

Comunicazioni cellulari e molecolari tra simbionti micorrizici

Nota di ANDREA GENRE, VALERIA SICILIANO, PAOLA BONFANTE
presentata dal Socio corrispondente Paola BONFANTE
nell'adunanza del 12 Aprile 2006

Riassunto. *I funghi micorrizici arbuscolari (AM) sono endosimbionti radicali della maggior parte delle piante vascolari a cui forniscono nutrienti minerali in cambio di carboidrati prodotti dalla fotosintesi. Tali scambi si realizzano grazie a un complesso processo che permette al fungo di colonizzare i tessuti radicali, dall'epidermide fino alle cellule più profonde della corteccia. I risultati qui presentati sono basati su osservazioni condotte su radici trasformate esprimenti diversi costrutti GFP per marcare in vivo alcune componenti cellulari. Essi dimostrano il controllo esercitato dalla pianta sul processo di colonizzazione delle cellule epidermiche, al cui interno si differenzia un nuovo apparato cellulare, composto da membrana plasmatica, citoscheletro e reticolo endoplasmatico. Questa struttura effimera, l'apparato di prepenetrazione, nel corso di poche ore porta alla costruzione di un canale, vale a dire di un compartimento apoplastico al cui interno può crescere il fungo e attraversare il lume cellulare senza danneggiare la cellula ospite. Si sono condotti esperimenti paralleli su piante selvatiche e mutanti non micorrizici, che hanno evidenziato in questi ultimi la mancanza di tali risposte cellulari. Infine risultati preliminari da studi dell'espressione genica effettuati in concomitanza con questa precoce fase di colonizzazione AM permettono di delinearne il background molecolare e di mettere in relazione tra loro eventi trascrizionali, attività genica e risposte cellulari.*

Abstract. *Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are root endosymbionts of most vascular plants, which they provide with inorganic nutrients in change of photosynthesized carbohydrates. Such nutritional exchanges take place at cellular level through a complex colonisation process involving epidermal and cortical cells. The results presented*

Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino e IPP-CNR - Viale Mattioli 25,
10125 Torino, Italia.

KEYWORDS: Arbuscular Mycorrhizas; Cytoskeleton; Endoplasmic Reticulum; Cell Responses; Signalling.

here are based on observations of transformed roots expressing different GFP tags for the cell components studied. They highlight the active control role played by the plant over the process of epidermal cell colonization. Within these cells is organized a novel cellular apparatus, composed of plasma membrane, cytoskeleton and endoplasmic reticulum. This ephemeral structure, the pre-penetration apparatus, leads in a range of few hours, to the construction of an apoplastic compartment where the fungus can grow to cross the cell lumen without damaging host cell integrity. Parallel experiments were made on wild type and non-mycorrhizal mutants, showing the lack of similar cell responses in the latter. Lastly, studies on gene expression during this phase of AM interaction are starting to outline its molecular background and correlate transcriptional events with gene activity and cell responses.

1. Introduzione

I funghi micorrizici arbuscolari (AM) vivono come endosimbionti nelle radici della maggior parte delle piante vascolari da almeno 450 milioni di anni (Remy et al., 1994) e si ritiene che abbiano avuto un ruolo fondamentale nella conquista delle terre emerse da parte delle piante stesse. La chiave per spiegare una così lunga storia di coevoluzione sta nei benefici nutrizionali che vengono garantiti a entrambi i partner dalla simbiosi. Mentre le ife extraradicali assorbono dei nutrienti minerali, tra cui il fosforo, dal suolo circostante e li cedono alla pianta, quest'ultima fornisce – in cambio – al fungo eterotrofo i carboidrati prodotti dalla fotosintesi. Tali scambi richiedono dei contatti cellulari che si realizzano grazie ad un complesso processo di colonizzazione (Bonfante e Perotto, 1995).

I funghi AM si sviluppano nella radice a partire dal micelio prodotto dalle loro grandi spore multinucleate. Sulla superficie radicale le ife differenziano degli appressori, strutture di adesione che a loro volta originano le ife di penetrazione. Queste crescono attraversando il lume delle cellule epidermiche, raggiungono il tessuto corticale e vi si diffondono, sviluppando infine le strutture simbiotiche chiamate arbuscoli, sito principale degli scambi nutrizionali tra i due organismi (Harrison, 2005).

