



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
*Memorie e Rendiconti di Chimica, Fisica,
Matematica e Scienze Naturali*
141° (2023), Vol. IV, fasc. 3, pp. 369-380
ISSN 0392-4130 • ISBN 978-88-98075-58-4

*Alla Professoressa Emilia Chiancone,
luminosa figura di Scienziata*

Funghi micorrizici arbuscolari e piante: un'avventura iniziata più di 400 milioni di anni fa

PAOLA BONFANTE

Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università di Torino
10125 Torino - Italia. Accademia Nazionale dei Lincei
ORCID: 0000-0003-3576-8530 • E.mail: paola.bonfante@unito.it

Abstract – Plants do not live alone: since they conquered terrestrial habitats about 450 million years ago, they have coexisted with a plethora of microorganisms, giving rise to the so-called plant microbiota. Among them a crucial role is played by some soil fungi, identified as arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, which colonize the roots of seventy-two percent of plants. This extraordinary ecological success is explained by a nutrient exchange that is beneficial for both partners: the fungus improves the mineral nutrition of the host plant by acting as a biofertilizer, while simultaneously gaining access to plant-derived reduced carbon sources. Molecular biology, genomic sequencing, omics techniques, and genetics are now trying to decipher the regulatory processes that allow such evolutionarily distant organisms to live together. Considering the current situation of global changes, the hope is to utilize the potential benefits of this symbiotic association to promote more sustainable and environmentally friendly agriculture.

Keywords: Arbuscular mycorrhizas; host cells; plant and fungal evolution; fungal genome sequencing; mineral nutrition; RNA sequencing; signaling; symbiosis

Riassunto – Le piante non vivono sole: fin da quando hanno conquistato gli habitat terrestri circa 450 milioni di anni fa, hanno convissuto con una miriade di microrganismi, dando origine al cosiddetto microbiota vegetale. Tra questi un ruolo cruciale è giocato da alcuni funghi del suolo, identificati come funghi micorrizici arbuscolari (AM), che colonizzano le radici del 72% delle piante. Questo straordinario successo ecologico si spiega con uno scambio di nutrienti vantaggioso per entrambi i partner: il fungo migliora la nutrizione minerale della pianta ospite agendo come biofertilizzante, ottenendo allo stesso tempo l'accesso a fonti di carbonio ridotte di origine vegetale. La biologia molecolare, il sequenziamento genomico, le tecniche omiche e la genetica stanno ora cercando di decifrare i processi regolatori che consentono a organismi così evolutivamente distanti come

* Prolusione tenuta in occasione dell'Inaugurazione del 242° Anno Accademico dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, tenutasi il 23 maggio 2024 presso la Biblioteca dell'Accademia.

piante e funghi di vivere insieme. Considerando l'attuale situazione di cambiamenti globali, la speranza è quella di utilizzare i potenziali benefici di questa associazione simbiotica per promuovere un'agricoltura più sostenibile e rispettosa dell'ambiente.

Parole chiave: micorrize arbuscolari; cellule ospiti; evoluzione delle piante e dei funghi; sequenziamento dei genomi fungini; nutrizione minerale; RNA sequencing; segnalazione; simbiosi

Introduzione

Secondo il più recente Kew Garden Report [3], il nostro pianeta ospita circa 390.000 specie di piante. Con i loro organi ipogei ed epigei, le piante immagazzinano più di 450 Gigaton (Gt) di carbonio, corrispondenti all'incirca all'80% della biomassa del pianeta [5]. Tutti sanno che grazie al processo fotosintetico, le piante producono zuccheri che sono alla base delle catene alimentari dei viventi, oltre che liberare l'ossigeno necessario per il nostro metabolismo. Meno noto è invece il ruolo giocato dalla cospicua biomassa sotterranea delle piante (130 Gt C). Essa è composta da radici che garantiscono ancoraggio e stabilità, oltre che procurare i nutrienti minerali e l'acqua, elementi essenziali per la dieta dei vegetali.

Proprio come molti organi del corpo umano che ospitano un complesso microbiota [55], così le radici delle piante vivono associate a una moltitudine di microbi che costituiscono il *plant microbiota* [19] e che possono promuovere la crescita, lo sviluppo e la salute dei loro ospiti. Tra questi, i funghi (con le loro 12 Gt C) sono i secondi microbi del suolo più cospicui per biomassa [5], superati solo dai batteri (70 Gt C). Tali cifre forniscono un solido supporto sperimentale alla ben riconosciuta affermazione secondo cui le *micorrize* – associazioni simbiotiche tra circa 340.000 specie di piante e 50.000 funghi del suolo – rappresentano uno dei processi ecologici più potenti e pervasivi degli ambienti terrestri. In queste interazioni reciprocamente vantaggiose, i funghi da una parte ricevono carbonio derivato dalla fotosintesi dalla pianta, e dall'altra supportano la dieta vegetale con nutrienti minerali, principalmente fosforo e azoto [54]. Presenti sia negli ecosistemi naturali sia nelle aree dedicate all'agricoltura e controllate dall'uomo, le micorrize offrono numerosi servizi ecosistemici. I funghi micorrizici sono infatti coinvolti nel sequestro del carbonio e nell'aggregazione delle particelle del suolo. Hawkins e colleghi [36] hanno dimostrato che circa il 6% del fotosintetato della pianta ospite viene immagazzinato nelle reti fungine che i funghi micorrizici arbuscolari (AMF) formano nel suolo. Gli AMF hanno anche un impatto

importante sulla composizione delle comunità microbiche e vegetali, come dimostrato in uno studio pionieristico di parecchi anni fa [72], in cui la diversità sotterranea degli AMF è emersa come un fattore importante nel mantenimento della biodiversità.

