





# I GEORGOFILI

Quaderni  
2005-VIII



## LE RADICI DELLE PIANTE COLTIVATE: ACQUISIZIONI SCIENTIFICHE ED INNOVAZIONI TECNICHE

Firenze, 16 giugno 2005

SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

Copyright © 2006  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»  
Anno 2005 - Serie VIII - Vol. 2 (181° dall'inizio)

Responsabile redazionale: dott. Paolo Nanni

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA  
Via G. Benivieni 1 - Firenze  
Tel. 055 5532924  
Fax: 055 5532085  
[info@sefeditrice.it](mailto:info@sefeditrice.it)  
[www.sefeditrice.it](http://www.sefeditrice.it)

## INDICE

GIULIANO MOSCA <i>Il sistema radicale e la gestione degli agro-ecosistemi</i>	7
GIOVANNI CACCO <i>La plasticità fenotipica degli apparati radicali</i>	17
STEFANO MANCUSO <i>Gli apici radicali come centri di comando della pianta: lo stato "neural-simile" della zona di transizione</i>	23
ELISA POLONE, ANDREA SQUARTINI <i>La radice e i microrganismi della rizosfera: analisi dei pattern di nodulazione di <i>Pisum sativum</i> in popolazioni naturali di <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i></i>	45
BRUNO MARANGONI, MORENO TOSELLI, ELENA BALDI <i>Influenza della sostanza organica sulla morfologia, sviluppo ed efficienza radicale nelle piante da frutto</i>	59
TEOFILO VAMERALI <i>Fitoestrazione di metalli pesanti da suoli inquinati: il ruolo della morfologia radicale nell'individuazione di piante accumulatrici</i>	73
ANNAMARIA CASTRIGNANÒ, DONATO DE GIORGIO, NICOLA LOPEZ <i>La variabilità spaziale dei sistemi radicali: le applicazioni della geostatistica</i>	83

MARIANA AMATO

*La radice come mediatore della variabilità spaziale dell'ambiente ipogeo:  
il consolidamento dei terreni in pendio*

115

ROBERTO TUBEROSA, SILVIO SALVI, PIERANGELO LANDI, SILVIA GIULIANI,  
MASSIMO BELLOTTI, MARCO MACCAFERRI, GIORGIO SPONZA,  
VALENTINA TALAMÉ, SERGIO CONTI, MARIA CORINNA SANGUINETI  
*L'apparato radicale dei cereali: l'approccio genomico*

127

## Il sistema radicale e la gestione degli agro-ecosistemi

L'apparato radicale delle piante coltivate continua a destare notevole interesse poiché l'acquisizione di nuove conoscenze fa comprendere sempre di più il ruolo e l'importanza degli scambi di messaggi tra radice e rizosfera, oltre a svelare i meccanismi della colonizzazione di quest'ultima da parte dei numerosissimi "attori" che la frequentano.

La ricerca oggi è orientata alla conoscenza in modo sempre più puntuale delle reciproche interazioni tra parte aerea e sotterranea della pianta, allo scopo di valutare il livello di adattamento delle piante coltivate nell'agro-ecosistema (Wardle et al., 2004; Marx, 2004). Tra le innumerevoli peculiarità che caratterizzano la rizosfera è da annoverare anche l'immobilizzazione del carbonio che esercita un certo impatto sul cosiddetto "global change". Il sistema radicale e i relativi essudati rappresentano infatti una cospicua fonte di sequestro del carbonio organico (Lal, 2004).

Degli oltre 90 elementi chimici naturali presenti nel terreno meno di 1/3 svolgono attività funzionali negli organismi viventi (Epstein, 1973).

La maggior parte dei nutrienti è presente in forma minerale e la fonte della maggior parte di essi è il terreno agrario.

Negli animali la tendenza evolutiva è stata di ridurre al minimo la superficie corporea esterna in rapporto alla massa e fino a una entità rispondente alle esigenze funzionali (locomozione, percezione sensoriale, ecc.). Nelle piante, al contrario, in genere si formano sistemi di estesa superficie sia aerei che sotterranei. Anche se questa non è la regola.

\* *Dipartimento Agronomia ambientale e Produzioni vegetali, Università degli Studi di Padova*

La cosiddetta “metà nascosta” è destinata a una moltitudine di funzioni, le più rilevanti delle quali verranno illustrate durante la giornata di studio da un gruppo di esperti con competenze assai diverse tra loro, ma allo stesso tempo complementari. Solamente affrontando un fenomeno così complesso secondo un approccio strettamente interdisciplinare si può pensare infatti di affrontarne lo studio con un adeguato margine di successo.

In risposta alle principali caratteristiche del terreno agrario – estrema eterogeneità, diluizione e scarsa mobilità di alcuni nutrienti – l’evoluzione nei vegetali ha dato origine a sistemi radicali che, grazie a una progressiva ripartizione e ramificazione, presentano una superficie di contatto con la rizosfera straordinariamente ampia. Allo scopo di accertare la necessità di un’estesa dimensione del sistema radicale, negli anni ’30, H.J. Dittmer della Università dell’Iowa isolò in una cassetta di vegetazione (55 cm di profondità e superficie di 77 cm<sup>2</sup>) una pianta di segale e la coltivò per 4 mesi. A fine esperimento, la lunghezza radicale complessiva risultava pari a 622 km, corrispondenti a 237 m<sup>2</sup>. Considerando anche i peli radicali si raggiungevano gli 11.200 km, corrispondenti a 650 m<sup>2</sup> di superficie.

In anni più recenti, presso la Station d’Agronomie dell’INRA di Tolosa, R. Blanchet e collaboratori (1986) hanno stimato che una coltura irrigua di soia della superficie di un ettaro (varietà del gruppo I, in semina primaverile) riesce a differenziare un sistema radicale la cui lunghezza complessiva può compiere una volta e mezza la circonferenza terrestre.

Una coltura per produrre in modo soddisfacente necessita sempre di differenziare un sistema radicale molto ampio?

Nel tentativo di dare una risposta credibile in proposito, si consideri la figura 1, nella quale vengono riportati sul piano cartesiano alcuni punti sperimentali relativi al prodotto agrario utile (t.ha<sup>-1</sup>) della soia al variare della lunghezza radicale (espressa in km.m<sup>-2</sup>). Come si può notare all’aumentare della variabile indipendente aumenta la produzione, secondo una legge di tipo lineare. Tuttavia il livello di correlazione tra le due variabili appare assai modesto, pur superando i limiti della significatività statistica. Ciò significa che la produzione di seme in soia e la lunghezza radicale sono da considerare come due eventi assai lontani tra loro e quindi poco interdipendenti. Di fatto la resa si costruisce, tramite le sue principali componenti, durante alcune ben specifiche fasi fenologiche, mentre l’accrescimento radicale segue ritmi di formazione differenti, ma soprattutto durante il ciclo vegetativo possono verificarsi attacchi parassitari o fenomeni di stress abiotico che certamente tendono, in funzione della loro intensità, a scollegare i due parametri. Quindi una grande dimensione dell’apparto radicale rappresenta una buona, ma non sufficiente, premessa per raggiungere delle elevate rese di prodotto.



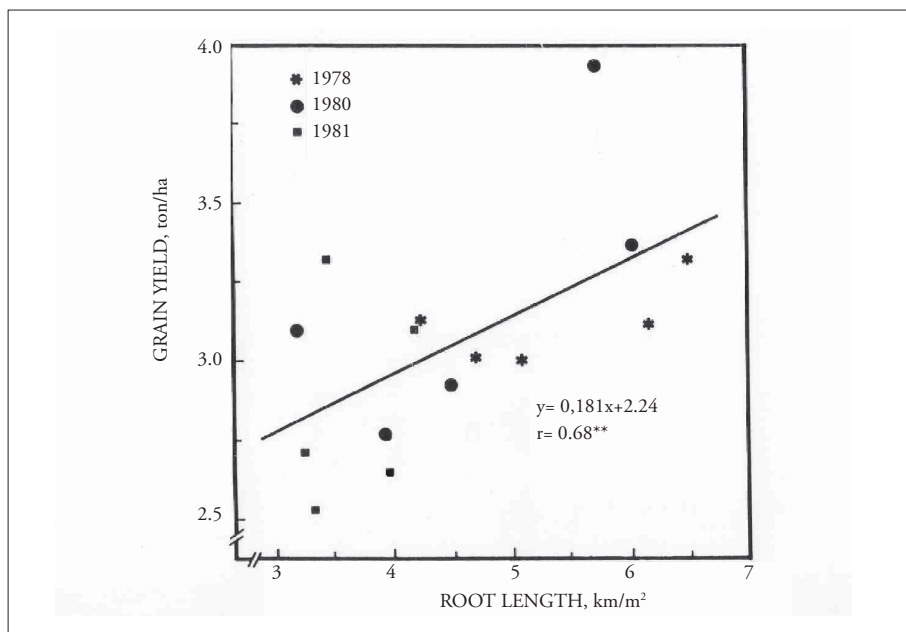


Fig. 1 *Relazione tra produzione di granella in soia e lunghezza radicale di alcune varietà coltivate in un triennio*

Se si sposta invece l'attenzione sulla capacità della radice di estrarre nutrienti minerali dal terreno si constata che la produzione annua di fitomassa terrestre è stimata essere pari a  $100 \cdot 10^9$  t di s.s. e si valuta che le sostanze minerali assimilate allo scopo siano pari al 5%. Pertanto i vegetali estraggono ogni anno dal terreno circa  $5 \cdot 10^9$  t di minerali.

In comparazione, nel 2001, si stima che l'estrazione a opera dell'uomo di minerali ferrosi e non (Pb, Ni, Zn) sia stata di poco superiore a  $1,126 \cdot 10^9$  t. Il rapporto che ne deriva è pari a 5:1 a favore dei vegetali.

Le piante dimostrano, grazie al loro apparato radicale, di possedere quindi una straordinaria capacità di intercettazione ed estrazione di fitonutrienti e altri ioni minerali dalla rizosfera.

#### AGRICOLTURA DI PRECISIONE E APPARATI RADICALI

L'introduzione di sistemi elettronici di controllo e gestione delle macchine operatrici agricole può contribuire a determinare un sensibile miglioramento delle loro prestazioni e fornire dati per il monitoraggio e il corret-

to funzionamento dei diversi componenti. Lo sviluppo di detti sistemi si traduce nel concetto di *precision farming* che, tramite l'uso di sensori, attuatori, mappe digitali e satelliti, punta alla gestione di limitate superfici al fine di ottimizzarne la produzione. Poter misurare in tempo reale le caratteristiche del binomio suolo/vegetazione, consentendo di conseguenza alle macchine di autoregolarsi, rappresenta la nuova frontiera dell'agricoltura di precisione.

In questo ambito si collocano gli approfondimenti di ricerca in materia di apparati radicali che vanno posti in relazione agli interventi sul terreno, alla distribuzione di nutrienti e fitoiatrici, alla gestione del rifornimento idrico, alla realizzazione dei sistemi di difesa integrata, al controllo del fenomeno erosivo, della salinità dei suoli e della eventuale presenza di metalli pesanti.

#### I PRINCIPALI METODI DI STUDIO DEGLI APPARATI RADICALI NELLE PIANTE COLTIVATE

Il sistema radicale è una sorta di universo poco conosciuto non sempre facile da osservare e misurare. Pertanto i ricercatori più virtuosi continuano a cimentarsi nella realizzazione e perfezionamento di nuove metodologie di studio. Tra i più conosciuti e collaudati si ricordano i metodi distruttivi quali il monolito, il *pin board* (fig. 2), il profilo di parete, il *core-break* (fig. 2) e il *core sampling* (carotaggio) (figg. 3 e 4). Nell'ambito di quelli conservativi se ne ricordano due: il metodo della finestra (fig. 6) e quello dei rizotroni e relativa analisi d'immagine (fig. 7). Le modalità d'impiego di ciascuno di essi sono state ampiamente descritte in letteratura (Smit et al., 2000).

#### IL TURNOVER RADICALE

La dinamica di formazione-accrescimento e morte-decomposizione della radice (turnover) rappresenta un importante processo che coinvolge tutte le piante. L'intensità di questo fenomeno influenza l'acquisizione dell'acqua e dei nutrienti e più in generale l'adattabilità del vegetale all'ecosistema. Il ruolo del turnover radicale per la pianta è assai significativo.

In numerose conifere, ad esempio, ogni anno dal 30 all'86% delle radici si disattiva e viene rinnovato. Il ricambio è molto attivo ed evidente anche nelle specie erbacee annuali:

- in *barbabietola da zucchero* meno della metà delle radici fibrose prodotte nel ciclo risultano ancora attive al momento dell'estirpo finale;
- in *arachide* (Krauss e Deacon, 1994) la durata media della radice è di 4-5 settimane e alla raccolta il 73-83% dell'apparato radicale ha già subito fenomeni di decomposizione;
- in molte *graminacee* la disattivazione del *cortex* radicale non determina necessariamente l'inattivazione della radice che può conservare la funzione di conduzione.

I patogeni e i parassiti ipogei non sempre sono responsabili di un più intenso turnover. In patata, ad esempio, i *nematodi* (Smit e Vamerali, 1998) possono ritardare la formazione dell'apparato radicale definitivo senza influire sulla formazione di radici superficiali, mentre modeste infezioni di *Phytophthora parasitica* in pomodoro non determinano un maggior tasso di mortalità radicale.

Il turnover influenza direttamente il potenziale di assorbimento dell'acqua e dei nutrienti della pianta e l'intensità di interscambio di messaggi con la rizosfera. Tra i metodi disponibili per la stima del turnover radicale si ricorda il prelievo di carote di terreno, ripetuto nel tempo con idonea numerosità campionaria e successiva tecnica di colorazione e separazione delle radici "vive", quale efficace tecnica di indagine. Inoltre i metodi dei rizotroni e la variante dei minirizotroni (fig. 5) presentano alcune difficoltà dovute alla incertezza nel definire con sufficiente credibilità una radice "inattiva o morta", distinguendola invece da quelle attive.

Talvolta si ricorre a taluni parametri morfologici quali la colorazione della radice stessa, le sue variazioni di diametro, la presenza di eventuali maculature.

#### LE RAPPRESENTAZIONI RADICALI

Le mappe radicali costituiscono le primissime rappresentazioni necessarie alla definizione delle relazioni spaziali fra radici.

L'esempio di figura 8 illustra, sul piano tridimensionale, la variazione di densità radicale lungo il profilo della rizosfera di due ibridi di mais a confronto, caratterizzati da una diversa geometria spaziale. Il cosiddetto ibrido numero due, anche in conseguenza del suo sistema radicale, appare chiaramente meno dotato di capacità esplorativa, tanto che in figura 9 dimostra di possedere una diversa capacità, rispetto all'ibrido uno, di utilizzazione dell'acqua traspirabile al diminuire di quella disponibile e contenuta nella rizosfera.

## BIBLIOGRAFIA

- AA.VV., (2000): *Obiettivo Radice. Metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente Mediterraneo*, Mosca e Vameralli Ed., Cleup Pd.
- BONA S., VOLTAN R., MOSCA G. (1991): *Soybean nodule development and nitrogenase activity during the reproductive phase: statistical modelling approach*, «J.A. Crop Sci.», 167 (4), pp. 249-253.
- EPSTEIN E. (1973), *Le radici*, «Le scienze», 60, pp. 84-92.
- KRAUSS U., DEACON J.W. (1994): *Root turnover of groundnut (Harachys hypogea L.) in soil tubes*, «Plant and Soil», 166, pp. 259-270.
- LAL R. (2004), *Soil Carbon Sequestration Impacts on Global Climate Change and Food Security*, «Science», vol. 304, pp. 1623-1627.
- MARX J. (2004): *The Roots of Plant-Microbe Collaborations*, «Science», vol. 304, pp. 234-236.
- MOSCA G. ET AL. (1992): *Effetti della lavorazione del terreno sullo sviluppo degli apparati radicali di frumento*, «Riv. di Agronomia», 26 (3), pp. 223-231.
- SMIT A.L. e VAMERALI T. (1998): *The influence of potato cyst nematodes (Globodera pallida) and drought on rooting dynamics of potato (Solanum tuberosum)*, «European J. of Agronomy», 9, pp. 137-146.
- SMIT A.L. ET AL. (2000): *Root Methods, A Handbook*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- VAMERALI T., GANIS A., BONA S. e MOSCA G. (1999): *An approach to minirhizotron root image analysis*, «Plant and Soil», 217 (1/2), pp. 183-193.
- VAMERALI T., GUARISE M., GANIS A., BONA S., MOSCA G. (2003a): *Fibrous root turnover and growth in sugar beet (Beta vulgaris var. saccharifera) as affected by nitrogen shortage*, «Dev. In Plant and Soil Sci.», vol. 101, pp. 169-178.
- VAMERALI T., GUARISE M., GANIS A., BONA S., MOSCA G. (2003b): *Analysis of root images from auger sampling with a fast procedure: a case of application to sugar beet*, «Dev. In Plant and Soil Sci.», vol. 101, pp. 376-386.
- VAMERALI T., SACCOMANI M., BONA S., MOSCA G., GUARISE M., GANIS A. (2003), *A comparison of root characteristics in relation to nutrient and water stress in two maize hybrids*, «Dev. In Plant and Soil Sci.», vol. 101, pp. 157-168.
- WASEL Y., ESHEL A., KAFKAFI U. (1991): *Plant Roots, The Hidden Half*. M. Dekker, Inc.
- WARDLE D.A., BARDGETT R. D., KLIRONOMOS J.N., SETALA H., VAN DER PUTTEN W. H., WALL D. H. (2004): «Science», vol. 304, pp. 1629-1633.

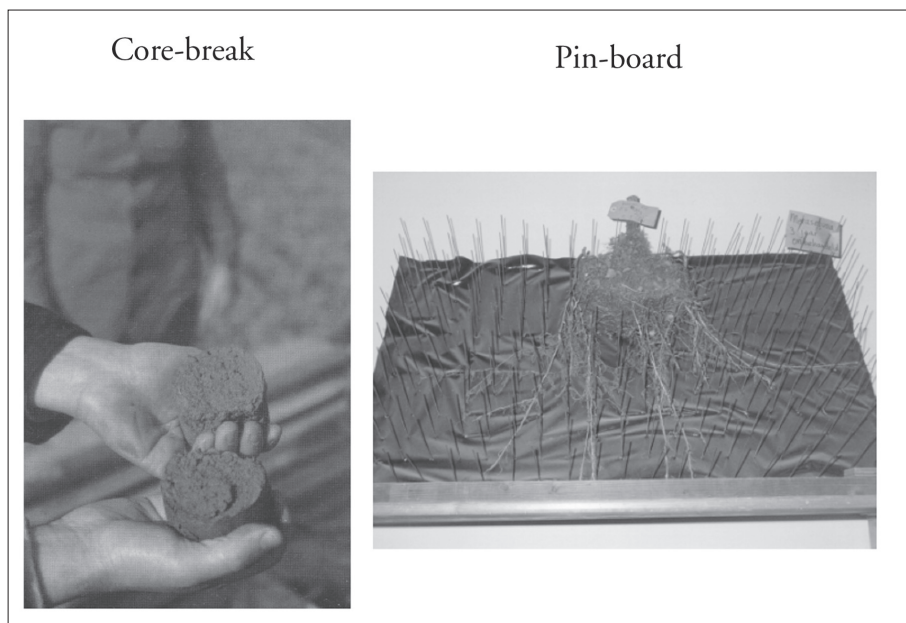


Fig. 2 *Illustrazione di due metodi classici di tipo non conservativo*  
(Foto: Gambarin e Vameralli)



Fig. 3 *Metodo del carotaggio: fasi di raccolta campioni* (Foto: Vameralli)

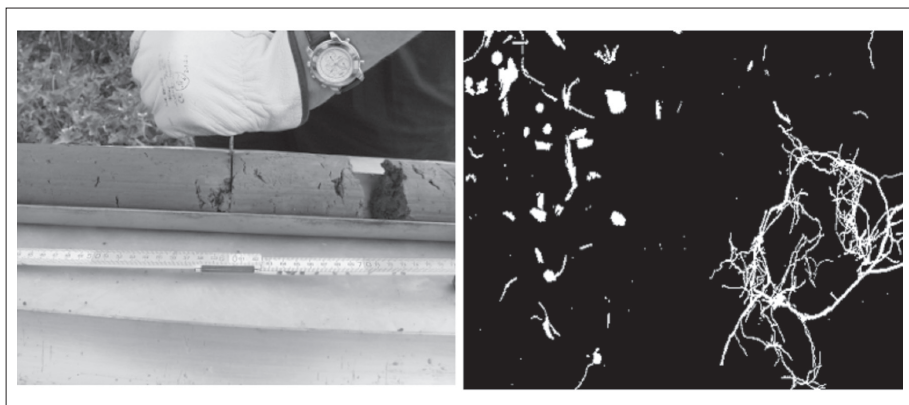


Fig. 4 Metodo del carotaggio: analisi d'immagine (Foto: Vamerali)

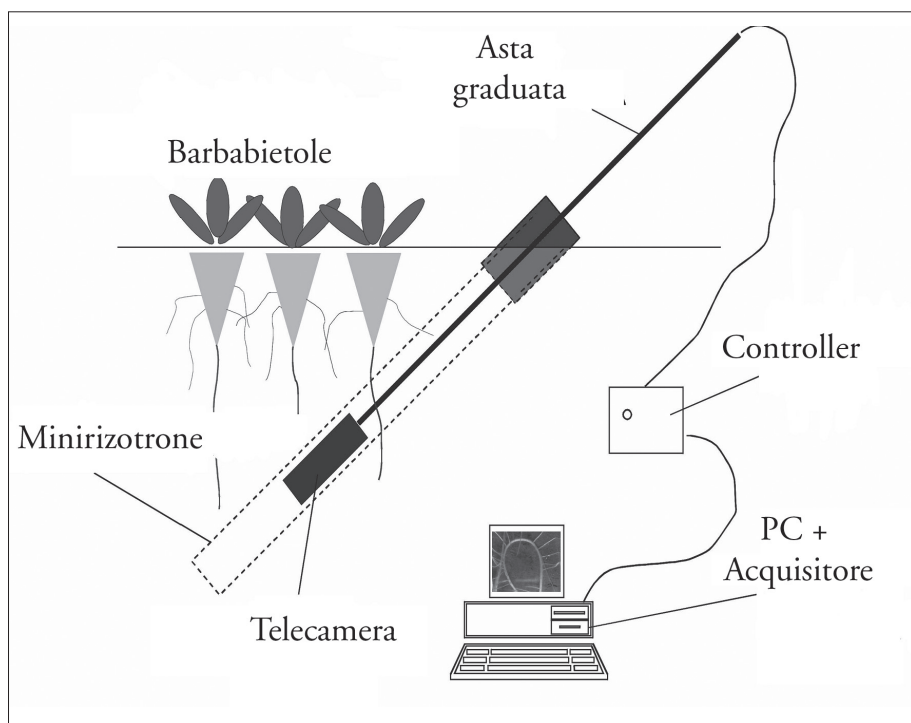


Fig. 5 Schematizzazione del metodo dei minirizotroni con uso di telecamera in situ



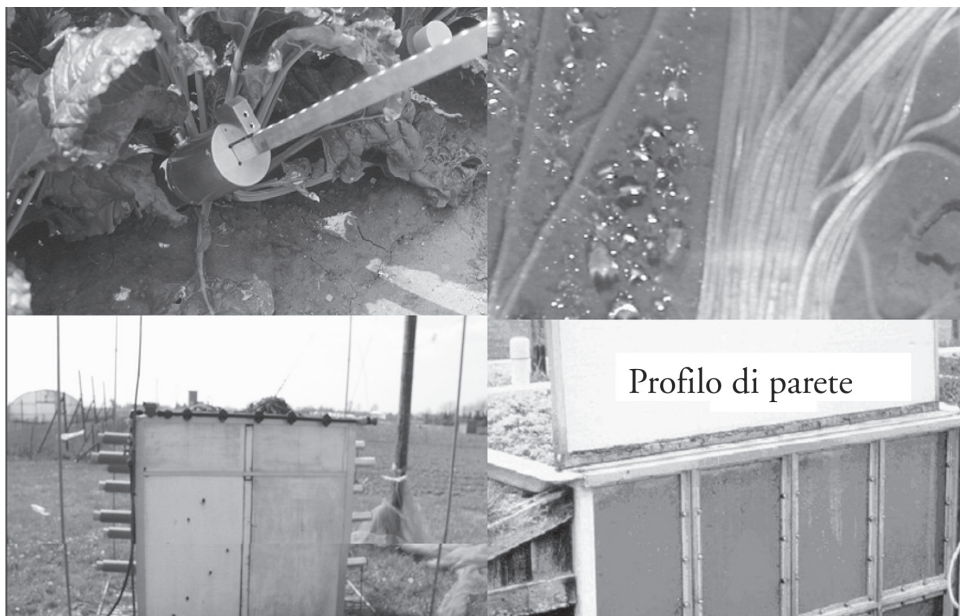


Fig. 6 *Applicazione in campo dei metodi dei minirizotroni e del profilo di parete (Foto: Vameralli)*

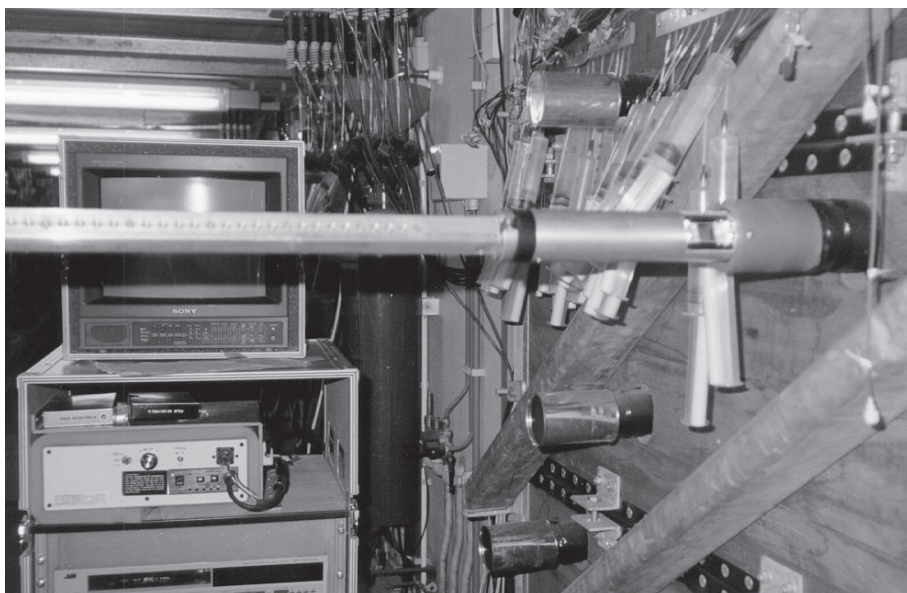


Fig. 7 *Metodo dei minirizotroni applicato alla stima del turnover radicale (Foto: per gentile concessione URC-Wageningen NL)*

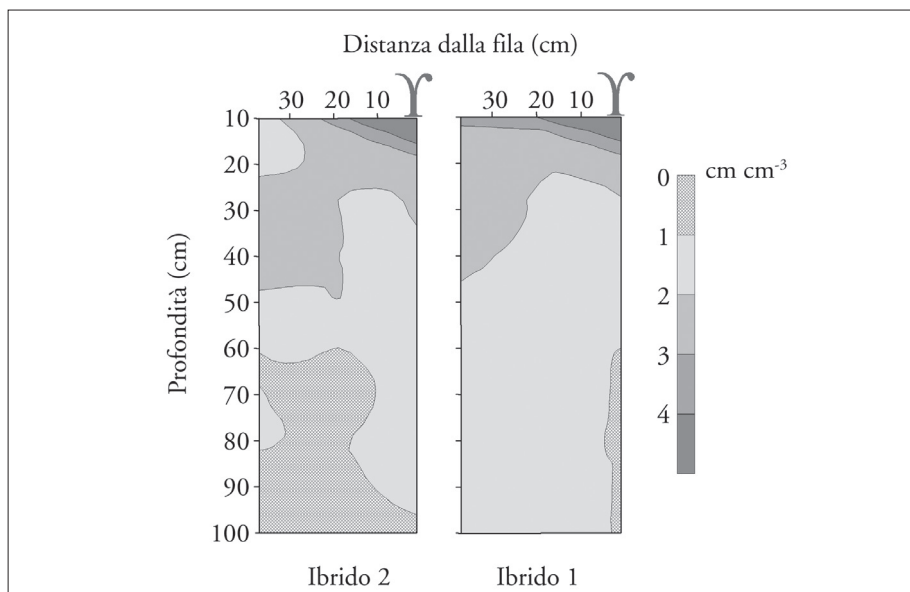


Fig. 8 *Mais: esempio di mappe radicali*

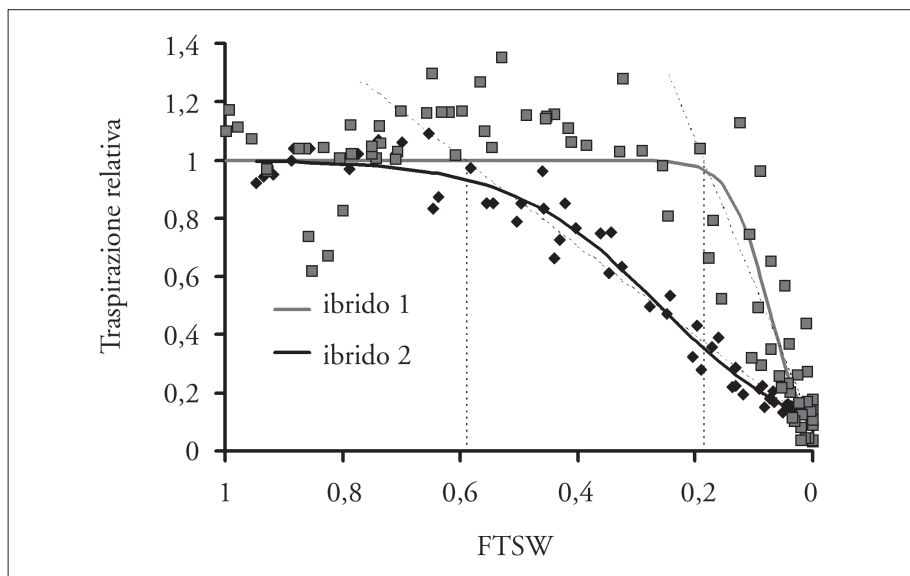


Fig. 9 *Variazione del ritmo traspirativo del mais in condizioni di stress idrico progressivo*



## La plasticità fenotipica degli apparati radicali

La plasticità fenotipica è definita come la «capacità di un organismo di produrre differenti fenotipi per differenti condizioni ambientali» (Pigliucci, 1996). Ne conseguono i seguenti corollari:

- primo che «tutte le risposte dell'organismo interessato sono stimulate da segnali che provengono dall'esterno»;
- secondo che «tutti i segnali vengono acquisiti e processati a livello cellulare» (Schlichting, 1986) confermando la stretta dipendenza tra “segnale” e “risposta” esistente tra ambiente e individuo.

La plasticità fenotipica è intrinsecamente nota fin dal 1911 quando Johannsen definì la natura di genotipo e fenotipo; poi, nel 1949 Schmalhausen descrisse la relazione tra ambiente, fenotipo e genotipo utilizzando alcuni algoritmi per la valutazione delle “norme di reazione” che ancor oggi sono utilizzate per la stima della plasticità. Infine, nel 1965, Bradshaw ipotizzò che la plasticità fenotipica avesse basi genetiche tali da poter essere trasmessa al pari di altri caratteri alla progenie.

Soltanto recentemente, però, la plasticità fenotipica è stata rivalutata in quanto è stata riconosciuta come la maggior fonte della variazione sulla quale può agire la selezione naturale. Questa consapevolezza ha condotto a una ridefinizione del concetto di genotipo inteso come “norma di reazione” o come “un repertorio di fenotipi”, piuttosto che una entità a risposta singola, tipica della concezione darwiniana, che, peraltro, considerava la plasticità fenotipica come un “disturbo” che interferiva sulle attribuzioni tassonomiche. Nei primi anni del 1990, la plasticità fisiologica era stata riscontrata in piante, alghe, invertebrati marini, insetti, pesci, anfibi, rettili e in piccoli mammiferi. Più recentemente la plasticità è stata studiata sistematicamente in piante che per

\* *Facoltà di Agraria, Università Mediterranea di Reggio Calabria*

loro natura mostrano ampie capacità di adattamento alle mutevoli condizioni ambientali. La plasticità fenotipica si basa sui meccanismi di interazione genica quali la pleiotropia, l'epistasi e l'interazione geni e ambiente, l'epigenetica, le cui strette relazioni rendono ulteriormente complessa e di difficile interpretazione questa materia. Peraltro non può sfuggire che il termine plasticità è carico di ambiguità, di imprecisione, poiché di per sé è privo di sicuri riscontri oggettivi anche se è indiscutibile che senza fenotipi non sarebbe permessa l'intelligibilità del genotipo. Le puntualizzazioni di Pigliucci e Sultan hanno il merito di aver meglio definito e oggettivato la "plasticità" distinguendo modi diversi della espressione fenotipica quali: i tratti funzionali, le fasi fenologiche, le espressioni del sesso, la riproduzione e altri fattori. Recentemente, il concetto di "plasticità" è stato ulteriormente esteso in relazione alle implicazioni che può avere nei processi di diversificazione evolutiva, nella conservazione della biodiversità e nelle manifestazioni fenologiche stesse.

Le condizioni ambientali pongono inevitabilmente dei limiti alle risposte di plasticità fenotipica oltre ai quali la crescita e lo sviluppo della pianta sono irreversibilmente inibite. Inoltre non è sempre vero che risposte plastiche siano adeguate ai mutamenti delle condizioni ambientali, ma, al di là di questo, la plasticità presenta limiti imposti dai costi che la pianta deve sostenere per il mantenimento di un adeguato livello della plasticità stessa. Questo aspetto è stato trattato da De Witt (1998), che identifica i costi accessori per il mantenimento della plasticità fenotipica a) la dotazione di opportuni sensori e di meccanismi molecolari e genetici, b) la produzione di proteine e altre strutture dedicate, c) strutture genetiche predisposte all'acquisizione di segnali provenienti dall'ambiente; ne consegue, quindi, che la plasticità fenotipica può esercitarsi entro certi limiti a spese dello sviluppo, della crescita e/o della produttività delle piante.

Nelle piante la plasticità fenotipica viene particolarmente espressa nell'apparato fogliare e nell'apparato radicale, organi funzionalmente deputati all'acquisizione delle risorse (Wiersum, 1958; Drew, 1975; Mollier e Pellerin, 1999) ed è principalmente su quest'ultimo che occorre riporre una particolare attenzione. L'apparato radicale non può essere considerato solo una struttura che assicura alla pianta l'acquisizione dei nutrienti e l'ancoraggio al suolo, ma, piuttosto, è una struttura polifunzionale se lo si considera dal punto di vista ambientale: le radici svolgono le funzioni benefiche per il suolo in quanto sono in grado di modificare in senso positivo le caratteristiche geotecniche del suolo stesso; sono le principali responsabili dell'immissione di carbonio organico nel suolo grazie, principalmente, al rilascio di essudati radicali; contribuiscono alla mobilità delle risorse idriche; contribuiscono

all'instaurarsi delle cenobiosi; sono responsabili del consolidamento del suolo grazie all'intreccio degli apparati radicali che limitano i processi di erosione; limitano i processi di *leaching* degli elementi nutritivi, principali responsabili dei fenomeni di eutrofizzazione delle acque e infine, possono essere utilizzati nell'ambito dei programmi di fitodepurazione di suoli inquinati da eccessi di nutrienti e da componenti xenobiotici.

È stato rilevato che può essere difficile stimare, nell'ambito delle numerose variabili del suolo che interagiscono con gli apparati radicali, le risposte di plasticità fenotipica al fine di definirne i campi d'azione, la potenzialità, il significato ecologico, evolutivo e agronomico. Tuttavia lo studio della plasticità fenotipica rappresenta il più accreditato approccio per la comprensione del comportamento di un organismo in un contesto differenziato dal punto di vista climatico-ambientale. L'approccio sperimentale possiede una forte componente olistica, ma è quella che può permettere di considerare un genotipo non fine a se stesso, ma come un "repertorio di fenotipi" che possiedono adeguate "norme di reazione" per l'adattamento ai fattori ambientali. Queste potrebbero essere le basi di partenza per sviluppare non solo conoscenze e sensibilità nell'ambito dei complessi rapporti pianta-ambiente, ma anche nuove linee guida per ricerche applicate verso un'agricoltura sostenibile.

Su questi argomenti ci siamo mossi e presentiamo parte delle nostre ricerche che riguardano il comportamento di alcuni portinnesti del genere *Citrus* sottoposti a dosi crescenti di nutrizione azotata. La scelta del *Citrus* come materiale biologico oggetto di studio scaturisce da interessi agronomici di interesse regionale: la Calabria è la seconda regione d'Italia per produzione agrumicola. La scelta del nitrato invece è dovuta alla sua duplice natura di elemento nutritivo fondamentale per la crescita e la produttività delle piante e di importante segnale in grado di controllare i processi metabolici e di influire sull'espressione dell'architettura radicale. Queste caratteristiche lo rendono, quindi, un fattore in grado di attivare l'espressione della plasticità fenotipica delle radici. Lo studio si è proposto di valutare l'evoluzione della morfologia radicale e dei parametri di allocazione e strutturali (finezza e densità di tessuto) nell'intero apparato radicale e nei diversi tipi di radice che lo compongono di due portinnesti di agrumi sottoposti a dosi crescenti di nitrato. L'analisi ha previsto uno studio comparativo tra i portinnesti al fine di individuare indici precoci di valutazione per individui caratterizzati da una migliore efficienza d'uso dell'azoto, secondo una logica *low input* che, sulla base del recente suggerimento dell'UE, deve prevedere una drastica riduzione dei carichi azotati in agricoltura. Successivamente sono stati analizzati i tratti morfologici che

sottendono tale efficienza e infine è stata verificata la relazione esistente tra efficienza d'uso dell'azoto e plasticità fenotipica.

A tale scopo sono stati scelti due portinnesti l'Arancio Dolce (AD) e l'Arancio Amaro (AA), che in campo si differenziano per i diversi livelli di azoto indotti nelle foglie del nesto: alto per AD e basso per AA. I portinnesti, allevati per 20 settimane in serra, sono stati irrigati con una soluzione nutritiva contenente dosi crescenti di nitrato ( $\text{NO}_3$ ) e, per i tempi fissati dai disegni sperimentali, sono stati valutati gli incrementi della biomassa del germoglio, qui chiamata "resa produttiva", al fine individuare genotipi a diversa efficienza per l'utilizzazione dell'azoto. L'efficienza è stata valutata secondo un algoritmo proposto da Gourley et al. (1994), che permette la stima dei parametri riguardanti il valore della massima resa produttiva e la concentrazione di nutriente, alla quale viene aggiunto metà del valore di tale resa. I risultati ottenuti indicano che AA e AD raggiungono la massima resa produttiva rispettivamente di  $0.476 \pm 0.04$  e  $0.420 \pm 0.05$  mg, le cui differenze risultano essere non significative, mentre le concentrazioni che realizzano la metà del valore della massima resa sono  $0.128 \pm 0.042$  e  $0.303 \pm 0.05$   $\mu\text{mol/L}$  per AA e AD rispettivamente, che risultano essere significativamente differenti e permettono di identificare il portinnesto AA come più efficiente in quanto più abile a utilizzare il nitrato rispetto ad AD.

Le analisi morfologiche, sia dell'intero apparato radicale sia dei diversi tipi radicali (fittone, I ordine e II ordine) di entrambi i portinnesti e per ogni concentrazione, sono state condotte per mezzo di un sistema di analisi d'immagini (WinRhizo, Regent Instruments, Canada). Sono stati determinati i seguenti parametri: il numero di apici, la lunghezza, la finezza (FR) ( $\text{cm cm}^{-3}$ ) e la densità di tessuto radicale (DTR) ( $\text{g cm}^{-3}$ ). I risultati, ottenuti nell'ambito dell'intero apparato radicale e per entrambi i portinnesti, evidenziano che le radici laterali di II ordine possiedono la più alta plasticità morfologica, rispetto alle radici di ordine inferiore (laterali di I ordine e fittone), all'aumentare della concentrazione di nitrato nel mezzo colturale. La più alta plasticità delle laterali di II ordine può essere interpretata in termini di vantaggio competitivo per le piante poiché tali radici sono quelle principalmente deputate all'acquisizione dei nutrienti dal suolo (Waisel ed Eshel, 2002). Negli agrumi questo risultato può assumere un significato adattativo ancora maggiore in quanto, quando le radici vanno incontro ad accrescimento secondario, quelle di ordine superiore (*laterali di II ordine*) sono caratterizzate, rispetto alle radici di basso ordine (*pioneer*), da un più elevato numero di cellule di passaggio (Eissestat e Achor, 1999), siti preferenziali per il movimento di acqua e nutrienti (Peterson ed Enstone, 1996).

Il confronto della plasticità morfologica dei diversi tipi di radice, in risposta alle variazioni della disponibilità del nitrato, evidenzia una marcata differenza tra i due portinnesti di agrumi. Infatti, a differenza dei parametri strutturali (FR e DTR), la plasticità riferita alla lunghezza delle radici e in particolare quelle laterali di II ordine, unitamente a quella relativa al numero di apici, risulta essere maggiore nel portinnesto AD rispetto all'AA che, come già segnalato, possiede una migliore "resa produttiva". Ne consegue che una maggiore plasticità non necessariamente coincide con le migliori *performances* produttive. Nel caso specifico, il portinnesto AD probabilmente spende una quota della sua capacità produttiva per realizzare un'elevata plasticità fenotipica che gli consente di realizzare una maggiore quantità di fenotipi per un'ampia variabilità di condizioni ambientali (DeWitt et al., 1998). Per converso, il portinnesto AA dovrebbe essere in teoria meno adattabile perché meno dotato di plasticità fenotipica agli effetti della nutrizione azotata ma risulta più efficiente nell'uso dell'azoto. Nel presente lavoro è stata presa in considerazione solo il fattore nutrizionale quale variabile per analizzare la risposta plastica dell'apparato radicale dei portinnesti. Prospettive future delle nostre ricerche prevedono di considerare altri fattori quali: la luce, la disponibilità idrica, la temperatura e altri per verificare come può variare il rapporto tra le plasticità dei due portinnesti e i disegni fattoriali per una serie di fattori ambientali che abbiamo già in allestimento ci permetterà di rispondere a tale quesito. È da considerare inoltre che, ai fini dell'adattamento di una specie, è necessario valutare non solo le differenze di plasticità fenotipica (*direction of plastic response*), ma anche le diverse intensità delle risposte (*magnitude of the responses*) alle differenti condizioni ambientali, come è stato recentemente suggerito da Bell e Sultan (1999) e con questi argomenti si aprono nuovi e interessanti orizzonti scientifici.

#### NOTE BIBLIOGRAFICHE ESSENZIALI

- BELL D.L., SULTAN S.E. (1999): *Dynamic phenotypic plasticity for root growth in Polygonum: a comparative study*, «American Journal of Botany», 86 (6), pp. 807-819.
- BRODSHAW A. D. (1965): *Evolutionary significance of Phenotypic Plasticity in plants*, «Annu. Rev. Ecol. Syst.», 17, pp. 667-693.
- DE WITT T.J., SIH A., WILSON D.S. (1998): *Costs and limits to benefits as constraints on the evolution of phenotypic plasticity*, «Trends in Ecology and Evolution», 13, pp. 77-81.
- EISSENSTAT D.M., ACHOR D.S. (1999): *Anatomical characteristics of roots of citrus rootstocks that vary in specific root length*, «New Phytol.», 141, pp. 309-321.
- GOURLEY C.J.P., ALLAN D.L., RUSSELLE M.P. (1994): *Plant nutrient efficiency: a comparison and suggested improvement*, «Plant and Soil», 158, pp. 29-37.

- PETERSON C.A., ENSTONE D.E. (1996): *Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots*, «Physiologia Plantarum», 97, pp. 592-598.
- PIGLIUCCI M. (1996): *How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa)*, «Trends in Ecology and Evolution», 11, pp. 168-173.
- SCHLICHTING L.D. (1986): *The evolution of Phenotypic Plasticity in plants*, «ADV. Genet.», 13, pp. 115-155.
- SCHMALHAUSEN I.L. (1949): *Factors of evolution: the theory of stabilizing selection*, University of Chicago Press, Chicago.
- SULTAN S. (1987): *Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants*,
- WASEL A., ESHEL A. (2002): *Functional diversity of various constituents of a single root system*, in *Plant roots. The hidden half*, Waisel Y., Eshel A. e Kafkafi U. (eds.), pp. 157-174.

## Gli apici radicali come centri di comando della pianta: lo stato “neural-simile” della zona di transizione

### INTRODUZIONE

Sebbene le piante siano, in linea generale, organismi privi di mobilità e manchino delle più ovvie attività cerebrali possedute dagli animali e dagli esseri umani, tuttavia esse sono capaci di manifestare tutte le caratteristiche proprie del comportamento intelligente, oltre che essere dotate di molecole neuroattive, in particolare sinaptogamine e recettori glutammato.

Recenti sviluppi della biologia cellulare vegetale hanno permesso di identificare nelle piante strutture assimilabili a sinapsi che utilizzano l'auxina come molecola simil-neurotrasmettitrice specifica per le piante. Ciò lascia intuire che la comunicazione sinaptica non sia limitata agli animali e agli esseri umani, ma che sia ampiamente presente anche nei tessuti vegetali. Gli apici radicali situati nel “polo” anteriore del corpo vegetale in virtù delle caratteristiche esibite, sembrano essi stessi, o più specificatamente le loro zone di transizione, agire in una qualche misura come centri di comando simili al cervello. L'opposto “polo” posteriore ospita gli organi sessuali ed è deputato alla funzione riproduttiva. Infine, ipotizziamo che i tessuti vascolari si comportino come strade per l'attività nervosa vegetale, permettendo rapidi scambi di informazioni tra le parti vegetali in crescita quali il fusto e le foglie e quelle che si comportano come un cervello e che risiedono negli apici radicali.

La lunga serie di studi sull'“intelligenza” delle piante, ebbe inizio con Aristotele (350 a.C.), il quale considerava le piante dotate di un'anima e di sentimenti, e proseguendo per tutto il corso della storia, raggiunse il suo culmine con Charles Darwin il quale, in collaborazione con suo figlio Francis (fig. 1),

\* *Laboratorio di Neurobiologia Vegetale, Dip. Ortoflorofrutticoltura, Università degli Studi di Firenze*

pubblicò nel 1880 *The power of movement in plants*, libro nel quale il grande naturalista asseriva che gli apici radicali delle piante si comportano come un cervello esteso, simile al cervello degli animali più semplici. Sebbene la lunga serie di esperimenti effettuati avesse convinto Darwin della correttezza delle proprie osservazioni, egli tuttavia non ebbe la forza di sostenere fino in fondo questa idea, dovendo già combattere strenuamente contro le terribili polemiche (ancor oggi non sopite) suscitate dalla sua teoria sull'origine delle specie (*On the origin of species by means of natural selection*), pubblicata nel 1859.