Gli eventi cellulari e molecolari associati con lo stabilirsi delle micorrize arbuscolari sono ancora poco noti, nonostante che numerosi e recenti studi stiano fornendo alcune importanti chiavi di comprensione. Si è dimostrato che nella rizosfera e prima del contatto i funghi AM rispondono a sesquiterpeni essudati dalla pianta ramificandosi ripetutamente in prossimità della radice (Akiyama et al., 2005) e sviluppando gli appressori. Prove citologiche mostrano che ogniqualvolta il fungo cresce attraverso il lume di una cellula ospite, esso è sempre circondato da un compartimento apoplastico e da una invaginazione della membrana plasmatica che lo delimita (Bonfante, 2001).

Si conosce ancora molto poco sulla natura del dialogo cellulare e molecolare che media il riconoscimento tra i due partner. Tuttavia, studi genetici condotti su leguminose (*Pisum*, *Medicago*, *Lotus*) hanno rivelato che un piccolo gruppo di geni della pianta controlla la colonizzazione radicale (Parniske, 2004). È interessante sottolineare che questi geni controllano anche la trasduzione del segnale simbiotico dei rizobi azoto fissatori (Nod Factor) durante le fasi precoci della nodulazione. Nel caso di *Medicago truncatula* la mutazione dei geni DMI1, DMI2 o DMI3 blocca l'infezione radicale sia da parte dei rizobi sia da parte dei funghi AM. Queste osservazioni supportano l'ipotesi che anche i funghi AM generino segnali in grado di essere identificati da parte della pianta. Inoltre numerosi geni vegetali come ENOD2, ENOD5, ENOD11, ENOD12 vengono espressi durante le fasi precoci sia della nodulazione sia della colonizzazione AM.

Come accennato sopra, studi citologici mostrano che, con rare eccezioni, le ife penetrano nella radice attraversando il lume delle cellule epidermiche, e non solo aprendosi un passaggio tra cellula e cellula, per raggiungere direttamente la corteccia. Almeno in alcune piante è questo un passaggio chiave in cui il contatto diretto cellula-cellula consente l'attivazione, da parte della pianta, di risposte di difesa o di accoglienza (*accommodation*) prima dell'invasione dei tessuti più profondi. Questo ruolo di "checkpoint" per le cellule epidermiche è stato evidenziato solo recentemente in seguito a studi condotti su piante mutanti in cui il programma di *accommodation* è alterato e le cellule epidermiche vanno incontro a morte cellulare in seguito alla rottura della propria integrità da parte delle ife di penetrazione (Novero et al., 2002).

Nonostante le importanti conoscenze derivate dalla dissezione genetica del processo di colonizzazione, attualmente non sono disponibili molte informazioni riguardo ai meccanismi cellulari che controllano la colonizzazione della singola cellula o ai tempi e alle modalità di costruzione dell'interfaccia e della deposizione della membrana perifungina.

Un approccio innovativo, basato su osservazioni in tempo reale della colonizzazione AM di *Medicago truncatula* e sull'espressione di proteine coniugate con la GFP, ci ha dato l'opportunità di visualizzare l'assemblaggio e la scomparsa di un nuovo apparato nelle cellule epidermiche, indotto dal contatto con il fungo. Questo apparato, detto di pre-penetrazione (PPA), definisce in anticipo il percorso che seguirà l'ifa intracellulare ed è con ogni probabilità responsabile della costruzione del compartimento dell'interfaccia già prima della effettiva penetrazione del fungo.

Osservazioni parallele su mutanti *dmi2* e *dmi3* hanno mostrato che la formazione degli appressori non induce in queste piante nessuna risposta paragonabile, mentre radici trasformate che esprimono un marcatore GFP sotto il controllo del promotore ENOD11 sono state usate per mettere in relazione le risposte molecolari della pianta a quelle cellulari (formazione del PPA).

Gli esperimenti sono stati condotti su radici trasformate con *Agrobacterium rhizogenes*, derivate dalle tre linee di piante (selvatico, dmi2 e dmi3). Tre proteine coniugate con GFP sono state fatte esprimere sotto il controllo del promotore costitutivo CaMV 35S: GFP:Map4-MBD, che marca i microtubuli (Marc et al., 1998), GFP:Fimbrin1-ABD, che marca i filamenti di actina (Voigt et al., 2005) e GFP-HDEL, che marca il reticolo endoplasmatico (Haseloff et al., 1997). Il promotore CaMV35S è invece stato sostituito da MtENOD11 nel costrutto P_{MtENOD11}:GFP-HDEL (Journet et al., 2001). La colorazione vitale con la sonda FM 4-64 (Molecular Probes, Oregon, USA) è stata invece utilizzata per visualizzare la membrana plasmatica.

