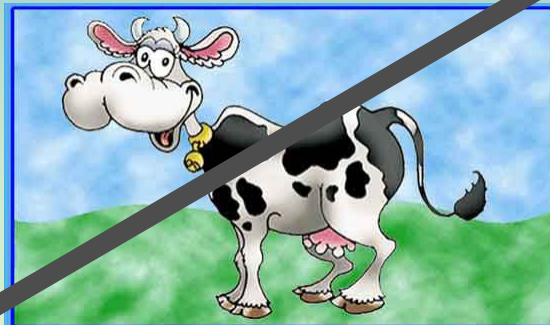


Le piante infettate hanno:

Maggior tasso fotosintetico
Maggiore resistenza a carenze o cambiamenti nutrizionali
Maggior resistenza alla siccità
Maggior competitività

L'associazione endofitica è ecologicamente vincente

- 3) Il Fungo Endofita, mediante produzione di alcaloidi anti-erbivori, attua una strategia difensiva mirata a proteggere il proprio partner autotrofo



Le tossine dei funghi endofiti

•PIRROLIZIDINE (Lolina)

Poco abbondanti ma frequenti nelle foglie.

Insetticida ad ampio spettro.

Inibisce la germinazione degli steli.

•ERGO-ALCALOIDI (ac. lisergico, ergotamina,...)

Molto abbondanti soprattutto nel meristema della guaina.

Causano il CHOKE disease nei mammiferi.

Aumentano con fertilizzazioni azotate e siccità.

•INDOLDITERPENOIDI (Lolitremici)

Abbondanti nelle foglie.

Neurotossine tremogeniche.

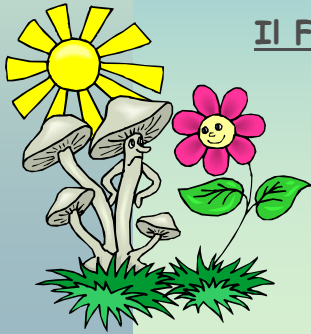
Causano il Ryegrass Stagger nei mammiferi (Tremore del Loietto).

•PIRROLOPIRAZINE

Insetticida.

Abbondante soprattutto nelle foglie vecchie.

L'associazione endofitica è ecologicamente vincente



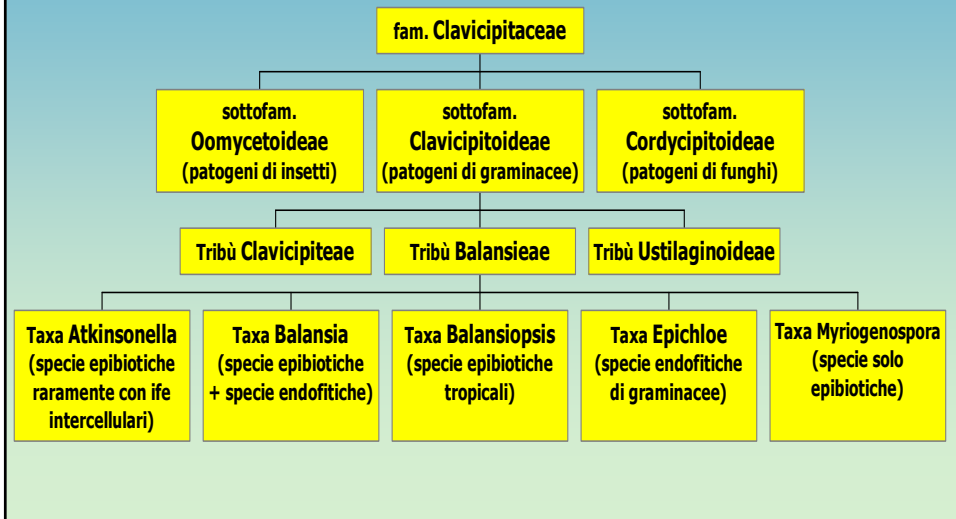
Il Fungo Endofita controlla, conserva e potenzia il suo ospite.

Tassonomia dei Funghi Endofiti

E-endofiti

Specie clavicipitacee mutualistiche del genere *Epichloë* Tulasne e loro forme conidiali, sistemiche e trasmissibili via seme, appartenenti al genere *Neotyphodium* Glenn, Bacon and Hanlin.