Sebbene gli studi di "neurobiologia vegetale" siano continuati fino ai nostri giorni essi sono stati sempre relegati ai margini della biologia vegetale essendo considerati scientificamente poco ortodossi.

Il nostro scopo è quello di dimostrare come tale punto di vista sia erroneo e di discutere per la prima volta in modo critico i recenti dati sulla "biologia nervosa delle piante" ottenuti sia attraverso studi di elettrofisiologia che mediante ricerche di biologia cellulare e molecolare. La conclusione alla quale siamo giunti è che nell'apice radicale esista un gruppo di cellule altamente specializzate, che possiede quasi tutti gli attributi propri di un tessuto cerebrale.

Storicamente si è ritenuto che gli animali e le piante fossero organizzati sulla base di principi contrastanti a causa dell'immobilità di quest'ultime. Tuttavia la storia della teoria cellulare, inizialmente elaborata grazie a studi effettuati su materiale vegetale e in seguito pienamente confermata anche per

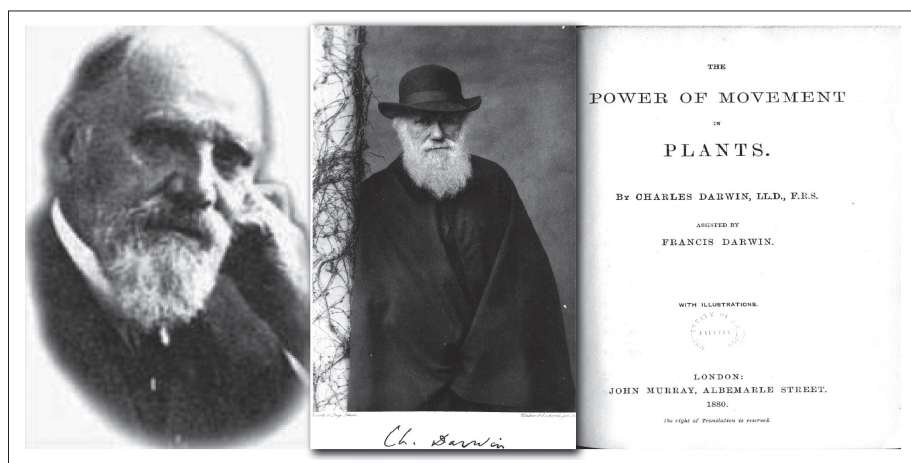


Fig. 1 Da sinistra Francis e Charles Darwin autori di *The power of movement in plants*, opera edita nel 1880, in cui per la prima volta si accenna a un "cervello" vegetale



gli animali, costituisce un eccellente esempio di come idee contrastanti siano alla fine coincise. La nostra convinzione che caratteristiche di tipo cerebrale siano prerogativa di una particolare zona altamente specializzata dell'apice radicale, costituisce un ulteriore passo nella dimostrazione di come le piante e gli animali, nonostante ovvie superficiali differenze, siano molto più simili di quanto normalmente non si consideri.

La scoperta di queste prerogative di attività simil-nervosa nelle piante per giunta annulla il divario osservato tra i vegetali e gli animali nel tentativo di armonizzare il numero di sub-sistemi biologici necessari per produrre materia, energia e informazione (Barlow, 1999).

#### ACQUISIZIONE DELL'INFORMAZIONE, APPRENDIMENTO, MEMORIZZAZIONE E COMUNICAZIONE

È ormai un dato certo che le piante superiori non solo siano capaci di ricevere segnali dall'ambiente circostante ma che posseggano anche meccanismi atti alla rapida trasmissione di questi. Inoltre le piante sono in grado di (ri)elaborare le informazioni ottenute dall'ambiente circostante manifestando una capacità di apprendimento che implica la ricerca di uno scopo, la capacità di stimare gli errori e la presenza di meccanismi mnemonici. Le piante possono comunicare (trasmettere) tale informazione alle piante vicine. Curiosamente la presenza di erbivori che si nutrono delle parti superiori delle piante (foglie e rami) induce le radici a emettere segnali chimici basati su composti volatili che vengono recepiti dalle radici di piante limitrofe.

Esistono altri esempi di "informazioni sotterranee" scambiate tra piante vicine. L'intelligenza delle piante è strettamente connessa con la plasticità fenotipica che permette comportamenti di efficace adattamento ai continui cambiamenti dell'ambiente circostante. Il comportamento intelligente delle piante ha ovviamente lo scopo di realizzare il massimo benessere in un dato ambiente. Questi processi di apprendimento e memorizzazione sono strettamente associati alle oscillazioni ritmiche circadiane e ultracircadiane dei flussi ionici sensibili ai fattori e agli stress ambientali. Comunque il fusto di una pianta può raggiungere dimensioni considerevoli: le sequoie ad esempio sono senza dubbio gli organismi terrestri più grandi. Dimensioni così estese richiedono rapidi mezzi di comunicazione su lunghe distanze allo scopo di armonizzare le attività delle radici sotterranee e dei rami senza eccessivi ritardi.

Le piante chiaramente mancano di un centro di controllo e somigliano a colonie di insetti sociali, come le formiche. È stato proposto che il loro sviluppo

sia guidato più da una determinazione collettiva che da una pianificazione centralizzata (Sachs, 2003). In modo simile a quanto avviene nell'organizzazione degli insetti sociali (Fewell, 2003) e anche nelle reti neurali del sistema nervoso centrale (Laughlin e Sejnowski, 2003), le piante costruiscono modelli complessi di organi attraverso fenomeni su larga scala, governati da un numero limitato di processi basati su dinamiche non lineari (Sachs, 2003; Fewell, 2003; Laughlin e Sejnowski, 2003). Nella sua opera fondamentale Charles Darwin propose che gli apici radicali collocati in corrispondenza del polo anteriore della struttura (corpo vegetale) costituissero il cervello delle piante che a sua volta assomigliava al cervello diffuso (esteso) proprio degli animali inferiori (Darwin, 1880). Inoltre gli apici vegetativi e radicali in generale sono considerati rappresentare i cosiddetti "centri dominanti" che percepiscono i segnali inviati dall'ambiente circostante e gli stimoli a crescere e che comunicano insieme attraverso percorsi di segnalazione a lunga distanza (Polevoi, 2001).

Per l'appunto, in un recente articolo è stato rivelato che il sistema nervoso diffuso degli emicordati possiede una sua anatomia nonostante la mancanza di un sistema centralizzato (Lowe et al., 2003). In questo senso il sistema nervoso diffuso degli animali inferiori assomiglia molto al sistema di venature proprio delle foglie e di altri organi delle piante superiori (Sachs, 2000, 2003).

Ovviamente il sistema nervoso degli emicordati diffuso ma strutturato si è successivamente centralizzato durante l'evoluzione della linea cordata (Lowe et al., 2003; Holland, 2003). Le piante, sessili e continuamente esposte all'azione di fattori ambientali in continuo mutamento, hanno mantenuto un sistema piuttosto diffuso che meglio si adatta al loro modo di vita sessile.

Esistono numerosi esempi di *potenziali d'azione* nelle piante ed è ormai ampiamente accettato che essi siano presenti in tutte le piante, e non solo in quelle, come le insettivore, capaci di rispondere con movimenti rapidi a una sollecitazione esterna (Pickard, 1973; Simons, 1981; Goldsworthy, 1983; Davies, 1987).

Va ricordato che una fra le prime osservazioni di un potenziale d'azione (1873) fu effettuata su delle piante; essa si deve a John Burdon-Sanderson che scoprì il suddetto fenomeno bioelettrico nelle foglie di *Dionea* (Burdon-Sanderson, 1873). Il potenziale d'azione vegetale è un potenziale d'onda negativo con una forma, un'ampiezza e una lunghezza tipiche che manifesta tutte le caratteristiche specifiche dei potenziali d'azione neuronali animali: stabile velocità di propagazione, capacità di propagarsi senza perdita di intensità e infine caratteri rispondenti alla legge del tutto-o-niente (Dziubinska et al., 1983; Zawadzki, 1980; Zawadzki et al., 1991).

I potenziali d'azione vegetali ultra rapidi possono raggiungere la velocità caratteristica dei potenziali d'azione del sistema nervoso animale (Volkov et al., 2000; Labady et al., 2002; Shvetsova et al., 2002). Inoltre, in modo del tutto simile a quello delle cellule neuronali animali, i potenziali d'azione vegetali sono strettamente associati al trasferimento del calcio (Beilby, 1984; Ward et al., 1995). I potenziali d'azione vegetali possono essere indotti da ferite così come da molti stimoli ambientali: stress meccanici, temperatura, luce, gravità, e anche in risposta all'ormone vegetale, auxina (Davies e Shuster, 1981; Rhodes et al., 1996; Pickard, 1984; Davies, 1987; Wildon et al., 1992; Shimmen, 2001). Ancora, i potenziali d'azione inducono risposte morfogeniche simili a quelle dell'ormone vegetale auxina (Frachisse et al., 1985; Goldsworthy e Rathore, 1985).

Esempi classici di telecomunicazione tra piante sono quelli ricavati da ferite o attacchi patogeni. Ad esempio nel pomodoro e nella vite le ferite producono la trasduzione di sistematici segnali elettrici (Rhodes et al., 1996; Mancuso, 1999). Un altro significativo esempio di telecomunicazione nelle piante è costituito dal rapido sviluppo di resistenza sistemica acquisita (SAR) in seguito ad attacchi patogeni (Alvarez et al., 1998; Petersen et al., 2000). Una infezione locale immunizzante in una parte della pianta produce rapidamente una resistenza non specifica nei confronti del patogeno nella totalità della pianta. In aggiunta, le cellule vegetali registrano e percepiscono molti parametri fisici ambientali, quali la luce, e la gravità, e trasmettono questa informazione radialmente alle cellule adiacenti o lungo l'asse apicale-basale dell'organo vegetale in coinvolto (Tanada et al., 1980; Behrens et al., 1985; Collings et al., 1992; Fromm e Eschrich, 1993; Bischoff et al., 1997; Weisenseel e Meyer, 1997; Schütz e Furuya, 2001).

La (tele)comunicazione vegetale si basa sulla rapida propagazione di segnali elettrici (Mancuso, 1999; Shimmen et al., 2001a, 2001b) che sono spesso seguiti da rapidi cambiamenti nell'espressione genica (Wildon et al., 1992; Stankovic e Davies, 1996; Vian et al., 1996). Ciò suggerisce che i segnali elettrici possano indurre una riprogrammazione genica. Inoltre, i potenziali d'azione possono indurre il rilascio dell'ormone vegetale dello stress (legato allo stress), l'etilene (Dziubinska et al., 2003) e un antico segnale gassoso l'ossido nitrico (S. Mancuso, S. Mugnai, D. Volkmann e F. Baluška, in corso di stampa) in parti della pianta lontane e non direttamente stimulate. Sebbene i potenziali d'azione rapidi siano fenomeni ben conosciuti, non esiste ancora una spiegazione, al livello di biologia cellulare, per questa forma di comunicazione tra piante.

## LE SINAPSI VEGETALI

Sebbene la manifestazione di potenziali d'azione in diverse specie e organi vegetali fosse ampiamente accettata come vera, tuttavia è stato almeno inizialmente impossibile collegare questi fenomeni bioelettrici di comunicazione con una attività simil-nervosa nelle piante essendo quest'ultime ritenute prive di sinapsi, neuroni e cervello. Tutto ciò sembra destinato a cambiare radicalmente di fronte a quanto da noi scoperto e cioè che le *cross-walls* della zona di transizione dell'apice radicale, e probabilmente tutte le *cross-walls* per una certa estensione, hanno proprietà che (Baluška et al., 2003a, 2003b, 2003c) rispondono alla definizione recentemente rivista ed allargata di sinapsi (Dustin e Colman, 2002).

Fondamentalmente, i recenti progressi nel campo dell'immunologia cellulare hanno rivelato che le interazioni di segnale tra le cellule T e gli antigeni che rappresentano le cellule bersaglio nel sistema immunitario animale, culminano nella formazione di sinapsi immunologiche basate sull'actina, le quali, sotto molti punti di vista, assomigliano alle sinapsi neuronali (Dustin e Cooper, 2000; Das et al., 2002; Dustin e Colman, 2002; Fuller et al., 2003; Huppa et al., 2003). Per questo motivo, i suddetti autori hanno rivisto e aggiornato la definizione di sinapsi.

Secondo la nuova definizione, per sinapsi si devono intendere domini di adesione asimmetrici basati sull'actina, specializzati nella rapida comunicazione intercellulare realizzata attraverso *vesicle trafficking* (Dustin e Colman, 2002). La nostra analisi delle *cross-walls* vegetali, specialmente nella zona di transizione dell'apice radicale, rivela che queste pareti possono anche essere considerate come sinapsi basate sull'actina (Baluška et al., 2000, 2001, 2003a, 2003b, 2003c, 2004; Barlow et al., 2004; Wojtaszek et al., 2004). È interessante notare, come oltre all'actina, queste sinapsi vegetali accumulino grandi quantità della miosina di classe VIII (Baluška et al., 2000, 2003c, 2004), molecola non convenzionale, specifica delle piante, apparentemente coinvolta nella endocitosi vegetale (Baluška et al., 2004).

Se le *cross-walls* rappresentano le sinapsi vegetali, allora esiste anche il bisogno di un qualche tipo di cellula capace di funzionare come un classico neurone. Nel cervello animale, l'immobilità dei corpi cellulari neuronali richiede la produzione di numerose appendici allungate, gli assoni, che trovano le cellule partner e organizzano quindi le sinapsi neuronali nel cervello. Le cellule vegetali hanno sostanzialmente forma tubolare e tipicamente entrano in contatto le une con le altre attraverso i loro poli terminali, anche noti come *cross-walls* (sinapsi vegetali), per formare lunghe file di cellule che compon-

gono le unità base dei tessuti vegetali (Baluška et al., 2003b). Ovviamente le cellule vegetali dotate di pareti rigide (Wojtaszek et al., 2004), che garantiscono loro forme tubolari allungate (Baluška et al., 2003b), non necessitano di estendere protuberanze quali gli assoni allo scopo di trovare le cellule partner. Questo caratteristico modello di interazione tra cellule all'interno dei tessuti vegetali potrebbe rappresentare il motivo per il quale le piante non posseggono nessuna delle classiche proteine microtubolari associate (MAPS) caratteristiche dei neuroni (Lloyd e Hussey et al., 2001; Hussey et al., 2002; Meagher e Fechheimer, 2003). Una ulteriore somiglianza con le sinapsi neuronali e immunologiche (Dustin e Cooper, 2000; Dustin e Colman, 2002; Das et al., 2002; Fuller et al., 2003) consiste nel fatto che le sinapsi vegetali realizzano regolati cicli di esocitosi/endocitosi guidati dalla polimerizzazione dell'actina (Geldner et al., 2001, 2003; Grebe et al., 2003; Boonsichirai et al., 2003). È importante notare che, le sinapsi vegetali, così come quelle neuronali e immunologiche, sono particolarmente ricche di actina (Baluška et al., 1997, 2000) e un citoscheletro intatto nel suo contenuto di actina è importante per il trasporto polare dell'auxina (Muday, 2000; Muday e Murphy, 2002).

#### L'AUXINA È UNA MOLECOLA SEGNALE CHE SI COMPORTA COME UN NEUROTRASMETTITORE

Se le cellule vegetali sono interconnesse mediante contatti sinaptici specializzati nel trasferimento di segnali elettrici, allora necessitano anche di appropriati neurotrasmettitori. Sorprendentemente le piante possiedono numerosi neurotrasmettitori (Roshchina, 2001) il cui ruolo nella comunicazione intercellulare delle piante rimane tutto da esplorare. Oltre ai neurotrasmettitori classici, nelle cellule vegetali è presente l'ormone vegetale auxina, che a essi assomiglia sotto molti aspetti (Baluška et al., 2003a). Ad esempio l'auxina extracellulare è responsabile di una vasta gamma di risposte elettriche nelle piante (Cleland, 1977; Bates e Goldsmith, 1983; Vorobiev e Manusadzianas, 1983; Pickard, 1984; Goldsworthy e Rathore, 1985; Böttger e Hilgendorf, 1988; Miller e Gow 1989; Goldsworthy e Mina, 1991; Mina e Goldsworthy, 1991; Zimmermann et al., 1994). Oltre a ciò l'auxina modula l'attività di diversi canali ionici (Böttger e Hilgendorf, 1988; Zimmermann et al., 1994; Thomine et al., 1997; Becker e Hedrich, 2002) essenziali per la propagazione dei segnali elettrici (Ward et al., 1995) e nella conservazione delle altre proprietà della membrana plasmatica (vedi per es. Zbell e Walter-Back, 1988).

L'auxina è responsabile anche delle oscillazioni del calcio citosolico libero e del pH (Felle, 1998) e la risposta elettrica della membrana plasmatica all'auxina esterna suggerisce un diretto coinvolgimento dell' $H^+$ -ATPase della membrana plasmatica (Felle et al., 1991).

L'auxina attiva l' $H^+$ -ATPase della membrana plasmatica (Kinoshita e Shimazaki, 1999) e promuove trasferimenti di ioni calcio simili a quelli indotti dalla gravistimolazione, mentre al contrario gli inibitori del trasporto auxinico quali l'NPA ed il TIBA interferiscono con le risposte indotte dalla gravità che coinvolgono ioni calcio (Plieth & Trewavas, 2002).

È importante sottolineare che il trasporto auxinico è sensibilmente modulato dalla gravità (Friml et al., 2002a; Ottenshläger et al., 2003) così come da molti altri fattori ambientali (Schrader et al., 2003).

In accordo con l'idea che la modalità di trasporto e il funzionamento della auxina siano simili a quelli dei neurotrasmettitori, il trasferimento dell'auxina è fortemente influenzato dalle sostanze actiniche (Muday, 2000; Muday & Murphy, 2002) ma non da quelle che agiscono sui microtubuli (Hasenstein et al., 1999).

Lo stimolo elettrico di crescita e polarità delle cellule vegetali richiede la presenza di auxina esogena (Goldsworthy e Rathore, 1985). A tale riguardo, l'auxina svolge gran parte delle sue sollecitazioni sulle cellule vegetali agendo dall'esterno (Diekmann et al., 1995; Tian et al., 1995; Steffens et al., 2001) e ciò implica il coinvolgimento del suo presunto recettore, la proteina 1 che lega l'auxina ( $ABP_1$ ), la cui localizzazione non è stata ancora chiarita (Rück et al., 1993; Diekmann et al., 1995; Baulny et al., 2000; Steffens et al., 2001; Napier et al., 2002).

È importante notare che l' $ABP_1$  è evidentemente essenziale per l'assemblaggio e il corretto mantenimento delle sinapsi vegetali poiché sia la mutazione dell' $ABP_1$  in *Arabidopsis thaliana* che la soppressione antisense dell' $ABP_1$  nelle cellule di tabacco BY-2 hanno come risultato la formazione di *cross-wall* (sinapsi vegetali) aberranti e di file irregolari di cellule (Chen et al., 2001). Questi esempi confermano la bontà del modello simil-neurotrasmettitore per l'auxina e il suo sistema di trasporto (Baluška et al., 2003a, Barlow et al., 2004). Così l'auxina oltre alle sue proprietà di simil-ormone e simil-morfogene (Jones, 1998; Friml, 2003; Bhalerao e Bennett, 2003), esibisce anche un comportamento da simil-neurotrasmettitore con comportamenti del tutto simili a quelli del neurotrasmettitore glutammato nelle sinapsi neuronali (Baluška et al., 2003a).

Un importante elemento a sostegno del fatto che l'auxina si comporta come un neurotrasmettitore deriva dagli studi sperimentali sul trasporto po-

lare nel cambio (Wodzicki, 1993; Wodzicki e Wodzicki, 1981; Wodzicki et al., 1979, 1999). Questi autori hanno mostrato come l'applicazione esterna dell'auxina sulle parti apicali dei segmenti del cambio induca un efflusso "a onda" (ondulatorio) di auxina dalla parte basale di questi segmenti. Stranamente la velocità di propagazione di questo segnale indotto dall'auxina è molte più veloce dello stesso trasporto di auxina e può essere propagato anche contro la direzione principale del trasporto polare dell'auxina. L'importanza vitale dell'auxina per l'esistenza stessa delle piante, correlata alla sua natura simil-neurale oltre alle sue proprietà di ormone e morfogene è evidenziata anche dai dati che rivelano la natura molto antica di questa, piccola ma estremamente potente, molecola di segnalazione (Cooke et al., 2002, 2003; Poli et al., 2003).

Particolarmente interessante è la similarità fra la struttura dell'IAA e alcuni importanti neurotrasmettitori animali come la serotonina o la melatonina con cui l'acido indolacetico condivide gran parte del ciclo biosintetico (fig. 2).

Recentemente la messa a punto di un nuovo microelettrodo sensibile nei confronti dell'IAA ci ha permesso di costruire delle mappe "topografiche" dei flussi di IAA all'interno dell'apice radicale (Mancuso et al., 2005). La zona di transizione della radice è apparsa come la regione più interessata dai flussi

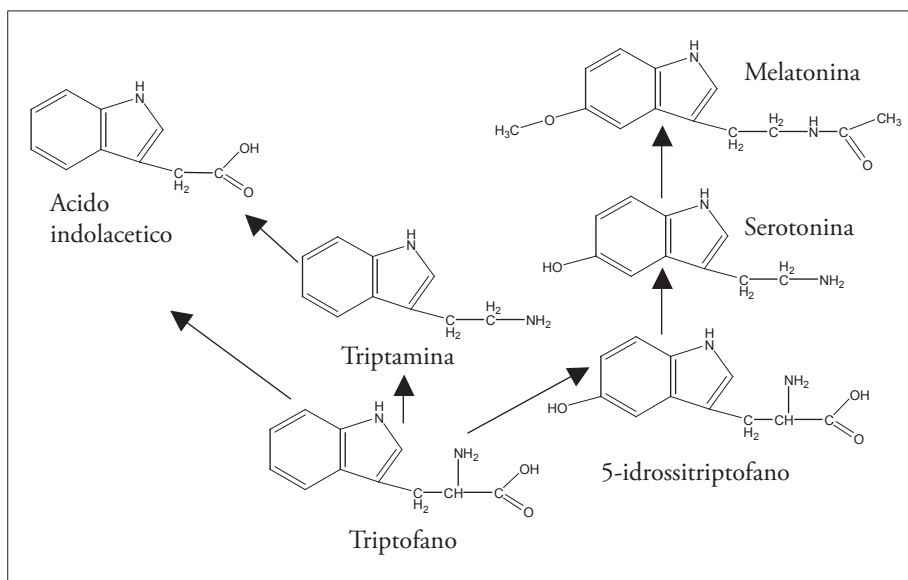


Fig. 2 Ciclo biosintetico dell'acido indolacetico (IAA) e di due importanti neurotrasmettitori: la serotonina e la melatonina

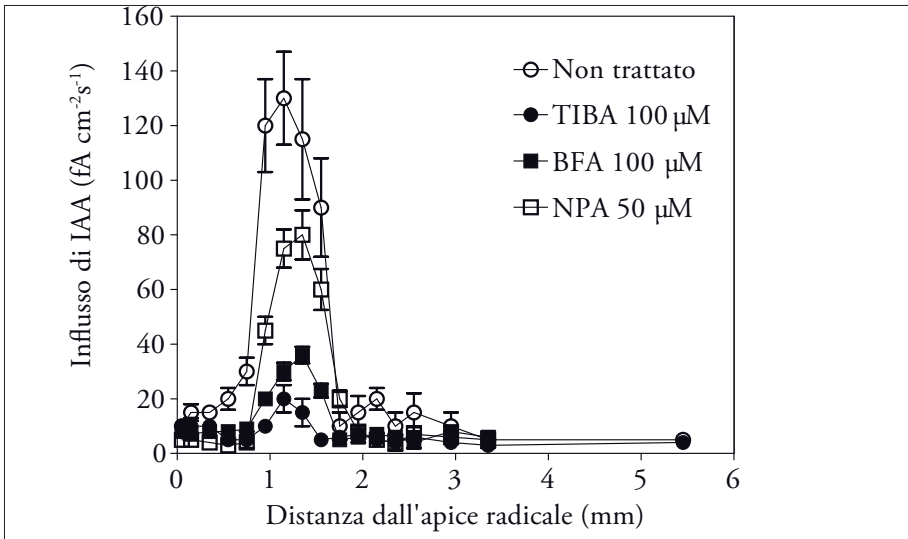


Fig. 3 *Profilo dell'influsso di IAA lungo una singola radice a diverse distanze dall'apice ed effetto di inibitori del trasporto auxinico (TIBA, BFA e NPA)*

auxinici con influssi di IAA fino a 7-8 volte superiori rispetto alle regioni limitrofe (fig. 3).

#### GLI APICI RADICALI AGISCONO COME CENTRI DI COMANDO NELLE PIANTE

Come già ricordato nell'introduzione, Charles Darwin fu il primo a proporre che un cervello vegetale diffuso fosse localizzato all'interno degli apici radicali in corrispondenza del "polo" anteriore del corpo vegetale (Darwin, 1880). I nostri risultati preliminari sono pienamente in accordo con questa, al tempo puramente speculativa, asserzione. Intuitivamente esistono molte buone ragioni perché nel corso dell'evoluzione le piante abbiano sviluppato i loro tessuti simil-celebrali negli apici radicali sepolti in profondità nella terra. Prima di tutto il suolo rappresenta un ambiente molto più stabile in confronto all'aria sia in termini di temperatura che di umidità ed è protetto dall'ozono atmosferico così come dalla radiazione UV solare. Inoltre in tal modo le radici sono protette dagli attacchi di animali che si nutrono di piante. Infine, lo *stem-pole* (il polo corrispondente al fusto) del corpo vegetale (la sua estremità posteriore) porta gli organi sessuali di riproduzione, mentre l'opposto polo radicale (l'estremità anteriore) è coerentemente il luogo delle attività simil-neurali (fig. 4).



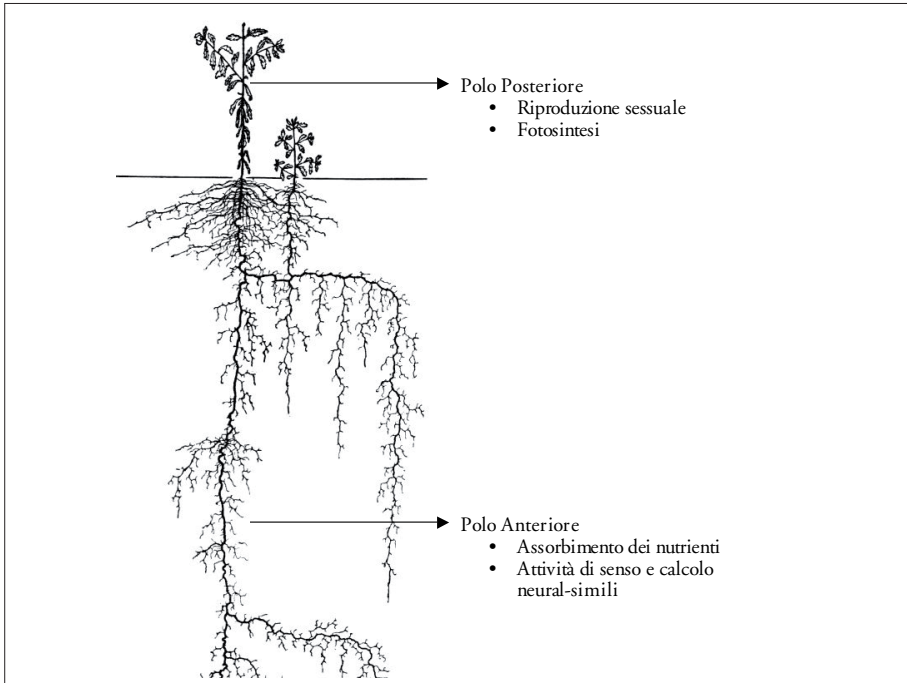


Fig. 4 *Rappresentazione della differenziazione nelle piante, secondo Darwin, fra il polo anteriore sede delle attività di calcolo e il polo posteriore sede della riproduzione sessuale*

È importante ricordare che gli apici radicali sono costituiti da tre zone distinte (fig. 5), l'interazione tra le quali garantisce l'efficace esplorazione del suolo alla ricerca sia dei nutrienti che dell'acqua.

Sotto questo aspetto è interessante osservare come una singola mutazione nel locus *TOPLESS* sia in grado di promuovere la trasformazione degli apici dei germogli in apici radicali in embrioni di *Arabidopsis*. L'elongazione delle cellule radicali è molto più rapida di quella delle cellule dei germogli e questa peculiarità non consente nessuna divisione cellulare nella zona di rapida elongazione. Al contrario nelle cellule dei germogli la divisione e l'elongazione cellulare si verificano contemporaneamente. La netta distinzione tra le regioni di divisione ed elongazione negli apici radicali ci consente di identificare una regione, detta zona di transizione, interposta tra le suddette e più note regioni apicali. Le cellule di questa zona di transizione mostrano una singolare (cito)architettura, con i nuclei in posizione centrale, circondati da microtubuli perinucleari che si irradiano verso le zone cellulari periferiche. Noi supponiamo che questa configurazione sia perfettamente adeguata sia per la percezione che per la trasmissione di segnali da e verso i nuclei. Poiché

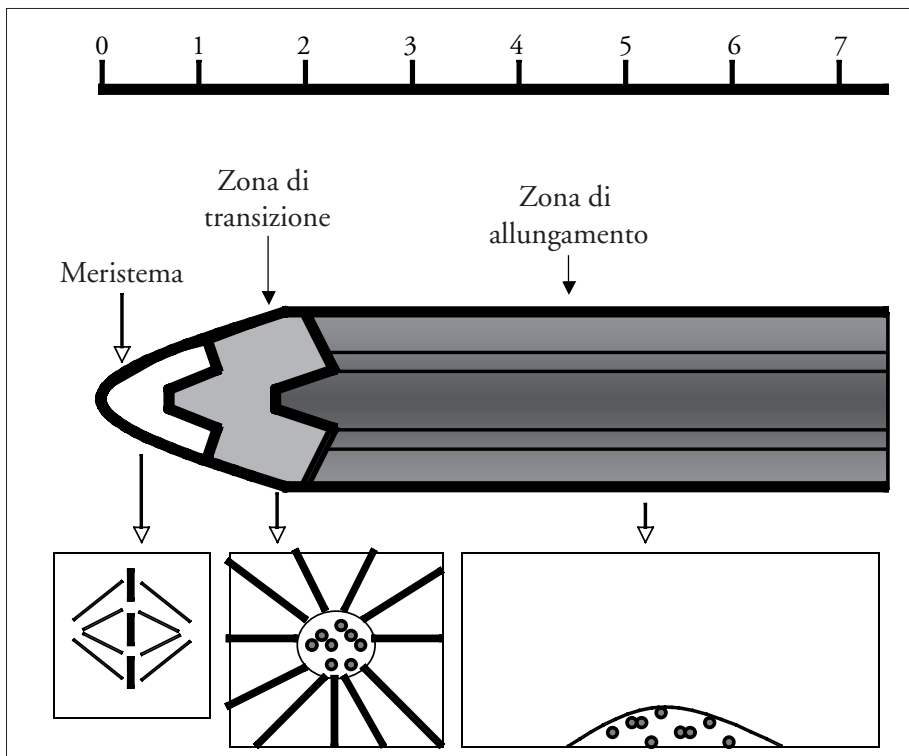


Fig. 5 *Rappresentazione schematica delle diverse regioni anatomiche dell'apice radicale*

a queste cellule non sono richiesti ardui compiti come la divisione cellulare o la rapida elongazione cellulare, esse possono impiegare tutte le loro risorse nella percezione e nella elaborazione dei segnali ricevuti dall'ambiente. È interessante osservare che gli apici radicali si comportano come siti per la percezione dello stimolo del freddo (Goulas et al., 2003) così come della siccità (Blake e Ferrell, 1977), e trasmettano queste informazioni alle parti aeree della pianta e agli apici vegetativi (Chamberlain et al., 2001; Dicke e Dijkman, 2001).

A sostegno dell'idea di apici radicali che ospitano tessuti vegetali simil-neurali, è accertato che il trasporto polare dell'auxina si realizza attraverso percorsi molto complessi all'interno degli apici radicali, con le cuffie radicali che fungono da centri di redistribuzione (Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2002a, 2002b). Inoltre la massima concentrazione di auxina (Sabatini et al., 1999; Jiang e Feldman, 2003) è localizzata in corrispondenza del centro di quiescenza e degli statociti della cuffia radicale. È importante sottoli-

neare che questa massima concentrazione di auxina risponde alla gravistimolazione (Rashotte et al., 2001; Ottenshläger et al., 2003; Boonsirichai et al., 2003) e alla esposizione ad auxina extracellulare (Ottenshläger et al., 2003). Per quanto riguarda questo secondo aspetto, livelli anche minimi di auxina esterna applicata alle radici inibiscono la crescita mentre livelli molto maggiori di auxina stimolano la crescita dei tessuti vegetali del fusto e delle foglie. L'auxina esterna induce anche una significativa ridistribuzione dei microtubuli corticali (Blancaflor e Hasenstein, 1995; Baluška et al., 1996b). Risposte simili da parte dei microtubuli sono state osservate anche in seguito a esposizione degli apici radicali al glutammato ed è stato provato che i recettori glutammato sono fondamentali per questa risposta (Sivaguru et al., 2003). Inoltre, i cationi alluminio, tossici per i neuroni (Deleers et al., 1986; Trombley, 1998), mimano l'azione del glutammato e inibiscono il trasporto basipeto dell'auxina (Kollmeier et al., 2000). I flussi di ioni calcio controllati dal glutammato sono piuttosto consistenti negli apici radicali al contrario di quanto avviene nelle foglie e nei cotiledoni dove i flussi di ioni calcio mostrano di essere poco influenzati dal glutammato esterno (Dennison e Spalding, 2000). Cosa ancora più importante, la parte distale della zona di transizione rappresenta la porzione dell'intera pianta (Sivaguru et al., 1998, 1999; Kollmeier et al., 2000) più sensibile all'alluminio ed è anche nota come la parte della radice più sensibile nei confronti dell'auxina e degli ioni calcio esogeni (Ishikawa e Evans, 1992, 1993; Baluška et al., 1996a, 1996b). È interessante notare come le cellule della porzione distale della zona di transizione rispondano alla esposizione all'alluminio inibendo l'attività respiratoria, riducendo l'ATP e producendo specie ossigenate reattive (ROS) (Yamamoto et al., 2002, 2003; Boscolo et al., 2003).

L'elevata sensibilità mostrato dagli apici radicali nei confronti dell'auxina è coerente con il cospicuo numero di sinapsi in essi presenti, e in particolare nella zona di transizione che si comporta come un tessuto simil-neurale. Infatti la zona di transizione risulta essere una zona cruciale dal punto di vista sensorio, ricevendo e rispondendo a una vasta gamma di segnali esterni e di sollecitazioni alla crescita (Baluška et al., 1994, 2001). La suddivisione in zone degli apici radicali in attiva crescita (Baluška et al., 1994, 2001) permette la sincronizzazione delle attività cellulari e delle risposte elettriche. Proprio come il cervello, essa rappresenta il più ampio serbatoio di ossigeno e mostra oscillazioni ritmiche (fig. 6) nell'assorbimento di ossigeno, potassio e calcio (Mancuso et al., 2005). Tale comportamento di cellule radicali anatomicamente raggruppate riflette il modello sincrono e oscillatorio dei

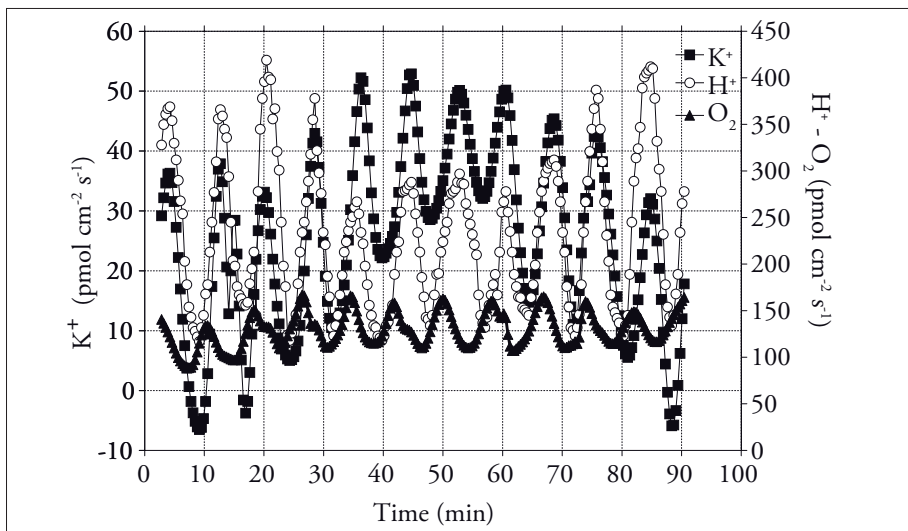


Fig. 6 *Andamento ritmico dei flussi di  $K^+$ ,  $H^+$  e  $O_2$  nella zona di transizione dell'apice radicale*

neuroni anatomicamente raggruppati che governano la rete sensi-motoria nel cervello (Engel et al., 2001; Harris et al., 2003). Se alcune di queste proprietà fisiche oscillatorie fossero accoppiate al controllo della crescita cellulare, allora esse potrebbero essere correlate ai movimenti nutazionali delle radici (Barlow et al., 1994; Shabala e Newman, 1997b). È importante notare che studi preliminari da noi condotti rivelano come le oscillazioni ritmiche dell'assorbimento di ossigeno nella zona di transizione di apici radicali di mais rispondono con estrema rapidità (entro pochi secondi) alla gravistimolazione (fig. 7) (Mancuso et al., 2005) così come alle ferite e ad altri stress applicati in modo selettivo agli apici vegetativi delle giovani piante di mais (Mancuso et al., dati non pubblicati). Misure effettuate a livello di singole cellule radicali mostrano come un incremento dell'assorbimento di ossigeno si verifichi quasi subito, con un tempo di induzione di 2-3 secondi, dopo l'arrivo di un potenziale d'azione prodotto dalla stimolazione locale dell'apice radicale. Questa situazione è quasi identica a quella registrata per i singoli neuroni nel cervello animale (Thompson et al., 2003). Comunque, quali processi cellulari regolino questa rapida trasmissione di segnali tra gli apici vegetativi (dei germogli) e quelli radicali, responsabile della risposta quasi immediata da parte delle cellule della zona di transizione degli apici radicali e se le piante posseggano tessuti deputati a ciò, sono domande cru-

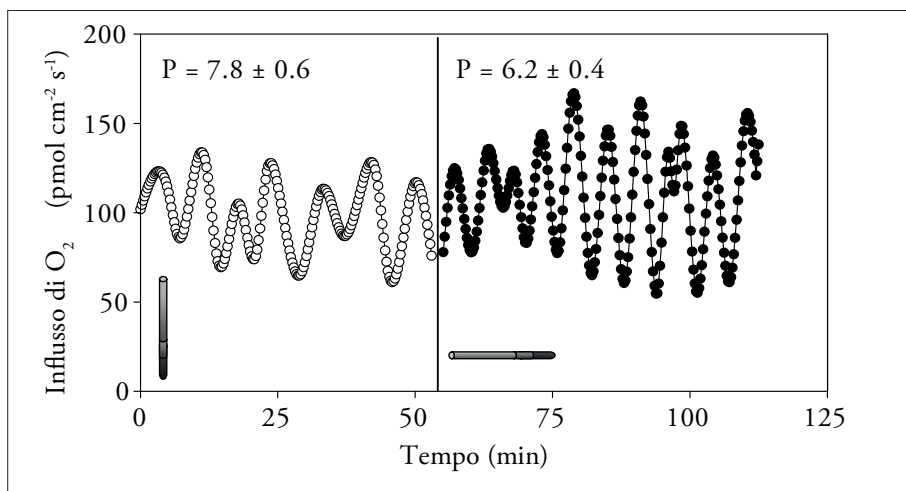


Fig. 7 *Variazione nel periodo delle oscillazioni del flusso di ossigeno, nella zona di transizione di radici sottoposte a gravistimolazione*

ciali ancora prive di risposta.

#### PREVISIONI

Questa visione d'insieme dei dati concernenti gli aspetti cognitivi delle piante superiori chiarisce il fatto che sebbene le piante siano immobili in senso generale e manchino delle più ovvie attività cerebrali possedute dagli animali e dall'uomo, tuttavia esse sono in grado di esibire attributi di un comportamento intelligente oltre che essere dotate di molecole "nervose", come le sinaptogamine, ed i recettori glutammato controllati dal sistema glutammato/glicina, che potrebbero sostenere una comunicazione intercellulare simil-sinaptica nelle piante. Senza dubbio, i recenti sviluppi nel campo della biologia cellulare vegetale hanno permesso l'identificazione di sinapsi vegetali (Baluška et al., 2003b, 2003c; Barlow et al. 2004), che costituiscono un dato innovativo nella biologia del sistema nervoso vegetale.

Sono necessari approfondimenti sulle molecole che agiscono da simil-neurotrasmettitori vegetali e sui loro recettori. Gli studi futuri dovranno essere mirati alla maggiore comprensione delle sinapsi vegetali e del carattere simil-nervoso del tessuto vascolare. La biologia cellulare e molecolare dovrebbe rivelare quali siano le molecole che regolano la costruzione ed il mantenimento delle sinapsi vegetali, mentre l'elettrofisiologia dovrebbe cercare di spiegare l'impatto dei sistemi di segnalazione sulla comunicazione sinaptica intercel-

lulare nelle piante. Gli attuali sviluppi metodologici nella biologia cellulare vegetale offre eccellenti prospettive per il raggiungimento di questi obiettivi. Ci attendono tempi emozionanti nei quali la scienza vegetale sarà rivoluzionata. Ciò porterà a un maggiore apprezzamento del regno vegetale e metterà in evidenza le caratteristiche comuni che legano insieme la comunità degli organismi viventi.

## BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ M. E., PENNELL R. I., MEIJER P. -J., ISHIKAWA A., DIXON R. A. & LAMB C. (1998): *Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity*, «Cell», 92, pp. 773-784.
- BALUŠKA F., BARLOW P. W. & KUBICA Š. (1994): *Importance of the post-mitotic 'isodiametric' growth (PIG) region for growth and development of roots*, «Plant & Soil», 167, pp. 31-42.
- BALUŠKA F., BARLOW P. W. & VOLKMANN D. (1996a): *Complete disintegration of the microtubular cytoskeleton precedes its auxin-mediated reconstruction in postmitotic maize root cells*, «Plant Cell Physiol», 37, pp. 1013-1021.
- BALUŠKA F., BARLOW P. W. & VOLKMANN D. (1996b): *Root cap mucilage and extracellular calcium as modulators of cellular growth in postmitotic growth zones of the maize root apex*, «Bot. Acta», 109, pp. 25-34.
- BALUŠKA F., BARLOW P. W. & VOLKMANN D. (2000): *Actin and myosin VIII in developing root cells*, in: *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*, Staiger CJ, Baluška F, Volkmann D, Barlow PW (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 457-476.
- BALUŠKA F., ŠAMAJ J. & MENZEL D. (2003a): *Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion?* «Trends Cell Biol», 13, pp. 282-285.
- BALUŠKA F., ŠAMAJ J., HLAVACKA A., KENDRICK-JONES J. & VOLKMANN D. (2003c): *Actin-dependent fluid-phase endocytosis in inner cortex cells of maize root apices*, «J. Exp. Bot.», in corso di pubblicazione.
- BALUŠKA F., ŠAMAJ J., WOJTASZEK P., VOLKMANN D. & MENZEL D. (2003d): *Cytoskeleton – plasma membrane – cell wall continuum: emerging links revisited*, «Plant Physiol», 136, pp. 482-491.
- BALUŠKA F., VOLKMANN D. & BARLOW P. W. (2001): *A polarity crossroad in the transition growth zone of maize root apices: cytoskeletal and developmental implications*, «J. Plant Growth Regul», 20, pp. 170-181.
- BALUŠKA F., WOJTASZEK P., VOLKMANN D. & BARLOW P. W. (2003b): *The architecture of polarized cell growth: the unique status of elongating plant cells*, «BioEssays», 25, pp. 569-576.
- BARLOW P. W., VOLKMANN D. & BALUŠKA F. (2004): *Polarity in roots: tubulin-based cell bodies and actin-based plant synapses direct polar auxin transport and polarised development*, in: Lindsey K (ed), *Polarity in Plants*, Blackwell, Oxford, UK, in corso di pubblicazione.
- BARLOW P.W. (1999): *Living plant systems: How robust are they in the absence of gravity?* «Adv. Space Res.», 23/12, pp. 1975-1986.
- BATES G. W. & GOLDSMITH M. H. M. (1983): *Rapid response of the plasma membrane*

- potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids*, «Planta», 159, pp. 231-237.
- BAULY J. M., SEALY I. M., MACDONALD H., BREARLEY J., DROGE S., HILLMER S., ROBINSON D. G., VENIS M. A., BLATT M. R., LAZARUS C. M. & NAPIER R. M. (2000): *Ove-rexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin*, «Plant Physiol», 124, pp. 1229-1238.
- BECKER D. & HEDRICH R. (2002): *Channelling auxin action: modulation of ion transport by indole-3-acetic acid*, «Plant Molec. Biol.», 49, pp. 349-356.
- BEHRENS H. M., GRADMANN D. & SIEVERS A. (1985): *Membrane-potential responses following gravistimulation in roots of *Lepidium sativum* L.* «Planta», 163, pp. 463-472.
- BEILBY M. J. (1984): *Calcium and plant action potential*, «Plant Cell Environm», 7, pp. 415-421.
- BISCHOFF F., MILLAR A. J., KAY S. A. & FURUYA M. (1997): *Phytochrome-induced inter-cellular signalling activates cab::luciferase gene expression*, «Plant J.», 12, pp. 839-849.
- BOONSICHIRAI K., SEDBROOK J. C., CHEN R., GILROY S. & MASSON P. H. (2003): *ARG1 is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes*, «Plant Cell», 14, in press.
- BOSE J. C. (1926): *The Nervous Mechanism of Plants*, Langmans, Green and Company, London, New York.
- BOSSEN M. E., TRETYN A., KENDRICK R. E. & VREDENBERG W. J. (1991): *Comparison between swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts induced by phytochrome and  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, benzylaminopurine, gibberellic acid, abscisic acid and acetylcholine*, «J. Plant Physiol», 137, pp. 706-710.
- BRENNER E. D., MARTINEZ-BARBOZA N., CLARK A. P., LIANG Q. S., STEVENSON D. W. & CORRUZZI G. M. (2000): *Arabidopsis mutants resistant to  $S(+)$ - $\beta$ -methyl- $\alpha,\beta$ -diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist*, «Plant Physiol», 124, pp. 1615-1625.
- BURDON-SANDERSON J. (1973): *Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionea muscipula* in the excited and unexcited states*, «Proc. R. Soc. Lond.», 21, pp. 491-496.
- CHEN J. -G., ULLAH H., YOUNG J. C., SUSSMAN M. R. & JONES A. M. (2001): *ABPI is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis*, «Genes Dev», 15, pp. 902-911.
- CLELAND R. E., PRINS H. B. A., HARPER J. R. & HIGINBOTHAM N. (1977): *Rapid hormone-induced hyperpolarization of the oat coleoptile transmembrane potential*, «Plant Physiol», 59, pp. 395-397.
- COLLINGS D. A., WHITE R. G. & OVERALL R. L. 1992. *Ionic current changes associated with the gravity-induced bending response in roots of *Zea mays* L.* «Plant Physiol», 100, pp. 1417-1426.
- DARWIN C. (1880): *The Power of Movements in Plants* (assisted by FRANCIS DARWIN), John Murray, London.
- DAS V., NAL B., ROUMIER A., MEAS-YEDID V., ZIMMER C., OLIVO-MARIN J. -C., ROUX P., DAUTRY-VARSAT A. & ALCOVER A. (2002): *Membrane – cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation*, «Immunol. Rev.», 189, pp. 123-135.
- DAVIES E. & SCHUSTER A. (1981): *Intercellular communication in plants: evidence for a rapidly generated, bidirectionally transmitted wound signal*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 78, pp. 2422-2426.
- DAVIES E. (1987): *Action potentials as multifunctional signals in plants: a unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses*, «Plant Cell Environm», 10, pp.