Si è applicata la tecnica detta “*targeted inoculation*” (Chabaud et al., 2002) all’interazione con *Gigaspora gigantea* e *G. rosea*, e adattata in modo da permettere osservazioni in microscopia confocale (microscopio Leica TCS SP2) prolungate e ripetute, attraverso la copertura delle colture con una pellicola trasparente e gas-permeabile (bioFOLIE 25, Sartorius AG, Germany).

2. L’apparato di pre-penetrazione

Il differenziamento dell’appressorio provoca innanzitutto la migrazione del nucleo della cellula epidermica sottostante direttamente in corrispondenza del sito di contatto (SC). Durante tale processo (Fig. 1), fasci di microfilamenti (MF) collegano il nucleo al SC, ampie placche di reticolo endoplasmatico (ER) si assemblano al di sotto del SC e i microtubuli (MT) corticali perdono il loro ordinamento in fasci paralleli per assumere un orientamento casuale. Questa fase si può considerare l’inizio della formazione del PPA. Infatti, una volta che il nucleo si è posizionato sotto l’appressorio, un sistema sub-conico di microtubuli si assembla, mentre i fasci di actina assumono una disposizione radiale, centrata sul SC e le placche di ER si organizzano in una forma a ciambella, con una regione centrale vuota esattamente in corrispondenza del SC.

Il nucleo inizia quindi una seconda migrazione attraverso la cellula, portando alla formazione di una colonna di citoplasma che lo collega al SC. All’interno di questa colonna MT, MF e ER sono particolarmente densi, ad eccezione di un canale centrale, come rivelato dalla ricostruzione tridimensionale al microscopio confocale.

La penetrazione dell’ifa, che inizia solo una volta che la colonna di citoplasma ha attraversato tutto il lume cellulare (4-5 ore dopo lo sviluppo dell’appressorio), segue esattamente il tracciato del canale centrale. Osservazioni prolungate nel tempo hanno infatti mostrato la dilatazione del canale mano a mano che l’apice ifale vi avanza. In seguito alla penetrazione fungina

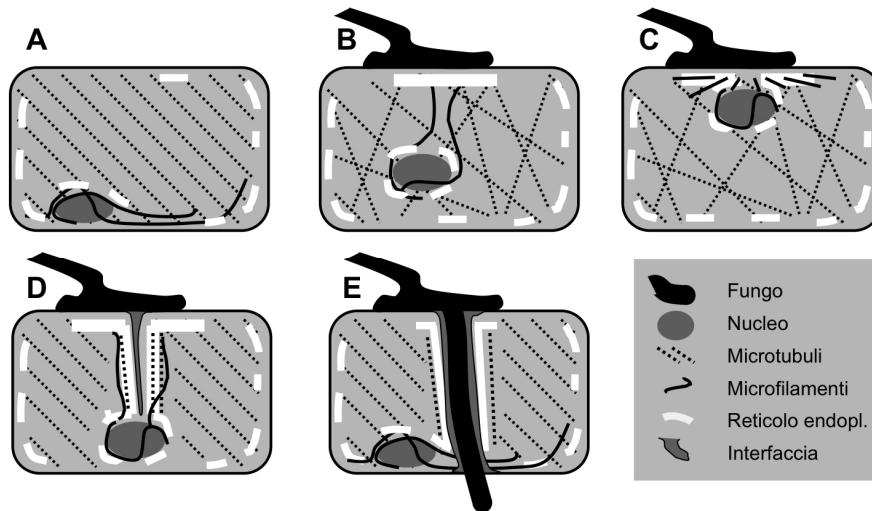


Figura 1. L'apparato di pre-penetrazione (PPA). A: Condizione iniziale prima del contatto con il fungo. B: Formazione dell'appressorio. C: Assemblaggio del PPA. D: Sviluppo completo del PPA. E: Penetrazione del fungo e scomparsa del PPA. Gli eventi qui schematizzati si compiono in circa 7-8 ore.

il nucleo perde contatto con la parte terminale della colonna di citoplasma e ritorna in posizione periferica. A questo stadio la densità generale delle strutture marcate si riduce fortemente, suggerendo lo smantellamento del PPA.

La colorazione della membrana plasmatica con la sonda fluorescente FM 4-64 ha inoltre fornito la prova di una diretta relazione tra il PPA e la sintesi dell'interfaccia, marcando una possibile invaginazione della membrana colocalizzata con il canale centrale del PPA. Simili invaginazioni di membrana non si sono invece mai osservate in radici di controllo.