Fam. Clavicipitaceae
- Hypocreales; Ascomycotina –
(Diehl, 1950)



Tassonomia dei Funghi Endofiti

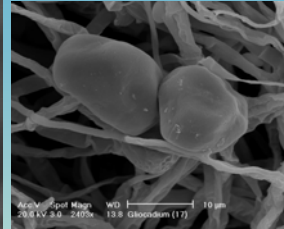
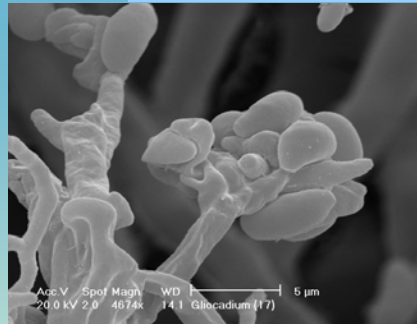
Individuati in USA, Nuova Zelanda e Svizzera
(Latch et al., 1984; Philipson, 1989; Schmidt, 1994)

- Asintomatici
- Alta frequenza di trasmissione verticale
- Capacità di infettare semi integri

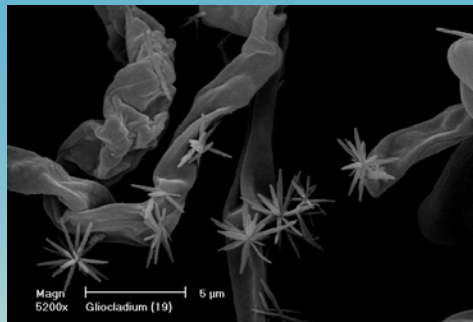
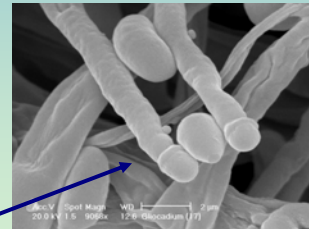
**P-endofiti (*Gliocladium* -like,
Phialophora -like species)**

Specie commensali o antagoniste per la graminacea, dotate di trasmissione verticale e di asintomaticità. Loro importanza ecologica?