- 623-631.
- DIEKMANN W., VENIS M. A. & ROBINSON D. G. (1995): *Auxins induce clustering of auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 92, pp. 3425-3429.
- DUSTIN M. L. & COLMAN D. R. (2002): *Neural and immunological synaptic relations*, «Science», 298, pp. 785-789.
- DUSTIN M. L. & COOPER J. A. (2000): *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*, «Nat. Immunol.», 1, pp. 23-29.
- DZIUBINSKA H., FILEK M., KOSCIELNIAK J. & TREBACZ K. (2003): *Variation and action potentials evoked by thermal stimuli accompany enhancement of ethylene emission in distant non-stimulated leaves of Vicia faba minor seedlings*, «J. Plant Physiol.», 160, pp. 1203-1210.
- DZIUBINSKA H., PASZEWSKI A., TREBACZ K. & ZAWADZKI T. (1983): *Electrical activity of the liverwort Conocephalum conicum: the all-or-nothing law, strength-duration relation, refractory periods and intracellular potentials*, «Physiol Plant.», 57, pp. 279-284.
- ENGEL A. K., FRIES P. & SINGER W. (2001): *Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing*, «Nat. Rev. Neurosci.», 2, pp. 704-716.
- FELLE H., PETERS W. & PALME K. (1991): *The electrical response of maize to auxins*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1064, pp. 199-204.
- FEWELL J. H. (2003): *Social insects networks*, «Science», 301, pp. 1867-1870.
- FRACHISSE J. -M., DESBIEZ M. -O. & THELLIER M. (1985): *Transmission of a traumatic signal via a wave of electric depolarization, and induction of correlations between the cotyledonary buds in Bidens pilosus*, «Physiol Plant», 64, pp. 48-52.
- FRIML J. (2003): *Auxin transport – shaping the plant*, «Curr. Opin. Plant Biol.», 6, pp. 7-12.
- FRIML J., BENKOVÁ E., BLILOU I., WISNIEWSKA J., HAMANN T., LIUNG K., WOODY S., SANDBERG G., SCHERES B., JÜRGENS G. & PALNE K. (2002b): *AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis*, «Cell», 108, pp. 661-673.
- FRIML J., WISNIEWSKA J., BENKOVÁ E., MEDGEN K. & PALME K. (2002a): *Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis*, «Nature», 415, pp. 806-809.
- FROMM J. & ESCHRICHT W. (1993): *Electric signals released from roots of willow (Salix viminalis L.) change transpiration and photosynthesis*, «J. Plant Physiol.», 141, pp. 673-680.
- FULLER C. L., BRACIALE V. L. & SAMELSON L. E. (2003): *All roads lead to actin: the intimate relationship between TCR signaling and the cytoskeleton*, «Immunol. Rev.», 191, pp. 220-236.
- GARTZKE J., LANGE K. (2002): *Cellular target of weak magnetic fields: ionic conduction along actin filaments of microvilli*, «Am. J. Physiol. Cell Physiol.», 283, pp. C1333-C1346.
- GELDNER N., ANDERS N., WOLTERS H., KEICHER J., KORNBERGER W., MÜLLER P., DELBARRE A., UEDA T., NAKANO A. & JÜRGENS G. (2003): *The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth*, «Cell», 112, pp. 219-230.
- GELDNER N., FRIML J., STIERHOF Y. D., JÜRGENS G. & PALME K. (2001): *Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking*, «Nature», 413, pp. 425-428.
- GERKE V. & MOSS S. E. (2002): *Annexins: from structure to function*, «Physiol. Rev.», 82, pp. 331-371.
- GOH C. -H., NAM H. G. & PARK Y. S. (2003): *Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of rd22 gene to light in abscisic acid-entrained Arabidopsis plants*, «Plant J.», 36, in corso di pubblicazione.



- GOLDSWORTHY A. & MINA M. G. (1991): *Electrical patterns of tobacco cells in media containing indole-3-acetic acid or 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid*, «Planta», 183, pp. 368-373.
- GOLDSWORTHY A. & RATHORE K. S. (1985): *The electrical control of growth in plant tissue cultures: the polar transport of auxin*, «J. Exp. Bot.», 36, pp. 1134-1141.
- GOLDSWORTHY A. (1983): *The evolution of plant action potentials*, «J. Theor. Biol.», 103, pp. 645-648.
- GOULAS E., DILY F. L. & OURRY A. (2003): *Effects of a cold treatment of the root system on white clover (Trifolium repens L.) morphogenesis and nitrogen reserve accumulation*. «J. Plant Physiol.», 160, pp. 893-902.
- GREBE M., XU J., MÖBIUS W., UEDA T., NAKANO A., GEUZE H. J., ROOK M. B. & SCHERES B. (2003): *Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes*. «Curr. Biol.», 13, pp. 1378-1387.
- HARRIS H. (1999): *The Birth Of The Cell*, Yale University Press, New Haven and London.
- HARRIS K. D., CSICSVARI J., HIRASE H., DRAGOI G. & BUSZÁKI G. (2003): *Organization of cell assemblies in the hippocampus*, «Nature», 424, pp. 552-556.
- HOLLAND N. D. (2003): *Early central nervous system evolution: an era of skin brains?*, «Nat. Rev. Neurosci.», 4, pp. 1-11.
- HUA J., GRISAFI P., CHENG S. -H. & FINK G. R. (2001): *Plant growth homeostasis is controlled by the Arabidopsis BON1 and BAP1 genes*, «Genes Dev.», 15, pp. 2263-2272.
- HUPPA J. B., GLEIMER M., SUMEN C. & DAVIS M. M. (2003): *Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full receptor activation*, «Nat. Immunol.», 4, pp. 749-755.
- HUSSEY P. J., HAWKINS T. J., IGARASHI H., KALORITI D. & SMERTENKO A. (2002): *The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the Xenopus MAP215-like protein, MOR1*, «Plant Molec. Biol.», 50, pp. 915-924.
- ISHIKAWA H. & EVANS M. L. (1992): *Induction of curvature in maize roots by calcium or by thigmostimulation. Role of the postmitotic isodiametric growth zone*, «Plant Physiol.», 100, pp. 762-768.
- ISHIKAWA H. & EVANS M. L. (1993): *The role of the distal elongation zone in response of maize roots to auxin and gravity*, «Plant Physiol.», 102, pp. 1203-1210.
- JAMBUNATHAN N., SIANI J. M. & McNELLIS T. W. (2001): *A humidity-sensitive Arabidopsis copine mutant exhibits precocious death and increased disease resistance*, «Plant Cell», 13, pp. 2225-2240.
- JIANG K. & FELDMAN L. J. (2003): *Root meristem establishment and maintenance: the role of auxin*, «J. Plant Growth. Regul.», 21, pp. 432-440.
- JONES A. M. (1998): *Auxin transport: down and out and up again*, «Science», 282, pp. 2201-2202.
- KINOSHITA T. & SHIMAZAKI K. (1999): *Blue light activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-AT-Pase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells*, «EMBO J.», 18, pp. 5548-5558.
- KOLLMEIER M., FELLE H. H. & HORST W. J. (2000): *Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum?*, «Plant Physiol.», 122, pp. 945-956.
- LAUGHLIN S. B. & SEJNOWSKI T. J. (2003): *Communication in neuronal networks*, «Science», 301, pp. 1870-1874.
- LLOYD C. W. & HUSSEY P. J. (2001): *Microtubule-associated proteins in plants – why we*

- need a MAP, «Nat. Rev. Mol. Cell Biol.», 2, pp. 40-47.
- LONG J. A., WOODY S., POETHING S., MEYEROWITZ E. M. & BARTON M. K. (2002): *Transformation of shoots into roots in Arabidopsis embryos mutant at the TOPLESS locus*, «Development», 129, pp. 2297-2306.
- LOVE C., WU M., SALIC A., EVANS L., LANDER E., STANGE-THOMANN N., GRUBER C. E., GERHART J. & KIRSCHNER M. (2003): *Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system*, «Cell», 113, pp. 853-865.
- MANCUSO S. (1999): *Hydraulic and electrical transmission of wound-induced signals in Vitis vinifera*, «Aust. J. Plant Physiol.», 26, pp. 55-61.
- MANCUSO S., MARRAS A.M., VOLKER M., BALUŠKA F. (2005): *Non-invasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon-nanotube-modified and self-referencing microelectrode*, «Anal. Biochem», 341, pp. 344-351.
- MANCUSO S., MUGNAI S., AZZARELLO E., SCHICK A., BALUŠKA F., VOLKMANN D. (2005): *Gravity-regulated oxygen uptake in root apices*, «International Botanical Congress», Vienna July 13 to July 20, 2005
- MANCUSO S., SHABALA S., SHABALA L., GRADMANN D., CHEN Z., NEWMAN I. (2005): *Oscillations in plant membrane-transport activity: model predictions, experimental validation, and physiological implications*, «J. Exp. Bot.», in corso di pubblicazione.
- MEAGHER R. B. & FECHHEIMER M. (2003): *The Arabidopsis cytoskeletal genome*, in *The Arabidopsis Book*, Meyerowitz, E. M. & Somerville, C. R. (eds.), American Society of Plant Biologists (<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>).
- MILLER A. L. & GOW N. A. R. (1989): *Correlation between root-generated ionic currents, pH, fusicoicin, indoleacetic acid, and growth of the primary root of Zea mays*, «Plant Physiol.», 89, pp. 1198-1206.
- MINA M. G. & GOLDSWORTHY A. (1991): *Changes in the electrical polarity of tobacco cells following the application of weak external currents*, «Planta», 186, pp. 104-108.
- MOMONOKI Y. S. (1992): *Occurrence of acetylcholine-hydrolyzing activity at the stele-cortex interface*, «Plant Physiol.», 99, pp. 130-133.
- OTTENSCHLÄGER I., WOLFF P., WOLVERTON C., BHALERAO R. P., SANDBERG G., ISHIKAWA H., EVANS M. & PLAME K. (2003): *Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 100, pp. 2987-2991.
- PETERSEN M., BRODERSEN P., NÆSTED H., ANDREASSON E., LINDHART U., JOHANSEN B., NIELSEN H. B., LACY M., AUSTIN M. J., PARKER J. E., SHARMA S. B., KLESSIG D. F., MARTIENSSSEN R., MATTSOON O., JENSEN A. B. & MUNDY J. (2000): *Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance*, «Cell», 103, pp. 1111-1120.
- PICKARD B. G. (1973): *Action potentials in higher plants*, «Bot. Rev.», 39, pp. 172-201.
- PICKARD B. G. (1984): *Voltage transients elicited by sudden step-up of auxin*, «Plant Cell Environm.», 7, pp. 171-178.
- PLIETH C. & TREWAVAS A. J. (2002): *Reorientation of seedlings in the earth's gravitational field induces cytosolic calcium transients*, «Plant Physiol.», 129, pp. 786-796.
- RASHOTTE A. M., DELONG A. & MUDAY G. K. (2001): *Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth*, «Plant Cell», 13, pp. 1683-1697.
- RHODES J. D., THAIN J. F. & WILDON D. C. (1996): *The pathway for systemic electrical signal conduction in the wounded tomato plant*, «Planta», 200, pp. 50-57.
- RÜCK A., PALME K., VENIS M. A., NAPIER R. M. & FELLE H. (1993): *Patch-clamp analysis*

- establishes a role for an auxin binding protein in the auxin stimulation of the plasma membrane current in Zea mays protoplasts*, «Plant J.», 4, pp. 41-46.
- SABATINI S., BEIS D., WOLKENFELT H., MURFETT J., GUILFOYLE T., MALAMY J., BENFEY P., LEYSER O., BECHTOLD N., WEISBEEK P. & SCHERES B. (1999): *An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root*, «Cell», 99, pp. 463-472.
- SACHS T. (2003): *Collective specification of cellular development*, «BioEssays», 25, pp. 897-903.
- SCHRADER J., BABA K., MAY S. T., PALME K., BENNETT M., BHALERAO R. P. & SANDBERG G. (2003): *Polar auxin transport in the wood-forming tissues of hybrid aspen is under simultaneous control of developmental and environmental signals*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 100, pp. 10096-10101.
- SCHÜTZ I. & FURUYA M. (2001): *Evidence for type II phytochrome-induced signalling leading to cab::luciferase gene expression in tobacco cotyledons*, «Planta», 212, pp. 759-764.
- SHELP B. J., BOWN A. W. & MCLEAN M. D. (1999): *Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid*, «Trends Plant Sci.», 4, pp. 446-452.
- SHIMMEN T. (2001a): *Involvement of receptor potentials and action potentials in mechano-perception in plants*, «Aust. J. Plant Physiol.», 28, pp. 567-576.
- SHIMMEN T. (2001b): *Electrical pressure of 'death message' in Chara: involvement of turgor pressure*, «Plant Cell Physiol.», 42, pp. 366-373.
- SIMONS P. (1981): *The role of electricity in plant movements*, «New Phytol.», 87, pp. 11-37.
- SIMONS P. (1992): *The Action Plant*, Blackwell Publishers, Oxford, England
- SIVAGURU M. & HORST W. J. (1998): *The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize*, «Plant Physiol.», 116, pp. 155-163.
- SIVAGURU M., BALUŠKA F., VOLKMANN D., FELLE H. H. & HORST W. J. (1999): *Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone*, «Plant Physiol.», 119, pp. 1073-1082.
- STANKOVIC B. & DAVIES E. (1996): *Both action potential and variation potential induce proteinase inhibitor gene expression in tomato*, «FEBS Lett.», 390, pp. 275-279.
- STEFFENS B., FECKLER C., PALME K., CHRISTIAN M., BÖTTGER M. & LÜTHEN H. (2001): *The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1*, «Plant J.», 27, pp. 591-599.
- SUN Q., YODA K., SUZUKI M. & SUZUKI H. (2003): *Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light*, «J. Exp. Bot.», 54, pp. 1627-1635.
- TANADA T. & VINTEN-JOHANSEN C. (1980): *Gravity induces fast electrical field change in soybean hypocotyl*, «Plant Cell Environm.», 3, pp. 127-130.
- THELLIER M., DESBIEZ M. O., CHAMPAGNAT P. & KERGOSIEN Y. (1982): *Do memory processes occur also in plants?*, «Physiol. Plant.», 56, pp. 281-284.
- THOMINE S., LELIEVRE F., BOUFFLET M., GUERN J. & BARBIER-BRYGOO H. (1997): *Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown Arabidopsis hypocotyls*, «Plant Physiol.», 115, pp. 533-542.
- THOMPSON J. K., PETERSON M. R. & FREEMAN R. D. (2003): *Single-neuron activity and tissue oxygenation in the cerebral cortex*, «Science», 299, pp. 1070-1072.
- TIAN H., KLÄMBT D. & JONES A. M. (1995): *Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 270, pp. 26962-26969.
- TREWAVAS A. (2002): *Mindless mastery*, «Nature», 415, pp. 841.
- TREWAVAS A. (2003): *Aspects of plant intelligence*, «Ann. Bot.», 92, pp. 1-20.
- TURANO F. J., MUHITCH M. J., FELKER F. C. & MCMAHON M. B. (2002): *The putative*

- glutamate receptor 3.2 from Arabidopsis thaliana (AtGLR3.2) is an integral membrane peptide that accumulates in rapidly growing tissues and persists in vascular-associated tissues*, «Plant Sci.», 163, pp. 43-51.
- VIAN A., HENRY-VIAN C., SCHANTZ R., LEDOIGT G., FRACHISSE J. -M., DESBIEZ M. -O. & JULIEN J. -L. (1996): *Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants?* «FEBS Lett.», 380, pp. 93-96.
- VOROBIEV L. N. & MANUSADZINAS L. (1983): *Bioelectrical reactions of Nitellopsis obtusa induced by indole-3-acetic acid*, «Physiol. Plant.», 59, pp. 651-658.
- WARD J. M., PEI Z. -M. & SCHROEDER J. I. (1995): *Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants*, «Plant Cell», 7, pp. 833-844.
- WEISENSEEL M. H. & MEYER A. J. (1997): *Bioelectricity, gravity and plants*, «Planta», 203, pp. S98-S106.
- WILDON D. C., THAIN J. F., MINCHIN P. E. H., GUBB I. R., REILLY A. J., SKIPPER Y. D., DOHERTY H. M., O'DONNELL P. J. & BOWLES D. J. (1992): *Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant*, «Nature», 360, pp. 62-65.
- WODZICKI T. J. & WODZICKI A. B. (1981): *Modulation of the oscillatory system involved in polar transport of auxin by other phytohormones*. «Physiol. Plant.», 53, pp. 176-180.
- WOJTASZEK P., VOLKMANN D. & BALUŠKA F. (2004): *Polarity and cell walls*, in: Lindsey K (ed), *Polarity in Plants*, Blackwell, Oxford, UK, in corso di pubblicazione.
- ZAWADZKI T. (1980): *Action potential in Lupinus angustifolius L. shoots*, «J. Exp. Bot.», 31, pp. 1371-1377.
- ZAWADZKI T., DAVIES E., DZIUBINSKA H. & TREBACZ K. (1991): *Characteristics of action potentials in Helianthus annuus*, «Physiol Plant.», 83, pp. 601-604.
- ZBELL B. & WALTER-BACK C. (1988): *Signal transduction of auxin on isolated plant cell membranes: indications for a rapid polyphosphoinositide response stimulated by indoleacetic acid*, «J. Plant Physiol.», 133, pp. 353-360.
- ZIMMERMANN S., THOMINE S., GUERN J. & BARBIER-BRYGOO H. (1994): *An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin*, «Plant J.», 6, pp. 707-716.

## La radice e i microrganismi della rizosfera: analisi dei pattern di nodulazione di *Pisum sativum* in popolazioni naturali di *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

### INTRODUZIONE

L'azoto (N) è elemento di fondamentale importanza per tutti gli organismi viventi, essendo costituente di numerosi composti organici azotati essenziali per la vita, quali le proteine e gli acidi nucleici.

L'azoto, oltre che nelle rocce, si trova in abbondanza nell'aria che respiriamo (costituisce circa il 78% dell'atmosfera), tuttavia l'azoto gassoso, in forma di molecola biatomica ( $N_2$ ), è assai poco reattivo perché i due atomi costituenti sono uniti da un triplo legame chimico ( $N \equiv N$ ) molto forte. La scarsa reattività dell'azoto fa sì che esso sia poco diffuso in forma combinata non volatile nella crosta terrestre, ma dal momento che la maggior parte degli esseri viventi non è in grado di utilizzare direttamente azoto molecolare, esso deve prima essere convertito in composti inorganici, per esempio in forma di ammoniaca o di ione ammonio, di nitrati e di nitriti.

Per la riduzione dell' $N_2$  ad ammonio si deve compiere un salto energetico di 225 Kcal. Questa energia di attivazione è ottenibile a pressioni di 100 Mpa e 350° C, come nei costosi processi industriali di sintesi dell'ammonio, indirizzato alla fertilizzazione chimica azotata dei vegetali.

La stessa reazione, alcuni batteri, detti batteri azotofissatori, sono in grado di svolgerla a pressione atmosferica e temperatura ambiente. Tale fissazione può fornire fino a 700-1000 Kg di azoto fissato per anno per ettaro (Peoples et al., 1995). Si può pertanto comprendere l'importanza dei batteri azotofissatori per la vita di piante e animali.

\* Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Padova

Gli azotofissatori sono esclusivamente procarioti; in base al loro rapporto con altri microrganismi, possiamo distinguerli in tre tipi:

- Diazotrofi liberi: si trovano nel suolo e nelle acque come organismi liberi, fissano quindi azoto indipendentemente dall'ambiente circostante e dalla presenza di altri microrganismi (ad esempio *Azotobacter*).
- Biocenosi diazotrofe: i batteri sono localizzati nella rizosfera di piante superiori e sono da queste influenzati attivamente (ad esempio *Azospirillum*).
- Simbiosi diazotrofe: i batteri instaurano rapporti di collaborazione endosimbiotica inducendo noduli in piante superiori (ad esempio *Rhizobium*).

Tra i tipi di fissazione biologica dell'azoto, quella simbiotica raggiunge la specializzazione più elevata e consente di ottenere le maggiori potenzialità di fissazione grazie al reciproco vantaggio per pianta e microrganismo.

Sebbene la maggior parte delle iniziali ricerche fosse rivolta a sistemi azotofissatori meno importanti dal punto di vista agrario, quali *Clostridium*, *Azotobacter* e *Klebsiella*, l'esistenza di un enzima (nitrogenasi) relativamente simile nei microrganismi capaci di fissare l'azoto atmosferico, ha consentito di acquisire nuove conoscenze anche sull'associazione *Rhizobium-Leguminosae*. L'enzima nitrogenasi catalizza la reazione di riduzione di  $N_2$  a  $NH_3$ , quest'ultima viene incorporata negli aminoacidi a livello del citoplasma nell'ospite.

Pertanto, la simbiosi *Rhizobium-Leguminosae* deve essere vista come un mezzo prezioso a disposizione dell'uomo per ridurre l'uso di concimi azotati nonché, di conseguenza, gli effetti nocivi di un loro eccesso sulla qualità ambientale.

La famiglia delle Leguminosae è quella che per eccellenza dimostra attitudine a formare simbiosi. Essa è divisa in tre sottofamiglie, la più antica, quella delle Cesalpinoideae (2000 specie) mostra solo il 23% di specie formanti noduli, laddove le più moderne Mimosoideae (3000 specie) e Papilionoideae (13000 specie) sono nodulate per il 90% e 97% rispettivamente (Bryan et al., 1996).

La famiglia delle Rhizobiaceae comprende i generi *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, a crescita veloce (con un tempo di generazione di 2-4 ore), *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, a crescita lenta (con un tempo di generazione di 4-8 ore).

#### MATERIALI E METODI

##### *Ceppi batterici e condizioni di crescita*



*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* è stato coltivato alla temperatura di 30° C nel mezzo BIII (0,23 g/l di  $K_2HPO_4$ , 0,10 g/l di  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,10 g/l di Na-glutammato, 10 g/l di mannitolo, 1 ml/l di soluzione stock di vitamine 1000X [in mg/l: riboflavina 20, acido paminobenzoico 20, acido nicotinico 20, biotina 20, tiamina-HCl 20, piridossina HCl 20, pantotenato di calcio 20, inositolo 120; il tutto disciolto in tampone 0,05M  $Na_2HPO_4$  pH 7, sterilizzato per filtrazione -0,22  $\mu m$ - e aggiunto al mezzo autoclavato], 1 ml/l di soluzione stock di oligoelementi 1000X [ $CaCl_2$  5g/l,  $H_3BO_3$  145 mg/l,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  125 mg/l,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  59 mg/l,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  5 mg/l,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  4,3 mg/l,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  108 mg/l,  $Na_2MoO_4$  125 mg/l, nitrilo triacetato 1g/l – aggiustato a pH 5 prima della sua aggiunta per evitare la precipitazione – ]. Il pH è stato portato a 6,9.

Il mezzo colturale solido è stato ottenuto aggiungendo al terreno liquido 16 g/l di agar. È stato aggiunto anche il colorante congo red (25 mg/l) che generalmente non colora *Rhizobium*.

### *Descrizione del sito di semina*

Il campo che costituisce il sito di semina è situato nella stazione sperimentale della Facoltà di Agraria dell'Università di Padova. Esso comprende 16 parcelle di un metro di lato, delimitate da pareti in cemento che penetrano nel suolo per circa un metro, mantenendo sufficientemente isolato il terreno contenuto nella parcella.

### *Procedura di campionamento delle radici*

Sono state prelevate 3 piante della varietà *Curico* dalla parcella n. 4, e 3 piante della stessa varietà dalla parcella n. 5.

Le piante sono state estratte dal terreno con l'uso di una vanga, alzando la zolla sottostante la radice, cercando di mantenere il più integro possibile l'apparato radicale. Si è poi proceduto a una prima grossolana eliminazione manuale della terra esterna all'apparato radicale. Successivamente le piante, con l'apparato radicale ancora compreso nella zolla di terreno, sono state immerse in un recipiente con acqua. Alla pianta immersa venivano fatti compiere piccoli movimenti per consentire la rimozione della terra. Sono stati sufficienti 2 di questi lavaggi per pianta per ottenere piante sufficientemente pulite. In

seguito le piante sono state etichettate con il numero della parcella seguito dalla lettera greca  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  e trasportate in laboratorio adagiandone l'apparato radicale su una vasca contenente acqua sul fondo.

### *Sterilizzazione*

L'apparato radicale di ciascuna pianta è stato immerso prima in etanolo al 95% (20 sec.) e successivamente in sodio ipoclorito al 5%: il tempo di immersione è stato variabile da 1 a 3 minuti. Sono stati poi eseguiti 6 lavaggi con acqua distillata sterile.

Al termine della sterilizzazione gli apparati radicali sono stati separati dalla parte aerea con un taglio all'altezza del colletto e sono stati trasferiti su piastre quadrate (23 x 23cm) sterili in plastica. Con bastoncini cotonati sterili si sono asciugati gli eccessi d'acqua. Si è poi proceduto alla separazione delle singole radici laterali con l'aiuto di pinze sterili in modo da distribuirle uniformemente sulla piastra. Si è dunque passati all'attribuzione del nome di ciascuna radice secondaria secondo il prospetto di nomenclatura.

### *Nomenclatura noduli*

Sono state assegnate alle radici secondarie le lettere dell'alfabeto dalla A alla Z in grafia maiuscola partendo dall'apice e risalendo al colletto e scrivendole con marker indelebile sulla piastra in plastica a fianco di ogni radice. Per apparati radicali con radici secondarie in numero maggiore di 23 si sono adoperate in aggiunta le lettere dell'alfabeto in grafia minuscola. Nel caso di radici terziarie si è fatto seguire alla lettera della radice secondaria un'altra lettera dell'alfabeto dalla A alla Z; radici quaternarie sono state rappresentate da una terza lettera. I noduli sono stati numerati progressivamente dalle porzioni distali a quelle prossimali delle radici.

### *Acquisizione dell'immagine dell'apparato radicale*

È stata acquisita l'immagine digitale dell'apparato radicale, dopo la sua nomenclatura con l'uso di uno scanner Epson Perfection 1240U.

### *Procedura di campionamento dei noduli*

L'apparato radicale è stato inumidito con acqua sterile con l'uso di pipetta pa-



steur sterile per evitare il disseccamento dei noduli. Sotto cappa sterile ogni nodulo è stato asportato dalla radice con bisturi flambato, misurato su griglia millimetrata in piastra petri sterile e inserito con pinza sterile in tubo cryovial sterile da 2ml. All'interno del tubo il nodulo è stato schiacciato con il dorso della stessa pinza. Il tubo è stato chiuso e contrassegnato con il codice di nomenclatura. Lo stesso codice è stato riportato su un modulo aggiungendo informazioni su dimensioni e forma del nodulo e, se presenti, caratteri particolari. Si è aggiunto a ciascun tubo 1ml di mezzo YMB sterile e il tubo è poi stato agitato manualmente. Si è proceduto alla collocazione dei tubi in scatole di cartone, le quali sono state disposte verticalmente su agitatore a 30 °C per 7 giorni. Trascorso il periodo di incubazione, i tubi sono stati osservati contro luce a occhio nudo per valutare la torbidità della soluzione, assegnando un segno positivo (+) o negativo (-) nel caso in cui la soluzione si presentava rispettivamente più o meno torbida rispetto all'acqua. I tubi di segno - sono stati nuovamente collocati in incubatore a 30 °C per ulteriori 2 giorni prima di ricontrollarne la torbidità, mentre ai tubi di segno + è stato aggiunto 1ml di glicerolo 80% sterile; i tubi sono poi stati agitati manualmente per qualche secondo e si sono attesi 15 minuti prima di collocarli nell'ultrafrigo ad una temperatura di -80 °C.

#### *Analisi rep-PCR di isolati di Rhizobium leguminosarum bv. viciae*

Una quantità (prelevata con un'ansa sterile) di cellule batteriche proveniente da una coltura cresciuta su piastra di BIII CR per circa 3 giorni è stata risospesa in 50 µl di una soluzione di lisi (0,25% sodio dodecil solfato [SDS], 0,05 M NaOH) e agitata per 60 sec. su vortex.

La sospensione batterica è stata scaldata per 15 minuti a 95 °C e successivamente centrifugata per 10 minuti in Eppendorf 5415D, in modo da ottenere la sedimentazione dei residui cellulari. 10 µl di surnatante sono stati trasferiti in una microprovetta contenente 90 µl di H<sub>2</sub>O demonizzata sterile. Un µl di questa soluzione è stato aggiunto ai 24 µl della miscela di amplificazione (14,9 µl di H<sub>2</sub>O bidistillata sterile, 2,5 di soluzione tampone per l'amplificazione 10X [AB Analitica, Padova], 4 µl di una miscela di deossinucleotidi trifosfati [dATP, dGTP, dTTP, dCTP] [AB Analitica, Padova] 1,25 mM ciascuno, 2,5 µl di una soluzione 20 µM di primer, 0,1 µl di una soluzione 0,5U/ µl di Taq polimerasi [AB Analitica, Padova].

A ogni analisi è stata preparata una miscela di amplificazione (master mix) in cui ciascun componente è presente in quantità sufficiente per esaminare tutti i campioni e successivamente sono state preparate aliquote da 24 µl a

ciascuna delle quali è stato aggiunto il DNA.

Il primer utilizzato è stato BOXA1R (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) (Versalovic et al., 1994): contenuto in GC del 68,2% e  $T_m$  di 67,7 °C.

I frammenti di DNA amplificati sono stati separati mediante gel d'agarosio (1.5%) contenente 0.3 µg/ml di etidio bromuro, visualizzato mediante radiazione ultravioletta con lunghezza d'onda di 254 nm e fotografato con apparato digitale Kodak EDAS290, salvando le immagini in formato TIFF.

### *Analisi di immagine computer-assistita*

Il livello di similarità dei tracciati elettroforetici, i conseguenti dendrogrammi e le matrici numeriche di distanza genetica tra i profili impiegate nei confronti per l'analisi ecogenetica, sono stati ottenuti analizzando le immagini digitali dei gel con il programma GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Belgio).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### *Coltivazione Piante*

Piante di pisello cv. Curico, sono state seminate in pieno campo in data 15 maggio 2002 ed estratte a 33 giorni dalla semina con l'intero apparato radicale dal quale sono stati isolati i noduli. Il terreno è una miscela di provenienza alloctona, ed è stato posto in sito all'inizio degli anni '90. A tale epoca si può quindi assumere che la composizione microbiologica fosse la stessa in tutte le parcelle. Le parcelle interessate dallo studio del presente progetto sono la n. 4 e la n. 5, le stesse sono state, negli anni dal 1994 al 1999 sottoposte a rilascio di ceppi selezionati di *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (ceppi 1110 e 1114, per la parcella 4, e 1114 per la parcella 5) e a coltivazione di pisello per quattro cicli (parcella 5) o per cinque cicli (parcella 4). La microflora naturale appartenente alla specie di rizobio simbiote del pisello, ha quindi ripetutamente ricevuto una selezione alla moltiplicazione in contesto simbiotico con la possibilità di una concomitante diversificazione genetica.

### *Isolamento batteri*

Un totale di 581 noduli sono stati escissi, e da essi si è proceduto all'isolamento degli endosimbionti batterici, coltivando i rizobi su mezzo liquido YMB,

dalla cui coltura sono stati ottenuti gli stocks per la crioconservazione con aggiunta di glicerolo. Le corrispondenti colture per l'analisi di caratterizzazione genetica sono state successivamente ottenute facendo moltiplicare colonie su piastre di mezzo minimo BIII con rosso Congo. Il numero di isolati batterici che hanno dato luogo a crescita sul mezzo YMB è inferiore al numero totale di noduli in quanto: a) alcuni noduli possono non contenere batteri in quanto si trovano in stadi troppo precoci della propria organogenesi, e non sono stati ancora invasivi; b) alcuni noduli, e in particolare quelli di dimensioni molto ridotte o quelli senescenti in fase di sfaldamento istologico, possono essere più sensibili ai trattamenti di sterilizzazione superficiale (indispensabili per eliminare gli altri batteri esterni di rizosfera e ottenere colture pure di endosimbionti). Inoltre nonostante la avvenuta crescita su mezzo YMB in alcuni casi non è stata ottenibile la formazione di colonie su piastra del mezzo BIII, più selettivo (importante per confermare la purezza delle colture e l'aspetto della colonia). A tale proposito, anche alla luce dei recenti esempi di nodulazione di leguminose da parte di batteri diversi dai rizobi, si potrebbe ipotizzare che una minoranza dei noduli potrebbe essere stata invasa da microrganismi d'altro tipo incapaci di crescere sul mezzo minimo BIII basato sul mannitolo quale unica fonte di carbonio, e più selettivo per i rizobi.

*Caratterizzazione degli isolati  
mediante analisi del polimorfismo di amplificazione*

Dopo una fase di scelta dell'oligonucleotide ideale per il fingerprinting dei rizobi isolati, in cui sono stati confrontati i primers per l'amplificazione NPC (TGGCACGACGCTTGAAAATT) e BOXA1R (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) la scelta è caduta sul secondo, in virtù della regolarità e riproducibilità di risposta. Successivamente sono stati quindi prodotti i lisati cellulari di tutti gli isolati dei quali erano state ottenute colonie su mezzo BIII, e si è proceduto alle amplificazioni PCR, i cui profili sono stati visualizzati per elettroforesi la cui immagine al transilluminatore è stata acquisita in formato digitale TIFF per essere processata con software GelComparII. Il fingerprinting caratteristico di ciascun individuo ("prova del DNA") permette di riconoscere i casi di identità, inoltre il grado di disuguaglianza nella posizione delle bande e nel loro numero può essere quantificato e ricondotto a distanze numeriche che esprimono una corrispondente distanza genetica tra gli isolati. L'efficacia della amplificazione

PCR col primer BOXA1R è stata sufficientemente elevata e un totale di 372 profili sono stati ottenuti.

### *Nomenclatura degli isolati batterici*

L'esame sistematico del dendrogramma e la comparazione visiva delle bande, e delle zone di transizione da gruppo a gruppo di profili ha permesso di determinare, quanti e quali noduli ospitassero lo stesso tipo di isolato. A elettroforetotipi uguali o divergenti per non oltre il 10% (corrispondente al livello di variabilità inter-replicati inerente al metodo di analisi) è stato attribuito lo stesso identificativo. Si è adottata una nomenclatura numerica progressiva a decorrere dalla sommità del dendrogramma. Oltre alla attribuzione assoluta di differenza, è stato introdotto un criterio sistematico per mantenere nel numero attribuito anche l'indicazione dell'appartenenza a un sottogruppo o famiglia i cui isolati condividano un elevato grado di somiglianza. Questo consiste in un prefisso costante seguito dai diversi suffissi progressivi, in numero uguale al numero di isolati appartenenti alla famiglia di profili designata dal prefisso. Ad esempio gli isolati da 22.1 a 22.36 consistono in un gruppo di 36 isolati non identici ma geneticamente imparentati tra loro in maniera soggettivamente apprezzabile dall'osservazione della conservazione delle loro bande nelle stesse posizioni, mentre isolati designati da una singola cifra, non appartengono a famiglie con relazioni altrettanto evidenti. A ogni conto, poiché il dendrogramma contiene di per sé un principio di ordinalità, la nostra modalità di attribuzione rispetta anche il fatto che due numeri aritmeticamente vicini corrispondano a due ceppi più simili tra loro di quelli relativi a due numeri fra loro più distanti.

### *Analisi del pattern di nodulazione per ciascun ceppo*

Il confronto dei dati permette le considerazioni, sintetizzate nella presente tabella, che riassume il numero di noduli, il numero di profili riscontrati per pianta e la loro ripartizione proporzionale in profili unici e profili comuni. Da un totale di 372 isolati di altrettanti noduli dei quali è stato ottenuto l'elettroforetogramma BOXA1R, sono stati identificati 205 tipi, ovvero 205 elettroforetogrammi, pari a 205 *ceppi*, definiti in quanto *unità tassonomiche operazionali fenotipicamente diverse al fingerprinting molecolare*. Questo dato costituisce la diversità biologica del campione considerato, concetto

	Parcella 4	Parcella 5
noduli/parcella	155	217
profili/parcella	95 (1 ogni 1.63 noduli)	129 (1 ogni 1.68 noduli)
unici per parcella	77 (81,0%)	111 (86,0%)
comuni 4 e 5	18	(8,7%)

equivalente a quello della “ricchezza di specie”, ma relativo in questo caso ai ceppi di una stessa specie, (*R. leguminosarum* bv. *viciae*). È noto da numerosa letteratura come i rizobi del suolo tendano in generale a essere rappresentati da alcuni ceppi competitivi che nodulano numerose volte e su più piante, tali casi sono ben visibili anche nel nostro studio e verranno adeguatamente discussi, ma è interessante come prima osservazione soffermarsi invece su quanto riguarda i ceppi non-dominanti. A tale proposito infatti, il dato più saliente che emerge da queste analisi scaturisce dalla considerazione di quanti, dei tipi riscontrati, siano stati reperiti *soltanto nei noduli dell'apparato radicale di un dato individuo di pisello*. Per la pianta 4alfa, ad esempio, 38 profili sui 53 presenti (pari al 71,7%) sono specifici. In generale un alto valore di casi individuo-specifici di simbionti si riscontra per tutte le piante osservate, con un massimo del 78% (pianta 5alfa) e un minimo del 59% (pianta 4beta). È possibile notare inoltre che i valori più alti sono propri delle piante dalle quali sono stati analizzati più noduli e si ritiene quindi rappresentino con maggior accuratezza la reale proporzione dei profili pianta-specifici, cioè si avvicinino al valore massimo del numero di ceppi che teoricamente potrebbero nodulare uno stesso individuo vegetale. Si osserva quindi che ogni esemplare di pianta pur condividendo esse genere, specie, biovar, cultivar, partita di semente, e, per quelle all'interno di una stessa parcella anche, la medesima zolla di terra, siano invase in maniera apparentemente specifica da popolazioni di simbionti molto distinte le une dalle altre, come se ogni pianta costituisse una sorta di isola in cui le interazioni genotipo/genotipo a livello individuale siano le principali regolatrici dell'interazione molecolare tra micro- e macro-simbionti. Ma a ciò va aggiunto che gran parte di questo effetto è legato al fatto che, di per sé, *la maggior parte dei noduli contengono un ceppo il cui profilo viene riscontrato una sola volta in assoluto*. Per rendere ragione di questo fattore è possibile elencare per ogni pianta il numero di profili unici (il profilo è reperito solo in quella data pianta e solo in uno dei noduli da essa formati) e calcolarne la percentuale. Questo dato, utile a saggiare il grado di esaustività del progetto nell'estrarre progressivamente casi nuovi dal terreno mediante l'uso delle piante quali esche specie-specifiche, non è però adatto a osservare

quanti ceppi nodulano una data pianta una volta sola, misura espressa invece dal numero dei profili singoli (il profilo è reperito in una o più piante ma solo in un nodulo per pianta). La loro percentuale sul numero di noduli ci informa di quanto questi nodulatori sporadici incidano sul totale di batteri ospitato da una pianta, mentre la percentuale sul numero di profili esprime la fetta di diversità ivi rappresentata da questi ceppi. Un ulteriore parametro utile è il rapporto tra numero profili e numero noduli, che può raggiungere il valore teorico massimo di 1 nel caso ogni nodulo ospitasse un profilo diverso. Il valore medio tra tutte le piante è 0,55, con notevoli fluttuazioni tra pianta e pianta.

I valori dei profili singoli, che si attestano consistentemente tra il 70 e l'80%, indicano come per la maggior parte dei rizobi di questa specie l'incontro con l'ospite sia un fenomeno probabilistico individuale. Questo indica che la prevalente situazione di profilo singolo o addirittura unico, di ceppi riscontrati associati a ogni individuo di vegetale, non sia tanto il risultato di interazioni di specificità genotipo batterio/genotipo leguminosa, quanto quello della casualità di incontro tra radici e membri di popolazioni microbiche estremamente diversificate. I dati indicano che in generale ogni nuova pianta seminata, che formi una media di circa cento noduli, reperisce con le ramificazioni del proprio apparato radicale circa sessanta nuovi ceppi non osservati in nessuna delle piante precedenti.

In tal senso, è possibile fare stime circa la reale entità della diversità biologica dei ceppi di *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* presenti in questi terreni; considerando che le tre piante di pisello provenienti da una stessa parcella condividevano uno spazio di 25 cm<sup>2</sup> di superficie, e che la profondità raggiungibile dagli apparati radicali nel mese successivo alla semina, coincidente in questa prova con la finestra temporale di opportunità per la nodulazione, è di circa 25 cm, si può assumere che le radici delle piante di una parcella abbiano a disposizione un volume di suolo di 15625 centimetri cubici (25<sup>3</sup>). Questo volume, di oltre 15 litri di suolo, contiene circa altrettanti kg di peso secco di terreno. Conoscendo la quantità di cellule di *Rhizobium* di questa specie per grammo di peso secco del terreno di queste parcelle, che nel 1993, prima delle coltivazioni si piselli su queste parcelle era di  $5,2 \times 10^3$  cellule per grammo di peso secco di suolo (V. Corich, tesi di Dottorato di Ricerca, Università di Padova, 1996), si può stimare che nel volume considerato esistano almeno  $7,8 \times 10^7$  cellule di rizobio della specie in questione. Ma, considerando che cinque stagioni di coltura di piante ospiti si sono susseguite tra l'epoca dell'analisi suddetta e la presente prova, si può assumere che i rizobi per grammo siano con molta probabilità aumentati, e poiché in molti

suoli europei la specie in questione può toccare le  $10^7$  cellule per grammo di terreno, il numero dei rizobi nodulanti totali a disposizione delle piante di CV curico in uno spazio di  $25 \text{ cm}^2$  potrebbe facilmente essere intorno alle  $10^{11}$  cellule. È pertanto altamente plausibile che il numero di ceppi distinti all'interno di tale popolazione giustifichi la alta diversità osservata nei noduli. In termini pratici, esistendo un ovvio limite fisico di ingombro alla possibilità di coesistenza di piante di pisello su una stessa superficie, si può assumere che, in un terreno come il presente, che ha ricevuto almeno 5 stagioni di colture di piselli in passato, per ciascuna pianta sarà sempre garantita una quota di almeno il 60% di noduli occupati da ceppi unici.

Passando invece alle considerazioni relative ai ceppi non-unic, questi come detto possono essere considerati rappresentare quella compagine dotata di un grado più o meno elevato di competitività, o di attitudine alla dispersione all'interno dell'ambiente considerato, ivi inclusa la capacità di diffusione da una parcella all'altra. Questo comportamento, che culmina nella definizione di ceppi "dominanti", è verificabile riscontrando i casi di profili reperiti su più di un individuo di pianta. I casi definibili comuni, sono quelli reperiti trasversalmente su più piante e rappresentano i tipi rispondenti alle suddette caratteristiche, il cui grado di sviluppo è misurato dal numero di casi osservati e dalla larghezza di distribuzione raggiunta (numero di piante, in cui il profilo è riscontrato).

## CONCLUSIONI

Analizzando le comunità di *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* nodulanti piselli nelle parcelle di terreno oggetto dell'indagine sono state isolate ed individuate, a partire da 581 noduli, un totale di 111 unità tassonomiche fenotipicamente distinguibili in base al fingerprinting del DNA.

I ceppi definiti dalla definizione suddetta appaiono rappresentare una limitata porzione della diversità biologica totale dei ceppi presenti nel sito, come testimoniato dalla elevata percentuale, prossima all'80%, di isolati identificati in un solo nodulo in ciascuna delle piante analizzate.

Mentre la maggioranza degli isolati appartiene a tipi unici, i ceppi ricorrenti, dominanti o competitivi, comuni a più piante e parcelle appartengono a un gruppo ristretto generalmente rappresentato da famiglie di profili simili, la cui distribuzione specifica dimostra avvenuti processi di dispersione e diffe-

renziamento genetico intercorsi durante i quindici anni successivi alla divisione della miscela di terreno originario in parcelle circoscritte.

#### RIASSUNTO

*Analisi dei pattern di nodulazione di Pisum sativum in popolazioni naturali di Rhizobium leguminosarum bv. viciae.*

Nel presente lavoro si è effettuato l'isolamento in coltura pura dei microrganismi simbiotici da 581 noduli formatisi su sei piante di pisello precedentemente seminate in parcelle di terreno dell'Azienda Agraria della Facoltà. Successivamente si è proceduto alla caratterizzazione genotipica di ciascun isolato mediante un metodo di fingerprinting PCR basato sull'appaiamento arbitrario dell'oligonucleotide BOXA1R. I profili elettroforetici ottenuti sono stati confrontati con il programma GelComparII e trasformati in entrate di una matrice di similarità dalla quale è stato possibile ottenere il dendrogramma delle relazioni reciproche tra gli isolati in termini di distanza genetica. Questa analisi ha permesso di stabilire il grado di ceppo-specificità dei batteri associati ai diversi individui di pianta e gli effetti di separazione fisica delle stesse, quando appartenenti a parcelle di terreno distinte.