Questi risultati suggeriscono fortemente che il PPA svolga un ruolo chiave nella costruzione dell'interfaccia, partecipando direttamente alla formazione del comparto apoplastico mediante il quale l'ifa di penetrazione attraverserà la cellula epidermica senza danneggiarne l'integrità e quindi la vitalità (Genre et al., 2005).

3. Ruolo di DMI2, DMI3 ed ENOD11

Le radici transgeniche derivate dai due mutanti *dmi* non hanno mostrato alcuna risposta cellulare riconducibile al PPA in seguito alla formazione dell'appressorio, come ad esempio le placche di ER o l'invaginazione della membrana plasmatica, ad eccezione della migrazione iniziale del nucleo al di sotto del SC. Questi risultati suggeriscono che le cellule epidermiche dei mu-

tanti *dmi2* e *dmi3* percepiscano ancora il contatto con il fungo ma non siano in grado di dare inizio alla formazione del PPA, evidenziando come la penetrazione fungina sia sotto lo stretto controllo della pianta.

Studi precedenti hanno mostrato l'attivazione di MtENOD11, che codifica per una proteina potenzialmente apoplastica, nelle cellule epidermiche e corticali durante l'interazione AM (Chabaud et al., 2002).

Nei nostri esperimenti radici *wild type* che esprimono $P_{MtENOD11}:GFP-HDEL$ mostrano un segnale fluorescente nel ER solo nelle cellule a contatto con l'appressorio ed in alcune di esse sono evidenti le tipiche strutture legate alla formazione del PPA. Quando poi il fungo attraversa la cellula, la fluorescenza diminuisce significativamente di intensità.

Queste osservazioni, unite ai dati sull'evoluzione nel tempo della risposta cellulare, permettono di localizzare l'attivazione di MtENOD11 nelle cellule epidermiche già 4-5 ore dopo il differenziamento degli appressori, cioè immediatamente prima della formazione del PPA.

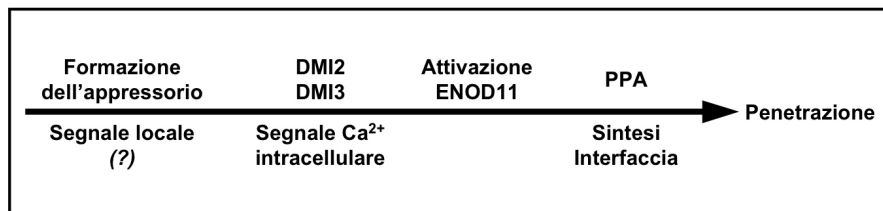


Figura 2. Modello che riassume gli eventi genetici, citologici e di segnalazione che portano all'effettiva colonizzazione dell'epidermide da parte dei funghi AM.

4. Il background molecolare dell'apparato di pre-penetrazione

Lo sviluppo della simbiosi tra le radici e i funghi AM coinvolge una complessa rete di percezione, amplificazione e traduzione del segnale nella pianta ospite (Harrison, 2005). Dal punto di vista molecolare, le interazioni tra le piante e i funghi AM sono state ampiamente analizzate negli ultimi anni allo scopo di chiarire i meccanismi coinvolti.

Tali studi hanno consentito di ottenere molte informazioni sul profilo trascrittomico delle associazioni micorriziche. Sono stati identificati specifici geni espressi durante il funzionamento della simbiosi, come ad esempio il trasportatore fosfatico MtPt4 (Harrison et al., 2002), ma una visione più completa dell'induzione genica è stata raggiunta usando tecniche come ibridazione sottrattiva repressiva (SSH) (Brechenmaker et al., 2004), cDNA AFLP (Kistner et al., 2005), e microarrays (Liu et al., 2003). Tuttavia le informazioni riguardanti gli stadi iniziali dell'interazione pianta-funghi AM sono abbastanza limitate soprattutto per le difficoltà nel sincronizzare gli even-

ti di sviluppo nei due simbionti (Weidman et al., 2004). Infatti sono necessari uno stretto controllo dei tempi e un marker fenotipico per un campionamento preciso al fine di evitare la diluizione di specifici trascritti e dissezionare il pattern di espressione genica che porta alla simbiosi. Allo scopo di determinare quale fosse il background molecolare del PPA, cioè quali geni della pianta fossero coinvolti in questa risposta è stato usato un analogo sistema sperimentale in vitro, costituito da radici trasformate GFP-HEDEL di *Medicago truncatula* inoculate con spore di *Gigaspora margarita* (Chabaud et al., 2001).