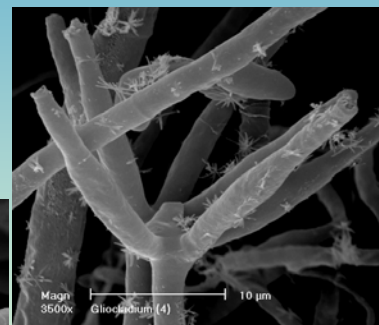
Osservazione dei p-endofiti al SEM



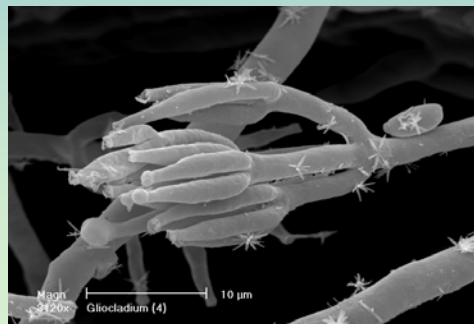
**Ceppo
n° 14**

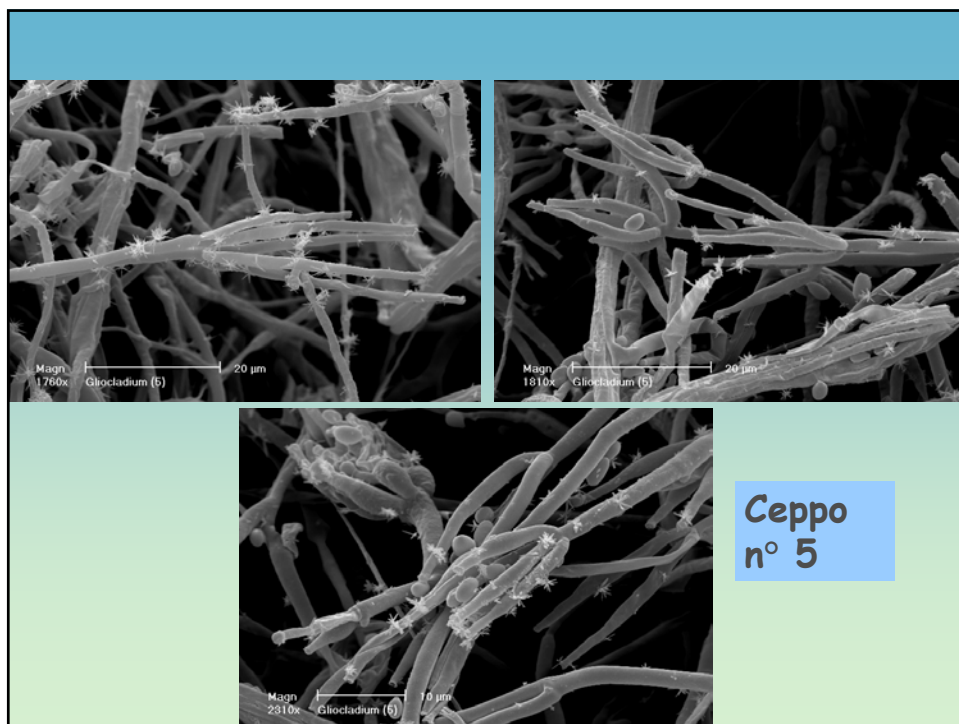


**Ceppo
n° 16**



**Ceppo
n° 4**

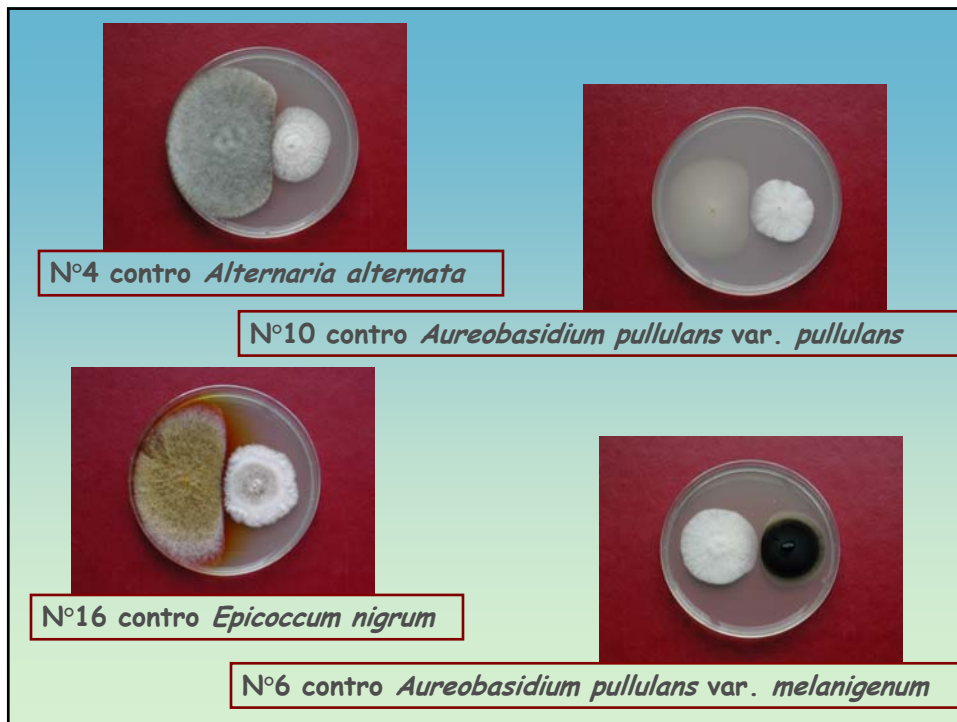




Inibizione dei micromiceti opposti ai p-endofiti =
 % di inibizione della crescita radiale del micelio

Inibizione (%) = $100 \times (R - r) / R$

R= raggio rivolto verso il centro della piastra nel controllo
 r= " " " " " nella coltura duale