#### ABSTRACT

*Analysis of the pea nodulation patterns on natural Rhizobium leguminosarum bv. viciae populations*

The microbial inhabitants of 581 pea root nodules formed on 6 plants purposely sown in a soil within the University's experimental agricultural station were isolated and characterized upon DNA-based BOXA1R PCR-electrophoretic fingerprinting. Band profiles were analyzed by GelComparII image analysis software converting differences into a numerical matrix yielding their similarity dendrogram in terms of genetic fingerprint distances. The level of strain-specific association with plant specimens and soil parcels have been assessed.



## BIBLIOGRAFIA

- BRYAN J. A., BERLYN G. P., GORDON J. C. (1996): *Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae*, «Plant and Soil», 186, pp. 151-159.
- PEOPLES M. B., HERRINDGE D. F., LADHA J. K. (1995): *Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production*, «Plant and Soil», 174, pp. 3-28.
- VERSALOVIC J., SCHNEIDER M., DE BRUIJN F. J., LUPSKI J. R. (1994): *Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction*, «Methods in Molecular and Cellular Biology», 5, pp. 25-40.



BRUNO MARANGONI\*, MORENO TOSELLI\*, ELENA BALDI\*

## Influenza della sostanza organica sulla morfologia, sviluppo ed efficienza radicale nelle piante da frutto

### INTRODUZIONE

#### *La sostanza organica*

In termini generali, per sostanza organica (S.O.) si intende quell'insieme di residui di origine animale (mesofauna e microfauna non più vitali) e vegetale (radici, foglie, microflora) in differente stadio di evoluzione (Bongiovanni et al., 1994), contenuta nei terreni agricoli in percentuali (0,5-10%) che variano in funzione dell'accumulo e della velocità di mineralizzazione del materiale organico.

La materia organica subisce processi di decomposizione dai quali si originano costituenti primari, non umici e costituenti secondari detti composti umici; questi componenti svolgono nel terreno un ruolo particolarmente significativo di ordine fisico, chimico e biologico.

Tra le funzioni di tipo fisico, importante è l'azione di miglioramento della struttura e della porosità del terreno dovuta alla maggiore formazione di aggregati e alla loro maggiore stabilità.

Per quanto riguarda le proprietà chimiche la sostanza organica agisce in modo diretto mettendo a disposizione, in forma assimilabile, alcuni elementi della fertilità attraverso la sua mineralizzazione; e, in modo indiretto, esplicando proprietà chelanti di molti gruppi funzionali (carbossilici, carbonilici, ammidici) riducendo così il rischio di insolubilizzazione dei microelementi. Altra importante funzione di tipo chimico riguarda la reazione del suolo, in quanto la decomposizione della sostanza organica determina la produzione di composti acidi che possono

\* Dipartimento di Colture Arboree, Università degli Studi di Bologna

provocare la diminuzione del pH, particolarmente utile nei terreni sub-alcini e alcalini. La sostanza organica porta inoltre a un aumento della capacità di scambio cationico (C.S.C.) nel terreno, grazie all'aumento dei siti con cariche negative in grado di adsorbire i cationi. In questo modo una maggiore quantità di elementi nutritivi può rimanere più a lungo nella zona radicale e venire quindi utilizzata per tempi maggiori dalle piante (Bongiovanni et al., 1994).

La sostanza organica determina, a livello biologico, uno stimolo all'azione della microfauna e microflora consentendo uno sviluppo equilibrato degli organismi viventi nel terreno, essenziale sia per la creazione di condizioni ottimali per lo sviluppo dei vegetali (Bongiovanni et al., 1994), sia per la degradazione di composti organici, comprese numerose sostanze di sintesi derivanti da fonti d'inquinamento (quali per esempio i fitofarmaci), che potrebbero interferire negativamente sulla crescita delle piante. La sostanza organica svolge anche un ruolo importante nella protezione dell'attività enzimatica del suolo, in quanto la vita degli enzimi extracellulari, prodotti principalmente dai procarioti e da altri microrganismi, sarebbe estremamente limitata in assenza di un adeguato substrato organico (Sequi e Nannipieri, 1989).

### *Le radici*

La radice non è solo deputata all'attività di assorbimento di acqua e nutrienti, essa infatti intrattiene con la rizosfera numerose interazioni che coinvolgono il rilascio di essudati, la produzione di sostanza organica e l'ancoraggio al suolo. La capacità di una specie vegetale di reperire le risorse di nutrienti nel suolo dipende dalla potenzialità di espandere le radici nel mezzo di crescita (Lynch, 1995); di conseguenza, una elevata densità radicale, unita a un tessuto xilematico di trasporto ben sviluppato ed efficiente, consentono un adeguato approvvigionamento idrico e nutrizionale alla chioma, garantendo alla pianta condizioni ottimali di crescita (Marangoni e Toselli, 2000).

Nelle radici delle piante arboree l'accrescimento in lunghezza (primario) risulta confinato alla zona apicale caratterizzata da un colore più chiaro, da una maggiore turgidità e fragilità e anche da un maggiore spessore rispetto alla radice secondaria. La zona di accrescimento primario risulta composta di diverse sottozone (fig. 1) che a partire dall'apice sono distinte in:

- zona di divisione cellulare;
- zona di allungamento cellulare;
- zona di sviluppo dei peli radicali;
- zona di suberificazione.

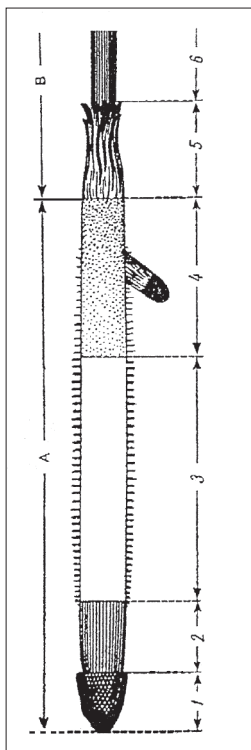


Fig. 1 *Zona di accrescimento e differenziazione di una radice.* A – *La radice primaria:* 1. meristema apicale e cuffia; 2. Zona di allungamento; 3. Zona pilifera; 4. Zona di suberificazione. B – *La radice secondaria:* 5. Zona di decomposizione del cortex primario; 6. Radice di conduzione. (Fonte: Muromtsev, 1969)

La zona pilifera corrisponde alla zona di accrescimento primario e ciò rende la fase di accrescimento coincidente a quella di assorbimento. Con il progredire dell'età, la zona di accrescimento primario manifesta alcune modifiche anatomiche che si riflettono sulla sua morfologia e sull'attività. Il cambiamento più importante è costituito dalla suberificazione dell'esoderma che produce l'isolamento del tessuto vascolare dalle cellule epidermiche con la conseguente degenerazione dei peli radicali. Questo processo, di particolare interesse per le piante arboree, è accompagnato da una variazione di colore (fig. 2) dovuta all'accumulo di suberina e, in certe specie, anche di tannini (Marangoni e Toselli, 2000). La suberificazione dei tessuti implica una riduzione della capacità assorbente e della respirazione delle radici (Bouma et al., 2001).

L'apparato radicale delle piante subisce un continuo rinnovo delle radici assorbenti che, a un certo punto del loro sviluppo, entrano in una fase di senescenza e muoiono, secondo meccanismi e tempi che dipendono dalla specie, dall'età e dalle pratiche colturali. Numerosi fattori, sia di tipo abiotico (temperatura, umidità, disponibilità di nutrienti) che biotico (insetti, funghi,

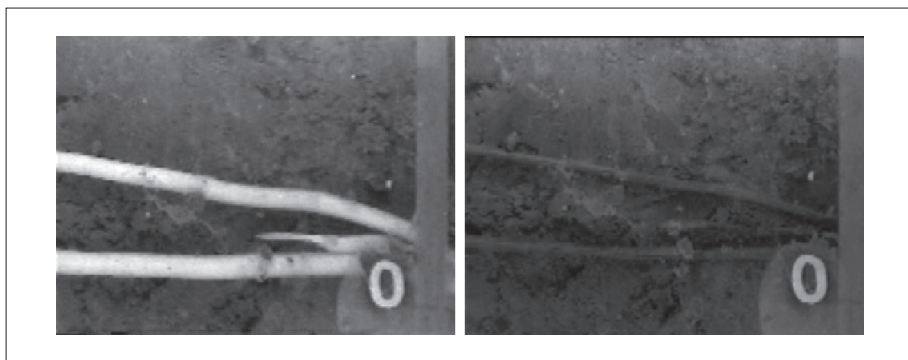


Fig. 2 *Suberificazione dei tessuti radicali*

batteri e altri organismi), sono in grado di modificare la dinamica del turnover radicale. Negli alberi da frutto, durante la ripresa vegetativa, la pianta utilizza le riserve di nutrienti contenute principalmente nella struttura radicale, di conseguenza la crescita delle nuove radici avviene prevalentemente dopo lo sviluppo di foglie e fiori (Wells e Eissenstat, 2001; Grassi et al., 2002). In melo e pesco, per esempio, si ha un'iniziale sviluppo delle radici durante o subito dopo la fioritura e, in alcuni casi, una successiva crescita in tarda estate o all'inizio dell'autunno (Wells e Eissenstat, 2003).

L'architettura dell'apparato radicale, oltre alle caratteristiche genetiche, viene condizionata dalle tecniche agronomiche e in particolare dalla concimazione, che attualmente ha ricevuto nuove attenzioni in seguito alla crescente diffusione di sistemi a basso impatto ambientale o biologici.

Gli effetti della concimazione minerale e organica vengono evidenziati dai risultati sperimentali su pesco e melo di seguito riportati.

### *Pesco*

Oggetto di studio è stato un pescheto della cv. Stark RedGold allevato a vaso e messo a dimora nel dicembre 2001 presso l'Azienda Sperimentale Marani (Ravenna). La gestione del suolo si avvale di una lavorazione superficiale lungo la fila mentre l'interfila risulta inerbito; le specie erbacee presenti, in prevalenza graminacee, sono di tipo spontaneo in quanto non è stata eseguita la semina di particolari essenze.

Sono state messe a confronto diverse tesi di concimazione di impianto per verificare la risposta della radice alla S.O.:

1. minerale: apporto all'impianto di 100 kg/ha di  $p_2o_5$  e 200 kg/ha di  $k_2o$ , seguiti da una somministrazione annua di 70 kg/ha di n frazionata in due interventi a inizio marzo (60%) e a inizio settembre (40%);
2. letame: apporto di 10 t di sostanza secca per ha;
3. ammendante compostato misto: apporto di 10 t di sostanza secca per ha.

La distribuzione dei fertilizzanti è stata eseguita operando lungo la zona del filare e le quantità apportate sono state conformi ai suggerimenti dei disciplinari di produzione integrata della Regione Emilia Romagna. Durante la stagione vegetativa sono stati eseguiti rilievi sullo sviluppo radicale con la tecnica del minirizotrone. I minirizotroni sono stati costruiti con dei tubi di plexiglas trasparente di 6 cm di diametro esterno, 5,5 cm di diametro interno e 100 cm di lunghezza, sulla loro parete esterna è stata disegnata una linea verticale, vicino alla quale, ogni 1,5 cm, è stato posizionato un numero progressivo, fissato con uno smalto trasparente (fig. 3). La scala graduata così costruita è servita per definire le profondità e avere un riferimento spaziale al momento della raccolta delle immagini. Nel mese di ottobre 2002 un minirizotrone, per ciascuna ripetizione, è stato posizionato, con l'ausilio di una trivella pneumatica, a una distanza di 50 cm dal fusto delle piante, in direzione est-ovest, con una inclinazione di 30° sulla verticale (fig. 3) al fine di impedire all'acqua di percolare preferenzialmente lungo la superficie del tubo.



Fig. 3 *Messa in posa dei minirizotroni (sinistra) e particolare del minirizotrone per il rilievo dello sviluppo radicale (destra)*

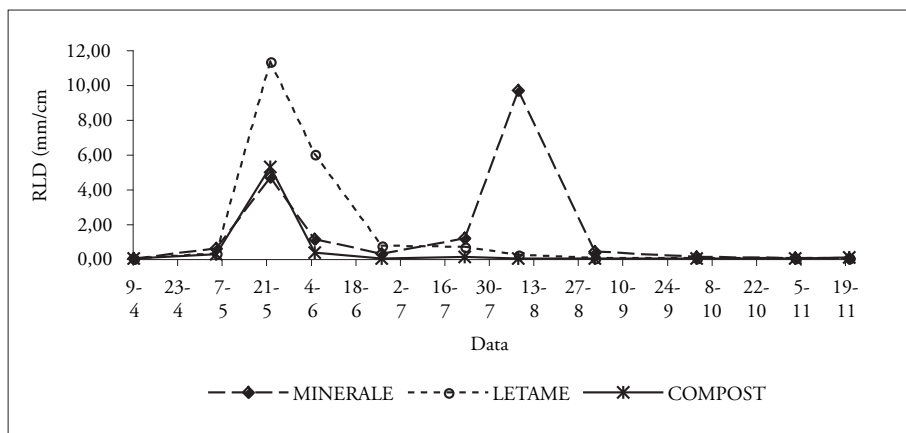


Fig. 4 *Effetto dei trattamenti sulla densità di lunghezza radicale delle radici bianche*

La sistemazione dei tubi è avvenuta in modo da far coincidere la metà della lunghezza del minirizotrone con la linea della fila.

Nel corso del 2003 i tre trattamenti a confronto hanno fatto registrare un picco di produzione di nuove radici nel rilievo di maggio. Sebbene l'analisi statistica non abbia evidenziato differenze significative (probabilmente a causa dell'elevata variabilità fra le repliche), la concimazione con letame ha stimolato una produzione di nuove radici più che doppia rispetto agli altri trattamenti (fig. 4). Successivamente, lo sviluppo radicale è diminuito ed è rimasto limitato in tutte le tesi a eccezione della concimazione minerale che, nel rilievo di agosto, ha mostrato un secondo picco di crescita con valori di densità di lunghezza radicale (RLD) di oltre 9 mm/cm<sup>2</sup> (fig. 4).

Per quanto riguarda la produzione cumulativa di radici bianche appena comparse, nella tesi concimata con letame si è notato un incremento intenso a partire dall'inizio di maggio, che si è protratto per circa un mese fino a raggiungere (fig. 5), il 6 giugno, valori di circa 17-18 mm/cm<sup>2</sup> di RLD. A partire da giugno la crescita è diminuita fino ad arrestarsi completamente tra luglio e agosto. La tesi trattata con compost ha mostrato un andamento simile a quello della tesi concimata con letame, tuttavia ha presentato produzioni di radici bianche molto più basse rispetto al letame (5-6 mm/cm<sup>2</sup>, 2,4-2,5 mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>, rispettivamente), e la produzione si è arrestata più precocemente (intorno al 22 maggio). Nella tesi trattata con concime minerale, invece, sono evidenti due fasi di crescita radicale, una terminata il 22 maggio che ha prodotto una quantità di radici bianche simile alla tesi concimata con compost; l'altra è stata osservata tra la metà di luglio e l'inizio di



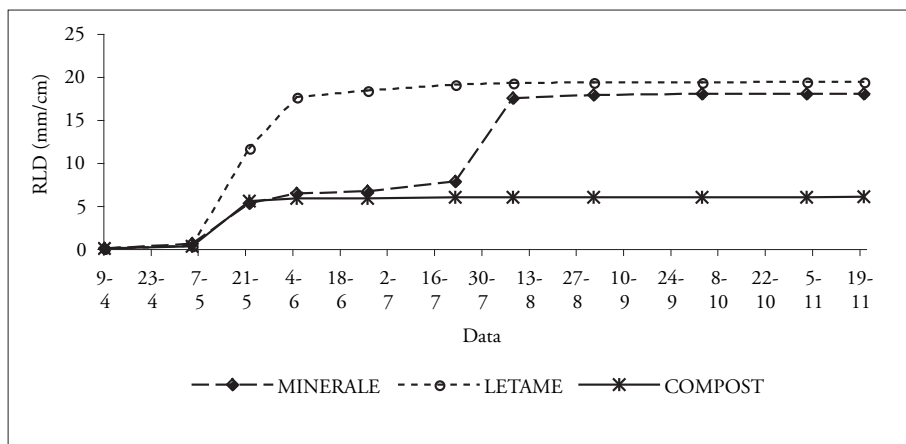


Fig. 5 Effetto del trattamento sulla produzione cumulativa (densità di radice) delle radici bianche appena comparse

agosto quando è stata raddoppiata la densità di lunghezza delle radici (fig. 5) raggiungendo valori simili alla concimazione con letame. La differenza tra concimazione con letame e quella minerale risiede nel fatto che la prima ha consentito di raggiungere la massima produzione di radici bianche già a fine maggio, circa 2 mesi e mezzo prima rispetto al trattamento minerale. L'impiego di compost ha determinato, invece, una produzione di radici pari a circa un terzo delle altre due tesi.

### Melo

Per la sperimentazione sono state utilizzate piantine micropropagate di melo (M9) trapiantate in rhizoboxes posti in camera di crescita per un periodo di 7 settimane (Mazzanti, 2001).

I rhizoboxes sono contenitori in plexiglas provvisti di una parete rimovibile tramite la quale è possibile effettuare osservazioni dirette sull'apparato radicale (fig. 6a).

Le piantine sono state regolarmente irrigate in modo da mantenere il suolo al 70% della capacità di campo. Ogni tre giorni sono state effettuate osservazioni sullo sviluppo radicale sovrapponendo fogli di plastica trasparente sulla parete e ricalcando con un pennarello di colore diverso per ogni rilievo la traccia delle radici (fig. 6b); al termine dell'esperimento l'immagine delle radici è stata digitalizzata e su di essa è stata effettuata una determinazione della lunghezza delle radici tramite un sistema informatico Rootedge Chord Algorithm (versione 2.2,

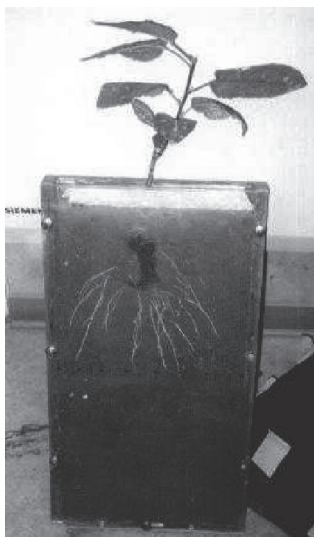


Fig. 6a *Rhizobox*

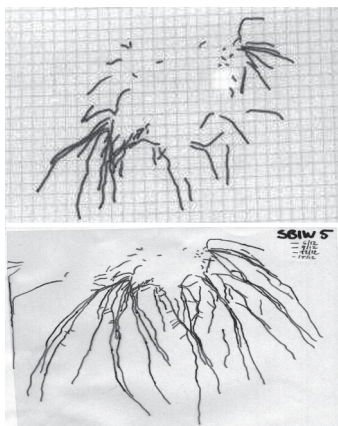


Fig. 6b *Rilievo della morfologia dell'apparato radicale nei rhizoboxes*

Iowa State University Research Foundation, USDA – ARS – NSTI, 1995).

Durante la prova sono stati confrontati i seguenti apporti di fertilizzanti:

1. controllo (solo terreno);
2. minerale basso dosaggio (25%);
3. minerale alto dosaggio (100%);
4. letame bovino maturo;
5. calce + melasso.

La crescita delle radici è iniziata dopo 4 giorni dal trapianto e il maggior tasso di crescita è stato osservato dopo 15 giorni dall'inizio dell'esperimento.

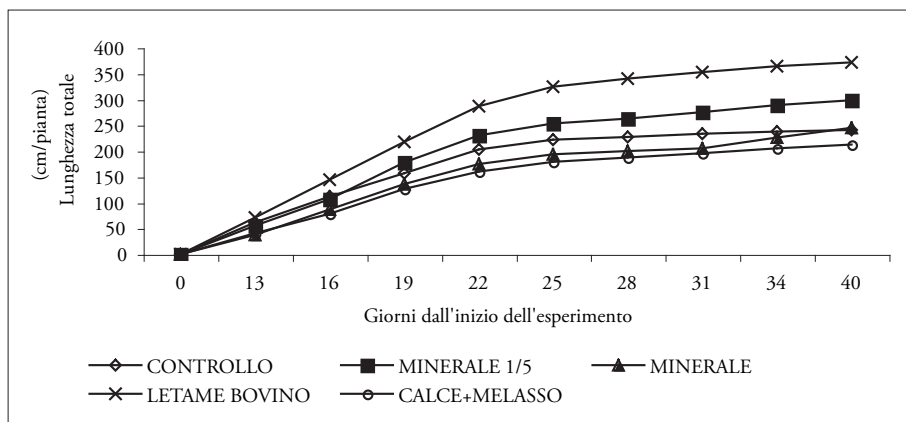


Fig. 7 *Lunghezza cumulativa delle radici fini*

Il trattamento con letame bovino ha indotto un maggior sviluppo in lunghezza delle radici (371 cm/pianta), significativamente superiore alla somministrazione di concime minerale alla dose bassa (298 cm/pianta) (fig. 7). I trattamenti minerali alla dose alta, il controllo e il calce + melasso hanno evidenziato i valori più bassi (244, 241 e 213 cm/pianta, rispettivamente) (fig. 7). La stimolazione del letame alla produzione di radici (figg. 7-8) può essere attribuita al miglioramento della struttura del suolo e all'azione di sostanze stimolanti presenti nel letame stesso o derivanti dal metabolismo dei microrganismi del suolo (Müller et al., 1989), indotto dalla sua applicazione, come risultato dell'attività della deidrogenasi. Dall'analisi della sostanza secca (dati

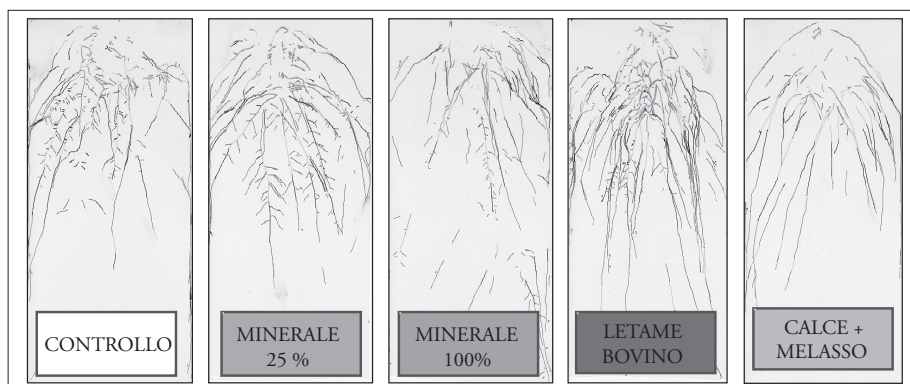


Fig. 8 *Crescita delle radici alla fine dell'esperimento*

non presentati) è risultato che le radici delle piante trattate con letame hanno una minore biomassa; questo implica che le radici sono più fini rispetto agli altri trattamenti e quindi presumibilmente l'apparato radicale risulta più efficiente nell'assorbimento dei nutrienti (Marschner, 1995).

Differenze fra i trattamenti sono state riscontrate anche sui frutti di piante di melo allevate in vaso e concimate con gli stessi fertilizzanti e ammendanti utilizzati nella prova in rhizoboxes. I frutti delle piante trattate con il concime minerale hanno, in generale, una maggiore quantità di amminoacidi (fig. 9) rispetto alle altre tesi; in particolare i frutti trattati con letame presentano quantità di lisina significativamente superiori rispetto al trattamento minerale che però evidenzia maggiori concentrazioni di acido glutammico (fig. 9).

## CONCLUSIONI

Da questi studi si è potuto verificare come il trattamento con letame abbia determinato un maggiore sviluppo di radici morfologicamente più sottili, rispetto agli altri trattamenti, compreso quello con ammendante compostato misto, che anzi ha determinato la minore produzione di nuove radici in assoluto.

Una maggiore produzione di radici in seguito alla somministrazione di dosi crescenti di sostanza organica è risultata evidente anche in studi fotografici effettuati presso l'Università del Michigan (fig. 10) (Stefanelli, dati non pubblicati).

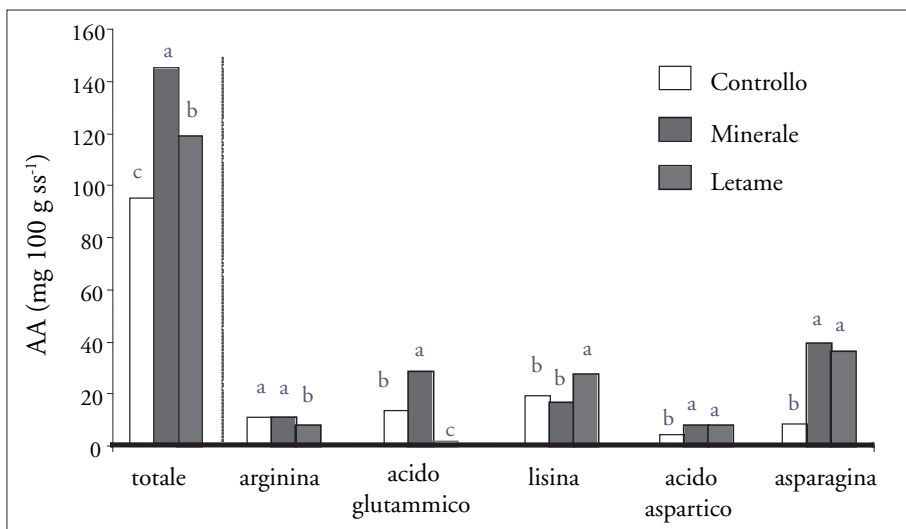


Fig. 9 Amminoacidi nei frutti di melo

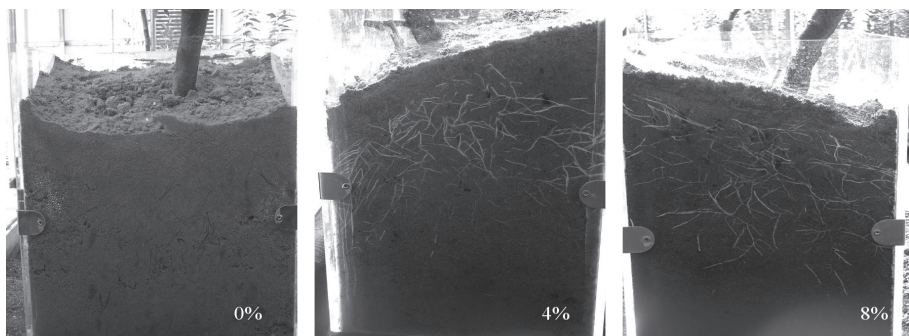


Fig. 10 *Effetto della sostanza organica a diverse concentrazioni (0, 4, 8%) sullo sviluppo delle radici*

Di norma la sostanza organica, e in particolare il letame bovino, contengono acidi umici e fulvici, componenti che hanno evidenziato, in studi precedenti, attività auxino-simili (Dell'Agnola e Nardi, 1987; Muscolo et al., 1999; Nardi et al., 1994; Baraldi et al., 1991) con conseguente stimolo della crescita della pianta in seguito all'aumento dell'allungamento cellulare (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). È stato dimostrato inoltre che alcune sostanze umiche a basso peso molecolare (principalmente acidi fulvici) stimolano l'attività della membrana plasmatica di radici di diverse piante aumentando l'attività dell' $H^+$ -ATPasi (Canellas et al., 2004; Pinton et al., 1999).

Dall'esame della crescita dell'apparato radicale in campo appare evidente che lo sviluppo di nuove radici si concentra in primavera subito dopo la fioritura e che la tesi concimata con concime minerale stimola anche una ripresa dello sviluppo radicale in tarda estate. Il picco primaverile nell'ambiente emiliano-romagnolo può essere collegato alle favorevoli condizioni di umidità e temperatura del terreno. Sembra chiaro che come osservato da Wells e Eissenstat (2003) lo sviluppo radicale segue l'esaurimento delle risorse e inizia subito dopo la fioritura. Inoltre, l'attività radicale è strettamente correlata all'attività vegetativa e riproduttiva, per cui tutti gli interventi che vengono effettuati sia nella parte aerea che in quella radicale influiscono sulla attività metabolica dell'albero e influenzano direttamente la composizione fisico-chimica dei frutti e il relativo valore alimentare.

## BIBLIOGRAFIA

- BARALDI R., FASOLO FABBRI MALAVASI F., PREDIERI S., CASTAGNETO M. (1991): *Effect of potassium humate on apple cv. Golden Delicious cultured in vitro*, «Plant Cell Tissue Organ Culture», 24, pp. 187-191.
- BONGIOVANNI S., SCAGLIARINI S., SANTINI R. (1994): *Utilizzo agronomico dei fanghi di depurazione*, «Il Divulgatore», 5, pp. 4-7.
- BOUMA T.J., YANAI R.D., ELKIN A.D., HARTMOND U., FLORES-ALVA D.E., EISSENSTAT D.M. (2001): *Estimating age-dependent cost and benefits of roots with contrasting life span: comparing apples and oranges*, «New Phyt.», 150, pp. 685-695.
- CANELLAS L.P., OLIVARES F.L., OKOROKOVA-FAÇANDA A.L., FAÇANDA A.R. (2002): *Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence and plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity in maize roots*, «Plant Physiol.», 130, pp. 1951-1957.
- DELL'AGNOLA G., NARDI S. (1987): *Hormone-like effect and enhanced nitrate uptake induced by depolycondensated humic fractions obtained from Allobofora and A. caligionosa faeces*, «Biol. Fert. Soils», 4, pp. 115-118.
- FRIAS I., CALDEIRA M.T., PEREZ C.J.R., NAVARRO A.J.P., CULIANEZ M.F.A., KUPPINGER O., STRANSKY H., PAGES M., HAGER A., SERRANO R. (1996): *A major isoform of the maize plasma membrane  $H^+$ -ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles*, «Plant Cell», 8, pp. 1533-1544.
- GRASSI G., MILLARD P., WENDLER R., MINOTTA G., TAGLIAVINI M. (2002): *Measurements of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilisation by cherry (Prunus avium L.) trees*, «Plant Cell Environ.», 25, pp. 1689-1699.
- HAGER A., DEBUS G., EDEL H.G., STRANSKY H., SERRANO R. (1991): *Auxin induced exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma membrane  $H^+$ -ATPase*, «Planta», 185, pp. 311-316.
- LYNCH J. (1995): *Root architecture and plant productivity*, «Plant Physiology», 109, pp. 7-13.
- MARANGONI B., TOSELLI M. (2000): *La radice delle dicotiledoni arboree*, in *Obiettivo radice. Metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*, a cura di G. Mosca e T. Vamerali, Consiglio Nazionale delle Ricerche, CLEUP, Padova, pp. 13-19.
- MARSCHNER H. (1995): *Mineral nutrition of higher plants*, Second edition, Academic press, London.
- MAZZANTI F. (2001): *Acquisizione di nutrienti da fertilizzanti organici e minerali e stato nutrizionale del melo*, Tesi di dottorato, Unibo.
- MULLER M., DEIGELE C., ZIEGLER H. (1989): *Hormonal interaction in the rhizosphere of maize (Zea mais L.) and their effects on plant development*, «Z. Pflanzen. Bodenk.», 152, pp. 247-254.
- MUROMTSEV I.A. (1969): *Active parts of root system of fruit plants*, Kolos Publishers, Moscow. Pubblicato per l'USDA e la NSF da Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi.
- MUSCOLO A., BOVALLO F., GIONFRIDDO F., NARDI S. (1999): *Earthworm humic matter produces auxin-like effect on Dacus carota cell growth and nitrate metabolism*, «Soil Biol. Biochem.», 31, pp. 1303-1311.
- NARDI S., PANUCCIO M.R., ABENAVOLI M.R., MUSCOLA A. (1994): *Auxin-like effect of humic substances extracted from faeces Allobofora caligionosa and A. rosea*, «Soil Biol. Biochem.», 26, pp. 1341-1346.

- PINTON R., CESCO S., IACOLETTING G., ASTOLFI S., VARANINI Z. (1999): *Modulation of  $\text{NO}_3^-$  uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase*, «Plant Soil», 215, pp. 155-161.
- SEQUI P. (1989):. *Chimica del suolo*. Patron Editore, Bologna.
- WELLS C.E., EISSENSTAT D.M. (2001): *Marked differences in survivorship among apple root of different diameters*, «Ecology», 82, pp. 882-892.
- WELLS C.E., EISSENSTAT D.M. (2003): *Beyond the roots of young seedlings: the influence of age and order on fine root physiology*, «J. Plant Growth Regul.», 21, pp. 324-334.





## Fitoestrazione di metalli pesanti da suoli inquinati: il ruolo della morfologia radicale nell'individuazione di piante accumulatrici

### INTRODUZIONE

Sempre più l'uomo deve confrontarsi con la necessità di arginare le conseguenze ambientali che derivano dalle attività antropiche industriali, agricole e civili che inevitabilmente comportano un degrado del territorio più o meno evidente. Sebbene l'inquinamento diffuso non sia da considerare meno pericoloso di quello acuto puntiforme, oggi si avverte l'esigenza di intervenire con adeguati sistemi di bonifica nei siti contaminati presso i quali siano stati scaricati o si siano accumulati inquinanti diversi. Alcuni siti pericolosi, sia in Italia che all'estero, sono stati individuati con apposito decreto ministeriale e in essi sono in attuazione procedimenti di rimediazione con tecnologie diverse in funzione del tipo di inquinante, volte alla rimozione, trasformazione o degradazione delle sostanze coinvolte.

### *L'inquinamento da metalli pesanti*

Tra le diverse forme di inquinamento ambientale, è largamente riconosciuta la pericolosità che deriva dall'accumulo di metalli pesanti, elementi ubiquitari, comunemente presenti nel terreno in quantità molto modeste – tanto da essere definiti elementi traccia – ma che in alcune specifiche condizioni possono raggiungere concentrazioni particolarmente elevate, da risultare pericolose per le piante, gli animali e l'uomo stesso. Si tratta di elementi presenti nel terreno in forma cationica (e.g., Cd, Cr, Mn, Ni, Cu, Pb, Zn), di elevato peso specifico

\* Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali, Università degli Studi di Padova, Agripolis

(> 5 g cm<sup>-3</sup>), in grado di esprimere anche diversi stati di ossidazione. Taluni di questi metalli sono microelementi, svolgendo il ruolo di cofattori enzimatici nelle piante, e in piccole quantità sono richiesti anche dall'organismo umano; tuttavia, quando nel terreno raggiungono concentrazioni anomale arrecano un inquinamento di tipo permanente, per la cui risoluzione si richiede obbligatoriamente l'asportazione, essendo impossibile la loro degradazione.

### *La fitoestrazione*

A fianco dei più consolidati, ma anche più invasivi metodi di rimediazione fisici e chimici in terreni contaminati da metalli pesanti, che richiedono un trattamento *ex-situ*, ovvero l'asportazione del terreno da disinquinare, già da alcuni anni sono in fase di studio e di applicazione anche metodi di tipo biologico. In particolare, ad accezione di alcune indagini riguardanti la *fitovolatilizzazione* di selenio in *Brassica juncea*, *Brassica oleracea* e *Beta vulgaris* (Zayed et al., 1998), sono state approfondite appositamente per i metalli pesanti ed i radionuclidi le tecniche di *fitoestrazione*. Si tratta di processi di biodecontaminazione che fanno uso di piante in grado di assorbire e traslocare l'inquinante alla parte aerea. La biomassa vegetale prodotta viene successivamente rimossa e destinata ad utilizzazioni non alimentari (e.g., incenerimento). La fase finale del processo deve portare al recupero delle ceneri in spazi molto contenuti da destinare alla discarica o alla produzione di conglomerati cementizi, anche se esiste la concreta possibilità che i singoli metalli possano essere separati singolarmente attraverso processi di risolubilizzazione.

Le prime tecniche di fitoestrazione si sono basate sull'individuazione di piante iper-accumulatrici, ovvero di vegetali in grado di concentrare i metalli a livelli molto superiori di quelli comunemente osservati, senza per questo manifestare segni evidenti di tossicità. Le piante iper-accumulatrici sono state definite da Brooks et al. (1977) come quelle in grado di accumulare Ni, Co, Cu, Cr o Pb in concentrazioni superiori a 1000 mg kg<sup>-1</sup> (0,1%), oppure di Mn o Zn in quantità superiore a 10.000 mg kg<sup>-1</sup> (1%). Sono state identificate piante iper-accumulatrici appartenenti a numerose famiglie botaniche, anche se gli esempi più importanti afferiscono alle *Brassicaceae* con i generi *Thlaspi*, *Brassica* e *Alyssum* (Brooks, 1998; Gleba et al., 1999). Sono specie molto studiate *Thlaspi caerulescens* J.C. Presl., pianta specifica per l'assorbimento del cadmio, e *Alyssum bertolonii* Desv. che accumula quantità significative di nichel.

La capacità fitoestrattiva di queste piante viene tuttavia limitata dalla mo-

desta produzione di biomassa e dalla specificità nell'assorbimento di solo uno o di pochi metalli, caratteristiche che hanno spinto la ricerca a sviluppare le metodologie di fitoestrazione basate su piante ad elevato accrescimento anche se caratterizzate da una concentrazione modesta di svariati metalli pesanti.

Rispetto ai metodi fisici e chimici, la fitoestrazione presenta numerosi vantaggi legati alla possibilità di operare *in situ*, ai bassi costi di gestione e alle limitate esigenze di manodopera, all'assenza di emissioni secondarie e alla possibilità di ricavare utilità secondarie come energia e ceneri. Per contro, il processo è molto lento, della durata valutabile nell'ordine di alcune decine di anni e più, in funzione del livello di inquinamento iniziale; interessa esclusivamente lo strato di terreno colonizzato dalle radici ed esiste una obiettiva difficoltà di operare nei terreni marcatamente inquinati a causa dell'elevata fitotossicità.

### *Il ruolo dell'apparato radicale*

Indipendentemente dal tipo di pianta impiegata, la morfologia dell'apparato radicale gioca un ruolo fondamentale nel determinare l'efficienza del processo fitoestrattivo. È ben noto in letteratura che alcuni caratteri morfologici del sistema radicale come il profilo di densità (RLD: *Root Length Density*), l'approfondimento e la lunghezza radicale specifica (lunghezza per unità di biomassa) costituiscono i principali parametri di valutazione per definire l'adattabilità di una specie alle condizioni di stress nutrizionale (Fitter e Stickland, 1991). La plasticità del sistema radicale quale risposta alle condizioni di accrescimento è stata verificata per la maggior parte dei nutrienti, ma in modo più marcato nelle dicotiledoni rispetto alle monocotiledoni (Eissenstat, 1992; Taub e Goldberg, 1996). Normalmente si osserva una maggiore proliferazione di radici nelle zone più ricche di nutrienti (concimate), anche se esiste una variabilità notevole dovuta alla mobilità dell'elemento considerato (Campbell e Grime, 1989). Per quanto riguarda i metalli pesanti è stato dimostrato che piante iper-accumulatrici come *Thlaspi caerulescens* tendono ad accrescere maggiormente l'apparato radicale proprio nelle zone in cui il terreno è più inquinato (Schwartz et al., 1999; Whiting et al., 2000), migliorando in questo modo l'efficienza della depurazione anche in condizioni di contaminazione eterogenea.

Sfortunatamente le piante iper-accumulatrici tendono a sviluppare un apparato radicale modesto e poco profondo (Ernst, 1996), che riduce la capacità di intercettazione degli inquinanti, mentre le informazioni disponibili a questo riguardo per le piante a più elevato potenziale di accrescimento sono

alquanto modeste.

La capacità del sistema radicale di colonizzare il substrato inquinato, di assorbire e traslocare alla parte aerea i metalli pesanti rappresentano i fattori chiave per migliorare l'efficienza della fitodepurazione e operare quindi una corretta scelta nell'ambito di questa tipologia di piante. A questo scopo, dal 1998 presso il Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali dell'Università di Padova viene condotta una intensa sperimentazione sulla fitoestrazione di metalli pesanti, che ha consentito di riconoscere il ruolo fondamentale della morfologia radicale nei processi di disinquinamento. In particolare, la distribuzione della superficie radicale assorbente si è dimostrata utile all'individuazione di piante accumulatrici, anche se questa relazione necessita di essere ulteriormente confermata in condizioni diverse da quelle sperimentali, per le quali i tipi di inquinanti e la loro presenza relativa possano cambiare significativamente.

#### LA SPERIMENTAZIONE SU BRASSICACEAE

##### *Valutazioni in stadio precoce*

La ricerca sperimentale è stata condotta con il preciso scopo di consentire l'insediamento di specie *Brassicaceae* potenzialmente fitodepuratrici in un terreno marcatamente inquinato da diversi metalli pesanti. È stato constatato che in tali condizioni un accrescimento apprezzabile era possibile solo attraverso una significativa diluizione del terreno con substrato non inquinato. Una possibile alternativa, di cui era tuttavia necessaria una adeguata verifica, poteva essere rappresentata dalla sovrapposizione di un sottile orizzonte di terreno non inquinato che garantisse un effetto "starter" iniziale ai vegetali accumulatori.

A un terreno medio-sabbioso, prelevato presso una ex-marcita dell'hinterland milanese, marcatamente inquinato da numerosi metalli pesanti in conseguenza dell'irrigazione condotta per diversi anni con acque reflue urbane, sono stati così sovrapposti 7 cm di terreno medio-limoso, terreno quest'ultimo usato anche come controllo non inquinato. Le analisi elementari del terreno anomalo, hanno rilevato una concentrazione di metalli ben oltre i limiti previsti dal D.M. 471 del 1999, con valori che superavano la soglia ammessa da un minimo di 3 volte per il Cr, 8 volte per il rame, 23 volte per il Pb, 45 volte per il Cd e fino a 100 volte per Zn (tab. 1).

La sperimentazione, condotta in vasi a parete trasparente (rhizobox) di-

METALLO PESANTE	Cr (Totale)	Cu	Zn	Cd	W	Pb
Limiti D.M. 471/99	150	120	150	2	–	100
Terreno di controllo	34,216	105,921	248,864	1,686	4,229	13,260
Terreno inquinato	452,400	953,100	15159,303	89,920	220,620	2279,090

Tab. 1 *Contenuto di metalli pesanti nel terreno inquinato oggetto di sperimentazione in raffronto a quello di controllo e ai limiti di legge previsti dal D.M. 471/1999 (mg kg<sup>-1</sup> s.s.) per siti a uso verde pubblico, privato e residenziale*

sposti in serra, ha riguardato *Brassica napus* var. *oleifera* (colza), *Brassica juncea* (senape indiana), *Lepidium sativum* (lepidio) e *Raphanus sativus* (rafano).

L'accrescimento radicale misurato attraverso metodologia non distruttiva – quest'ultima rivelatasi significativamente correlata alla metodica distruttiva – ha evidenziato una marcata fitotossicità a livello radicale. È stata osservata infatti una contrazione significativa dell'accrescimento radicale (lunghezza) rispetto al controllo, con oscillazioni variabili da un minimo del 32% in rafano a un massimo del 72% in colza. La fitotossicità è stata meno evidente a livello epigeo; per il rafano, è stato osservato addirittura un aumento di biomassa, indicando che questa pianta possa trovare un possibile impiego nella fitoestrazione in queste specifiche condizioni sperimentali. Malgrado il generale effetto negativo sulla radice, *R. sativus* e *B. juncea* hanno risentito in minor misura rispetto alle altre specie in termini di approfondimento massimo, risultando anche le uniche in grado di mantenere la distribuzione delle radici tra i due orizzonti di terreno, inquinato e non, pressoché inalterata. In colza e lepidio invece, la ridistribuzione di lunghezza radicale verso l'orizzonte superficiale non contaminato è stata particolarmente evidente.

Come era lecito attendersi, è stata rilevata una relazione negativa tra accrescimento epigeo e concentrazione di metalli pesanti, cosicché la miglior efficienza del colza è stata parzialmente disattesa dalla modesta capacità di affrancamento. Lo sviluppo radicale pressoché doppio rispetto alle altre specie, unitamente a un buon accrescimento epigeo, hanno consentito invece a *Raphanus sativus* di accumulare quantità di Cd e Cr, pur nei limiti di una valutazione così precoce, degne di interesse (fig. 1).

*Risultati su piante adulte*

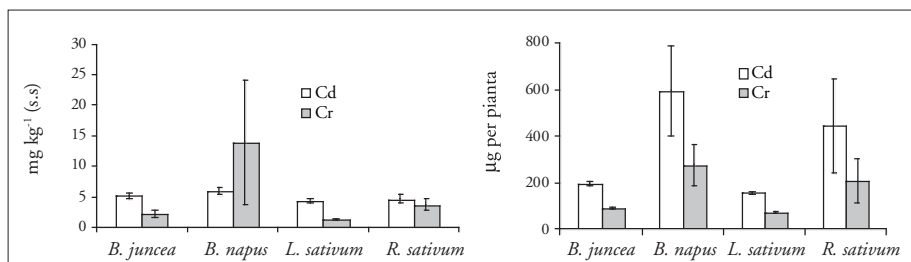


Fig. 1 Concentrazioni e asportazioni di cadmio e cromo ( $\pm$  S.E.) in diverse specie dopo 60 giorni di coltivazione in terreno contaminato e sovrapposto da un sottile strato di terreno di controllo.

I primi risultati ottenuti su *Brassicaceae* in stadio precoce suggeriscono l'esistenza di un ruolo importante della radice nei meccanismi di adattamento in presenza di metalli pesanti e che la risposta dei vegetali può essere anche molto diversificata. Sorge tuttavia una domanda, qual è il vero ruolo della morfologia radicale quando la pianta raggiunge la maturità?

Per fornire questa risposta ci si è avvalsi di uno strumento di analisi altrettanto originale, lo studio della variabilità intraspecifica di *Raphanus sativus*. Sono stati coltivati in vaso e fino allo stadio adulto sei diverse varietà commerciali di rafano, ricorrendo alla sovrapposizione dell'orizzonte superficiale non inquinato sul medesimo terreno di Milano e in raffronto al controllo non inquinato.

In tali condizioni, *R. sativus* ha confermato l'estrema tolleranza ai metalli manifestata in stadio precoce, producendo una biomassa aerea costantemente superiore al controllo (intervallo di variazione: +37÷+87%). L'incremento ponderale della porzione radicale ha riguardato invece solo alcune varietà, ma è interessante osservare come la presenza degli inquinanti abbia indotto una profonda riorganizzazione del comparto ipogeo, con un aumento della frazione fibrosa (+21,3% in media) a scapito di quella fittonante. *R. sativus* ha comunque manifestato chiari sintomi di fitotossicità, come dimostra l'aumento generalizzato di radici fini (biomassa) nell'orizzonte non inquinato, in alcuni casi potendo superare anche l'80%.