In questo sistema, gli appressori venivano osservati all'apice delle ife dopo circa 5 giorni di co-coltura e in questa fase è stata verificata la formazione del PPA. In tal modo è stato utilizzato il PPA come marker cellulare. I prelievi venivano effettuati sotto stereoscopio con bisturi e consistevano in porzioni radicali lunghe 1cm escisse al momento e nel punto di contatto fisico tra radice e appressori. Simili porzioni venivano prelevate da radici cresciute nelle stesse condizioni ma non inoculate (controllo) Gli RNA sono stati usati per un esperimento di ibridazione sottrattiva soppressiva, nel quale al cDNA proveniente da segmenti radicali al di sotto dell'appressorio è stato sottratto cDNA da analoghe porzioni radicali non inoculate. I frammenti di cDNA sottratto sono stati clonati, in modo da ottenere una libreria di espressione differenziale costituita da 229 cloni. 114 di essi sono stati sequenziali e rappresentano trascritti di *M. truncatula* differenzialmente espressi nel punto e al momento di contatto con l'appressorio di *G. margarita*. L'analisi *in silico* è stata condotta utilizzando l'algoritmo blastX per verificare similarità a livello amminoacidico con geni vegetali precedentemente noti.

Una parte delle sequenze, selezionate in base a uno screening con *dot-blot reverse northern*, è stata analizzata in *real time* RT-PCR, per verificare la correlazione con gli eventi precoci dell'interazione simbiotica, e con uno stadio più tardivo (48h dopo la formazione dell'appressorio) dell'infezione fungina. Il livello di trascrizione dei geni selezionati è stato inoltre indagato nel mutante di *M. truncatula* (Myc⁻) *dmi3-1*, consentendo di posizionare la loro espressione nella catena di traduzione del segnale che porta alla simbiosi. Analisi preliminari hanno consentito di individuare alcuni geni (tra cui un clone che codifica per un'*expansin-related protein 1 precursor* (*EXPR1*) la cui espressione si accompagna in maniera esclusiva alla formazione del PPA.

5. Conclusioni

Questi risultati rappresentano la prima prova cellulare diretta che la pianta ospite esercita un ruolo attivo nella preparazione e localizzazione della penetrazione del fungo AM. Ciò rispecchia perfettamente il programma genetico definito "intracellular accommodation program" da Parniske (2000). Appare ora molto importante ricercare risposte analoghe prima e durante la

formazione degli arbuscoli, ove il compartimento dell'interfaccia raggiunge la propria massima complessità ed estensione. Il fatto che una parziale riorganizzazione dei microtubuli sia stata descritta nelle cellule adiacenti agli arbuscoli lascia sperare in un esito positivo (Blancaflor et al., 2001).

Il PPA indotto dai funghi AM suggerisce altresì paralleli meccanicistici con il cordone di infezione tipico dei rizobi, estendendo dunque le omologie tra le due simbiosi ben oltre la via comune di controllo genetico sopra menzionata. Al momento non è stata descritta nessuna osservazione in vivo della colonizzazione cellulare da parte di *Rhizobium* che possa evidenziare analogie precise; tuttavia densi fasci di microtubuli sono stati visualizzati tra l'estremità del cordone di infezione e il nucleo della cellula ospite (Timmers et al., 1999), il che rende l'ipotesi dell'analogia tra i due sistemi assai accattivante.

In conclusione presentiamo qui uno schema semplificato (Fig. 2) che posiziona i nostri risultati all'interno del quadro degli eventi finora noti nella colonizzazione AM. Le proteine DMI2 e DMI3 sono necessarie affinché avvenga la seconda migrazione nucleare e la formazione del PPA. Poiché questi geni controllano anche la trasduzione del segnale dipendente dal Nod Factor, è stata inclusa nel modello l'ipotesi che i funghi AM producano un analogo fattore (e.g. Albrecht et al. 1999), collocandone l'azione a monte dell'attività DMI. L'attivazione di MtENOD11 è invece stata posizionata tra l'attività delle proteine DMI e l'assemblaggio del PPA sia a fronte dei dati attuali sia in base ad indagini precedenti che riportano la mancata attivazione del gene nell'epidermide di mutanti *dmi2* (Chabaud et al., 2002). I dati preliminari finora ottenuti attraverso l'analisi trascrittomica di porzioni radicali selezionate, suggeriscono che alcuni geni si attivino in modo specifico durante la formazione del PPA formando un complesso scenario di regolazione genica. Attraverso le tecniche della "reverse genetics" sarà possibile ottenere mutanti difettivi in modo specifico per tali geni: solo così si potrà appieno valutare la loro funzione durante le prime tappe di interazione con i funghi AM.