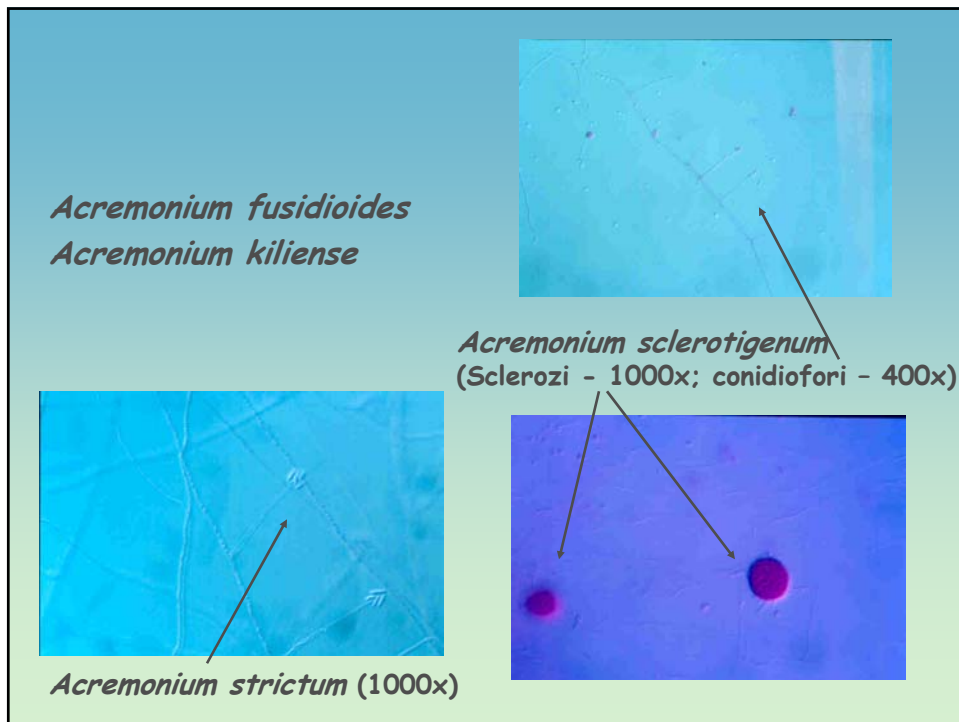
Tassonomia dei Funghi Endofiti

A-endofiti

(*Acremonium*-endophytes, tassonomicamente appartenenti al genere *Acremonium* sez. *Simplex*)

Gruppo endofitico "europeo" di recente individuazione (Nafaa *et al.*, 1998).

La loro endofiticità nella pianta si manifesta solo in certe condizioni, in quanto possono vivere anche al di fuori dell'ospite.



Tassonomia dei Funghi Endofiti

Il gruppo, definito dal Petrini (1986), include specie epifitiche in grado di condurre fasi di vita endofitica nell'ospite e di distinguersi per le loro ben attive capacità metaboliche.

Endofiti non sistemici

Fusarium spp.; comuni specie epifitiche quali *Alternaria alternata*, *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum*; specie patogene specializzate per le graminacee stesse

Ricerca microscopica di micelio fungino endofitico

Metodologia di Shelby & Dalrymple (1987)

- ✓ Immersione delle cariossidi e delle foglie per 16 ore in una soluzione acquosa di NaOH al 5%
- ✓ Lavaggio per 3 minuti in acqua corrente
- ✓ Colorazione delle cariossidi e delle foglie per immersione in una soluzione di blu di anilina 1% e acido lattico 85% (1:2)
- ✓ Asportazione delle glumette, rottura delle cariossidi nelle singole parti costitutive
- ✓ Osservazione al microscopio ottico

Vantaggi:

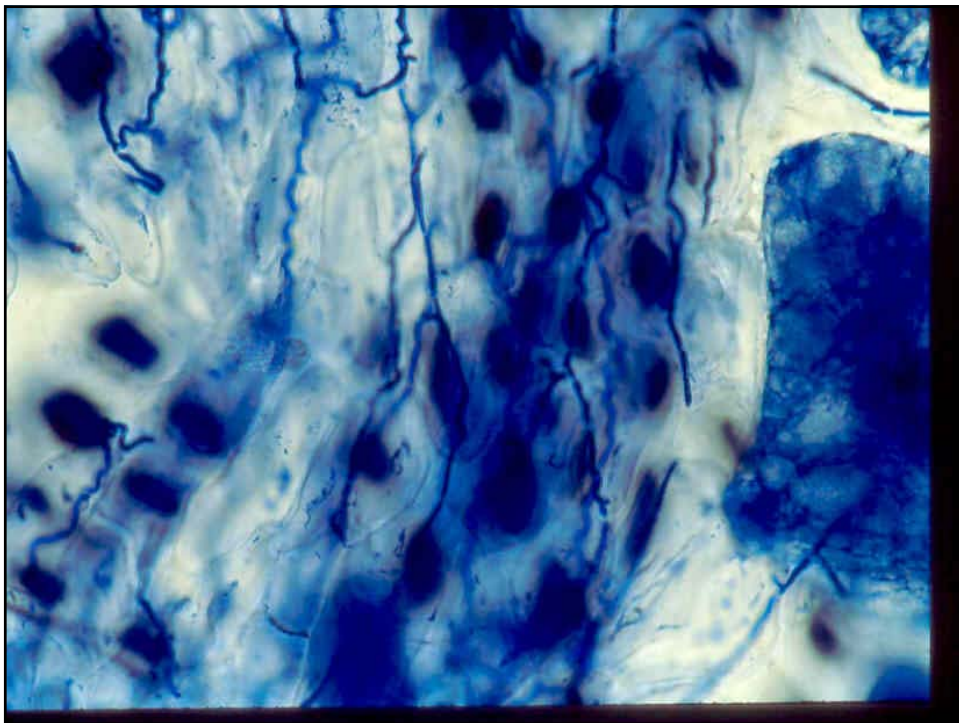
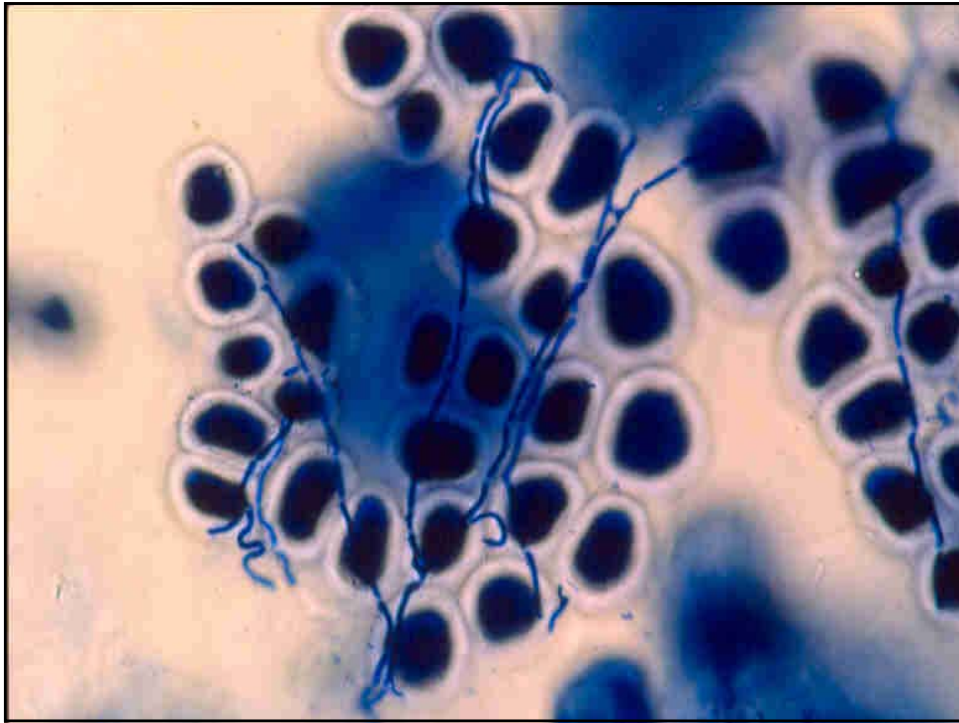
Le più alte percentuali di colonizzazione endofitica;
Risparmio di tempo rispetto ad altre metodiche
Minore affaticamento dell'analista rispetto ad altre metodiche

Svantaggi:

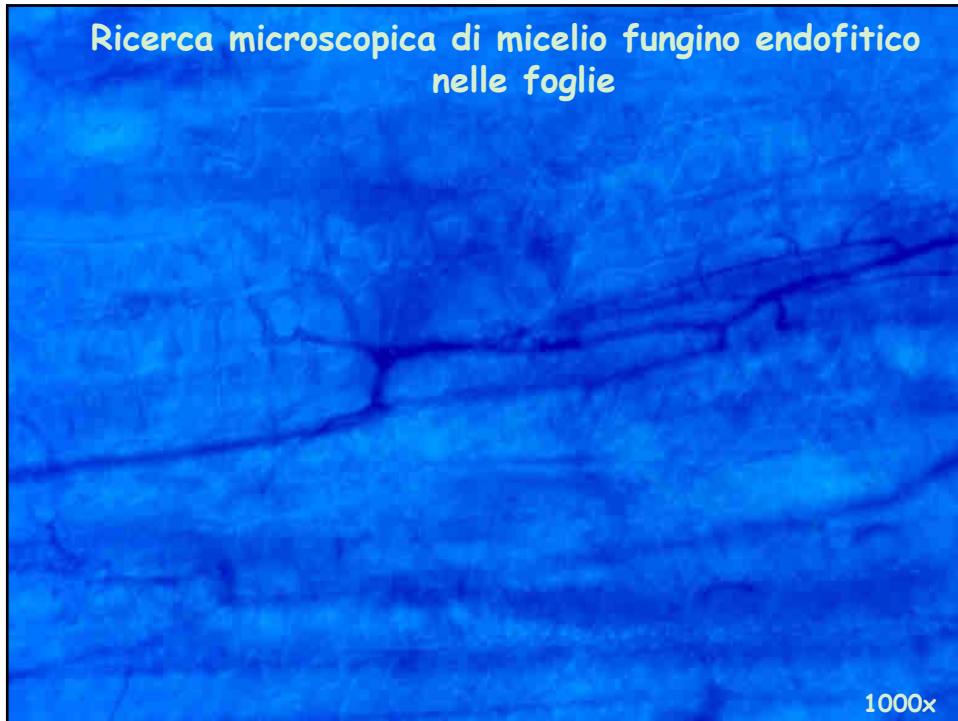
Non permette di testare la vitalità dell'inoculo fungino;
Non permette di nominare il micelio endofitico osservato.

Si consiglia seme piuttosto che foglia!

1000x



Ricerca microscopica di micelio fungino endofitico nelle foglie



Indagine micologica di foglie, semi ed ovari

- ✓ Lavaggio sotto acqua corrente
- ✓ Sterilizzazione superficiale con
etanolo 96% (max 1 min)
- ✓ Immersione in ipoclorito di sodio - cloro 3%
(5-10 min)
- ✓ Immersione in etanolo 96% (max 1 min)
- ✓ Deposizione in piastre contenenti
terreno colturale MEA
- ✓ Osservazione costante (per almeno 2 mesi)

Si consiglia seme, ovario e nodo (mai la foglia!)



I funghi endofiti recano con sè una storia di evoluzione insieme ai loro ospiti e di costruzione di adattamenti specializzati a eludere i meccanismi di resistenza generale delle piante.

Non ci si stupisca se funghi riconosciuti in quanto patogeni, saprobi o commensali possano mostrare gradi di colonizzazione dell'ospite estremamente differenti fra loro e, infine, vivere da endofiti!

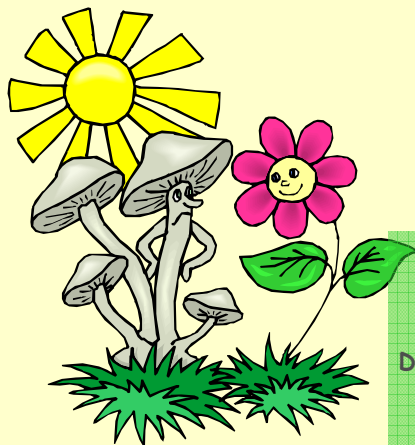
"...all these groups of fungi are not as separate as some might like them to be but, on the contrary, they form a *continuum* of interaction between the plant and the fungus that range from the casual and superficial to the intimate and deeply involved."

Chapela & Petrini

Lancaster Univ., 1991 April 10-11

Personal communication

E' stato un piacere!
Grazie!!!



Marinella Rodolfi



Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli
Ambienti Terrestri, Sezione di Micologia
Università degli Studi di Pavia