Il rafano non può certo essere considerato pianta iper-accumulatrice, le concentrazioni misurate sia nel comparto epigeo che radicale (fittone) sono risultate per tutti i metalli analizzati ben al di sotto dei valori soglia individuati in letteratura (tab. 2). La radice di riserva, struttura che può incidere per il 7-10% sul peso complessivo della pianta, costituisce la prima struttura di deposito dei metalli nella pianta. In essa infatti, l'entità dell'accumulo è confrontabile a quello della porzione epigea, ma nel caso di Cr, Cu e Pb le

APPARATO EPIGEO	Cd	Co	Cr	Cu	Mn	Mo	Ni	Pb	W	Zn
Diablo	1,475 ab	0,344 a	0,892 a	6,333 b	30,495 a	1,823 a	2,025 ab	4,764 a	0,297 a	283,275 ab
Regresso	2,394 ab	0,431 a	1,383 a	6,349 b	31,210 a	1,693 a	2,683 ab	0,650 a	0,332 a	483,023 ab
Remonta	1,526 ab	0,405 a	1,309 a	5,221 b	31,891 a	1,583 a	2,407 ab	0,377 a	0,280 a	350,362 ab
Rimbo	2,187 ab	0,392 a	1,484 a	6,409 b	33,451 a	2,231 a	2,920 ab	0,659 a	0,366 a	432,569 ab
Siletta nova	3,500 a	0,449 a	1,317 a	7,652 b	51,018 a	1,911 a	3,493 a	1,471 a	0,297 a	651,227 a
Trambo	1,187 b	0,244 a	0,964 a	12,924 a	23,019 a	1,695 a	1,710 b	0,371 a	0,349 a	256,123 b
<b>MEDIA</b>	<b>2,045</b>	<b>0,377</b>	<b>1,225</b>	<b>7,481</b>	<b>33,514</b>	<b>1,823</b>	<b>2,540</b>	<b>1,382</b>	<b>0,320</b>	<b>409,430</b>
C.V. (%)	41	20	20	37	28	13	25	123	11	36
RADICE FITTONANTE										
Diablo	1,378 b	0,867 a	9,857 a	34,506 a	59,743 a	<0,280	4,677 a	3,006 b	<0,900	254,665 b
Regresso	3,095 a	0,738 a	5,417 a	31,972 a	54,199 a	<0,280	3,727 a	4,585 ab	<0,900	644,869 a
Remonta	1,581 ab	0,728 a	7,894 a	39,643 a	37,019 a	<0,280	4,887 a	2,758 b	<0,900	361,872 ab
Rimbo	3,015 ab	0,511 a	10,962 a	35,487 a	39,343 a	<0,280	5,698 a	8,442 a	<0,900	608,782 a
Siletta nova	3,078 ab	0,631 a	5,352 a	26,311 a	37,464 a	<0,280	3,360 A	3,446 b	<0,900	640,654 a
Trambo	1,905 ab	0,700 a	6,029 a	41,473 a	42,168 a	<0,280	3,731 A	2,963 b	<0,900	338,052 ab
<b>MEDIA</b>	<b>2,342</b>	<b>0,696</b>	<b>7,585</b>	<b>34,898</b>	<b>44,989</b>	–	<b>4,347</b>	<b>4,200</b>	–	<b>474,816</b>
C.V. (%)	34	17	32	16	21	–	20	52	–	37

Tab. 2 Concentrazione di metalli pesanti (mg kg<sup>-1</sup> s.s.) nella porzione epigea e nel fittone di sei diverse varietà di rafano raccolte allo stadio di fioritura-inizio formazione siliques. Lettere diverse indicano differenze significative (test di Duncan P≤0,05)

concentrazioni possono risultare molto più elevate e meno variabili.

La disposizione dell'orizzonte non inquinato è risultata di estrema utilità, avendo consentito un regolare accrescimento del rafano senza che potesse essere osservato alcun ritardo fenologico. Non solo, questa tecnica si è rivelata di estrema utilità per l'individuazione dei genotipi maggiormente efficienti nella fitoestrazione. Infatti, l'entità dell'accumulo – espressa come somma delle concentrazioni di metalli standardizzate per le soglie dell'iper-accumulo – è risultata significativamente correlata con la frazione di radici fini (% del totale) che hanno colonizzato l'orizzonte inquinato.

Questo sembrerebbe essere un risultato atteso, già verificato per i nutrienti, maggiore è la superficie di scambio tanto maggiore è l'assorbimento, ma non poteva essere così scontato per gli elementi traccia, essendo possibili per questi meccanismi di esclusione prima e/o di modesta traslocazione alla parte aerea poi.

I risultati finora ottenuti, e in parte riassunti in Mosca et al. (2004), suggeriscono l'assunzione da parte della radice di un ruolo strategico nella *phyto-remediation* e la necessità di proseguire la ricerca per verificare l'ipotesi di una generalizzazione dei risultati anche in altre specie. Studi ulteriori in questo campo di ricerca sono inoltre necessari per individuare gli interventi tecnico-agronomici più idonei al miglioramento dell'accrescimento radicale, condizione essenziale per migliorare l'efficienza della fitoestrazione e contenere sensibilmente i tempi di bonifica. La sovrapposizione di un sottile orizzonte non inquinato è solo uno dei potenziali accorgimenti utili all'insediamento di piante depuratrici in condizioni particolarmente compromesse; numerosi altri sono gli interventi applicabili che devono essere tuttavia adeguatamente sperimentati nelle specifiche condizioni operative.

#### BIBLIOGRAFIA

- BROOKS R.R., (1998): *General Introduction*. In Brooks R.R. ed. *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archeology, Mineral Exploration and Phytomining*, Cambridge (U.K.), pp. 1-14.
- BROOKS R.R., LEE J., REEVES R.D., JAFFRÉ T. (1977): *Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants*, «J. Geochemical Exploration», 7, pp. 49-57.
- CAMPBELL D.B., GRIME J.P. (1989): *A new method of exposing developing root systems to controlled patchiness in mineral nutrient supply*, «Ann. Bot.», 63, pp. 395-400.
- EISSENSTAT D.M. (1992): *Costs and benefits of constructing roots of small diameter*, «J. Plant Nutr.», 15, pp. 763-782.



- ERNEST W.H.O. (1996): *Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants*, «Appl. Geochem.», 11, pp. 163-167.
- FITTER A.H., STICKLAND T.R. (1991): *Architectural analysis of plant root systems. 2. Influence of nutrient supply on architecture in contrasting plant species*, «New Phytol.», 118, pp. 383-389.
- GLEBA D., BORISJUK N.V., BORISJUK L.G., KNEER R., POULEV A., SKARZHINSKAYA M., DUSHENKOV S., LOGENDRA S., GLEBA Y.Y., RASKIN I. (1999): *Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming*, «Proc. Natl. Acad. Sci. USA», 96, pp. 5973-5977.
- MOSCA G., VAMERALI T., GANIS A., COLETTI L., BONA S. (2004): *Miglioramento dell'efficienza agronomica della fitodecontaminazione di metalli pesanti*. In *Fitoestrazione di Metalli Pesanti – Contenimento del Rischio Ambientale e Relazioni Suolo-Microrganismi-Pianta*. A cura di G. Zerbi e L. Marchiol, Forum Editrice, Udine, pp. 105-135.
- SCHWARTZ C., MOREL J.L., SAUMIER S., WHITING S.N., BACKER A.J.M. (1999): *Root architecture of the Zn-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localisation in soil*, «Plant Soil», 208, pp. 103-115.
- TAUB D.R., GOLDBERG D. (1996): *Root system topology of plants from habitats differing in soil resource availability*, «Funct. Ecol», 10, pp. 258-264.
- WHITING S.N., LEAKE J.R., MCGRATH S.P., BACKER A.J.M. (2000): *Positive response to Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens**, «New Phytol.», 145, pp. 199-210.
- ZAYED A., LYTLE C.M., TERRY N. (1998): *Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants*, «Planta», 206, pp. 284-292.



## La variabilità spaziale dei sistemi radicali: le applicazioni della geostatistica

### INTRODUZIONE

I ricercatori in scienze agrarie e ambientali hanno riconosciuto l'importanza dei problemi associati con la variabilità dei suoli sin dall'inizio del secolo scorso (Waynick e Sharp, 1919; Harris, 1920). Mescolare insieme più campioni per ottenere un campione composito che sia "rappresentativo" di un campo agrario è un modo pratico di risolvere il problema della variabilità spaziale (Ferrari e Vermeulen, 1955). Studi sull'eterogeneità dei sistemi naturali hanno mostrato una sostanziale variabilità anche a scale inferiori al metro (Snaydon, 1962; Frankland et al., 1963), il che ha avuto un'influenza considerevole sia nello sviluppo dello schema sperimentale che della statistica in generale. Modelli statistici, come il blocco randomizzato, il quadrato latino e lo split-plot furono definiti proprio con lo scopo di minimizzare l'effetto della variabilità sperimentale sui risultati delle prove agronomiche, mentre le procedure statistiche sono state usate per organizzare e sintetizzare i dati in modo da fare inferenza sui fenomeni di interesse. I test comunemente usati in ecologia sono  $t$ ,  $F$  e  $\chi^2$  o, come procedura, l'analisi della varianza (ANOVA), che rappresentano degli strumenti statistici generalmente semplici e facili da implementare, ma che si basano su due assunti: ciascun dato è indipendente dall'altro e tutti i dati sono distribuiti identicamente. Si pone dunque la questione: "Sono queste assunzioni valide nelle indagini ecologiche e in particolare per lo studio delle radici?" Assumere una dipendenza spaziale è in realtà più pratico e realistico, poiché ciò che identifichiamo come fenomeni ecologici coinvolge il riconoscimento di una correlazione. Le radici sono esseri viventi in continua evoluzione e la loro distribuzione spaziale dipen-

\* CRA – Istituto Sperimentale Agronomico, Bari

de da numerosi fattori sia endogeni che esogeni. Esiste infatti tutta un'ampia letteratura relativa all'effetto delle condizioni idriche, della disponibilità dei nutrienti e della compattazione del suolo sulla eterogeneità dello sviluppo radicale (Amato, 1991; Jackson e Caldwell, 1993; Amato e Govi, 1996). Molti studi ecologici in particolare riguardano l'analisi della dispersione e delle strutture di associazione fra specie diverse in differenti posti e tempi (Pielou, 1977), strutture che riflettono più la dipendenza spaziale che l'indipendenza. Le diverse definizioni usate di ecologia, come per esempio: «lo studio dell'ambiente naturale, particolarmente delle interrelazioni fra gli organismi e l'ambiente circostante» (Ricklefs, 1973) e «lo studio scientifico delle relazioni fra organismi e ambiente» (McNaughton e Wolf, 1973), presuppongono la dipendenza spazio-temporale. Anche se quest'ultima è particolarmente importante in studi sulla distribuzione congiunta fra organismi viventi e variabili ambientali, tuttavia molte delle misure statistiche tradizionali tendono a ignorarla. Consideriamo, a titolo di esempio, il rapporto di Hegenveld (1979) sulla distribuzione spaziale del coleottero *Dyschirius globosus* su un terreno 800 m x 400 m sommerso, bonificato in Olanda. Cinque trappole furono disposte ai vertici di un esagono centrato a ciascun nodo di una griglia di campionamento 21 x 12 con celle di lato pari a 40 m e i dati si riferiscono al numero di coleotteri catturati durante i mesi di aprile-agosto. Un grafico 3D della distribuzione dei dati (fig. 1) rivela una marcata concentrazione di individui intorno al centro dell'area campionata. Due zone, in particolare, vicino al centro di questa concentrazione mostrano dei valori particolarmente elevati, tuttavia ciò che va sottolineato è la similarità fra i valori contigui.

Consideriamo ora un'altra distribuzione completamente differente, relativa a un'area di campionamento del tutto simile a quella precedente (fig. 2). Diversamente dalla distribuzione continua del *D. globolus*, questo nuovo schema mostra valori alti, medi e piccoli completamente disgiunti fra loro e senza alcuna apparente struttura. Questa nuova griglia in realtà è stata ottenuta con una randomizzazione dei dati di *D. globolus*, pertanto entrambe le griglie contengono lo stesso numero di dati e gli stessi valori e hanno quindi la stessa distribuzione di frequenza e la stessa statistica univariata. Un'analisi statistica o un test basati unicamente su misure quali media, varianza, coefficiente di variazione o distribuzione di frequenza, non riescono a catturare le pur evidenti differenze fra i due casi. Risulta dunque chiara la necessità di definire un modo diverso di organizzare e descrivere i dati, che sia in grado di caratterizzare il grado di dipendenza spaziale o, eventualmente, l'assenza fra le locazioni di campionamento. Vi sono molte tecniche che permettono di differenziare distribuzioni spaziali manifestatamene diverse quali quelle delle

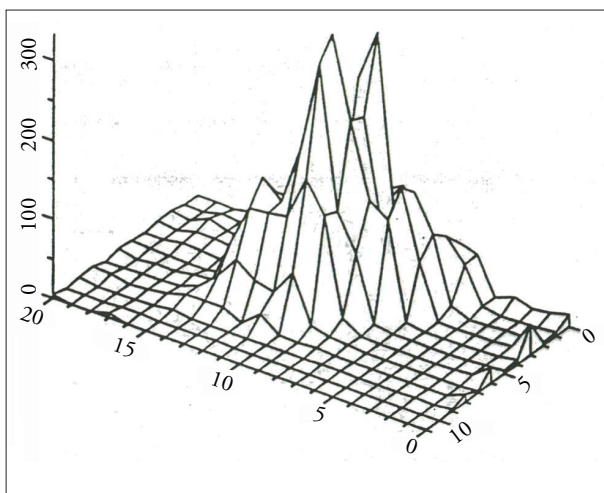


Fig. 1 *Distribuzione spaziale di Dyschirius globosus da Hegenveld, 1979*

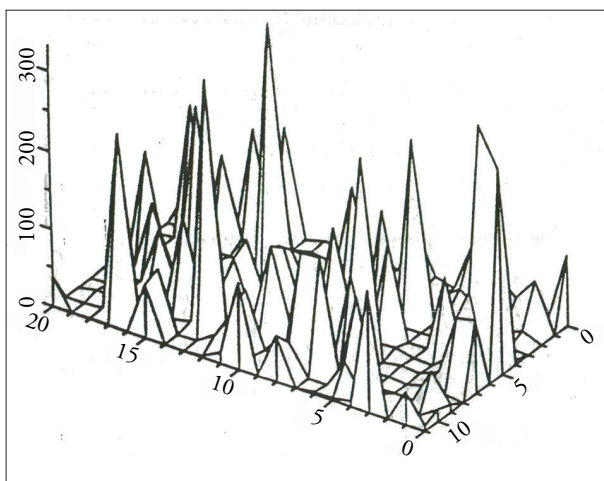


Fig. 2 *Variazione spaziale di Dyschirius globosus, ridistribuita casualmente, da Rossi et al., 1992*

figure 1 e 2. Una classe particolare di metodi statistici, basati sulla modellizzazione della dipendenza spaziale, è la *geostatistica* che rappresenta una branca della statistica applicata focalizzata sulla rilevazione, modellizzazione, stima o simulazione delle strutture spaziali.

#### GEOSTATISTICA: TEORIA DELLE VARIABILI REGIONALIZZATE

Per la maggior parte delle proprietà la variazione da punto a punto è di solito di tipo erratico, nel senso che non esiste alcuna semplice espressione matema-

tica che possa pienamente descriverla: tale variazione, comunque, non è totalmente casuale, in quanto esiste pur sempre una qualche forma di struttura o di dipendenza spaziale. La teoria delle *variabili regionalizzate* o *geostatistica* consente di tener conto di questi aspetti delle proprietà spaziali, seguendo un approccio di tipo stocastico. In questa nota si farà solo un breve cenno ai principi fondamentali della teoria, ma il lettore interessato è rimandato ai numerosi testi specifici (Journel e Huijbregts, 1978; Webster e Oliver, 1990; Goovaerts, 1997; Castrignanò e Stelluti, 2001) per una descrizione più dettagliata.

Nelle applicazioni più semplici la teoria assume una media locale costante e una varianza “stazionaria” delle differenze (residui) fra i punti separati da un dato vettore distanza: è questo ciò che costituisce “l’ipotesi intrinseca” di Matheron (1965). La sua formulazione è espressa nei termini di varianza delle differenze, ovvero di valore atteso<sup>1</sup> delle differenze al quadrato, in formula:

$$\text{var} [z(\mathbf{x}) - z(\mathbf{x}+\mathbf{h})] = E[\{z(\mathbf{x}) - z(\mathbf{x}+\mathbf{h})\}^2] = 2\gamma(\mathbf{h})$$

ove  $z(\mathbf{x})$  rappresenta il valore di una qualche proprietà  $z$  nel punto  $\mathbf{x}$  e  $z(\mathbf{x}+\mathbf{h})$  è il valore di  $z$  a  $(\mathbf{x}+\mathbf{h})$ . La semivarianza  $\gamma$  dipende quindi dal vettore di separazione  $\mathbf{h}$ , il lag, sia in termini di distanza che di direzione, ma non dalle posizioni effettive dei punti.

La funzione che collega  $\gamma$  ad  $\mathbf{h}$  è detta *variogramma* e, nel caso di variazione intrinseca, esso contiene tutta l’informazione utile relativa alla variazione spaziale della proprietà in esame.

## IL VARIOGRAMMA

La lettura e interpretazione del variogramma è fondamentale, poiché esso sintetizza tutta l’informazione essenziale, quale la forma della variazione, la sua grandezza e la scala spaziale, anche se non si tratta di un concetto assoluto, ma dipendente sensibilmente dalla scala di indagine e dalle dimensioni dell’area di campionamento. Dopo aver calcolato il variogramma sperimentale è necessario adattare alle semi-varianze discrete un modello matematico continuo, che verrà successivamente utilizzato nella fase di interpolazione con il kriging. I modelli teorici autorizzati possono assumere forme differenti, ma in generale quelli che appaiono limitati superiormente

<sup>1</sup> Il valore atteso per le variabili casuali è l’analogo della media per le variabili deterministiche.

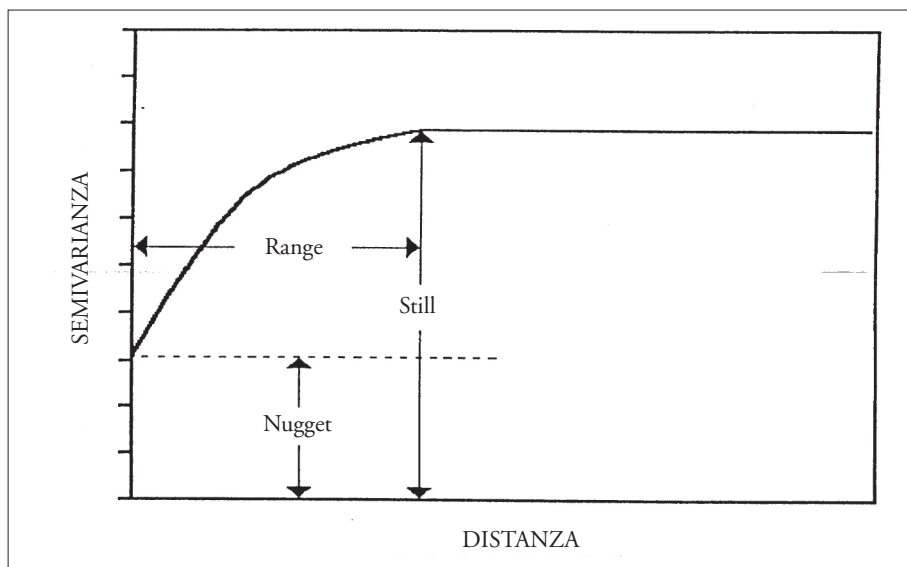


Fig. 3 Variogramma teorico

raggiungono un valore massimo (*sill*) a distanza finita (*range*) o asintoticamente a distanza infinita (fig. 3): in questo caso il sill rappresenta la varianza *a priori* di un processo casuale. Spesso il variogramma sperimentale interseca l'asse delle ordinate a qualche valore finito positivo, noto come *varianza di nugget*, che comprende diverse componenti: l'errore di misura e la variazione dipendente spazialmente relativa a distanze più piccole del minimo intervallo di campionamento.

Come caso estremo il variogramma sperimentale può presentare un andamento orizzontale, *nugget puro*, che denota totale assenza di dipendenza spaziale nei dati, per cui non ha senso tentare di applicare un qualche metodo di interpolazione. Se la variabile è comunque supposta continua, solo un campionamento più intenso può rivelare l'esistenza di una qualche probabile struttura spaziale a scala più piccola.

#### KRIGING

Il termine kriging comprende in realtà tutta una serie di metodi lineari per la stima locale, che va dal *kriging semplice* o *ordinario*, al *co-kriging multivariato*, al *kriging universale* e al *kriging con deriva esterna* entrambi non stazionari, al *factor kriging*, al *kriging disgiuntivo* e all'*indicator kri-*

*ging*, gli ultimi due non lineari. Il kriging consiste essenzialmente in una media pesata:

$$\hat{z}(x_0) = \sum_{i=1}^n \lambda_i z(x_i)$$

ove  $\hat{z}(x_0)$  è la stima in un punto non campionato e  $\lambda_i$  sono i pesi che sommano a 1 in modo che la stima sia non distorta e sono calcolati in modo da minimizzare la varianza di stima. Per ottenere delle rappresentazioni spaziali,  $\hat{z}(x_0)$  è calcolato ai nodi di una griglia sufficientemente fine, definita dall'utente e i risultati possono venir mostrati sottoforma di mappe alle isolinee, ai falsi colori o tridimensionali. Il kriging permette di superare molte delle limitazioni proprie dei metodi tradizionali di interpolazione: i pesi non sono arbitrariamente fissati, ma determinati dal modello di variogramma e dalla configurazione dei dati; si tratta di un interpolatore *ottimale*, nel senso che le stime sono non distorte e note con il minimo della varianza e le suddette varianze di stima possono venir calcolate e mappate insieme alle stime, per cui è possibile definirne pure i limiti fiduciali. Quanto esposto è sufficiente ad affermare la superiorità del kriging rispetto agli altri interpolatori e la sua maggiore sensibilità alle variazioni reali; va comunque sottolineato che, come ogni procedura statistica, esso presuppone il verificarsi di determinate assunzioni quali, fondamentalmente, la presenza di una qualche dipendenza spaziale. L'ampia varietà di procedure di kriging richiede inoltre una scelta oculata di quella più adatta al caso considerato.

#### GEOSTATISTICA MULTIVARIATA

Nelle indagini ambientali l'informazione oltre a essere georeferenziata è spesso anche multivariata: campioni vengono raccolti in più località e su ciascuno di essi vengono svolte diverse misure. Per i dati spaziali multivariati si osserva generalmente, oltre alla correlazione spaziale fra le osservazioni, anche una dipendenza più o meno forte fra le varie proprietà in esame.

La geostatistica multivariata utilizza la correlazione spaziale e l'informazione derivante dalle relazioni fra le variabili per migliorare la precisione della stima e separare le diverse cause di variazione in funzione della scala spaziale a cui esse operano (Castrignanò e Stelluti, 2001).

Per *variabili coregionalizzate* si intende variabili regionalizzate mutuamente dipendenti spazialmente e una misura della variabilità incrociata fra due



variabili è data dal *semivariogramma incrociato*, definito come metà della media del prodotto degli incrementi  $h$  relativi a due diversi attributi  $z$  e  $z'$ :

$$\gamma_{zz'}(h) = \frac{1}{2N(h)} \sum_{i=1}^{N(h)} \{ [z(x_i) - z(x_i + h)] \cdot [z'(x_i) - z'(x_i + h)] \}$$

## COKRIGING

Quando una o più variabili sono stimate come combinazione lineare, sfruttando sia la dipendenza spaziale che quella fra le variabili, la tecnica prende il nome di *cokriging*.

Per applicare il cokriging è necessario modellare contemporaneamente sia i variogrammi diretti, per ciascuna variabile, che quelli incrociati, per ciascuna coppia di variabili, sotto la condizione che le varianze di una qualunque combinazione lineare delle variabili siano non negative. L'utilizzo dell'algebra matriciale consente un facile passaggio dal caso univariato (kriging) a quello multivariato (cokriging), in cui tutte le sommatorie si intendono estese non solo ai punti di campionamento, ma anche alle variabili in esame.

L'aumentata complessità di calcolo e il maggior consumo di tempo-computer, richiesti dal cokriging ordinario rispetto al kriging, possono essere giustificati solo nel caso in cui le variabili considerate siano sufficientemente correlate fra di loro, con un coefficiente significativo di correlazione maggiore di 0.5.

## SIMULAZIONE STOCASTICA

La potenza di ogni scienza empirica risiede nella sua capacità di stimare o prevedere un qualunque attributo e gli ecologisti, in particolare, sono spesso interessati a stimare la densità di una popolazione, per esempio di radici, o la concentrazione di una variabile ambientale che si suppone influenzi tale densità. Quando alla variabile in esame è associato il concetto di un qualche tipo di *rischio*, sia economico che per la salute pubblica, è necessario unire alla stima una valutazione della sua incertezza o errore (Castrignanò et al., 2004). Il controllo dell'infestazione da nematodi di una coltura richiede una valutazione della severità del fenomeno e si possono avere differenti conseguenze sia economiche che ambientali secondo che la densità degli organismi sia sovrastimata o sotto-stimata. La sovrastima causa generalmente uno spreco di risorse, richiedendo un intervento che può non essere necessario, mentre la sottostima è ancor più

pericolosa poiché, oltre a produrre un danno economico, può mettere a rischio la vita o la salute degli stessi organismi. Secondo Suter et al., 1987: «Il rischio è spesso definito come l'incertezza relativa a un evento indesiderato, ove l'incertezza è espressa come probabilità di tale evenienza», per cui un obiettivo della valutazione dei rischi è quello di calcolare la suddetta probabilità. L'incertezza nella stima può derivare da varie cause: da una parte vi è la variabilità intrinseca nella densità di una popolazione di organismi viventi, come le radici, dall'altra quella dei diversi parametri ambientali. Suter et al. (1987) chiamano la fonte di questo tipo di incertezza «stocasticità naturale», ma l'indeterminatezza che noi associamo a un processo naturale non deriva dalla natura, bensì dalla nostra ignoranza relativa alla sua genesi. Un'altra sorgente comune di incertezza riguarda il livello di soglia critica al di sopra o al di sotto del quale è richiesto o meno un qualche intervento; altra comune causa di incertezza è quella associata all'errore sperimentale e di campionamento, che noi siamo in grado di identificare e valutare, ma che non possiamo eliminare. Una metodologia di valutazione dei rischi, che sia realmente efficace, deve poter tener conto di tutte queste diverse sorgenti di incertezza.

Graham et al. (1991) enfatizzano l'importanza di considerare le caratteristiche spaziali della variabile ecologica di interesse quando si vuole stimare il rischio ecologico: l'eterogeneità spaziale è una caratteristica naturale di tutti gli ecosistemi e pertanto una valutazione dei rischi deve necessariamente integrare la variabilità spaziale per essere realistica ed efficace. Presentiamo di seguito una serie di tecniche sufficientemente potenti e flessibili, che soddisfano i requisiti precedenti, nota come "simulazione stocastica condizionale" e finalizzata principalmente a quantificare l'incertezza delle stime. Essa differisce profondamente dalla simulazione meccanicistica più ampiamente applicata nelle scienze ambientali, che permette di prevedere la variazione nel tempo di una o più variabili d'interesse, sulla base di una serie di equazioni matematiche definite. Nel caso della simulazione stocastica, invece, la sola cosa che viene assegnata è la disposizione spaziale dei campioni e i loro valori assoluti e, sebbene la sua formulazione non sia affatto recente, essa si è venuta affermando solo negli ultimi anni, grazie all'avvento di computers dotati di notevoli velocità di calcolo e capacità di memoria.

La formulazione rigorosa della simulazione stocastica condizionale richiede dei concetti matematici e una notazione formale, che possono apparire piuttosto ostici e noiosi, il che rappresenta un ostacolo alla diffusione di questa metodologia, la cui idea è, al contrario, estremamente semplice. Anziché soffermarsi quindi sul formalismo matematico, risulterà più fruttuoso illustrarne il significato, ricorrendo a un'analogia assai familiare, quale quella del

gioco del puzzle. Nel caso specifico si tratta però di un puzzle un po' particolare, forse il più difficile che esista, in quanto non si dispone sul coperchio della scatola della fotografia dell'oggetto da ricostruire, per cui non si conosce la sua "vera" immagine finale. Tutti i tasselli di questo puzzle, inoltre, hanno esattamente le stesse forme e dimensioni e sono, pertanto, interscambiabili e possono venir scelti da un insieme estremamente grande (praticamente infinito). Un qualsiasi tentativo di ricostruire l'immagine sarebbe senz'altro destinato al fallimento, se non si disponesse di un'informazione importante riguardo all'immagine finale: alcuni tasselli nel puzzle occupano delle posizioni note e fisse. Se si suppone che questi pezzi immutabili forniscano una descrizione fedele dell'immagine finale, si può tentare di fare alcune congetture su di essa; si può assumere, per esempio, che l'istogramma delle frequenze relative dei colori di questo sottoinsieme (e così tutta la statistica univariata corrispondente) coincida con quello dell'immagine completa. La conoscenza delle posizioni esatte di alcuni pezzi consente anche di quantificare alcune informazioni relative alla distribuzione spaziale: se, per esempio, lungo un lato del puzzle predominano il blu o il bianco, si può prevedere che questa regione rappresenti un cielo o un mare, e quindi scegliere preferibilmente i tasselli di colore blu o bianco nella sua ricostruzione; analogamente, si può tener conto della prevalenza in determinate direzioni di colori particolari. Ciò che possiamo fare è, quindi, tentare di costruirci un modello mentale, che cerchi di quantificare quel grado di similitudine che riusciamo a scorgere fra i tasselli di cui conosciamo con esattezza la posizione.

L'idea centrale della simulazione stocastica può essere così formulata: poiché si dispone solo di informazioni parziali circa la "vera" immagine finale, si può tentare di costruire un gran numero di immagini possibili. Ciò deve essere realizzato "onorando" ovvero conservando le posizioni dei tasselli noti e utilizzando gli altri pezzi disponibili, in modo che siano rispettate le proprietà inferite dell'immagine, quali l'istogramma e il modello di distribuzione spaziale. Il risultato finale sarà la produzione di più immagini, tutte ugualmente possibili, che nel loro insieme caratterizzano l'incertezza con cui la "vera" immagine è conosciuta.

La simulazione stocastica inizia con lo scegliere un punto che non coincida con un pezzo fisso e, da un'indagine preliminare sui tasselli noti, col fare qualche congettura sul colore o i colori o l'insieme di linee che potrebbero caratterizzare il probabile tassello da collocare. Implicitamente, ricostruiamo mentalmente il disegno intorno ai pezzi noti e questo ci guida nella scelta del tassello dalla pila praticamente infinita dei pezzi disponibili. In realtà, questa scelta non è univocamente determinata, ci sono molti altri modi in cui

questo primo tassello potrebbe essere tratto dalla pila: si tratta di un tassello “simulato”, condizionato ai pezzi immutabili di cui conosciamo esattamente le posizioni.

A questo punto un secondo sito deve essere scelto, sempre in maniera casuale. Per questo e per tutti i siti successivi il procedimento precedentemente illustrato viene praticamente ripetuto; l'unica differenza consiste nel fatto che, nella ricostruzione mentale degli intorni dei pezzi fissi, si tiene conto anche di quelli già simulati. La procedura, ripetuta fino alla completa allocazione di tutti i tasselli mancanti, produce un'immagine che rappresenta una simulazione stocastica della “vera” immagine, non raffigurata sul coperchio della scatola del puzzle. L'immagine così prodotta potrebbe corrispondere a quella vera oppure no; questo però non è noto, per cui ciò che resta da fare è di smontare l'immagine precedentemente costruita e di ripetere il procedimento in modo da crearne una nuova. Anche questa seconda immagine, al pari della prima, deve onorare i dati noti, riflettere l'istogramma delle frequenze e obbedire al modello di distribuzione spaziale dei tasselli campione. L'immagine risultante avrà la stessa probabilità della prima di rappresentare l'immagine “vera”; non si sa infatti se quest'ultima immagine sia più o meno rispondente a quella reale. Se il procedimento illustrato viene reiterato un centinaio o un migliaio di volte, alla fine si otterrà per ciascun punto non campionato un centinaio o un migliaio di stime di ciò che potrebbe essere il “vero” tassello. Analizzate insieme queste stime permettono di definire una distribuzione di frequenze, ovvero una distribuzione di probabilità condizionale, che rappresenta una misura dell'incertezza relativa alla conoscenza dell'immagine reale.

La simulazione stocastica condizionale dei fenomeni naturali è molto simile al comune gioco del puzzle: con quest'ultimo si tenta di ricostruire un'immagine finale nota, disponendo opportunamente i diversi tasselli; con la simulazione stocastica si cerca di costruire per inferenza molteplici immagini, tutte ugualmente probabili, di una realtà non conosciuta, utilizzando unicamente i valori campionari che rappresentano i tasselli immutabili. Sono questi campioni che costituiscono, generalmente, l'unica informazione disponibile circa l'immagine “vera, da cui è possibile inferire qualche utile informazione che ci permetta di realizzare possibili riproduzioni della realtà. Tutte le immagini simulate, però, devono possedere alcune caratteristiche comuni ritenute importanti: prima di tutto la cosiddetta statistica “di base”, che potrebbe essere rappresentata dall'istogramma campionario, il che garantirebbe la condivisione di tutti i momenti statistici. Una seconda richiesta è che ciascun'immagine onori i dati campione e che riproduca il modello di distribuzione spaziale, inferito dai campioni e/o da altre fonti d'informazioni correlate.

Sintetizzando, si può dire che l'idea della simulazione stocastica è estremamente semplice: creare immagini multiple, ugualmente probabili del fenomeno d'interesse. Tranne che nelle postazioni di campionamento, in ciascun altro punto viene generata una gamma di numerosi valori possibili del fenomeno, che dà un'idea dell'incertezza associata alla stima. Il fatto che la simulazione stocastica onori la statistica "di base" e fornisca una misura sia globale che locale dell'incertezza la fa preferire ad altri metodi di stima, quali il kriging o quelli basati sull'inverso della distanza o sui poligoni d'influenza.

La simulazione differisce dal kriging o da ogni altro algoritmo d'interpolazione per due aspetti principali:

- Nella maggior parte degli algoritmi d'interpolazione lo scopo è la "migliore" stima locale  $z^*(\mathbf{x})$  in ogni punto non campionato  $\mathbf{x}$ , considerato indipendentemente, senza alcuna relazione alla statistica spaziale globale delle stime  $z^*(\mathbf{x})$ . Nella simulazione, al contrario, le caratteristiche globali e la statistica dei valori simulati,  $z^{(l)}(\mathbf{x})$ , hanno la prevalenza sulla precisione locale.
- Per un dato insieme di dati locali, che costituiscono l'informazione condizionante, il kriging usato come tecnica d'interpolazione fornisce un unico modello numerico, che è il migliore in termini di precisione locale. Al contrario, la simulazione fornisce molti modelli numerici alternativi,  $z^{(l)}(\mathbf{x})$ ,  $l=1, \dots, L$ , ciascuno dei quali è una "buona" rappresentazione della realtà secondo qualche criterio globale. Le differenze fra questi  $L$  modelli alternativi o "realizzazioni" costituisce una misura dell'incertezza spaziale.

Esistono diversi tipi di simulazione, noi faremo riferimento in particolare a quella di tipo sequenziale. La simulazione sequenziale (Journel e Alabert, 1989) consiste nel costruirsi un modello della funzione di probabilità cumulata condizionale,  $F(\mathbf{x}'; z|(N)) = \text{Prob}\{Z(\mathbf{x}') \leq z|(N)\}$ , ove  $N$  rappresenta l'informazione condizionale, e nel trarre a caso da essa un valore, in ciascuno dei nodi della griglia d'interpolazione visitati secondo un percorso casuale. Per assicurare la riproduzione dell'istogramma campionario, ogni funzione  $F$  è resa condizionale non solo agli  $N$  dati originari, ma anche a tutti i valori simulati nei punti precedentemente visitati. Si possono distinguere due principali tipi d'algoritmi sequenziali, a seconda che la serie di funzioni  $F$  sia determinata secondo un approccio multigaussiano o a variabile indicatrice. È importante apprezzare le potenzialità e le limitazioni dei metodi di simulazione gaussiana e a variabile indicatrice, in modo da poter scegliere quello più adatto alle particolari situazioni.

La simulazione gaussiana si basa sulla teoria classica normale multivariata, pertanto se i dati non sono distribuiti normalmente, è necessario

trasformarli prima della simulazione per poi riesprimerli, dopo l'analisi, in termini delle variabili originarie. Il metodo dal punto di vista del calcolo risulta generalmente rapido e facile da implementare, ma non consente di inglobare sorgenti d'informazione di tipo diverso. Un'altra caratteristica delle simulazioni gaussiane è che le loro realizzazioni presentano la proprietà di "massima entropia" ovvero, per un dato modello di covarianza spaziale, la distribuzione multigaussiana esalta la discontinuità dei valori estremi. Ne segue pertanto che una simulazione con alta entropia dà l'impressione di un grande disordine, con i valori alti e bassi che si alternano frequentemente. La simulazione a variabile indicatrice offre un metodo alternativo, più efficace nel riprodurre strutture spaziali più complesse di continuità, poiché ha minore entropia. Il metodo è non parametrico, non richiede cioè alcuna assunzione "a priori" sul tipo di distribuzione multivariata, ma necessita solo di una trasformazione a una variabile binaria (indicatrice). L'approccio non parametrico consente una maggiore flessibilità nella modellizzazione del processo (nel caso, per esempio, in cui siano presenti anisotropie di tipo differente per le varie classi di valori) e può incorporare facilmente più sorgenti d'informazione di tipo diverso (quantitativo e qualitativo).

In sintesi, se l'interesse è la stima dei valori medi nell'area in esame, l'approccio gaussiano più rapido dovrebbe essere preferito; se, al contrario, l'interesse è sulla caratterizzazione spaziale di particolari strutture di associazione (clustering) o sulla riproduzione più accurata della continuità spaziale, allora il metodo a variabile indicatrice risulta il più idoneo.

Journel (1983) sostiene che, poiché i modelli gaussiani producono simulazioni con la massima entropia, possano essere poco adatti nei casi in cui l'interesse è nella continuità dei valori estremi (minimi o massimi nella densità radicale). L'esaltazione dell'entropia può risultare al contrario vantaggiosa nei casi in cui non ci si aspetta alcuna continuità strutturale spaziale particolare, al di là di quella descritta dalla covarianza. Per distribuzioni di piante o parassiti radicali può essere più prudente assumere la massima entropia, poiché molte differenze locali (su piccola scala) possono dare origine a una struttura spaziale estremamente variabile, del tipo "a sale e pepe".

#### VANTAGGI DELLA SIMULAZIONE

Sintetizzando, si può affermare che la simulazione stocastica presenta numerosi vantaggi rispetto al kriging:

- Le mappe simulate appaiono più realistiche di quelle stimate poiché riproducono la variabilità spaziale ed evitano quell'effetto di "livellamento" (smoothing), che è tipico del processo di kriging. La simulazione stocastica deve quindi preferirsi al kriging in tutte quelle applicazioni in cui si voglia riprodurre l'effettiva variabilità osservata, come nel caso in cui si voglia delimitare aree occupate da organismi con diverso grado di associazione.
- Dalle molteplici realizzazioni ugualmente probabili è possibile in ciascun punto stimato costruirsi l'istogramma delle frequenze e quindi avere una misura dell'incertezza associata alla stima. Questa valutazione dell'errore è non parametrica e prescinde quindi dal tipo di distribuzione campionaria.
- Ciascuna mappa simulata, per esempio della distribuzione radicale, può essere inviata in ingresso anche a complessi modelli di simulazione dinamica delle piante, al fine di stimare la propagazione degli errori e prevederne l'impatto sulla risposta colturale.
- L'insieme delle mappe simulate può essere elaborato a posteriori (post-processing), per stimare la probabilità di superamento o no di una determinata soglia critica: sarà sufficiente in ogni punto contare il numero di volte in cui tale limite è superato. La loro proporzione, rispetto al numero totale di realizzazioni prodotte, fornirà la probabilità richiesta che risulterà molto utile nel delimitare, per esempio, aree ad alta o bassa concentrazione di radici.

#### ESEMPI DALLA LETTERATURA

Non vi sono molte applicazioni della geostatistica direttamente alla distribuzione del sistema radicale (Bengough et al., 2000), mentre questa tecnica è stata usata più diffusamente per descrivere la variabilità spaziale a scala molto fine dei nutrienti del suolo intorno a piante individuali (Jackson e Caldwell, 1993, 1993b; Halvorson et al., 1995; Schlesinger et al., 1996). In particolare Jackson e Caldwell (1993b) usarono tecniche geostatistiche univariate per quantificare la scala e il grado di variabilità spaziale intorno a piante di *Artemisia tridentata* e di *Pseudoroegneria spicata*. Campioni di suolo furono prelevati a ogni metro in una griglia di 10-m x 12-m e ogni 12.5 cm in 9 griglie "nicchiate" di 0,5 m x 0,5 m, distribuite casualmente e contenenti almeno una delle due piante. Furono determinati 11 parametri del suolo (sostanza organica, pH, contenuto idrico, massa delle radici vive, respirazione microbica, mineralizzazione netta di N, potenziale di nitrificazione, ammonio estraibile, nitrati, fosfati e potassio) e in particolare la massa radicale fu trasformata

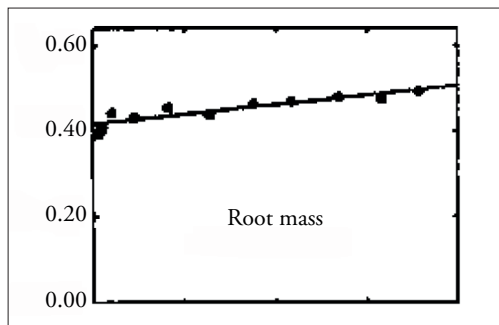


Fig. 4 Semivariogramma della massa radicale (da Jackson e Caldwell, 1993)

nei logaritmi, poiché la distribuzione presentava una eccentricità positiva e un intervallo di variazione di più di due ordini di grandezza, da 0,013 g a 2,63 g. Tale variabile tuttavia non mostrava alcuna struttura spaziale, con un variogramma lineare di pendenza leggermente diversa da zero (fig. 4), anche se gli autori non hanno effettuato alcun test statistico per verificarne la significatività. I semivariogrammi delle altre variabili mostravano una autocorrelazione spaziale (range) a distanze inferiori a 1m, mentre nessuno dei processi microbici analizzati (mineralizzazione netta di N, potenziale di nitrificazione e respirazione microbica) mostravano alcuna autocorrelazione significativa, anche alla scala di misura più fine di 12,5 cm. Dai risultati di questa ricerca gli autori concludono che le proprietà plastiche delle radici e la loro capacità di esplorazione attiva dell'ambiente in un suolo eterogeneo sono fattori fondamentali nel determinare il bilancio dei nutrienti di molte piante.

Klironomos et al. (1999) nel loro studio, mirante a valutare gli effetti di elevate concentrazioni di  $\text{CO}_2$  sull'attività microbica del sottosuolo in un ecosistema di tipo mediterraneo, descrivono la struttura spaziale di vari fattori biotici e abiotici del sottosuolo, ponendo anche tale struttura in relazione con la posizione della vegetazione e stratificano il suolo in aree ad alta e bassa attività. Gli autori suggeriscono l'uso di tecniche geostatistiche per ottimizzare il campionamento, aumentando la potenza statistica sperimentale e riducendone l'errore di II tipo. Un campo di 3-m x 10-m fu intensamente campionato, raccogliendo 44 campioni a distanza di 1m e ulteriori 27 campioni intorno a ciascuno di tre arbusti di *A. fasciculatum* a intervalli di 0,125 m e fino a una profondità di 15 cm. Le radici furono separate dal suolo per setacciamento e seccate in stufa a 80 °C per 24 ore per determinarne la sostanza secca, mentre la sostanza organica totale fu stimata dalla perdita per combustione a 550 °C. Atri 20 parametri biotici e chimici furono determinati e la geostatistica fu applicata per calcolare i variogrammi sperimentali, adattare dei modelli sferici e produrre mappe spaziali con la tecnica del kriging a blocchi. I risultati di tale studio mostravano che le



variabili biologiche e chimiche analizzate non erano distribuite casualmente nel suolo, ma ciascuna esibiva una distribuzione spaziale specifica: le micorrize (fig. 5) e i microartropodi (fig. 6) mostravano dei gradienti spaziali da aree di bassa a quelle di alta attività, risultando fortemente strutturate spazialmente. La biomassa radicale, quella fungina e batterica (fig. 7), i nutrienti del suolo e i nematodi (fig. 8) mostravano invece delle piccole aree isolate caratterizzate da attività molto alta o molto bassa, all'interno di una matrice più estesa di attività intermedia. La maggior parte dei punti isolati a bassa attività furono associati a siti con elevata rocciosità, mentre "hot-spot", ovvero aree con picchi di attività relative a 5 parametri (biomassa radicale, batterica e fungina, spore di *Acaulospora* e nematodi), furono trovate in corrispondenza o nelle vicinanze della vegetazione. Le importanti conclusioni che gli autori traggono da questa analisi è che molte delle variabili biotiche e abiotiche nel suolo sono strutturate spazialmente e che tale informazione può essere vantaggiosamente utilizzata per pianificare esperimenti in campo con maggiore potenza statistica. Le variabili biotiche e quelle relative ai nutrienti non erano distribuite in maniera casuale e quindi un campionamento completamente casuale, senza alcuna conoscenza "a priori" della distribuzione spaziale, avrebbe condotto inevitabilmente ad alta

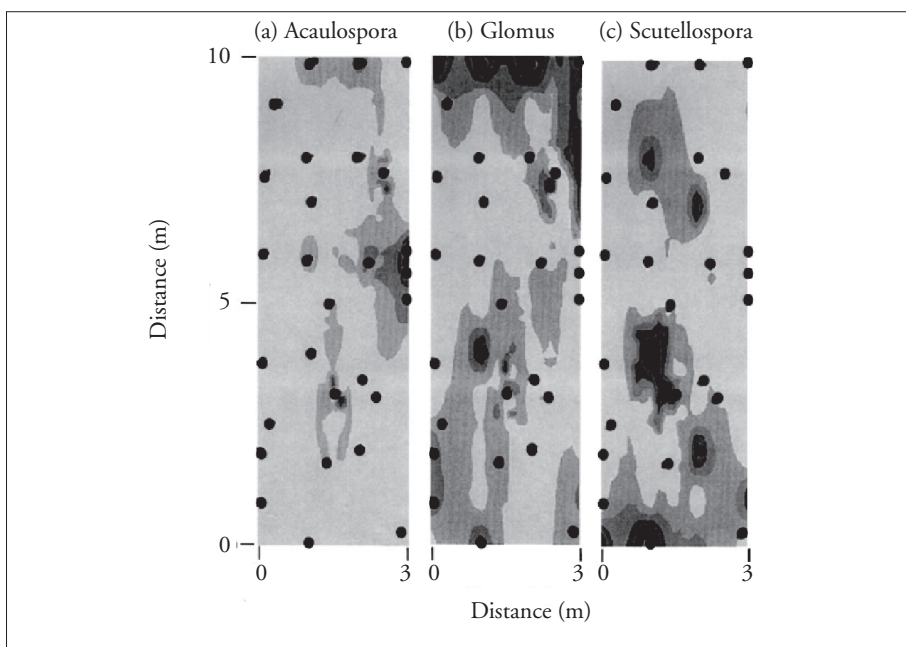


Fig. 5 Distribuzione spaziale di Micorrize, da Klironomos et al., 1999

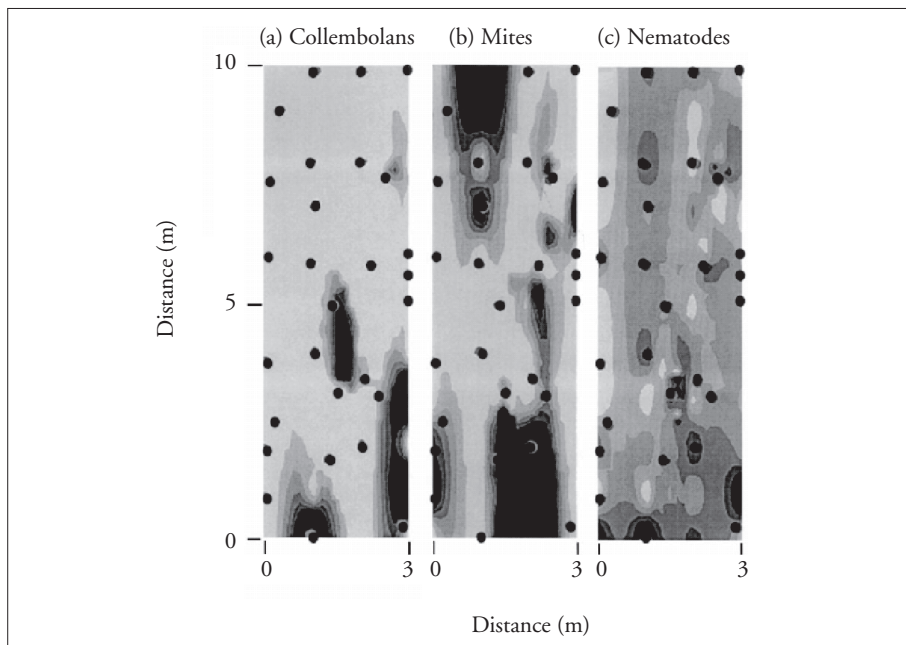


Fig. 6 Distribuzione spaziale di Microartropodi, da Klironomos et al., 1999

varianza campionaria, a bassa potenza statistica e ad alta probabilità di commettere errori del II tipo, ovvero all'impossibilità di rifiutare l'ipotesi nulla quando questa risultasse falsa.