Bibliografia

- [1] AKIYAMA K., MATSUZAKI K. and HAYASHI H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435, 824-827.
- [2] ALBRECHT C., GEURTS R. and BISSELING T. (1999). Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J.* 18, 281-288.
- [3] BLANCAFLOR E.B., ZHAO L. and HARRISON M.J. (2001). Microtubule organisation in root cells of *Medicago truncatula* during development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Glomus versiforme*. *Protoplasma* 217, 154-165.

- [4] BONFANTE P. (2001). At the interface between mycorrhizal fungi and plants: the structural organization of cell wall, plasma membrane and cytoskeleton. In *Mycota, IX: Fungal Associations*, pp. 45-91. B. Hock, ed. Springer Verlag, Berlin.
- [5] BONFANTE P., PEROTTO S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *Tansley Review N. 82, New Phytol* 130: 3-21.
- [6] BRECHENMACHER L., WEIDMANN S., VAN TUINEN D., CHATAGNIERC O., GIANINAZZI S., FRANKEN P., GIANINAZZI-PEARSON V. (2004). Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* 14: 253-262.
- [7] CHABAUD M., VENARD C., DEFAUX-PETRAS A., BÉCARD G. and BARKER D.G. (2002). Targeted inoculation of *Medicago truncatula* in vitro root cultures reveals *MtENOD11* expression during early stages of infection by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 156, 265-273.
- [8] GENRE A., CHABAUD M., TIMMERS T., BONFANTE P., BARKER D.G. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17: 3489-3499.
- [9] HARRISON M.J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 19-42.
- [10] HARRISON M.J., DEWBRE GR., LIU J. (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429.
- [11] HASELOFF J., SIEMERING R.K., PRASHER D.C. and HODGE S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2122-2127.
- [12] JOURNET E.P., EL-GACHTOULI N., VERNOUD V., DE BILLY F., PICHON M., DEDIEU A., ARNOULD C., MORANDI D., BARKER D.G. and GIANINAZZI-PEARSON V. (2001). *Medicago truncatula* *ENOD11*: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 737-748.
- [13] KISTNER C, WINZER T., PITZSCHKE A., MULDER L., SATO S., KANEKO T., TABATA S, SANDAL N, STOUGAARD J, WEBB J, SZCZYGLOWSKI K, PARNISKE M (2005). Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* 17: 2217-2229.
- [14] LIU J, BLAYLOCK L.A., ENDRE G., CHO J., TOWN CH.D., VANDENBOSCH K.A., HARRISON M.J. (2003) Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* 15: 2106-2123.
- [15] MARC J., GRANGER C.L., BRINCAT J., FISHER D.D., KAO, T., MCCUBBIN A.G. and CYR R. (1998). A GFP-MAP4 reporter gene for visualising cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* 10, 1927-1939.
- [16] NOVERO M., FACCIO A., GENRE A., STOUGAARD J., WEBB K.J., MULDER L., PARNISKE M. and BONFANTE P. (2002). Dual requirement of the *LjSym4* gene for mycorrhizal de-

- velopment in epidermal and cortical cells of *Lotus japonicus* roots. *New Phytol.* 154, 741-749.
- [17] PARNISKE M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 320-328.
- [18] PARNISKE M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 414-421.
- [19] REMY W., TAYLOR T.N., HASS H. and KERP H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11841-11843.
- [20] TIMMERS A.C.J., AURIAC M.C. and TRUCHET G. (1999). Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126, 3617-3628.
- [21] VOIGT B., TIMMERS A.C.J., SAMAJ J., MÜLLER J., BALUSKA F. and MENZEL D. (2005). GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *Eur. J. Cell. Biol.* 84, 595-608.
- [22] WEIDMANN S., SANCHEZ L., DESCOMBINE J., CHATAGNIER O., GIANINAZZI S., GIANINAZZI-PEARSON V. (2004). Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 1385-1393.

Ringraziamenti

Le ricerche descritte sono state finanziate da fondi Cebioem, MIUR-Prin 2003 e CNR-Biodiversità.