Più recentemente Maestre e Cortina (2002) partirono dalla considerazione che la distribuzione spaziale degli attributi topografici e delle proprietà del suolo può rappresentare un fattore chiave nel determinare i flussi di acqua e soluti in ecosistemi semi-aridi e che pertanto la sua identificazione è fondamentale per comprendere i processi di degrado di queste aree e per programmare adeguate misure di recupero. Nel loro studio analizzarono la distribuzione della vegetazione e di alcune proprietà superficiali del suolo (croste biologiche, croste fisiche, muschi, frammenti di rocce, biopori, accumulo di radici fini e pietre nel sottosuolo) in una steppa semi-arida di *Stipa tenacissima* nel SE della Spagna. Gli autori applicarono una combinazione di analisi spaziale, detta SADIE (Perry, 1998; Perry et al., 1999), che utilizza indici espressi in funzione della distanza, con la geostatistica per descrivere le strutture di variazione delle proprietà del suolo e della vegetazione.

In particolare SADIE fornisce un indice di raggruppamento (clustering) che misura il grado di associazione dei dati in aree con densità superiore alla media

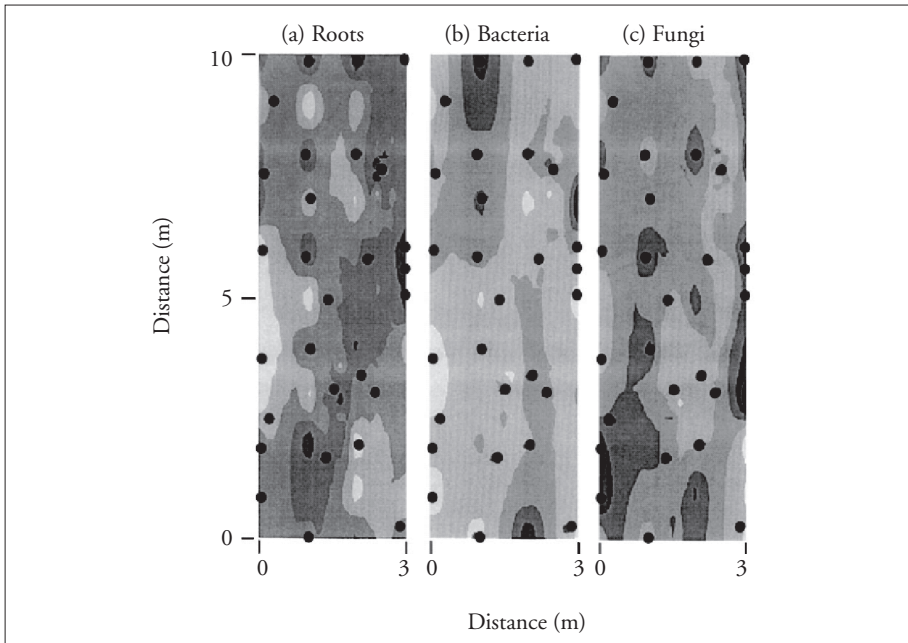


Fig. 7 Distribuzione spaziale di biomassa radicale, batterica e fungina da Klironomos et al., 1999

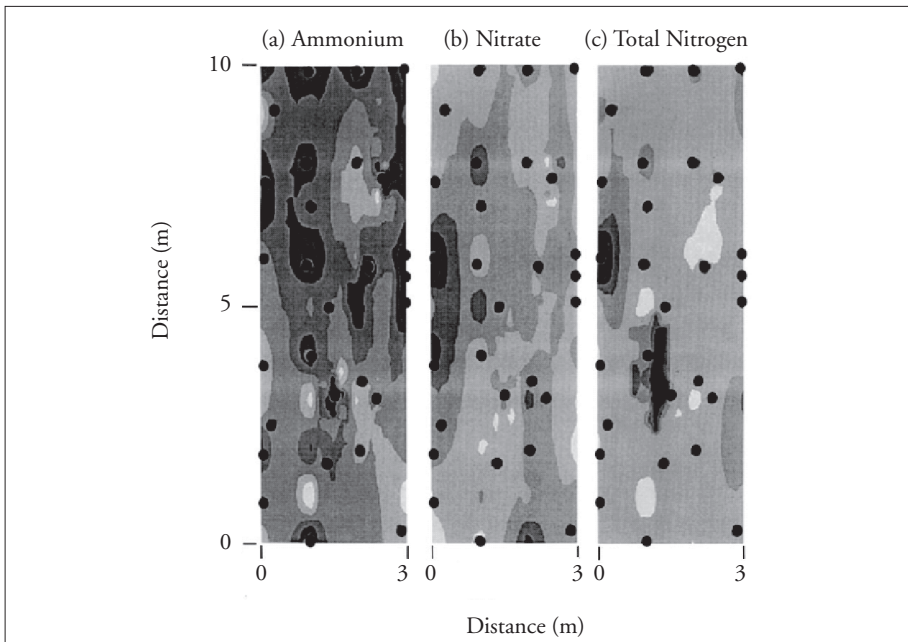


Fig. 8 Distribuzione spaziale di nutrienti del suolo da Klironomos et al., 1999

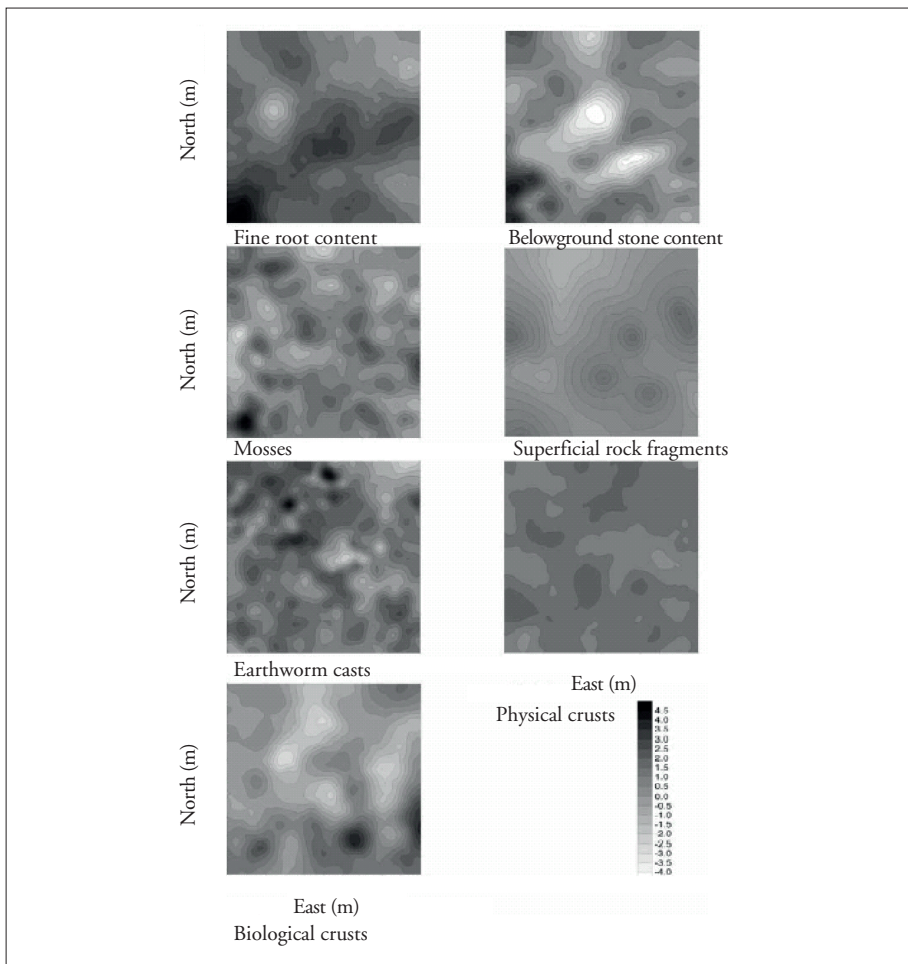


Fig. 9 Mappe dell'indice di clustering di SADIE di alcune proprietà del suolo, da Maestre e Cortina (2002)

(patches) e in quelle con densità al di sotto della media (gaps). Su un'area di 50 m x 50 m furono raccolti 294 campioni secondo un campionamento stratificato in due situazioni rappresentative: vicino agli arbusti di *Stipa tenacissima* e nelle aree aperte, caratterizzate da scarsa vegetazione. In ciascun punto di campionamento fu scavata una buca di 25 x 25 x 25 cm e determinata la percentuale di radici fini e il contenuto in pietre usando una scala semiquantitativa (da 1 a 3); le altre variabili furono determinate assumendo come supporto di misura un quadrato di 25 cm di lato. Furono quindi calcolati i variogrammi sperimentali dell'indice di clustering relativo ai vari parametri misurati, a cui furono adat-

tati dei modelli matematici autorizzati. I valori fra i punti di campionamento furono quindi interpolati con il kriging ordinario a blocchi, utilizzando un blocco di dimensioni 2,5 m x 2,5 m. Le mappe dell'indice di clustering (fig. 9) sembravano suggerire la presenza di aree di maggiore concentrazione per la distribuzione delle biopore, delle radici fini, del contenuto in pietre nel suolo, dei muschi e delle croste biologiche (croste di cianobatteri e di licheni). L'analisi di correlazione suggeriva inoltre che le distribuzioni spaziali di alcune proprietà del suolo, come le croste biologiche, la copertura dei muschi, i frammenti superficiali delle rocce, le croste fisiche e le radici fini, furono legate significativamente con la presenza della vegetazione in superficie. Gli autori concludevano che lo studio aveva rivelato la presenza di complesse strutture spaziali sia nelle proprietà del suolo che della vegetazione nell'area analizzata, ma che ulteriore sperimentazione sarebbe necessaria per comprendere meglio l'effetto dei parametri ambientali sulla morfologia e dinamica delle radici.

#### CASO DI STUDIO

Per dimostrare le potenzialità dell'applicazione della geostatistica all'analisi della distribuzione radicale, abbiamo utilizzato, a titolo di esempio, i dati relativi a una prova agronomica in cui 5 cultivar di girasole, sottoposte a tre livelli di azoto, venivano poste a confronto secondo uno schema a split-plot con tre ripetizioni. Come metodo di studio degli apparati radicali è stato scelto quello non distruttivo dei minirizotroni: al momento della semina del girasole due tubi di plexiglass sono stati installati sulla fila e nella interfila in ogni parcella relativa a un solo genotipo (cv. *Isoleic*), con una inclinazione di 45° rispetto alla superficie del terreno. Su ogni tubo, lungo 2 m e con diametro esterno di 5 cm, è stato disegnato, sulla parte esterna e per tutta la sua lunghezza, un reticolo costituito da circonferenze distanziate 2,5 cm e da 4 linee verticali, equidistanti e parallele che, incontrando gli anelli circolari, li suddividono in 4 archi uguali. I rilievi sono stati effettuati, con una telecamera a sonda tipo "RI-R 90" a cui era collegato un videoregistratore, in coincidenza delle principali fasi fenologiche del girasole (maggio 12°-14° foglia; giugno-floritura). Su ogni singolo quadrante del reticolo sono state contate le radici, distinguendole in primarie e secondarie. I singoli conteggi sono stati trasformati in densità di lunghezza radicale ( $\text{cm cm}^{-3}$ ) (RLD), secondo l'equazione di Upchurch e Ritchie (1983):

$$\text{RLD} = N_d / A_d$$

dove  $N$  è il numero delle radici intersecanti il tubo;  $d$  il diametro esterno del tubo e  $A$  l'area di osservazione del tubo ( $9 \times 82 \text{ cm}^2$ ). I valori di RLD, sono stati registrati in funzione della posizione sull'asse del tubo e i valori relativi ai 4 settori longitudinali sono stati archiviati e trattati come variabili distinte. In questo esempio le radici principali e secondarie sono state cumulate in un unico valore e sono stati analizzati, a titolo di illustrazione della tecnica, i dati solo del tubo 1 della 1 ripetizione, considerando i tre livelli di fertilizzazione azotata (0, 50 e  $100 \text{ Kg} \cdot \text{ha}^{-1}$  di N) nei due momenti del ciclo colturale (maggio e giugno).

I dati relativi ai 4 settori longitudinali del tubo sono stati sottoposti a un'analisi esplorativa, mediante il calcolo della statistica di base, la rappresentazione degli istogrammi delle frequenze e la determinazione della matrice di correlazione. Per tutti i dataset considerati le 4 variabili mostravano un sensibile scostamento dalle distribuzioni normale e lognormale, anche verificato con un test  $\chi^2$  e presentavano correlazioni significative elevate. Si è pertanto optato per un'analisi multivariata, previa normalizzazione e standardizzazione dei dati tramite una anamorfosi che utilizza uno sviluppo in serie ai polinomi di Hermite, troncato a un numero finito di elementi variabile fra 30 e 100. Per poter ricostruire spazialmente il dato di densità radicale è stato necessario applicare per ciascuna data e livello azotato, un modello lineare di coregionalizzazione (LMC) alla matrice dei variogrammi diretti e incrociati delle 4 variabili; nella tabella 1 sono riportati i risultati di un tale adattamento. Sintetizzando, possiamo dire che per tutti i dataset, fatta eccezione per il trattamento non fertilizzato del mese di maggio, caratterizzato da elevata erraticità e variabilità a corto raggio, il modello di dipendenza spaziale multivariato comprende 3 strutture di base: 1) un effetto nugget, che rappresenta la componente casuale, non correlata spazialmente della variabilità; 2) un modello sferico a corto raggio (range: 30-50 cm) e 3) un modello sferico a più lungo raggio (range: 80-120 cm), che rappresenta in entrambe le date la proporzione principale della variazione totale, come attestato dal primo autovalore corrispondente. La bontà di adattamento dei modelli è stata verificata con test di cross-validation. Questi risultati dell'analisi strutturale sono già indicativi di alcune caratteristiche morfologiche del sistema radicale che stiamo analizzando: l'esistenza di due chiare strutture di correlazione spaziale sta a significare che grandi variazioni in RLD avvengono anche a distanze di parecchi centimetri a causa del raggruppamento (clustering) delle radici. Questa aggregazione spaziale si verifica effettivamente a due scale spaziali principali, il fatto però che la maggiore componente di variazione sia associata alla scala più lunga è da associarsi a uno stato dinamico delle radici che tendono ad approfondirsi.

Una volta adattato un modello LMC, si pone il problema di decidere fra



DATA	TRATTAMENTO	STRUTTURA 1	STRUTTURA 2	STRUTTURA 3
12 <sup>a</sup> -13 <sup>a</sup> foglia	T0	Sferica (R=12 cm)	Nugget	
	T50	Cubica (R=50 cm)	Sferica (R=90 cm)	Nugget
	T100	Cubica (R=50 cm)	Sferica (R=80 cm)	Nugget
fioritura	T0	Cubica (R=50 cm)	Sferica (R=80 cm)	Nugget
	T50	Cubica (R=50 cm)	Cubica (R=120 cm)	Nugget
	T100	Bessel-J (R=100 cm)	Cubica (R=30 cm)	Nugget

Tab. 1 Parametri del modello lineare di coregonalizzazione (LMC)

l'utilizzo di una tecnica di stima (kriging) o di simulazione stocastica. Il notevole grado di incertezza insito nel processo di conteggio delle radici pone come condizione cruciale la valutazione degli errori di stima, per cui si è optato per l'applicazione della simulazione seriale di tipo gaussiano con la produzione di 500 realizzazioni. Ai valori simulati è stata quindi applicata la trasformazione inversa all'anamorfofi precedentemente stimata, al fine di poter esprimere le previsioni in termini di valori originari di RLD. Le singole realizzazioni, anche se ugualmente probabili dal punto di vista statistico, differiscono fra loro e queste differenze danno un'idea dell'incertezza intrinseca della previsione. Per ottenere tuttavia una stima quantitativa di tale incertezza, si è proceduto a una post-elaborazione dell'insieme delle 500 realizzazioni, producendo tre tipi di mappe: quella delle medie, delle deviazioni standard e delle probabilità di superamento di un valore soglia critico, che è stato arbitrariamente posto a  $0,5 \text{ cm cm}^{-3}$ .

Nelle figure 10 e 11 sono riportate le mappe prodotte per tipo (media, standard deviation, probabilità), data di misura (maggio, giugno) e livello azotato (0, 50, 100). Una caratteristica comune, che si ricava facilmente dall'ispezione di tali immagini, è l'accentuata anisotropia, ovvero una distribuzione non uniforme delle radici secondo le diverse orientazioni nello spazio. Analizzando più dettagliatamente le singole immagini, si può osservare che per il campionamento di maggio per la tesi 0 è evidente una tendenza dell'apparato radicale a svilupparsi in profondità, preferibilmente lungo una determinata orientazione, mentre per le altre la densità è molto rada. Per la tesi 50 si nota una distribuzione radicale anche negli strati più superficiali, con una accentuata anisotropia, caratterizzata da massimo sviluppo lungo un'orientazione diversa dalla precedente, con valori di RLD sensibilmente maggiori rispetto al controllo. La distribuzione radicale per la tesi 100 appare molto simile alla precedente, con una maggiore uniformità fra le varie direzioni spaziali. Le corrispondenti mappe della deviazione standard mostrano una generale proporzionalità positiva con la media; questa proprietà, nota come eteroschedasticità della varianza, è una

conseguenza della deviazione dalla normalità delle distribuzioni radicali. Questo risultato, tra l'altro, sottolinea la necessità di ricorrere a metodi non parametrici o alla simulazione stocastica per stimare l'errore, a causa dell'inadeguatezza della varianza di kriging a stimare l'errore locale. Le corrispondenti mappe di probabilità hanno il vantaggio, rispetto a quelle delle medie, di mettere chiaramente in evidenza le aree dove si verifica la maggior concentrazione di radici: per il trattamento 0, densità radicali  $> 0,5 \text{ cm cm}^{-3}$  possono essere trovate solo secondo una determinata orientazione, mentre per le altre tale probabilità è praticamente nulla; per la tesi 50, si ha una concentrazione di radici nella parte centrale del tubo a una profondità di circa 50 cm; per la tesi 100, valgono praticamente le stesse considerazioni relative alla tesi 50, con la differenza che la zona di massima concentrazione è più superficiale, a circa 40 cm di profondità e i valori di probabilità sono più elevati.

I rilievi effettuati nel mese di giugno mostrano delle differenze rispetto a quelli precedenti: il testimone non concimato presenta dei valori più elevati rispetto a quelli di maggio e una distribuzione più uniforme; si nota inoltre una maggiore concentrazione in profondità. Le mappe delle medie di RLD per le tesi 50 e 100 appaiono molto simili fra loro, tuttavia si differenziano dal testimone per i valori più bassi di densità e per uno spostamento dell'area di maggiore concentrazione a profondità più superficiali. I valori corrispondenti di deviazione standard, rispetto a quelli di maggio, appaiono più uniformemente distribuiti. Anche per questo rilievo più tardivo le mappe di probabilità sono utili a evidenziare le zone di massima concentrazione: per il testimone, secondo una determinata orientazione, le radici si concentrano alla profondità di 60-80 cm, mentre per le altre tesi l'addensamento avviene a profondità più superficiali. Come per il campionamento di maggio la zona di massima concentrazione radicale per le tesi concimate, appare limitata a una ristretta parte centrale del tubo, a circa 50 cm di profondità per la tesi 50 e 40 cm per la tesi 100.

Urge tuttavia sottolineare che questi risultati sono stati descritti solo a titolo illustrativo delle tecniche utilizzate e non vogliono essere dimostrative di relazioni di tipo causa-effetto fra le proprietà morfologiche delle radici e i fattori antropici esterni, quali la fertilizzazione. L'anisotropia osservata può dipendere infatti da molteplici cause sia morfologiche che ambientali, in quanto lo sviluppo preferenziale secondo determinate orientazioni è funzione del tipo di radice, ma anche di molte proprietà del suolo (temperatura, contenuto idrico, impedenza meccanica) che possono essere strutturate spazialmente e influire sensibilmente sul sistema radicale (Logsdon e Linden, 1992).

Da quanto illustrato appare evidente come la ricostruzione 3D di un siste-



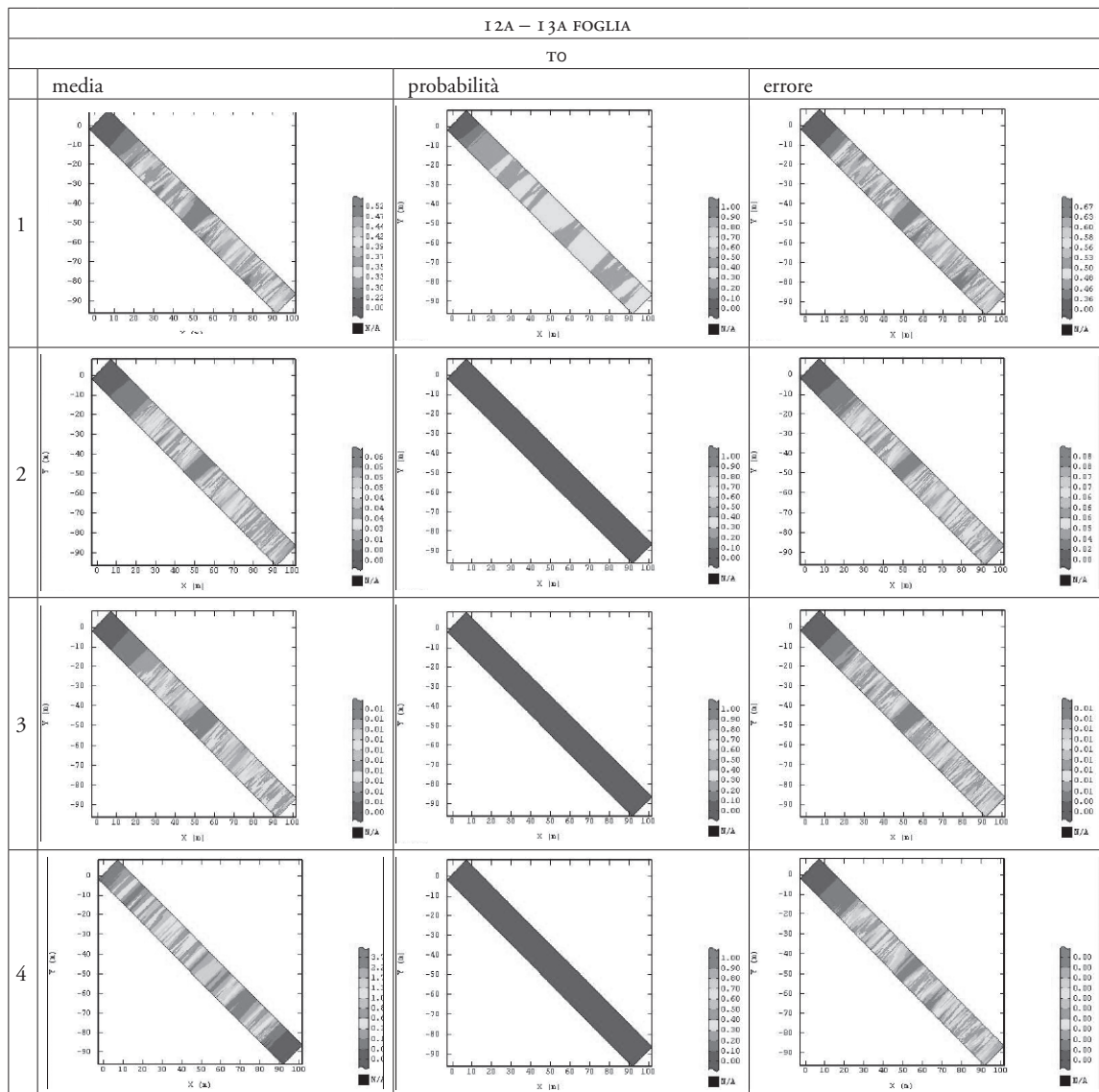


Fig. 10 Mappe radicali del mese di maggio per ciascun livello azotato (0, 50 e 100)

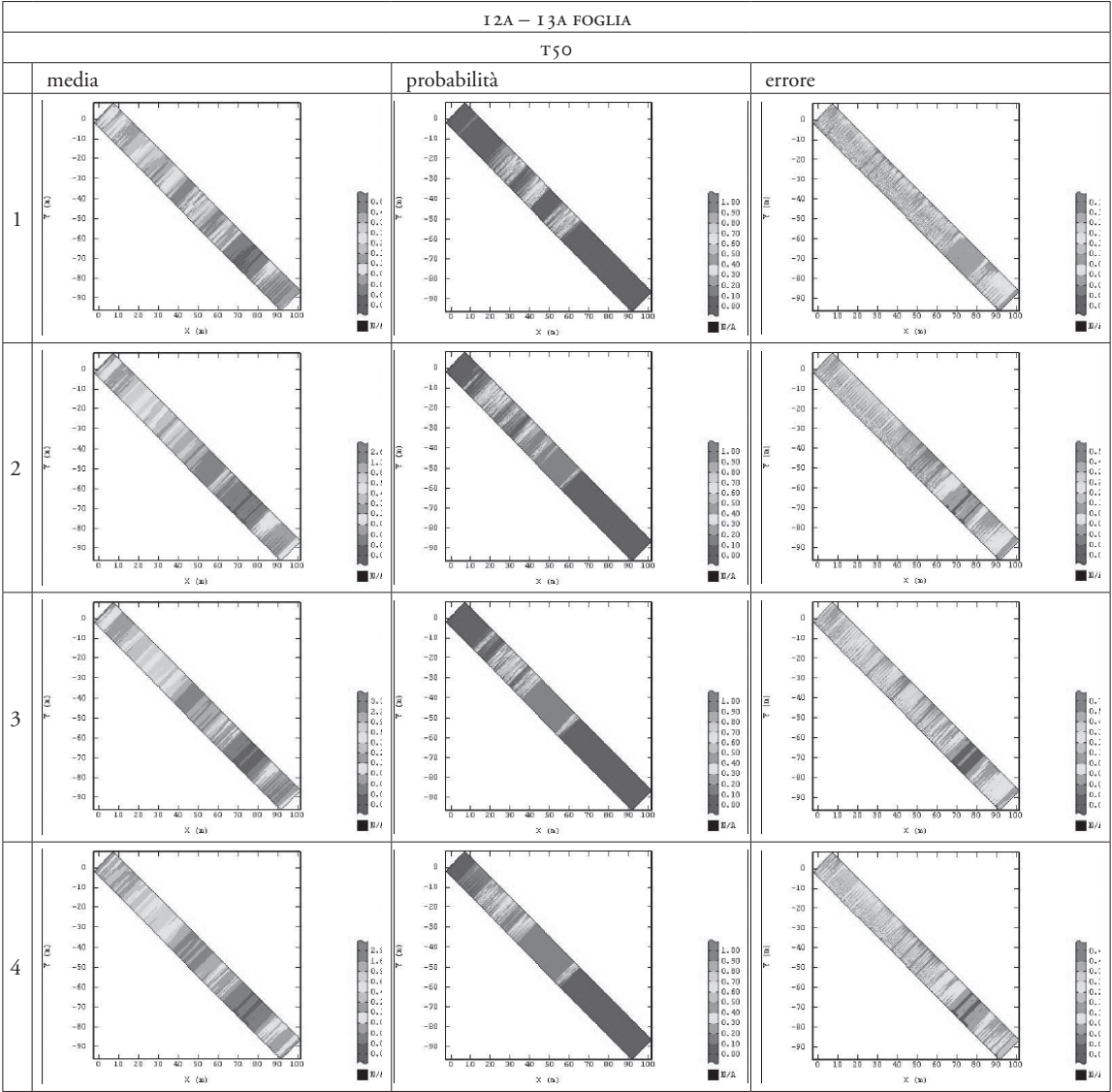


Fig. 10

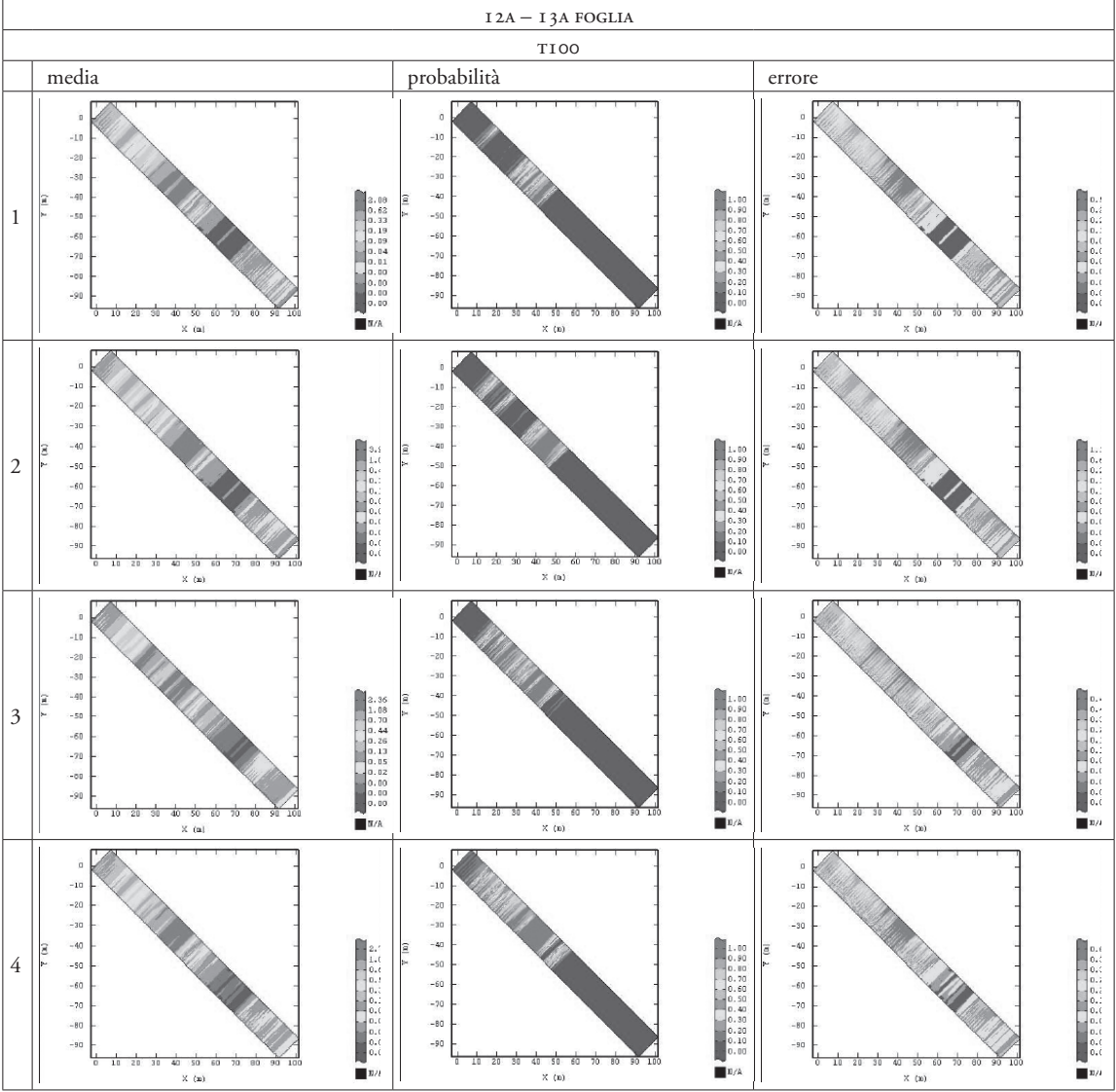


Fig. 10

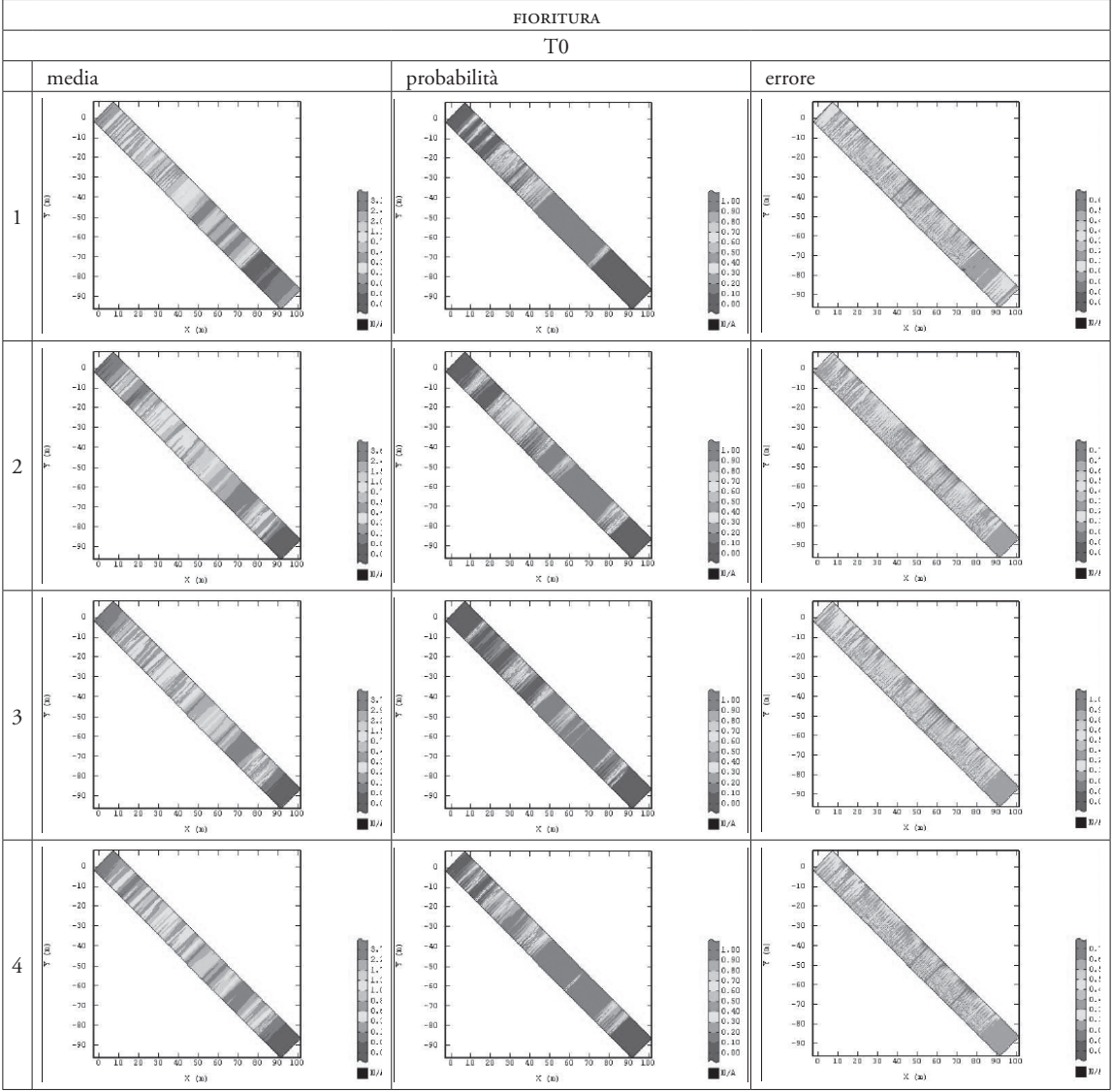


Fig. 11 Mappe radicali del mese di giugno per ciascun livello azotato (0, 50 e 100)

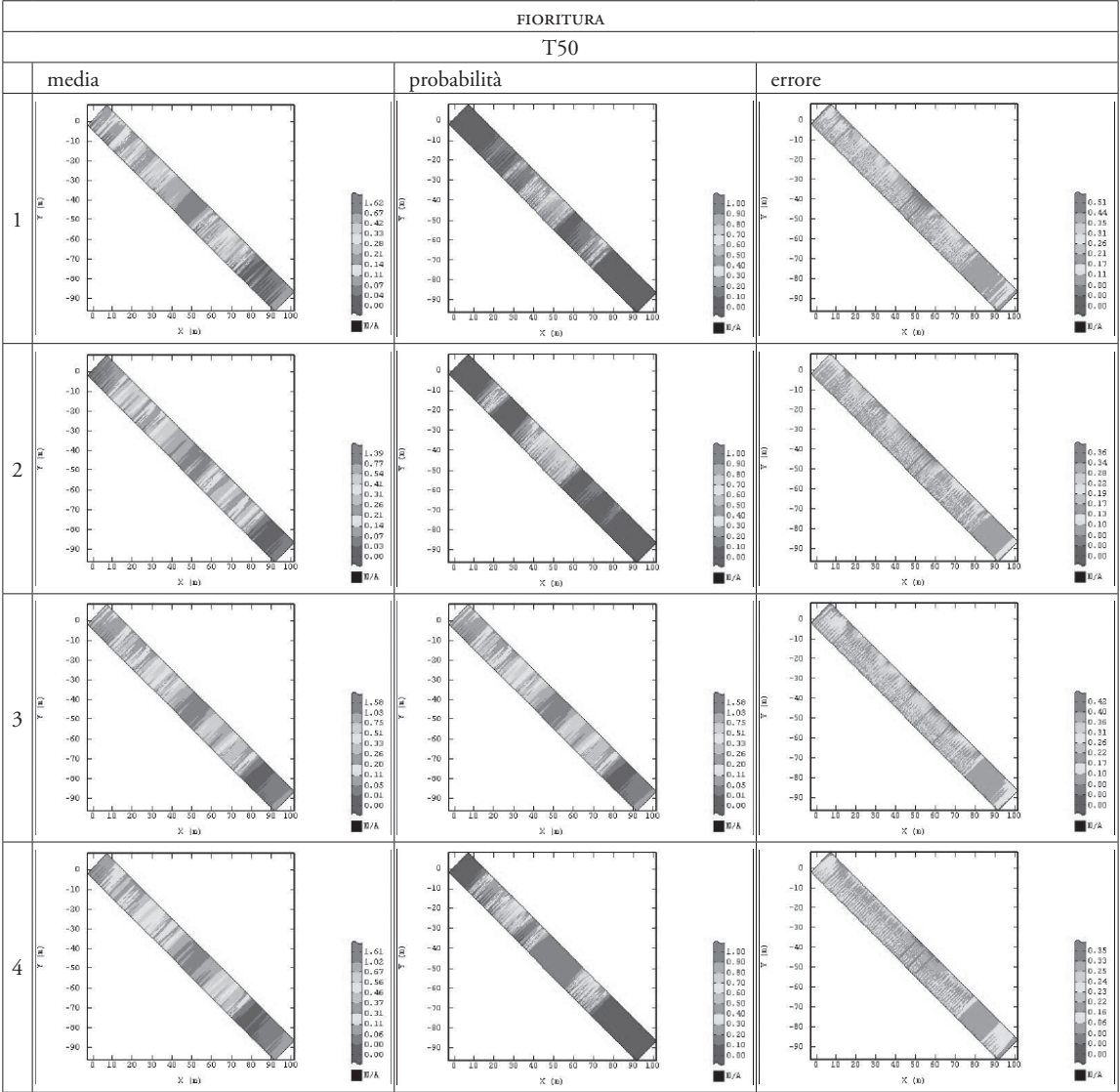


Fig. 11

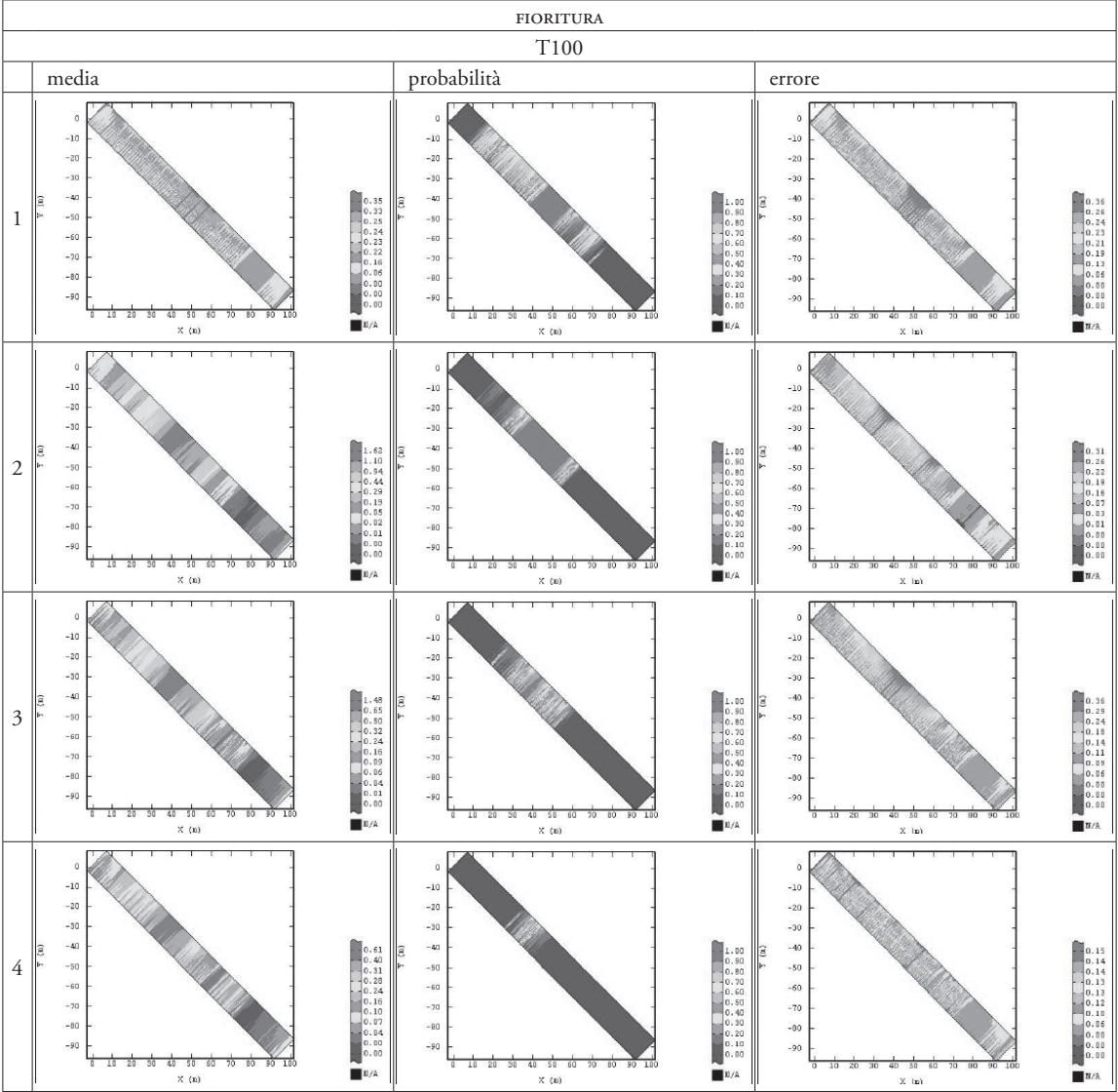


Fig. 11



ma radicale, relativo a un intero campo di mais o bosco di pioppi, non sia un problema di tecnica di elaborazione: abbiamo oggi gli strumenti geostatistici adeguati per descrivere un sistema così complesso come quello delle radici, alla cui morfologia e distribuzione dinamica nello spazio 3D concorrono sia fattori deterministici, esprimibili in termini di causa-effetto, che numerosi fattori stocastici, il cui effetto non è imputabile a cause note o chiaramente individuabili. Pensare di installare un numero sufficiente di minirizotroni in un campo di mais è una prospettiva praticamente irrealizzabile, anche perché il disturbo apportato al sistema naturale da un dispositivo così esteso rischierebbe di rendere poco affidabili i risultati, sebbene ottenuti con complesse tecniche geostatistiche multivariate. Una possibile soluzione, che richiederà sia molta ricerca che estesa sperimentazione in campo, ci potrà venire dall'impiego del GPR (round penetrating radar), che è in grado di fornire una misura non invasiva della struttura delle radici di un albero. Questa tecnica è stata applicata con successo da Butnor et al. (2003) per misurare in situ la biomassa radicale a una profondità di 30 cm all'interno di un dispositivo forestale, piantato a *Pinus taeda* L. I dati furono elaborati secondo tecniche statistiche classiche e poste in correlazione con i valori ricavati da misure ottenute da campioni distruttivi di suolo. Attualmente il CRA-ISA è impegnato nella ricostruzione 3D delle uscite tensiometriche del GPR da porre in relazione con la biomassa radicale.

## CONCLUSIONI

A conclusione di questa rassegna delle applicazioni della geostatistica nel campo della distribuzione radicale, possiamo dire che le soluzioni sono ben lungi dall'essere definitive. Molta ricerca e sperimentazione sono necessarie, ma una soluzione effettivamente vincente, che abbia una valenza non solo conoscitiva ma anche pratica, potrà derivare solo da un lavoro congiunto di miglioramento delle tecniche di misura e di elaborazione dei dati.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia Franco Fornaro per la collaborazione prestata nella raccolta ed elaborazione dei dati sperimentali.

## BIBLIOGRAFIA

AMATO M. (1991): *Spatial distribution and water uptake of roots in structured soils*, PhD. thesis, Michigan State University, East Lansing, USA, pp. XIII-204.

- AMATO M., GOVI G. (1996): *L'apparato radicale delle piante coltivate in relazione alla gestione idrica delle colture*, «Irrigazione e drenaggio», 43 (4), pp. 3-12.
- BENGOUGH A.G., CASTRIGNANÒ A., PAGÈS L., VAN NOORDWIJK M. (2000): *Sampling strategies, scaling, and statistics*, in *Root Methods*, A.L. Smith et al. (eds.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- BUTNOR J.R., DOOLITTLE J.A., JOHNSEN K.H., SAMUELSON L., STOKES T., KRESS L. (2003): *Utility of Ground Penetrating Radar as a Root Biomass Survey Tool in Forest Systems*, «Soil Sci. Soc. Am. J.», 67, pp.:1607-1615.
- CASTRIGNANÒ A., STELLUTI M. (2000): *Procedure geostatistiche nell'analisi delle radici*, in *Obiettivo Radice – Metodi di studio e risultati ottenuti in ambiente mediterraneo*, a cura di G. Mosca e T. Camerali, CLEUP, Padova.
- CASTRIGNANÒ A., STELLUTI M. (2001): *Applicazione della geostatistica all'analisi dei dati spaziali*, Università degli Studi di Perugia.
- CASTRIGNANÒ A., BUTTAFUOCO G., CANU A., ZUCCA C., MADRAU S. (2004): *Assessing spatial uncertainty of soil erodibility using joint stochastic simulation*, Proceedings of Eurosoil 2004, 4<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> September 2004, Institute of Soil Science and Forest Nutrition, Albert-Ludwigs-University Freiburg, Germany (N. Wöhrle, M. Scheurer eds.), CD-ROM.
- FERRARI T.J., VERMEULEN F.H.B. (1955): *Soil heterogeneity and soil testing*, «Netherlands Journal of Agricultural Science», 3, pp. 265-275.
- FRANKLAND J.C., OVINGTON J.D., MACRAE C. (1963): *Spatial and seasonal variations in soil, litter and ground vegetation in some lake district woodlands*, «Journal of Ecology», 51, pp. 97-112.
- GRAHAM R.L., HUNSACKER C.T., O'NEILL R.V., JACKSON B.L. (1991): *Ecological risk assessment at the regional scale*, «Ecological Applications», 2, pp. 196-206.
- GOOVAERTS P. (1997): *Geostatistics for natural resources evaluation*, Oxford University Press, New York-Oxford.
- HALVORSON J.J., SMITH J.L., BOLTON H., ROSSI R.E. (1995): *Evaluating shrub-associated spatial patterns of soil properties in a shrub-steppe ecosystem using multiple-variable geostatistics*, «Soil Sci. Soc. Am. J.», 59, pp. 1476-1487.
- HARRIS J.A. (1920): *Practical universality of field heterogeneity as a factor influencing plot yields*, «Journal of Agricultural Research», XIX (7).
- HEGENVELD R. (1979): *The analysis of spatial patterns of some ground beetles (col. Carabidae)*, in *Spatial and temporal analysis in ecology*, M. Cormack, J.K. Ord (eds.), International Co-operative Publishing House, Fairland, USA.
- JACKSON R.B., CALDWELL M.M. (1993): *Geostatistical patterns of soil heterogeneity around individual perennial plants*, «Journal of Ecology», 81, pp. 683-692.
- JACKSON R.B., CALDWELL M.M. (1993): *The scale of nutrient heterogeneity around individual plants and its quantification with geostatistics*, «Ecology», 74 (2), pp. 612-614.
- JOURNEL A.G., HUIJBREGTS C.J. (1978): *Mining geostatistics*, Academic Press, New York.
- JOURNEL A.G., 1983. *Non-parametric estimation of spatial distributions*, «Mathematical Geology», 15, pp. 445-468.
- JOURNEL A.G., ALABERT F. (1989): *Non-Gaussian data expansion in the earth sciences*, «Terra Nova», 1, pp. 1233-1334.
- KLIRONOMOS J.N., RILLIG M.C., ALLEN M.F. (1999): *Designing belowground field experiments with the help of semi-variance and power analyses*, «Applied Soil Ecology», 12, pp. 227-238.
- LOGSDON S.D., LINDEN D.R. (1992): *Interactions of earthworms with soil physical conditions influencing plant growth*, «Soil Sci.», 154, pp. 330-336.



- MAESTRE F.T., CORTINA J. (2002): *Spatial patterns of surface soil properties and vegetation in a Mediterranean semi-arid steppe*, «Plant and Soil», 241, pp. 279-291.
- MCNAUGHTON S.J., WOLF L.L. (1973): *General ecology*, Holt, Rinehart & Winston, New York.
- PERRY J.N., 1998. *measures of spatial patterns for counts*, «Ecology», 79, pp. 1008-1017.
- PERRY J.N., WINDER L., HOLLAND J.M., ALSTON R.D. (1999): *Red-blue plots for detecting clusters in count data*, «Ecol. Lett.», 2, pp. 106-113.
- PIELOU E.C. (1977): *Mathematical ecology*, John Wiley & Sons, New York.
- RICKLEFS R.E. (1973): *Ecology*, Chiron Press, Newton, USA.
- SCHLESINGER W.H., RAIKES J.A., HARTLEY A.E., CROSS A.F. (1996): *On the spatial pattern of soil nutrients in desert ecosystems*, «Ecology», 77, pp. 364-374.
- SNAYDON R.W. (1962): *Micro-distribution of Trifolium repens L. and its relations to soil factors*, «Journal of Ecology», 50, pp. 133-143.
- SUTER G.W., BARNHOUSE L.W., O'NEILL R.V. (1987): *Treatment of risk in environmental impact assessment*, «Environmental Management», 11, pp. 295-303.
- WAYNICK D.D., SHARP L.T. (1919): *Variability in soils and its significance to past and future soil investigations. Variation in nitrogen and carbon in field soils and their relation to the accuracy of field trials*, «University of California Publications in Agricultural Science», 4 (5), pp. 121-139.
- WEBSTER R., OLIVER M.A. (1990): *Statistical method in soil and land resources survey*, Oxford University Press, Oxford.



MARIANA AMATO\*

## La radice come mediatore della variabilità spaziale dell'ambiente ipogeo: il consolidamento dei terreni in pendio

### AVANT-PROPOS

La radice deve mediare fra le esigenze di stabilità della pianta e la variabilità delle risorse nel terreno. La plasticità delle strutture e dei comportamenti è dunque affrontata come elemento chiave non solo per la sopravvivenza delle piante, ma anche per la loro gestione a fini produttivi e di salvaguardia dell'ambiente. Accanto agli aspetti più tradizionalmente agronomici, la dinamica dei versanti aggiunge una dimensione importante e relativamente poco studiata al problema della differenziazione e integrazione dei comportamenti radicali nei sistemi gestiti dall'uomo.

Le relazioni radice-terreno sono trattate dal punto di vista della capacità della radice di modificare le proprietà meccaniche del suo substrato di crescita. In questo contesto la variabilità può assumere il ruolo di handicap da superare con diverse strategie biologiche e gestionali, o di occasione per ottimizzare l'utilizzazione delle risorse nel sistema.

### LA PIANTA E LA VARIABILITÀ SPAZIALE DELL'AMBIENTE IPOGEO

La variabilità delle proprietà del suolo può essere studiata a diverse scale, a ognuna delle quali essa appare come un aspetto di primaria importanza per le relazioni del terreno con gli organismi viventi, e in particolare con gli apparati radicali delle piante. La variabilità dimensionale del sistema dei pori con la sua organizzazione spaziale, ad esempio, è alla base dei concetti di abitabilità

\* *Università degli Studi della Basilicata*

del terreno, dal momento che ne determina le proprietà fondamentali, dalla penetrabilità all'equilibrio fra le fasi liquida e aeriforme dell'ambiente ipogeo con tutti i processi conseguenti. Eterogeneità nella distribuzione spaziale è poi descritta per moltissimi fenomeni, e interpretata in maniere diverse secondo i casi e i punti di vista degli studiosi.

Il comportamento delle piante rispetto alla variabilità del suolo è quasi esclusivamente mediato dagli apparati radicali che mettono in atto una varietà di comportamenti adattativi e compensativi che tendono ad assicurare in ogni circostanza flussi di acqua ed elementi nutritivi sufficienti per i processi di assimilazione di carbonio e riproduzione delle parti epigee (Amato, 2004a). La risposta delle radici non è però l'unico tipo di interazione rilevante per i temi della variabilità fra la pianta e il suo substrato. Gli apparati radicali infatti contribuiscono a modificare l'eterogeneità nel suolo, creandone con la loro stessa presenza e funzionamento o riducendola con processi diversi. Ne deriva un quadro complesso di distribuzione spaziale delle proprietà del terreno che costituisce una caratteristica determinante del suo comportamento.

Ai fini della gestione agraria e ambientale della vegetazione, tale complessità si traduce in alcuni casi in uno svantaggio che si cerca di minimizzare utilizzando strategie e tecniche sito-specifiche, e in altri casi comporta vantaggi nel potenziare l'autonomia del sistema suolo-vegetazione nell'utilizzazione delle risorse naturali (Amato, 2003).

Anche per quello che riguarda le relazioni fra piante e stabilità dei versanti la variabilità è un aspetto di grande importanza, e comporta conseguenze non trascurabili sia sulla vegetazione che sulle proprietà fisiche del suolo rilevanti per il suo comportamento meccanico.

#### LA VEGETAZIONE E LA STABILITÀ DEI VERSANTI

La vegetazione interagisce in molte maniere con la stabilità del terreno. Gli effetti di tali interazioni sono stati tradizionalmente gestiti con tecniche che hanno permesso di sfruttare le proprietà delle piante e la modellazione del suolo in maniera favorevole al contenimento di frane e erosione.

Le specie vegetali stesse, così come i sistemi di coltivazione, si sono a loro volta co-evoluti con le necessità umane legate all'agricoltura e alle altre attività antropiche, che hanno determinato il successo della coltivazione, della gestione forestale e ricreativa, e della vegetazione naturale solo per essenze e sistemi capaci di far fronte all'instabilità dei terreni, in relazione alle condizioni pedo-climatiche di ogni ambiente, nonché al ciclo della sostanza orga-

nica, che interviene nei processi di stabilizzazione della superficie del suolo.

Dunque il patrimonio agro-ambientale conta oggi un gran numero di specie e di sistemi di gestione di suolo e vegetazione che possono essere definiti “a molteplice attitudine”. In essi, cioè, i caratteri responsabili della produzione o gli aspetti ricreativi e ornamentali, si associano tradizionalmente a caratteristiche responsabili della capacità di stabilizzare il suolo, intervenire nei cicli idrologici, e limitare le perdite di elementi nutritivi. Tali specie e sistemi di gestione esercitano le loro azioni di protezione del suolo attraverso diversi meccanismi legati all’architettura e alla fisiologia delle piante, alla gestione del suolo e alle relazioni spaziali fra sistemi di piante. Nell’analisi dei sistemi suolo-vegetazione questi aspetti sono rimasti spesso “impliciti” rispetto alle caratteristiche legate alla produzione, ma non sono meno importanti, ed emergono in tutta la loro rilevanza parallelamente allo spostamento dell’attenzione dai ruoli produttivi a quelli ambientali dell’agricoltura e della gestione della vegetazione.

Fra essi assume particolare rilievo la necessità di valutare le conseguenze dei cambiamenti di ordinamento colturale, o in generale di uso del suolo sulla sua stabilità. La letteratura riporta infatti che la transizione da una coltura all’altra o da uno stato agricolo a uno naturale, così come ogni tipo di discontinuità nella copertura vegetale (Amato et al., 2000), sono associati a una maggiore fragilità del sistema, con la conseguente maggiore probabilità di frane, erosione e degrado. Oltre all’indubbio interesse teorico di queste tematiche, è quindi particolarmente importante studiare tali situazioni critiche per fornire un supporto tecnico sia alle scelte relative alle tecniche agronomiche che alle decisioni di politica agraria e di programmazione territoriale.

Gli strumenti di analisi e previsione basati su relazioni statistiche fra caratteristiche topografiche, meteorologiche, vegetazionali, pedologiche e gestionali da un lato, ed eventi franosi o erosione dall’altro, appaiono a questo scopo di utilità limitata. Tali studi hanno permesso importanti avanzamenti nella comprensione e gestione dei fenomeni, ma uno dei loro punti critici è la trasferibilità, dunque il loro uso è problematico per la formulazione di nuovi scenari. Invece gli approcci basati sulla modellizzazione della dinamica del sistema suolo in relazione alla vegetazione, alla gestione e ai fattori meteorici sembrano promettenti, a patto che li si adotti in maniera appropriata.

In questo senso è necessario dunque individuare i meccanismi che sono alla base degli effetti stabilizzanti da parte della vegetazione e i fenomeni di risposta delle piante a condizioni di stress meccanico nel loro substrato di crescita.

GLI EFFETTI DELLA VEGETAZIONE SULLA STABILITÀ DEI PENDII

La vegetazione ricopre un ruolo complesso nella stabilizzazione dei versanti. I meccanismi possono essere ascritti a due tipi di fenomeni: quelli che intervengono direttamente sulle proprietà meccaniche del sistema, e quelli che lo fanno indirettamente, modificando il bilancio idrologico. Entrambi verranno presentati essenzialmente in relazione all'effetto delle piante sull'aumento della coesione apparente del terreno negli strati permeati da radici.

La vegetazione influisce su molti aspetti del bilancio idrologico (Amato, 2004b), con un effetto netto che generalmente comporta una diminuzione del contenuto medio di acqua nel volume esplorato dalle radici.

Le ripercussioni di tale effetto sulla stabilità del terreno sono duplici: da un lato il minore contenuto idrico comporta un minore peso del terreno, e dall'altro esso comporta un aumento dei valori di coesione apparente, che sono funzione decrescente del contenuto idrico nei terreni di ogni tessitura, a eccezione dei substrati molto sciolti (sabbie), per i quali la coesione massima non si ritrova nel suolo asciutto, ma in corrispondenza di valori bassi di contenuto idrico, con la presenza di acqua fortemente insatura. In questi materiali infatti anche il piccolo effetto della tensione che si sviluppa in seno al corpo liquido contribuisce in maniera significativa alle forze di coesione del materiale polifasico che si definisce terreno.

È importante sottolineare che in presenza di vegetazione il contenuto di acqua è mediamente inferiore nel profilo, ma esistono zone localmente a più elevato contenuto idrico rispetto al terreno nudo, data la molteplicità dei meccanismi coinvolti. Si assiste dunque non solo a una maggiore coesione media nel terreno, ma anche a una sua distribuzione spaziale diversa rispetto a quella dei suoli nudi, con conseguenze che sono funzione anche delle altre condizioni. a esempio gli strati di superficie del terreno, ombreggiati dalla vegetazione, pur presentando un basso contenuto di acqua non si asciugano fino ai valori estremi dei terreni nudi data la riduzione della componente evaporativa del bilancio idrologico (Amato, 2004b). In caso di substrati molto sciolti, questo comporta una probabilità minore di raggiungere valori criticamente bassi di coesione, pur trattandosi di valori di contenuto idrico che comportano comunque una coesione piuttosto elevata per le altre tessiture. Oppure le zone di terreno adiacente alle radici fini, interessate dalla essudazione di composti polisaccaridici da parte delle strutture radicali e degli organismi rizosferici, possono presentarsi più idratate del terreno non rizosferico a causa della elevata igroscopicità di tali essudati (Chenu, 1993), con le conseguenze indirette descritte sopra sulla coesione. Aggiunge complessità al

fenomeno il fatto che i prodotti rizosferici hanno anche un'azione diretta sulle proprietà meccaniche del terreno, aumentandone la resistenza alla rottura per taglio (Chenu e Guerif, 1991), che è funzione della coesione.

Il termine 'medio' si riferisce anche alla dinamica temporale del contenuto idrico nel suolo: esso è inferiore a quello dei suoli non vegetati in particolare nei periodi di maggiore domanda evapotraspirativa dell'atmosfera e/o minore piovosità, in relazione allo stato vegetativo delle piante, ma questo non esclude la possibilità che in altri periodi la vegetazione sia pressoché ininfluyente sul contenuto di acqua del terreno se gli apporti meteorici sono elevati e/o le piante sono poco attive.

Gli effetti delle piante mediati dal ciclo idrologico non sono solo benefici. a esempio, in aggiunta agli effetti delle parti epigee della pianta sull'infiltrazione (Amato, 2004b), l'interfaccia suolo-radice, in particolare per le strutture grandi e/o morte, e i canali lasciati dalle stesse, possono costituire vie preferenziali per il movimento dell'acqua, con effetti anche negativi, per l'aumento del contenuto idrico degli strati profondi di terreno, e per l'eventuale erosione dei canali stessi fino a dimensioni che provocano il crollo del terreno soprastante, come nei fenomeni di "piping" delle zone calanchive (Del Prete et al., 1997).

Inoltre le alterazioni del bilancio idrologico hanno effetti sulle proprietà meccaniche del terreno anche a causa delle loro conseguenze per il bilancio salino (Amato, 2004b., Amato et al., 2005). La concentrazione e la composizione ionica dei sali del terreno, infatti, hanno riflessi diretti sulla sua coesione e resistenza alla rottura per taglio (Di Maio, 2004).

I meccanismi legati in maniera diretta al comportamento meccanico delle piante possono anch'essi essere benefici o avversi. Fra questi ultimi ricordiamo il peso delle piante, che per la sua componente tangenziale alla superficie del suolo può aggravare le condizioni di instabilità, e l'effetto di trasmissione delle sollecitazioni del vento al suolo attraverso le strutture rigide delle piante.

Fra gli effetti meccanici stabilizzanti, vi è invece, in primo luogo, il rinforzo meccanico: si tratta di un aumento della resistenza a rottura del terreno a causa della presenza di strutture radicali, che agiscono come fibre re-dirigendo gli sforzi interni al terreno lungo il loro asse longitudinale e contrastandoli con la loro resistenza a trazione. A questo riguardo due aspetti vanno evidenziati: il primo riguarda l'osservazione che gli apparati radicali delle piante cresciute in substrati mobili presentano un'architettura non simmetrica, poiché la maggior parte delle strutture principali risulta orientata verso monte rispetto alla pianta (Amato, 2003; Di Iorio et al., 2005). In questo modo le radici si trovano disposte in maniera tale da essere in gran parte sottoposte a trazione.

Il secondo aspetto importante è il fatto che la resistenza delle radici alla

rottura per trazione è notevolmente più elevata della resistenza a rottura del terreno. Le radici dunque rappresentano un enorme potenziale di consolidamento, che va verificato in considerazione delle altre proprietà meccaniche e architetturali (Amato et al., 2005).

La variabilità dei valori di resistenza a trazione delle radici è notevolissima, e si accompagna alla variabilità di tutte le caratteristiche delle parti ipogee delle piante, legata alle problematiche cui si è fatto cenno sopra. Pertanto gli indici di dispersione dei valori sono generalmente più elevati per le variabili degli organi epigei rispetto alle parti epigee. D'altra parte diversi autori, fra i quali Amato e Ritchie (2002), hanno mostrato come l'individuazione di una componente strutturata possa consentire di ridurre i valori della dispersione dei dati nel caso delle caratteristiche biometriche. Analogamente, la variabilità delle caratteristiche meccaniche risulta almeno in parte ascrivibile a componenti isolabili dall'errore: i valori di resistenza a trazione delle radici variano infatti fra le specie, ma soprattutto con l'età e la dimensione delle radici, decrescendo spesso all'aumentare del diametro (v. rassegna in Greenway, 1987, Amato et al., 1997, Amato, 2003, 2004), verosimilmente in relazione alla minore densità delle componenti strutturali della parete cellulare, e in particolare della cellulosa, in radici di età maggiore. Chiaffitelli et al. (2003) riportano a esempio una maggiore resistenza a trazione del cilindro centrale di *Lygeum spartum* (L.) rispetto alla radice intera, in corrispondenza di una maggiore densità degli elementi strutturali della parete.

Le radici che crescono sottoposte a trazione sono più resistenti delle altre: su terreni in pendio, le radici a monte della pianta, che sono cresciute sostenendone il peso, hanno maggiore resistenza rispetto a quelle a valle (Schiechtl, 1980). Amato (2003) e Chiaffitelli et al. (2003) mostrano come radici cresciute in substrati mobili risultino più resistenti alla trazione di quelle della stessa specie cresciute in piano, riferendone anche variazioni anatomiche e strutturali. Tali elementi di variabilità nelle strutture ipogee delle piante sembrano dunque orientati a ridurre l'eterogeneità spaziale del sistema suolo-vegetazione nelle caratteristiche legate al rischio di instabilità, in quanto la maggiore resistenza radicale compensa in parte le maggiori sollecitazioni meccaniche in siti declivi rispetto a quelli in piano.

Esistono inoltre altri tipi di variazione, come le fluttuazioni stagionali, legate al grado di lignificazione delle radici (Hathaway e Penny, 1975).

La sola presenza di fibre, come singoli segmenti di radice, rinforza dunque il terreno, a causa dell'elevata resistenza a rottura per trazione delle radici stesse, anche in substrati incoerenti, come dimostrato da Gray e Ohashi (1983) su sabbia. La resistenza a trazione del complesso radici-terreno diventa dun-



que funzione, della densità di radici, ma la sua entità non è di facile determinazione: i primi contributi riportavano una dipendenza lineare del rinforzo dalla densità radicale (ad esempio Ziemer, 1981), mentre più attente considerazioni teoriche e apparati sperimentali di scala più adeguata al fenomeno hanno portato a risultati più complessi (Amato et al., 2005).

In particolare Shewbridge e Sitar (1989) riportano che il rinforzo radicale cresce meno che linearmente con la densità, e ha relazioni complesse con le dimensioni della zona di taglio, lungo la quale avviene la rottura del terreno. L'entità del rinforzo del terreno da parte delle radici, inoltre, dipende anche dai valori della resistenza al contatto fra suolo e radice (Waldron e Dakessian, 1981) che evita lo scivolamento delle stesse dalla matrice di terreno. Tale valore è presumibilmente più elevato in radici fini e ramificate rispetto a strutture legnose semplici, ed è maggiore nelle regioni con maggiore presenza di peli radicali ed essudati che favoriscono il legame col terreno, ed è notevolmente sottostimato dagli esperimenti condotti in ambienti ricostruiti artificialmente mescolando fibre o radici al terreno in laboratorio (Kazutoki e Ziemer, 1991).

Il contributo degli apparati radicali di piante vive è comunque superiore a quello di fibre singole data la struttura ramificata, in parte assimilabile a una rete, che le radici formano, esercitando un contenimento meccanico del terreno. Questo effetto imbrigliante è particolarmente evidente per le radici giovani, ed è messo in evidenza da test eseguiti su terreno permeato di radici (v. ad esempio Reistenberg e Svonik-Dunford, 1983, Del Prete et al., 1997).

È inoltre importante sottolineare come la presenza di radici nel terreno causi una redistribuzione degli sforzi, che vengono trasferiti in parte lungo le strutture radicali dalla zona di taglio alle zone limitrofe, con un ampliamento della zona di taglio e un parziale impedimento dei fenomeni di localizzazione delle deformazioni (Cavazza, 1981; Amato et al., 2005).

Nell'analisi delle capacità di rinforzo dovute alla resistenza a trazione da parte delle radici è importante considerarne la dinamica temporale, legata sia allo sviluppo e crescita degli apparati radicali che alla decomposizione delle strutture ipogee nel terreno dopo la morte della pianta. Il primo argomento è stato oggetto di numerosi studi cui si rinvia, mentre per il secondo si può fare riferimento ad alcuni contributi specifici dello studio delle caratteristiche meccaniche delle radici, che mostrano come la radice possa garantire la costanza delle capacità di rinforzo anche per diversi mesi dopo la scomparsa della parte epigea (Watson et al., 1997, Olivero Project Progress report series 5, 2004).

Tsukamoto e Kusakabe (1984) hanno proposto una schematizzazione delle possibili posizioni relative delle radici e dei piani di slittamento del terreno,

che corrispondono a diversi effetti di contenimento dei movimenti franosi.

Altri fattori contribuiscono al rinforzo del terreno a opera delle radici, quali il già citato incremento della coesione dovuto ai prodotti rizosferici (Chenu e Guerif, 1991). La dinamica temporale di questi composti è un fattore da indagare per accertarne il ruolo nella stabilità dei versanti. A tal proposito va sottolineata l'analisi già riportata nei classici dell'agronomia (Russell, 1986) circa l'effetto delle diverse frazioni organiche rizosferiche sulla entità e dinamica temporale di proprietà fisiche del suolo legate alla coesione, che evidenziava come i polisaccaridi freschi garantissero un effetto maggiore di quello delle frazioni umiche, ma di durata molto inferiore, corrispondente a poche settimane dopo la morte dell'organismo che li aveva prodotti.

#### VARIABILITÀ SPAZIALE DEL RINFORZO RADICALE

Oltre alle considerazioni già fatte sopra, la variabilità può essere analizzata in relazione al ruolo che diverse specie vegetali giocano nel rinforzo del suolo.

In uno studio sull'inerbimento di un oliveto della collina interna della Basilicata, Chiaffitelli et al. (2004) hanno riportato che le potenzialità di rinforzo meccanico espresse dagli apparati radicali della copertura erbacea erano notevolmente variabili in funzione della posizione lungo il pendio.

Nello studio in questione, infatti, la cotica di inerbimento spontaneo presentava specie diverse, ma in gran parte appartenenti alle famiglie delle graminacee e alle leguminose (Marino et al., 2004). Fra esse, le specie appartenenti alla famiglia delle graminacee presentavano le caratteristiche più interessanti per il rinforzo, sia per la loro elevata densità radicale che per le caratteristiche meccaniche delle strutture radicali, raggiungendo ad esempio valori di circa 60 MPa di resistenza a trazione con la specie *Aegilops geniculata* (L.), e molto superiori a quelle delle leguminose dominanti appartenenti al genere *Medicago*.

È da notare però che la presenza di radici erbacee è risultata in questo studio inferiore proprio nelle zone a maggiore pendenza e dunque più suscettibili a processi di instabilità del suolo, e che in tali zone anche la percentuale di radici di graminacee è diminuita rispetto alle altre zone, in coincidenza della minore concentrazione di azoto in questi stessi siti, e probabilmente anche della minore stabilità del pendio che ne ha limitato l'attecchimento spontaneo. Le leguminose hanno invece mostrato una maggiore incidenza percentuale proprio nelle zone più declivi, e ciò concorda con i dati sulla minore presenza iniziale di azoto nel suolo.

Tale distribuzione spaziale risulta sfavorevole per la conservazione del suolo sul versante, dal momento che le radici delle leguminose si sono rivelate meno dense e meno forti di quelle delle graminacee.

Dal punto di vista teorico tali dati possono essere confrontati con quelli sopra riportati sull'aumento della resistenza a trazione delle radici cresciute in substrati a maggiore pendenza, e che è stata commentata in termini di risposta compensativa rispetto alla variabilità meccanica del suolo. L'esperimento di inerbimento dell'oliveto invece rappresenta un caso in cui la vegetazione accentua la variabilità già esistente mostrandosi meno efficiente nella protezione delle zone che ne avrebbero maggiore necessità, dunque esaltandone le differenze rispetto alle zone meno acclivi.

Dal punto di vista della gestione agronomica, si ravvisa in questo caso la necessità di mettere in atto strategie per modificare la composizione floristica delle aree a maggiore pendenza a favore delle graminacee (ad esempio con l'ausilio di fertilizzanti azotati) e ridurre così la variabilità del sistema.

Un altro studio nel quale si evidenziano aspetti sfavorevoli della variabilità indotta dalla vegetazione sulla stabilità del suolo è quello relativo all'abbandono dell'agricoltura in un'area periurbana soggetta a dissesto idrogeologico a ridosso della città di Napoli (Amato, 2003). In questo sistema si riscontra una maggiore incidenza dei fenomeni franosi in coincidenza delle transizioni dalla coltivazione alla presenza di specie arboree, mentre i fenomeni di instabilità risultano ridotti se all'agricoltura subentra vegetazione erbacea. Le determinazioni eseguite sui due tipi di vegetazione hanno evidenziato la superiorità delle specie erbacee, soprattutto le graminacee, in entrambe le caratteristiche relative al rinforzo radicale, con densità radicali elevate e valori di resistenza a trazione fino a circa 80 MPa (*Poa spp.*) mentre le arboree, pur mostrando una maggiore profondità degli apparati radicali, presentavano valori inferiori di densità e di resistenza, ma soprattutto una notevole variabilità di tali valori nello spazio, presentandosi come piante isolate.

## CONCLUSIONI

A scala di pianta la variabilità ha numerosi fattori ed effetti, anche se ci si limita a considerare la sola funzione di consolidamento del terreno da parte degli apparati radicali. Essi partecipano non solo alla risposta delle piante alla variabilità del substrato di crescita, ma costituiscono anche fonte di nuova eterogeneità o possono contribuire a ridurla con processi diversi.

Dal punto di vista dell'interpretazione e della gestione, la variabilità del sistema suolo-radice non assume dunque un ruolo univoco, presentandosi in alcuni casi come un svantaggio che si cerca di minimizzare utilizzando strategie e tecniche sito-specifiche, e in altri casi comporta vantaggi nel potenziare l'autonomia del sistema suolo-vegetazione nell'utilizzazione delle risorse naturali e nella stabilità del territorio.

Tali molteplici dimensioni del sistema rivestono un grande interesse teorico per le loro implicazioni di ecologia spaziale e devono essere prese in considerazione per le loro applicazioni a tutte le scale di osservazione.

#### BIBLIOGRAFIA

- AMATO M. (2003): *La pianta e la variabilità spaziale dell'ambiente ipogeo*, Comunicazione orale, xxxv Convegno Nazionale S.I.A., Napoli, 16-18 settembre 2003.
- AMATO M. (2004a): *La radice: rappresentazioni e metodi di studio della metà invisibile delle piante*, in Amato M., Migliozi A., Mazzoleni S. *Il sistema suolo-vegetazione*, Liguori Editore, Napoli, pp. 3-16.
- AMATO M. (2004b): *Le relazioni fra piante e acqua del terreno*, in Amato M., Migliozi A., Mazzoleni S., *Il sistema suolo-vegetazione*, Liguori Editore, Napoli, pp. 137-150.
- AMATO M., BELFIORE G., MAZZOLENI S., URCIUOLI G. (2005): *Analisi del contributo meccanico della vegetazione alla resistenza delle coltri di terreno superficiale*, in: *Convegno Nazionale: La mitigazione del rischio da colate di fango a Sarno e negli altri comuni colpiti dagli eventi del maggio 1998*, Napoli, 2 e 3 maggio 2005 e Sarno, 4 e 5 maggio 2005. In corso di stampa.
- AMATO M., DI MARTINO P., DI PASQUALE G., MAZZOLENI S., MIGLIOZZI A., STRUMIA S. (2000): *Il ruolo della vegetazione nelle frane di Quindici*, «Quaderni di Geologia Applicata», 7 (1), pp. 97-108.
- AMATO M., PARDO A., FARETTA S., QUAGLIETTA-CHIARANDÀ F. (1997): *Misura della resistenza alla trazione delle radici un contributo alla determinazione dell'effetto delle piante sulla stabilità del terreno*, «Rivista di Agronomia», 31 (2), pp. 762-767.
- AMATO M., RITCHIE J.T. (2002): *Spatial distribution of roots and water uptake of Maize (Zea mays L.) as affected by soil structure*, «Crop Science», 42, pp. 773-780.
- CAVAZZA L. (1981): *Fisica del Terreno agrario*, UTET, Torino.
- CHENU C. (1993): *Clay-or sand-polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water-related properties and microstructure*. «Geoderma», 56, pp. 143-156.
- CHENU C., GUÉRIF J. (1991): *Mechanical strength of clay minerals as influenced by an adsorbed polysaccharide*, «Soil Sci. Soc. Am. J.», 55, pp. 1076-1080.
- CHIAFFITELLI V., AMATO M., DE MICCO V., ARONNE G. (2003): *Caratteristiche meccaniche e anatomiche di radici di Lygeum spp. sottoposte a diverse situazioni di stress*, Comunicazione orale. xxxv Convegno Nazionale S.I.A., Napoli, 16-18 settembre 2003.
- CHIAFFITELLI V., AMATO M., DI TOMMASO T. (2004): *Il contributo delle radici alla stabilità del suolo in un oliveto inerbito*, Atti del convegno: Convegno "Il Futuro dei sistemi olivicoli in aree marginali: aspetti socio-economici, conservazione delle risorse naturali

- e produzioni di qualità", Matera, 12-13 ottobre 2004.
- DEL PRETE M., BENTIVENGA M., AMATO M., BASSO F., TACCONI P. (1997): *Badland erosion processes and their interactions with vegetation: a case study from Pisticci, Basilicata, Southern Italy*, «Geo. Fis. Din. Quat.», 20, pp. 147-155.
- DI IORIO A., LASSERRE B., SCIPPA G.S., CHIATANTE D. (2005): *Root system architecture of Quercus pubescens trees growing on different sloping conditions*, «Ann. Bot.», 95 (2), pp. 351-61.
- DI MAIO C. (2004): *Shear strength of clays and clayey soils: the influence of pore fluid composition*, in: *Chemo-mechanical couplings in porous media Geomechanics and Biomechanics*, Springer-Verlag, pp. 45-55.
- GRAY D.H., OHASHI H., (1983): *Mechanics of fiber reinforcement in sand*, «Journ. Geotechnical Engineering», ASCE, 109 (3), pp. 335-353.
- GREENWAY D.R. (1987): *Vegetation and slope stability*, in: *Slope stability*, Anderson M.G. e Richards K.S eds., John Wiley and sons, pp. 187-230.
- HATHAWAY R.L. e PENNY D. (1975): *Root strength in some Populus and Salix clones*, «New Zealand J. Bot.», 13, pp. 333-344.
- WATSON A.J.; MARDEN M.; ROWAN D. (1997): *Root wood strength deterioration in kanuka (Kunzea ericoides var. ericoides) after clearfelling*, «New Zealand Journal of Forestry Science», 27 (2), pp. 205-215.
- KAZUTOKI A., ZIEMER R.R. (1991): *Effect of tree roots on a shear zone: modelling reinforced shear stress*, «Canadian Journal of Forest Research», 21, pp. 1012-1019.
- LARANCI P., DALLARI D., AMATO M., PETRELLI M., SCARASCIA-MUGNOZZA G. (2004): *Capacità di radicazione e proprietà biotecniche di alcuni arbusti e alberi mediterranei (per il recupero ecologico di ambienti degradati)*, «Riv. Di Ing. Agr.», (2004) 2, pp. 9-16.
- MARINO R., CELANO G., XILOYANNIS C. (2004): *Indagini preliminari sulla diversità floristica nei sistemi olivicoli in ambiente semi-arido mediterraneo*, Atti del convegno: Convegno "Il Futuro dei sistemi olivicoli in aree marginali: aspetti socio-economici, conservazione delle risorse naturali e produzioni di qualità", Matera, 12-13 ottobre 2004.
- Olivero Project Progress report series 5 (2004): Second annual report.
- REISTENBERG M.H., SOVONICK-DUNFORD S. (1983): *The role of woody vegetation on stabilizing slopes in the Cincinnati area*, «Geologic Soc. of America Bulletin», 94, pp. 504-518.
- RUSSELL E. W (1986): *Russell's Soil Conditions and Plant Growth*, Longman, Harlow.
- SHEWBRIDGE S.E., SITAR N. (1989): *Deformation characteristics of reinforced sand in direct shear*, «Journal of Geotechnical Engineering», ASCE, 115 (8), pp. 1134-1147.
- TSUKAMOTO Y., KUSAKABE O. (1984): *Vegetative influences on debris slide occurrences on steep slopes in Japan*, «Proc. Symp.» 'Effects of forest land use on erosion and slope stability', Environment and policy institute, Honolulu, Hawaii.
- WALDRON L.J., DAKESSIAN S. (1981): *Soil reinforcement by roots: calculation of increased soil shear resistance from root properties*, «Soil Sci.», 132 (6), pp. 427-435.
- ZIEMER R.R. (1981): *Roots and the stability of forested slopes*, in *Erosion and sediment transport in pacific rim steeplands*, «Int. Assoc. Hydrol. Sci.», pp. 343-361.



ROBERTO TUBEROSA\*, SILVIO SALVI\*, PIERANGELO LANDI\*, SILVIA GIULIANI\*,  
MASSIMO BELLOTTI\*, MARCO MACCAFERRI\*, GIORGIO SPONZA\*,  
VALENTINA TALAMÉ\*, SERGIO CONTI\*, MARIA CORINNA SANGUINETTI\*

## L'apparato radicale dei cereali: l'approccio genomico

### PREMESSA

Le attività di miglioramento genetico delle colture agrarie hanno prevalentemente riguardato la porzione epigea della pianta, data la difficoltà di analisi fenotipica della radice. Inoltre, l'elevata plasticità di sviluppo della radice in risposta ai fattori fisico-chimici del suolo comporta una bassa ereditabilità delle caratteristiche radicali, condizione che riduce l'efficacia della selezione (O'Toole e Bland, 1987). Un altro motivo per il quale, salvo rare eccezioni, le caratteristiche radicali non sono in genere considerate dai miglioratori vegetali va ricercato nella scarsa conoscenza della loro base genetica, prevalentemente di tipo quantitativo. Contrariamente ai caratteri cosiddetti "mendeliani", cioè a base genetica semplice (uno o pochi geni coinvolti), la variabilità per i caratteri quantitativi (es. dimensioni della porzione epigea e ipogea della pianta, produttività, ecc.) è controllata da un elevato numero di geni ciascuno dei quali ha in genere un effetto sul fenotipo di scarsa entità e che risente dell'azione dei fattori ambientali (Falconer, 1981; Hallauer e Miranda, 1988). La distribuzione di frequenza dei valori fenotipici di un determinato carattere, quale ad esempio l'altezza della pianta, in una popolazione segregante derivata dall'incrocio tra due linee pure sarà di tipo bimodale quando la variabilità sia ascrivibile a un singolo allele parentale a effetto drastico rispetto al cosiddetto "wild-type" (es. allele mutato recessivo che in condizione omozigote causa nanismo in seguito a mancata sintesi di gibberellina), mentre sarà di tipo normale quando sia ascrivibile alla segregazione a numerosi loci di alleli a

\* *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università degli Studi di Bologna*

effetto ridotto. In quest'ultimo caso l'osservazione fenotipica non consente di identificare con ragionevole accuratezza gli individui portatori delle forme alleliche alternative presenti a ciascuno dei numerosi geni (a volte svariate decine) che controllano la variabilità per il carattere studiato; conseguentemente, non è possibile individuare i geni coinvolti e la loro localizzazione sui cromosomi. Queste limitazioni nello studio dei caratteri quantitativi possono essere parzialmente superate applicando le metodiche di genomica sviluppate nel passato ventennio.

#### L'APPROCCIO GENOMICO

I recenti sviluppi della genomica (fig. 1) offrono per la prima volta la possibilità di identificare, mappare e clonare i loci che controllano i caratteri quantitativi: tali loci vengono definiti QTL (Quantitative Trait Loci). A tal fine si possono utilizzare popolazioni segreganti costituite da ca. 100-200 progenie derivate mediante uno o più cicli di autofecondazione a partire dall'incrocio fra due linee parentali diversificate per il carattere di interesse (es. dimensioni della radice) o comunque in grado di originare una popolazione segregante per tale carattere. Le singole progenie (es. famiglie  $F_2$ ) vengono valutate fenotipicamente e il loro DNA viene caratterizzato utilizzando marcatori molecolari (da ca. 150 a 300 loci molecolari a seconda delle dimensioni del genoma della specie in oggetto) per determinare quale delle linee parentali abbia contribuito le diverse porzioni cromosomiche che ne compongono il genoma. L'analisi statistica congiunta dei dati fenotipici e dei dati molecolari di tutte le progenie permette di identificare i QTL. Per un approfondimento degli aspetti più rilevanti dell'analisi QTL si rimanda a precedenti pubblicazioni (Tanksley, 1993; Lee, 1995; Hackett, 2002; Tuberosa et al., 2002c).

Nonostante l'approccio QTL sia stato proposto da Sachs già nel 1923, la sua effettiva applicazione è stata possibile solo a partire dagli anni '80, quando furono sviluppate le metodiche in grado di fornire profili molecolari a un numero sufficientemente elevato di loci del genoma. I primi marcatori molecolari messi a punto furono gli RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), a cui poi fecero seguito altre categorie di marcatori come i RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), gli SSR (Simple Sequence Repeat), gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e, più recentemente, gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism). L'uso di queste diverse categorie di marcatori ha permesso di ottenere mappe genetiche estremamente dettagliate che forniscono una potente "lente di ingrandimento" per una più ac-



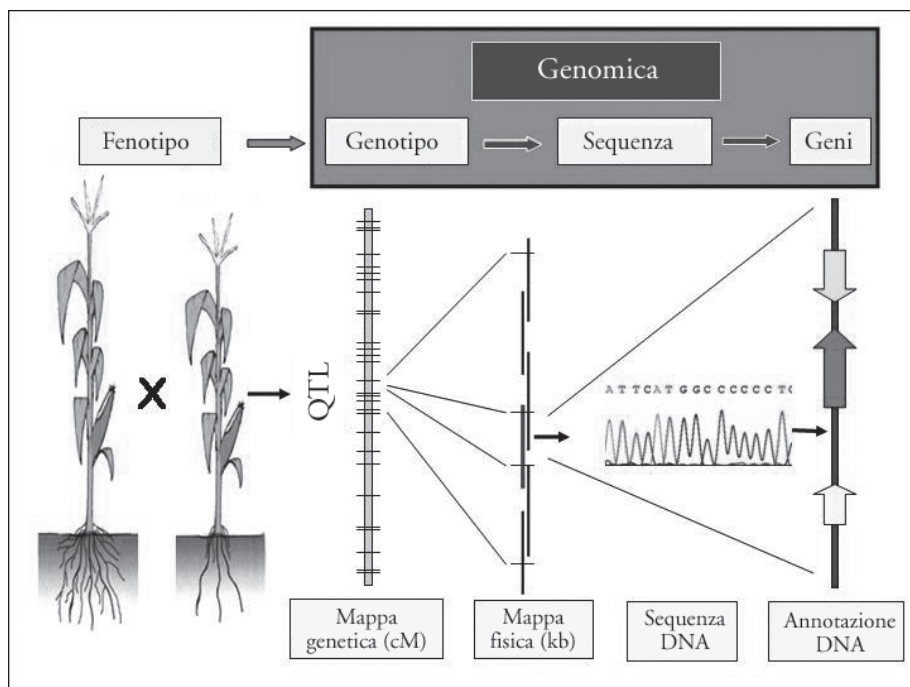


Fig. 1 *Le genomica consente di identificare i geni che controllano i caratteri quantitativi. Inizialmente, l'analisi congiunta del fenotipo e dei profili molecolari delle piante di una popolazione di mappa ottenuta dall'incrocio tra due linee diversificate per il carattere di interesse (es. massa della radice) identifica con una notevole approssimazione (ca. 10-30 cM) la posizione dei QTL (Quantitative Trait Loci) che influenzano la variabilità del carattere studiato. Successivamente, le procedure di clonaggio posizionale, quali la mappatura fine dei QTL, l'utilizzazione di mappe fisiche (es. librerie di cloni BAC) e l'annotazione delle sequenze dei cloni BAC di interesse, permettono di identificare i possibili geni candidati responsabili delle differenze fenotipiche*

curata identificazione delle regioni cromosomiche coinvolte nel controllo dei caratteri quantitativi. Queste mappe forniscono la base per studi genomici più approfonditi che si prefiggono l'obiettivo di identificare a livello del DNA le sequenze responsabili dei caratteri di interesse e, ove possibile, clonare tali sequenze (Salvi e Tuberosa, 2005).

Un aspetto rilevante e di notevole significato applicativo degli approcci di genomica consiste nella trasferibilità tra specie filogeneticamente vicine delle informazioni di mappa relative a marcatori, geni e QTL (Paterson et al., 1996; Gale e Devos, 1998; Sorrells et al., 2003). Tale prerogativa scaturisce dal fatto che nell'ambito di ogni famiglia botanica il fenomeno di speciazione ha comportato una serie di parziali riarrangiamenti cromosomici (inversioni,

traslocazioni, duplicazioni, ecc.) verificatisi a partire da una specie ancestrale. Poiché tali riarrangiamenti interessano porzioni molto estese dei cromosomi (fino a interi bracci cromosomici), la disposizione lineare dei geni nell'ambito delle singole porzioni risulta spesso conservata. Il livello di tale conservazione viene definito "sintenia". Perciò, all'interno di una famiglia botanica, la disponibilità di dettagliate informazioni molecolari e genetiche relative a una o più specie può consentire di estrapolare in maniera relativamente precisa l'organizzazione strutturale dei cromosomi, in termini di contenuto e ordine lineare dei geni, delle altre specie. Questo approccio è oggi frequentemente applicato nelle Graminacee: ad esempio, in studi di genomica del frumento, mais, orzo e sorgo si utilizzano informazioni ottenute dal sequenziamento del genoma del riso (Goff et al., 2002), scelto come specie di riferimento sia per il genoma relativamente semplice sia per l'enorme importanza economica come coltura agraria. Analogamente, il sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* ha aperto nuovi e vasti orizzonti per le Crucifere e per altre specie di Dicotiledoni le cui regioni cromosomiche di interesse mostrino un sufficiente grado di sintenia con *Arabidopsis*. Il livello di sintenia tra *Arabidopsis* e le Graminacee, taxa separati da quasi 140 milioni di anni di evoluzione, è invece troppo limitato per consentirne l'utilizzazione a fini di miglioramento genetico (Devos et al., 1999; van Buuren et al., 2002).

### *Genomica, QTL e miglioramento genetico*

Per quanto concerne le pratiche di miglioramento genetico, la genomica permette di intervenire in maniera più diretta e mirata rispetto alle pratiche convenzionali. Qualora si identifichino uno o più marcatori molecolari strettamente associati (cioè adiacenti sullo stesso cromosoma) a un gene/QTL che controlla la variabilità del carattere oggetto di selezione, sarà possibile attuare la cosiddetta "selezione assistita con marcatori" che ci permetterà di selezionare gli individui desiderati sulla base dei loro profili molecolari evitando quindi la loro analisi fenotipica (Quarrie, 1996; Prioul et al., 1997; Ribaut e Hoisington, 1998). Risultano evidenti i vantaggi qualora si tratti di caratteri quantitativi la cui determinazione fenotipica sia difficile e/o costosa, come ad esempio le caratteristiche della radice. Inoltre, qualora si riesca a clonare la sequenza responsabile del QTL, sarà possibile applicare altre metodiche quali il TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes; Comai et al., 2004; Talamè et al., 2004a), il "gene shuffling" (cioè riassetto genico; Perales e Ditty, 2005) e/o la mutagenesi sito-specifica (Iida e Tera-

da, 2004) per identificare e/o ottenere alleli più efficaci per l'espressione del carattere oggetto di selezione nella specie di origine e/o in altre specie anche filogeneticamente lontane. Infine, i risultati acquisiti attraverso l'analisi QTL e altri approcci di genomica, quali l'analisi dei trascritti (trascrittomica), delle proteine (proteomica) e dei metaboliti (metabolomica), possono contribuire a migliorare le nostre conoscenze relative alla regolazione dell'espressione dei caratteri quantitativi e agli effetti dei fattori ambientali (es. disponibilità idrica, di nutrienti, ecc.) sulla variabilità osservata a livello fenotipico (Tuberosa et al., 2002a; Morgante e Salamini, 2003).

Un evidente vantaggio dell'approccio genomico volto a identificare QTL per caratteri complessi (es. dimensioni della radice, altezza della pianta, produzione di granella, ecc.) è che la ricerca può essere condotta senza alcuna ipotesi iniziale relativa ai possibili geni candidati che sottendono la variabilità osservata: si tratta pertanto di un approccio con percorso "top-down", vale a dire dal fenotipo al gene, in cui l'osservazione fenotipica del materiale sperimentale, congiuntamente all'analisi molecolare, ci guidano, quasi come un "filo di Arianna", verso le regioni cromosomiche di interesse. Nell'approccio con percorso "bottom-up", cioè dal gene al fenotipo, tipicamente utilizzato nell'ingegneria genetica, si interviene manipolando l'espressione di uno o pochi geni che si ipotizza possano svolgere un ruolo importante per il carattere di interesse. Mentre questo approccio è valido per caratteri semplici, esso presenta evidenti limiti per caratteri complessi (poligenici) per i quali risulta difficile identificare a priori i fattori genetici coinvolti. L'approccio QTL si basa invece su di un riscontro oggettivo e tangibile dettato dalla pianta stessa e non elaborato a priori su modelli inevitabilmente riduttivi e semplicistici.

Vi sono, tuttavia, alcune rilevanti limitazioni all'approccio QTL. La principale deriva dal fatto che la maggior parte dei QTL ha un effetto ridotto a livello fenotipico (Beavis, 1998), caratteristica che ne rende difficile, e spesso impossibile, l'identificazione e l'utilizzazione ai fini selettivi. Va tuttavia ricordato che una frazione limitata di QTL (i cosiddetti "major QTL", cioè QTL a effetto maggiore) è caratterizzata da effetti fenotipici piuttosto rilevanti e di entità tale da permetterne un'accurata mappatura e, in alcuni casi, il clonaggio, vale a dire l'identificazione della sequenza responsabile del QTL stesso. Sono questi i QTL di maggiore interesse su cui si concentra l'attenzione dei genetisti molecolari. A tutt'oggi, sono quasi una ventina i QTL clonati nelle piante e il loro numero sta aumentando rapidamente (Salvi e Tuberosa, 2005). Altra limitazione nell'analisi QTL è riconducibile alle possibili interazioni tra QTL diversi, condizione che comporta stime errate del reale effetto di ogni singolo QTL, spesso sovrastimato. Infine, è opportuno sottolineare che l'accuratezza con cui

si mappano i QTL è alquanto ridotta, in quanto la lunghezza della porzione cromosomica di interesse cui attribuire un particolare QTL varia da 10 a 30 centiMorgan (cM), che corrispondono a una porzione cospicua di un cromosoma. Poiché si stima che in mais siano presenti ca. 60.000 geni (Messing et al., 2005) distribuiti uniformemente su una mappa genetica di ca. 2.000 cM, un intervallo di 10 cM conterrà ca. 300 geni. A parte rare eccezioni, non è quindi possibile identificare il/i gene/i responsabile/i del fenotipo osservato. Per raggiungere questo importante obiettivo sarà necessario procedere alla mappatura “fine” (i.e. molto accurata; la si realizza utilizzando numerosi marcatori) del QTL e, successivamente, al suo clonaggio posizionale (Salvi e Tuberosa, 2005). Per perseguire tali obiettivi è indispensabile “isogenizzare” il QTL, vale a dire costituire linee pure caratterizzate da un patrimonio genetico pressoché identico per tutto il genoma ad eccezione della porzione cromosomica sede del QTL; a tale regione, le due linee isogeniche saranno omozigoti per le forme alleliche alternative presenti nelle due linee parentali della popolazione di mappa.

L'isogenizzazione di un QTL può essere conseguita attraverso diversi approcci: il più semplice consiste nel realizzare successive autofecondazioni partendo da una pianta eterozigote alla regione cromosomica che contiene il QTL. Utilizzando le informazioni fornite dai marcatori che fiancheggiano il QTL, nel corso delle successive autofecondazioni vengono scelti gli individui che per tale regione risultano eterozigoti. Quando il numero delle autofecondazioni (almeno 4 o 5) assicura un elevato grado di omozigosi e isogenizzazione (ca. 98% del genoma), si selezionano, nella discendenza di singole piante, quelle che risultano essere omozigoti per le porzioni cromosomiche parentali alternative al QTL di interesse. La disponibilità di linee isogeniche per un determinato QTL permette di svolgere studi molto dettagliati in quanto il numero di genotipi da valutare (al minimo, saranno due) risulta drasticamente ridotto rispetto al numero di progenie di una popolazione di mappa (da 100 a 200 progenie). Le linee isogeniche costituiscono quindi materiali ideali per più approfonditi studi volti a interpretare, su base morfo-fisiologica, gli effetti fenotipici di un particolare QTL (Tuberosa et al., 2002c). La disponibilità di linee isogeniche a più QTL permetterà inoltre di realizzare incroci per verificare la presenza di interazioni epistatiche tra QTL.

### *QTL per caratteristiche della radice e resistenza allo stress idrico*

La resistenza allo stress idrico dipende da numerosi caratteri morfo-fisiologici (Ludlow e Muchow, 1990; Blum, 1996; Richards et al., 2002) per lo più a

base genetica complessa (Blum, 1988; Tuberosa et al., 2002c). In tale ambito, presso il nostro Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali dell'Università di Bologna sono in atto da oltre un decennio ricerche volte a identificare QTL per caratteristiche morfo-fisiologiche in grado di influenzare la resa in granella in mais, orzo e frumento in condizioni di carenza idrica (Tuberosa et al., 1998, 2002b,c; Sanguineti et al., 1999; Landi et al., 2002; Talamè et al., 2004b, Tuberosa e Salvi, 2004). Particolare attenzione è stata rivolta all'identificazione di QTL che influenzano le caratteristiche della radice del mais (Landi et al., 2002; Tuberosa et al., 2002b, 2003) e del frumento duro (Li Simin et al., 2005). Poiché la misurazione delle caratteristiche radicali in campo è alquanto laboriosa, abbiamo utilizzato dati raccolti in una fase precoce di sviluppo ricorrendo a sistemi sperimentali che consentono di analizzare un numero elevato di piante in spazi e tempi ridotti. Per tale obiettivo siamo ricorsi alla coltura idroponica per il mais (Tuberosa et al., 2002b), mentre per il frumento duro si è utilizzato un sistema di crescita in agarosio (Bengough et al., 2004). Ovviamente queste condizioni sperimentali sono molto diverse da quelle a cui la pianta va soggetta in campo. Tuttavia, l'analisi comparata dei QTL per i caratteri radicali studiati in sistemi artificiali e i QTL per la resa in granella in prove di campo è in grado di fornirci importanti informazioni in merito all'importanza di questi QTL sotto il profilo agronomico (Tuberosa et al., 2002b, 2003).

*QTL per caratteristiche radicali in frumento duro.* In frumento duro si sono utilizzati due approcci sperimentali complementari. Un approccio si basa sull'analisi di 250 famiglie  $F_6$  derivate da un incrocio tra due linee che differiscono per resistenza alla siccità. Il secondo approccio fa ricorso alla "mappatura per associazione" nell'ambito di una vasta collezione di accessioni di diversa provenienza. A tale scopo presso il nostro Dipartimento è stata raccolta una collezione di ca. 200 accessioni che rappresentano i principali gruppi di "breeding" del frumento duro. La mappatura per associazione offre il vantaggio di esplorare una variabilità genetica nettamente superiore a quella comunemente esplorata da incroci biparentali. Tale strategia sfrutta l'esistenza di un residuo livello di disequilibrio di associazione (cioè di correlazione tra la composizione allelica a loci diversi sullo stesso cromosoma) in campioni rappresentativi del germoplasma coltivato di una specie, con il fine di verificare l'eventuale associazione tra loci marcatori e regioni cromosomiche sede di geni alla base del carattere in esame (Buckler et al., 2002). Studi preliminari da noi condotti hanno indicato la presenza di un rilevante disequilibrio di associazione in frumento duro (Maccaferri et al., 2003, 2005), risultato

parzialmente atteso viste la base genetica piuttosto ristretta e la prevalente autogamia di questa specie.

Al momento, gli unici risultati di rilievo riguardano la collezione di accessioni, in quanto l'analisi delle 250 famiglie  $F_6$  derivate dall'incrocio biparentale è in corso di realizzazione. Per determinare il valore fenotipico delle radici si è fatto ricorso alla tecnica originariamente descritta da Bengough et al. (2004) in cui la radice si accresce in un gel di agar di ca. 5 mm di spessore racchiuso tra due lastre trasparenti che permettono quindi una raccolta di dati di tipo non distruttivo in successivi rilievi. L'analisi statistica sui dati fenotipici e molecolari ha permesso di identificare tre regioni (cromosoma 5AS, 5BS e 7BL) che influenzano significativamente la variabilità per la lunghezza della radice seminale primaria (Li Simin et al., 2005) e che quindi si ritiene contengano QTL in grado di influenzare tale carattere. Queste ricerche vengono condotte nell'ambito del progetto IDuWUE (acronimo per: Improving Durum wheat for Water Use Efficiency; <http://www.distagenomics.unibo.it/iduwie/index.html>) finanziato dalla EU che si pone l'obiettivo di identificare QTL per caratteri che influenzano l'efficienza di utilizzo dell'acqua e dell'azoto nel frumento duro. Evidentemente, tra i vari caratteri morfo-fisiologici che influenzano il bilancio idrico della pianta, quelli legati alla radice svolgono un'azione determinante sull'assorbimento dell'acqua e quindi sull'efficienza del suo utilizzo (Richards e Passioura, 1981, 1989; Richards et al., 2002; Tuberosa, 2004). Non appena si renderanno disponibili i risultati relativi all'analisi QTL per la resa in granella e altre importanti caratteristiche agronomiche, la posizione di tali QTL verrà confrontata con quella dei QTL per le radici descritti da Li Simin et al. (2005).

*QTL per caratteristiche radicali in mais.* Le ricerche da noi condotte in mais hanno permesso di identificare un QTL ad azione maggiore che influenza l'architettura della radice e il contenuto in acido abscissico (ABA) del tessuto fogliare. Sulla base di questi effetti fenotipici, il QTL è stato denominato *rot-ABA1* (Giuliani et al., 2005b). Questo QTL, localizzato sul cromosoma 2 vicino al marcatore RFLP *csu133*, fu inizialmente descritto sulla base del suo effetto sul contenuto in ABA della foglia in condizioni di ridotta disponibilità idrica (Tuberosa et al., 1998). I medesimi autori ipotizzarono che l'effetto di questo QTL sull'ABA potesse essere riconducibile a un effetto primario del QTL sulle caratteristiche della radice. Per verificare questa ipotesi e per meglio valutare gli effetti del QTL sulla resa e su altri caratteri di interesse agronomico, si è proceduto a isogenizzare il QTL (Landi et al., 2005); questo ha permesso di produrre linee isogeniche differenziate solo per la regione cro-

mosomica sede del QTL a cui risultano omozigoti per l'allele che incrementa ovvero per l'allele che diminuisce il contenuto di ABA della foglia. La valutazione di queste linee isogeniche in condizioni ambientali che favoriscono l'allettamento radicale ha indicato che tali linee isogeniche differiscono notevolmente per questo carattere di rilevante interesse agronomico (Giuliani, 2004; Giuliani et al., 2005b). In particolare, la linea isogenica caratterizzata da maggiore contenuto in ABA ha presentato valori di allettamento radicale significativamente inferiori rispetto alla corrispondente linea isogenica con minore contenuto in ABA (Giuliani et al., 2005b). Nonostante ciò, quest'ultima ha fatto registrare rese superiori quando valutata in combinazione ibrida con diverse linee tester (Li Yu et al., 2005). Si è ipotizzato che questo risultato sia riconducibile agli effetti dell'ABA a livello riproduttivo, in accordo con le indicazioni fornite da ricerche condotte nei cereali che avevano evidenziato effetti deleteri sulla fertilità riproduttiva dovuti a un eccesso di ABA (Saini e Westgate, 2000). È quindi plausibile che anche in mais un eccesso di ABA possa diminuire la fertilità riproduttiva (McLaughlin e Boyer, 2004) e, conseguentemente, ridurre la resa finale. Sulla base dei dati raccolti nelle prove di campo è stato elaborato un modello che riassume le presunte modalità di azione di *root-ABA1* (Giuliani et al., 2005b). Secondo il modello, l'azione primaria del QTL si esplica sulla dimensione e architettura dell'apparato radicale e, secondariamente, su allettamento radicale e concentrazione di ABA nella foglia. Per verificare la correttezza di tale ipotesi, è stato condotto un esperimento in cui piante isogeniche al QTL sono state cresciute in colonne di plexiglass (1 m di altezza x 0,3 m di diametro), condizione che ha consentito un'ispezione molto accurata delle radici. I dati raccolti alla fioritura hanno evidenziato che la linea isogenica caratterizzata da un maggiore accumulo di ABA possiede un apparato radicale più vigoroso e più esteso negli strati superficiali del suolo. Queste caratteristiche rendono quindi conto su base meccanistica della maggiore resistenza all'allettamento radicale di tale linea. Per quanto concerne l'effetto del QTL sull'ABA, si ipotizza che esso consegua alla differenza in massa radicale e alla diversa densità delle radici negli strati superficiali del suolo (Giuliani et al., 2005b), maggiormente soggetti a disidratazione per la forte evaporazione. Poiché l'ABA è attivamente sintetizzato dalla radice, un apparato radicale di dimensioni rilevanti e più esteso in superficie (e come tale esposto maggiormente a stress idrico) comporta una maggiore produzione di ABA e, conseguentemente, un più rilevante trasporto di ABA alla foglia attraverso il flusso xilematico. Questo modello è indirettamente avvalorato dai risultati ottenuti da Lebreton et al. (1995) utilizzando l'incrocio Polj17 x F2, diverso da quello da noi considerato (Os420 x IABO78). Infatti,



nella popolazione derivata da Polj17 x F2 è stata evidenziata, in posizione corrispondente a quella di *root-ABAI*, la presenza di un QTL per le dimensioni della radice nonché per il contenuto in ABA, con una associazione tra i due caratteri di segno positivo, vale a dire di segno analogo a quella da noi riscontrata per *root-ABAI*.

Per meglio comprendere l'azione congiunta del QTL sui caratteri sino a ora esaminati (cioè allettamento radicale, massa della radice, angolo di inserzione della radici avventizie sul fusto, contenuto in ABA, resa in granella, ecc.) si sta portando a termine la mappatura fine della regione di interesse. Per la mappatura fine si sono utilizzate 140 famiglie F<sub>4</sub> derivate da altrettante piante selezionate nell'ambito di ca. 1800 piante F<sub>2</sub> ottenute dall'incrocio tra due linee isogeniche al QTL. Il criterio utilizzato per scegliere le 140 piante F<sub>2</sub> è stato la presenza di ricombinazione (dovuta a *crossing-over*) nella regione di ca. 30 cM entro cui è stato originariamente mappato il QTL. Infatti solo le piante portatrici di un cromosoma ricombinante nella regione del QTL risultano "informative" a fini della mappatura genica fine dello stesso. L'elevato numero di eventi di ricombinazione considerati e la disponibilità di altri marcatori polimorfici limitrofi al QTL consentiranno quindi una sua mappatura con elevata accuratezza. Per identificare nuovi marcatori nell'ambito della regione di interesse si sono utilizzate le informazioni di sintenia tra mais e riso nonché i profili di espressione ottenuti da analisi *microarray* delle linee isogeniche (Giuliani et al., 2005). Come criterio di analisi fenotipica delle linee isogeniche, si è utilizzato il contenuto in ABA fogliare, in quanto non era proponibile realizzare un'indagine accurata delle caratteristiche radicali delle ca. 1700 piante (140 famiglie x 2 repliche x 6 piante/replica) considerate. I dati così raccolti consentiranno di restringere a ca. 2-3 cM la regione sede del QTL per poi passare al suo clonaggio posizionale secondo le procedure qui di seguito descritte e già utilizzate con successo per clonare *Vgt1*, un QTL che influenza la data di fioritura del mais (Salvi et al., 2002, 2003).

#### CLONAGGIO POSIZIONALE DI QTL

La figura 2 riassume i passaggi principali richiesti per il clonaggio posizionale di un QTL. Terminata la fase di mappatura fine del QTL, il passo successivo per il clonaggio posizionale di un QTL richiede il cosiddetto "ancoraggio" (dall'inglese "anchoring") tra mappa genetica e mappa fisica. L'ancoraggio si basa sull'identificazione di punti di corrispondenza molecolare tra la mappa genetica e quella fisica. La mappa fisica può essere costituita dalla sequenza



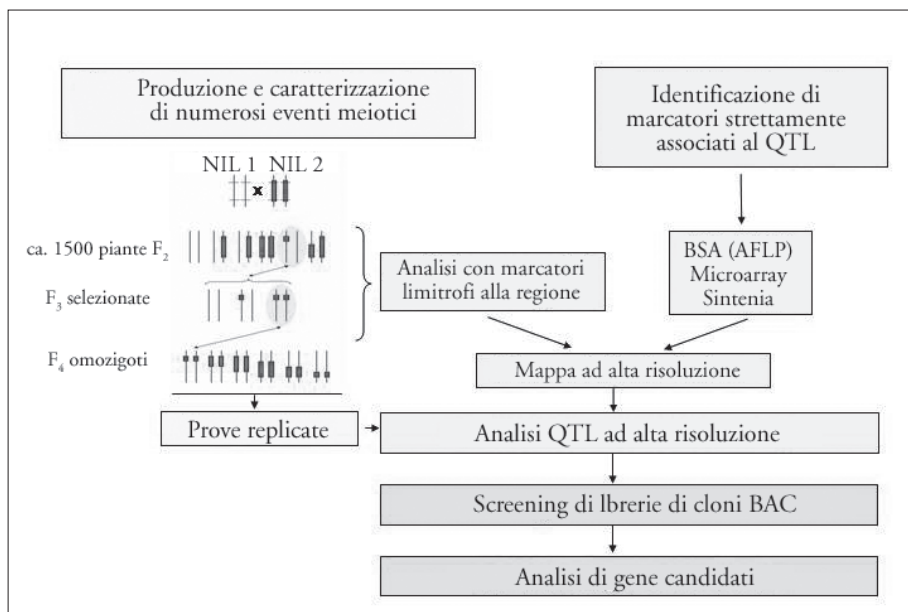


Fig. 2 Procedure richieste per il clonaggio posizionale di un QTL (Quantitative Trait Locus) per il quale siano disponibili due linee isogeniche (NIL: near isogenic line). Per identificare i marcatori strettamente associati richiesti per realizzare la mappa ad alta risoluzione si utilizza la bulk segregant analysis (BSA), l'analisi dei profili di espressione mediante microarray e/o marcatori identificati attraverso l'analisi delle relazioni di sintenia con specie modello (es: riso per le Graminacee)

nucleotidica completa del DNA genomico della specie (per ora disponibile solo per *Arabidopsis* e riso) o da una libreria di cloni (frammenti) di DNA genomico che, sulla base di una caratterizzazione molecolare (fingerprin-ting) sono stati allineati e coprono parzialmente o interamente il genoma. Il modo attualmente più comune per produrre librerie genomiche è attraverso il clonaggio dei frammenti genomici in vettori BAC (Bacterial Artificial Chromosome). Una libreria BAC è costituita da una miriade di frammenti (cloni BAC, ciascuno lungo ca. 100.000-150.000 paia di basi) che, nel loro complesso, rappresentano il genoma della specie in oggetto. Per poter utilizzare proficuamente la libreria BAC, è necessario allineare i frammenti che la compongono secondo la loro posizione sul genoma. Nel caso di *Vgt1*, l'aggiunta di un elevato numero di marcatori nella regione limitrofa al QTL ha consentito di identificare un singolo clone BAC che conteneva la regione di interesse (Salvi et al.; risultati non pubblicati). Il passo successivo è stato il sequenziamento del clone BAC e la sua annotazione per identificare i

geni candidati responsabili del fenotipo. Nel caso specifico di *Vgt1*, i risultati dell'analisi genetica indicano che il QTL non rappresenta un gene codificante bensì una piccola regione di ca. 2700 paia di basi che apparentemente non risulta codificare per particolari messaggeri/proteine. Si ritiene che il QTL espliciti la propria azione tramite un'interazione DNA-DNA, con l'eventuale mediazione di composti proteici, in grado di influire sul livello di espressione di un gene limitrofo (*ZmApt2* che codifica per un fattore di trascrizione della famiglia AP2) la cui manipolazione, tramite esperimenti di ingegneria genetica, ha mostrato un effetto rilevante sulla data di fioritura (Salvi et al.; risultati non pubblicati). Altri esperimenti indicano che i QTL possono spiegare la propria azione tramite sequenze apparentemente non codificanti in grado di influire sul livello di espressione di geni limitrofi a tali sequenze (Salvi e Tuberosa, 2005). In questi casi non è tuttavia da escludere che tali regioni apparentemente non codificanti in realtà codifichino per microRNA con un ruolo di tipo regolativo sul livello di espressione di altri geni.

Oltre a *root-ABA1*, altri QTL a effetto maggiore per caratteristiche della radice in mais sono in avanzata fase di isogenizzazione presso il nostro laboratorio e verranno presto avviati al clonaggio posizionale. In particolare, un QTL sul cromosoma 1 ha mostrato effetti fenotipici molto rilevanti su caratteristiche della radice misurate in uno stadio precoce di sviluppo nell'ambito di esperimenti condotti su plantule allevate in idroponica (Tuberosa et al., 2002b) e anche in piante allevate in pieno campo e sottoposte a estirpazione poco dopo la fioritura, per ottenere una stima indiretta della dimensione dell'apparato radicale (Landi et al., 2002).

Si è inoltre proceduto a creare una libreria di linee di introgressione partendo dall'incrocio B73 x Gaspé Flint, utilizzando la B73 come linea parentale ricorrente e Gaspé Flint come donatore di frammenti cromosomici di lunghezza variabile dai 20 ai 30 cM (Salvi et al., 2004). In pratica, per produrre una libreria di linee di introgressione si procede con successivi cicli di reincrocio (6 nel nostro caso, utilizzando B73 come genitore ricorrente) selezionando famiglie che presentino porzioni diverse del genoma del parentale donatore (Gaspé Flint), avendo cura di scegliere un numero adeguato di famiglie (ca. 90) per coprire tutto il genoma. Al termine delle operazioni si ottiene una collezione di linee isogeniche ciascuna delle quali conterrà un diverso frammento cromosomico proveniente da Gaspé Flint. La collezione di linee così ottenute permette di esplorare tutto il genoma per individuare QTL per caratteri di interesse. Qualora si identificassero QTL a effetto sufficientemente elevato da renderne possibile il clonaggio posizionale, si può immediatamente procedere con la mappatura fine evitando la tediosa procedura

dell'isogenizzazione del QTL. I dati sinora raccolti valutando la libreria di introgressione B73 x Gaspé Flint hanno consentito l'identificazione di almeno tre QTL a effetto maggiore per caratteri della radice, confermando quindi l'efficacia di questo tipo di approccio (Salvi et al., 2004). Si procederà quanto prima alla mappatura fine di tali QTL.

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le applicazioni della genomica per lo studio dei caratteri agronomici contribuiranno a una gestione più efficace delle problematiche relative alla sostenibilità delle produzioni agricole (Young et al., 1999; Tuberosa et al., 2002a; Morgante e Salamini, 2003). I risultati qui riportati indicano come l'approccio genomico consenta di approfondire le conoscenze sulla base genetica della variabilità osservata per le caratteristiche della radice. Per apprezzare meglio il contributo che la genomica ha fornito alla dissezione genetica dei caratteri quantitativi va ricordata una considerazione formulata in un articolo dedicato alle tematiche della siccità che fu pubblicato da Ludlow e Muchow nel 1990, quando cioè la genomica delle piante iniziava a svilupparsi. Sulla base degli approcci disponibili all'epoca, gli autori correttamente sottolinearono l'impossibilità di ottenere linee isogeniche per caratteri quantitativi nell'ambito della variabilità genetica spontanea. Oggi, grazie ai progressi della genomica, è possibile isogenizzare i QTL e clonare le sequenze alla base della variabilità genetica di tipo quantitativo (Salvi e Tuberosa, 2005). Le piattaforme genomiche, la bioinformatica e le informazioni di sequenza acquisite su specie modello (es. riso per i cereali e *Arabidopsis* per le dicotiledoni) faciliteranno l'identificazione e il clonaggio di geni/QTL che controllano lo sviluppo e l'architettura dell'apparato radicale. Tali informazioni e i materiali acquisiti renderanno più efficiente, e quindi più efficace, la selezione dei genotipi con le caratteristiche desiderate. Sulla base delle informazioni in merito a QTL per caratteristiche radicali del riso (Champoux et al., 1995; Price et al., 2002), la selezione assistita con marcatori è già stata utilizzata per individuare piante con caratteristiche radicali particolari che si ritiene possano conferire un vantaggio produttivo in condizione di stress idrico. L'introduzione di nuove piattaforme tecnologiche (es. microdissezione con laser, Hochholdinger et al., 2004) in grado di fornire informazioni più dettagliate in merito all'espressione genica in porzioni molto circoscritte della radice permetterà di identificare con maggiore facilità i possibili geni candidati alla base dei fenotipi osservati. Lo studio dei profili degli mRNA (Cushman e Bohnert, 2000; Bruce et al.,

2001; Ozturk et al., 2002), proteici (Zivy e de Vienne, 2000) e dei metaboliti (Fiehn, 2002) fornirà un valido ausilio per restringere ulteriormente il numero dei geni candidati (Pflieger et al., 2001; Wayne e McIntyre, 2002) e per facilitare il clonaggio dei QTL.

Infine, è opportuno sottolineare che l'approccio QTL costituisce un punto d'incontro ideale per discipline diverse ma tra di loro complementari, come l'agronomia, la fisiologia, la genetica e il miglioramento genetico. Solo un corretto approccio interdisciplinare potrà garantire che i risultati ottenuti nell'ambito delle ricerche di genomica si traducano in un tangibile miglioramento dei caratteri indagati. Ci auguriamo che questa nota possa contribuire a stimolare l'interesse per la genomica da parte dei colleghi impegnati nelle suddette discipline.

#### RIASSUNTO

I recenti sviluppi della genomica consentono di mappare e clonare i loci che controllano la variabilità dei caratteri quantitativi, i cosiddetti QTL (Quantitative Trait Loci). Si riportano i risultati di ricerche volte a identificare QTL per le caratteristiche della radice in frumento duro e mais. In mais, alcuni di tali QTL sono in fase avanzata di isogenizzazione. La valutazione di linee isogeniche per *root-ABAI*, ha permesso di dedurre che l'azione primaria di questo QTL si esplica sulla massa e distribuzione delle radici negli strati superficiali del suolo e, secondariamente, su contenuto in acido abscissico della foglia e sulla resa in granella. Utilizzando le metodiche già applicate con successo per clonare il QTL *Vgt1* che controlla la data di fioritura del mais, si sta procedendo al clonaggio posizionale di *root-ABAI*. In futuro, la genomica e altre piattaforme tecnologiche forniranno ampie opportunità per meglio comprendere la base genetica dei caratteri radicali e per ottimizzare l'architettura della radice in funzione delle prevalenti condizioni ambientali.

#### ABSTRACT

The recent progress in genomics allows us to map and clone the loci responsible for the variation of quantitative traits, the so-called QTL (Quantitative Trait Loci). The results of studies aimed at identifying QTL for root traits in durum wheat and maize are reported. In maize, we have isogenized a number of QTL. The evaluation of isogenic lines for *root-ABAI* has suggested that this QTL acts primarily on the mass and distribution of roots in the superficial soil layers, and, secondarily, on leaf abscisic acid concentration and grain yield. The procedures utilized to clone *Vgt1*, a QTL for flowering time in maize, are being deployed to clone *root-ABAI*. In the future, genomics and other platforms will provide us with ample opportunities to unravel the genetic basis of root traits and to optimize root architecture as a function of the prevailing environmental conditions.

## BIBLIOGRAFIA

- BEAVIS W.D. (1998): *QTL analysis: power, precision, and accuracy*, in *Molecular dissection of complex traits*, a cura di A.H. Paterson, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 145-162.
- BENGOUGH A.G., GORDON D.C., AL-MENAIE H., ELLIS R.P., ALLAN D., KEITH R., THOMAS W.T.B., FORSTER B.P. (2004): *Gel observation chamber for rapid screening of root traits in cereal seedlings*, «Plant and Soil», 262, pp. 63-70.
- BLUM A. (1988): *Breeding for stress environments*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- BLUM A. (1996): *Crop responses to drought and the interpretation of adaptation*, «Plant Growth Regulation», 20, pp. 135-148.
- BRUCE W., DESBONS P., CRAST O., FOLKERTS O. (2001): *Gene expression profiling of two related maize inbred lines with contrasting root-lodging traits*, «Journal of Experimental Botany», 52, pp. 459-468.
- BUCKLER E.S.I., THORNSBERRY J.M. (2002): *Plant molecular diversity and applications to genomics*, «Current Opinion in Plant Biology», 5, pp. 107-111.
- CHAMPOUX M.C., WANG G., SARKARUNG S., MACKILL D.J., O'TOOLE J.C., HUANG N., MCCOUCH S.R. (1995): *Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers*, «Theoretical and Applied Genetics», 90, pp. 969-981.
- COMAI L., YOUNG K., TILL B.J., REYNOLDS S.H., GREENE E.A., CODOMO C.A., ENNS L.C., JOHNSON J.E., BURTNER C., ODDEN A.R., HENIKOFF S. (2004): *Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling*, «Plant Journal», 37, pp. 778-786.
- CUSHMAN J.C., BOHNERT H.J. (2000): *Genomic approaches to plant stress tolerance*, «Current Opinions in Plant Biology», 3, pp. 117-124.
- DEVOS K.M., BEALES J., NAGAMURA Y., SASAKI T. (1999): *Arabidopsis-rice: will colinearity allow gene prediction across the eudicot-monocot divide?*, «Genome Research», 9, pp. 825-829.
- FALCONER D.S. (1981): *Introduction to quantitative genetics*, 2<sup>nd</sup> edn., Longman Inc., London, UK.
- FIEHN O. (2002): *Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 155-171.
- GALE M.D., DEVOS K.M. (1998): *Plant comparative genetics after 10 years*. «Science», 282, pp. 656-659.
- GIULIANI S. (2004): *Caratterizzazione di un QTL maggiore che influenza le caratteristiche della radice e la concentrazione in ABA del mais*, Tesi di dottorato, Università di Bologna.
- GIULIANI S., CLARKE J., KREPS J., LANDI P., SANGUINETI M.C., SALVI S., ZHU T., TUBEROSA R. (2005): *Microarray analysis of backcrossed-derived lines differing for root-ABA1, a major QTL controlling root characteristics and ABA concentration in maize*, in *Volume of Proceedings of the Congress "In the wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution" (Bologna, 27-31 May 2003)*, a cura di R. Tuberosa, R.L. Phillips, M. Gale, Avenue Media, Bologna, Italy, pp. 463-490.
- GIULIANI S., SANGUINETI M.C., TUBEROSA R., BELLOTTI M., SALVI S., LANDI P. (2005b): *Root-ABA1, a major constitutive QTL, affects maize root architecture and leaf ABA concentration at different water regimes*, «Journal of Experimental Botany», 56, pp. 3061-3070.

- GOFF S.A., RICKE D., LAN T.H., PRESTING G., WANG R., DUNN M., GLAZEBROOK J., SESSIONS A., OELLER P., VARMA H., HADLEY D., HUTCHISON D., MARTIN C., KATAGIRI F., LANGE B.M., MOUGHAMER T., XIA Y., BUDWORTH P., ZHONG J., MIGUEL T., PASZKOWSKI U., ZHANG S., COLBERT M., SUN W.L., CHEN L., COOPER B., PARK S., WOOD T.C., MAO L., QUAIL P., WING R., DEAN R., YU Y., ZHARKIKH A., SHEN R., SAHASRABUDHE S., THOMAS A., CANNINGS R., GUTIN A., PRUSS D., REID J., TAVTIGIAN S., MITCHELL J., ELDRIDGE G., SCHOLL T., MILLER R.M., BHATNAGAR S., ADEY N., RUBANO T., TUSNEEM N., ROBINSON R., FELDHAUS J., MACALMA T., OLIPHANT A., BRIGGS S. (2002): *A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica)*, «Science», 296, pp. 92-100.
- HACKETT C. (2002): *Statistical methods for QTL mapping in cereals*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 585-599.
- HALLAUER A.R., MIRANDA FO J.B. (1988): *Quantitative genetics in maize breeding*, 2<sup>nd</sup> edn., Iowa State University Press, Ames.
- HOCHHOLDINGER F., PARK W.J., SAUER M., WOLL K. (2004): *From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals*, «Trends in Plant Science», 9, pp. 42-48.
- IIDA S., TERADA R. (2004): *A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice*, «Current Opinions in Biotechnology», 15, pp. 132-138.
- LANDI P., SANGUINETI M.C., DARRAH L.L., GIULIANI M.M., SALVI S., TUBEROSA R. (2002): *Detection of QTLs for vertical root pulling resistance in maize and overlaps with QTLs for root traits in hydroponics and for grain yield at different water regimes*, «Maydica», 47, pp. 233-243.
- LANDI P., SANGUINETI M.C., SALVI S., GIULIANI S., BELLOTTI M., MACCAFERRI M., CONTI S., TUBEROSA R. (2005): *Validation and characterization of a major QTL affecting leaf ABA concentration in maize*, «Molecular Breeding», 15, pp. 291-303.
- LEBRETON C., LAZIC-JANCIC V., STEED A., PEKIC S., QUARRIE S.A. (1995): *Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits*, «Journal of Experimental Botany», 46, pp. 853-865.
- LEE M. (1995): *DNA markers and plant breeding programs*, «Advances in Agronomy», 55, pp. 265-344.
- LI SIMIN., MACCAFERRI M., SANGUINETI M.C., CORNETI S., CHIARI T., TUBEROSA R. (2005): *Evaluation of root characteristics in a collection of durum wheat*, «International Symposium on Genomics-based Plant Germplasm Research (Beijing, China, 25-28 April 2005) », p. 36.
- LI YU., WANG T., SHI Y., SONG Y., LIU C., SANGUINETI M.C., LANDI P., TUBEROSA R. (2005): *Testcross evaluation of root-ABA1, a major QTL influencing root architecture and ABA concentration in maize*, «International Symposium on Genomics-based Plant Germplasm Research (Beijing, China, 25-28 April 2005) », p. 80.
- LUDLOW M.M., MUCHOW R.C. (1990): *A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments*, «Advances in Agronomy», 43, pp. 107-153.
- MACCAFERRI M., RATTI C., TUBEROSA R., RUBIES AUTONELL C., VALLEGA V., SANGUINETI M.C. (2005): *A durum wheat germplasm collection suitable for gene discovery via association mapping*, «Proceedings of the International Symposium on Genomics-based Plant Germplasm Research (Beijing, China, 25-28 April 2005) », pp. 47-57.
- MACCAFERRI M., SANGUINETI M.C., DONINI P., TUBEROSA R. (2003): *Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm*, «Theoretical Applied Genetics», 107, pp. 783-797.



- MACCAFERRI M., SANGUINETI M.C., TUBEROSA R. (2005): *Analysis of linkage disequilibrium in a collection of elite durum wheat genotypes*, «Molecular Breeding», 15, pp. 271-289.
- McLAUGHLIN J.E., BOYER J.S. (2004): *Sugar-responsive gene expression, invertase activity, and senescence aborting maize ovaries at low water potentials*, «Annals of Botany», 94, pp. 675-689.
- MORGANTE M., SALAMINI F. (2003): *From plant genomics to breeding practice*, «Current Opinion in Biotechnology», 14, pp. 214-219.
- O'TOOLE J.C., BLAND W.L. (1987): *Genotypic variation in crop plant root systems*, «Advances in Agronomy», 41, pp. 91-145.
- OZTURK Z.N., TALAMÉ V., DEYHOLOS M., MICHALOWSKI C.B., GALBRAITH D.W., GOZUKIRMIZI N., TUBEROSA R., BOHNERT H.J. (2002): *Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 551-573.
- PATERSON A.H., LAN T.-H., REISCHMANN K.P., CHANG C., LIN Y.-R., LIU S.-C., BUROW M.D., KOWALSKI S.P., KATSAR C.S., DEL MONTE T.A. (1996): *Toward a unified genetic map of higher plants, transcending the monocot-dicot divergence*, «Nature Genetics», 14, pp. 380-382.
- PARALES R.E., DITTY J.L. (2005): *Laboratory evolution of catabolic enzymes and pathways*. «Current Opinion in Biotechnology», 16, pp. 315-325.
- PFLIEGER S., LEFEBVRE V., CAUSSE M. (2001): *The candidate gene approach in plant genetics: a review*, «Molecular Breeding», 7, pp. 275-291.
- PRICE A.H., TOWNEND J., JONES M.P., AUDEBERT A., COURTOIS B. (2002): *Mapping QTLs associated with drought avoidance in upland rice grown in the Philippines and West Africa*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 683-695.
- PRIOUL J.L., QUARRIE S., CAUSSE M., DE VIENNE D. (1997): *Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics*, «Journal of Experimental Botany», 48, pp. 1151-1163.
- QUARRIE S.A. (1996): *New molecular tools to improve the efficiency of breeding for increased drought resistance*, «Plant Growth Regulation», 20, pp. 167-178.
- RIBAUT J.M., HOISINGTON D. (1998): *Marker-assisted selection: new tools and strategies*, «Trends in Plant Science», 3, pp. 236-239.
- RICHARDS R.A., PASSIOURA J.B. (1981): *Seminal root morphology and water-use in wheat. II. Genetic variation*, «Crop Science», 21, 253-255.
- RICHARDS R.A., PASSIOURA J.B. (1989): *A breeding program to reduce the diameter of the major xylem vessel in the seminal roots of wheat and its effect on grain yield in rain-fed environments*, «Australian Journal of Agricultural Research», 40, pp. 943-950.
- RICHARDS R.A., REBETZKE G., CONDON A., VAN HERWAARDEN A. (2002): *Breeding opportunities for increasing the efficiency of water use and crop yield in temperate cereals*, «Crop Science», 42, pp. 111-121.
- SAINI H.S., WESTGATE M.E. (2000): *Reproductive development in grain crops during drought*, «Advances in Agronomy», 68, pp. 59-96.
- SALVI S., TUBEROSA R. (2005): *To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges?*, «Trends in Plant Science», 10, pp. 297-304.
- SALVI S., TUBEROSA R., CHIAPPARINO E., MACCARERRI M., VEILLET S., VAN BEUNINGEN L., ISAAC P., EDWARDS K., PHILLIPS R.L. (2002): *Toward positional cloning of Vgt1, a QTL controlling the transition from the vegetative to the reproductive phase in maize*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 601-613.

- SALVI S., MORGANTE M., FENGLER K., MEELEY B., ANANIEV E., SVITASHEV S., BRUGEMANN E., NIU X., LI B., TINGEY S.C., TOMES D., GUO-HUA MIAO G.H., PHILLIPS R.L., TUBEROSA R. (2003): *Progress in the positional cloning of Vgt1, a QTL controlling flowering time in maize*, «Proc. 57<sup>th</sup> Annual Corn and Sorghum Research Conference», American Seed Trade Association, pp. 1-18 (available as pdf file).
- SALVI S., BELLOTTI M., SACCHET F., TUBEROSA R. (2004): *A collection of introgression lines of the maize early-flowering variety Gaspè Flint into B73*, «Plant & Animal Genomes XII Conference» (San Diego, California, 10-14 January 2004), p. 194.
- SANGUINETI M.C., TUBEROSA R., LANDI P., SALVI S., MACCAFERRI M., CASARINI E., CONTI S. (1999): *QTL analysis of drought-related traits and grain yield in relation to genetic variation for leaf abscisic acid concentration in field-grown maize*, «Journal of Experimental Botany», 50, pp. 1289-1297.
- SAX K. (1923): *The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in Phaseolus vulgaris*, «Genetics», 8, pp. 552-560.
- SORRELLS M.E., LA ROTA M., BERMUDEZ-KANDIANIS C.E., GREENE R.A., KANTETY R., MUNKVOLD J.D., MIFTAHUDIN, MAHMOUD A., MA X., GUSTAFSON P.J., QI L.L., ECHALIER B., GILL B.S., MATTHEWS D.E., LAZO G.R., CHAO S., ANDERSON O.D., EDWARDS H., LINKIEWICZ A.M., DUBCOVSKY J., AKHUNOV E.D., DVORAK J., ZHANG D., NGUYEN H.T., PENG J., LAPITAN N.L., GONZALEZ-HERNANDEZ J.L., ANDERSON J.A., HOSSAIN K., KALAVACHALA V., KIANIAN S.F., CHOI D.W., CLOSE T.J., DILBIRLI G.M., GILL K.S., STEBER C., WALKER-SIMMONS M.K., MCGUIRE P.E., QUALSET C.O. (2003): *Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes*, «Genome Research», 13, pp. 1818-1827.
- TALAMÈ V., SALVI S., SANGUINETI M.C., TUBEROSA R. (2004a): *Development of a TILLING resource in barley*, in *Genetic variation for plant breeding. Proceedings of the XVIIth EUCARPIA General Congress (Tulln, Austria, 8-11 September 2004)*, a cura di J. Vollmann, H. Grausgruber, P. Ruckebauer, p. 310.
- TALAMÈ V., SANGUINETI M.C., CHIAPPARINO E., BAHRI H., BEN SALEM M., FORSTER B.P., ELLIS R.P., RHOUMA S., ZOUMAROU W., WAUGH R., TUBEROSA R. (2004b): *Identification of Hordeum spontaneum QTL alleles improving field performance of barley grown under rainfed conditions*, «Annals of Applied Biology», 144, pp. 309-319.
- TANKSLEY S.D. (1993): *Mapping polygenes*, «Annual Review of Genetics», 27, pp. 205-233.
- TUBEROSA R. (2004): *Molecular approaches to unravel the genetic basis of water use efficiency*, in *Water use efficiency in plant biology*, a cura di M.A. Bacon, Blackwell, Oxford, pp. 228-301.
- TUBEROSA R., SALVI S. (2004): *QTLs and genes for tolerance to abiotic stress in cereals*, in *Cereal Genomics*, a cura di P.K. Gupta, R. Varshney, Kluwer, The Netherlands, pp. 253-315.
- TUBEROSA R., SANGUINETI M.C., LANDI P., SALVI S., CASARINI E., CONTI S. (1998): *RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (Zea mays L.)*, «Theoretical and Applied Genetics», 97, pp. 744-755.
- TUBEROSA R., GILL B., QUARRIE S. (2002a): *Cereal genomics: ushering in a brave new world*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 445-449.
- TUBEROSA R., SALVI S., SANGUINETI M.C., LANDI P., MACCAFERRI M., CONTI S. (2002c): *Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield in drought-stressed maize: case studies, shortcomings and perspectives*, «Annals of Botany», 89, pp. 941-963.



- TUBEROSA R., SALVI S., SANGUINETI M.C., MACCAFERRI M., GIULIANI S., LANDI P. (2003): *Searching for QTLs controlling root traits in maize: a critical appraisal*, «Plant and Soil», 255, pp. 35-54.
- TUBEROSA R., SANGUINETI M.C., LANDI P., GIULIANI M.M., SALVI S., CONTI S. (2002b): *Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 697-712.
- VAN BUUREN M., SALVI S., MORGANTE M., SERHANI B., TUBEROSA R. (2002): *Comparative genomic mapping between a 754 kb region flanking DREB1A in Arabidopsis thaliana and maize*, «Plant Molecular Biology», 48, pp. 741-750.
- WAYNE M.L., MCINTYRE L. (2002): *Combining mapping and arraying: an approach to candidate gene identification*, «Proceedings of the National Academy of Science USA», 99, pp. 14903-14906.
- YOUNG N.D. (1999): *A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding*, «Molecular Breeding», 5, pp. 505-510.
- ZIVY M., DE VIENNE D. (2000): *Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology*, «Plant Molecular Biology», 44, pp. 575-580.



Finito di stampare  
nel mese di ottobre 2006  
dalla Tipografia ABC  
Sesto Fiorentino - Firenze