Il ruolo della *biodiversità* nel funzionamento degli ecosistemi è oggi considerato fondamentale, come affermano anche i Sustainable Developmental Goals delle Nazioni Unite e, in questo contesto, si ritiene che le simbiosi micorriziche forniscano un contributo importante ai meccanismi che supportano l'intera biosfera e il suo funzionamento [24].

Il legame tra micorrize e biodiversità del pianeta è abbastanza ben definito: il 90% delle piante vascolari e non vascolari esistenti può formare micorrize e, tra queste, le angiosperme rappresentano il gruppo più ampio e diversificato di specie micorriziche (85-90%). Includono erbe annuali e alberi perenni, nonché la maggior parte delle colture che sono alla base dell'alimentazione umana, come riso, grano, mais, patate, patate dolci, pomodori e manioca. Il numero di specie fungine micorriziche è più difficile da accertare e attualmente si stima che rappresenti circa il 10% delle specie fungine conosciute [38], e che appartengano ai tre principali phyla, Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota. La grande diversità vegetale-fungina, supportata da oltre 400 milioni di anni di vita condivisa, ha dato origine a quattro principali tipologie micorriziche, definite in base ai loro principali tratti morfo-fisiologici, come ectomicorrize, micorrize ericoidei, micorrize delle orchidee e micorrize arbuscolari [30]. Le loro specifiche interazioni cellula-cellula sono state inizialmente descritte grazie a osservazioni ultrastrutturali compiute tra gli anni '70 e '90: questi studi pionieristici hanno fornito le basi per successive indagini sulla segnalazione e sulla regolazione genetica tra i diversi partner [10]. Gli stessi studi hanno rivelato che alcuni tratti cellulari e molecolari sono condivisi tra i quattro tipi di micorrize, anche se essi hanno avuto origine in momenti diversi durante l'evoluzione delle piante [30] e hanno una distribuzione non uniforme [69]. Le micorrize AM sono la tipologia dominante: grazie alla loro gamma di ospiti estremamente ampia (il 72% delle piante), sono presenti nella maggior parte degli ecosistemi terrestri, dagli aridi ambienti subartici alle foreste pluviali subtropicali. Una ragione del successo ecologico delle AM può essere trovata nella loro storia evolutiva: sono infatti riconosciute come la forma più antica di simbiosi. Reperti fossili risalenti a circa 400 milioni di anni fa (MYA) e attribuiti a piante estinte, come *Aglaophyton majus*, rivelano la presenza di strutture in-

tracellulari molto simili agli arbuscoli formati dagli attuali funghi AM [12, 58]. Oltre alle piante degli ecosistemi naturali, le simbiosi AM si sviluppano anche nella maggior parte delle piante coltivate, il che ha attirato l'interesse non solo di scienziati, agronomi e ambientalisti, ma anche di politici. Comprendere i meccanismi che regolano l'interazione tra piante e funghi è infatti emersa come una responsabilità sociale per risolvere il dilemma tra risparmiare spazio per la conservazione della natura [76] o coltivare piante per nutrire una popolazione umana in crescita [11]. Nel contesto di questo complesso scenario ecologico ed etico, lo scopo della review è quello di offrire una sinossi della recente letteratura sulla biologia dei funghi AM e sulle loro interazioni con la pianta ospite, con un focus particolare sul contatto che si sviluppa tra cellule vegetali e ife fungine, in termini di segnalazione molecolare, scambio di nutrienti e organizzazione cellulare. Nuove tecnologie, come il sequenziamento del genoma, la trascrittomiche e la proteomica, nonché l'imaging subcellulare, stanno fornendo nuovi strumenti per decifrare le basi genetiche, molecolari e cellulari della simbiosi AM e meglio comprendere la loro storia evolutiva.

Funghi Micorrizici Arbuscolari: dalla posizione filogenetica al sequenziamento del loro genoma

I funghi AM sono i rappresentanti più numerosi del subphylum Glomeromycotina, (phylum Mucoromycota), che comprende anche *Geosiphon pyriformis*, un fungo assai raro che ospita cianobatteri [62]. Anche se la loro classificazione come Glomeromycota o Glomeromycotina è ancora controversa [64, 69], l'assegnazione dei funghi AM al phylum Mucoromycota soddisfa parametri morfologici, genomici e funzionali. Come altri Mucoromycota, gli AM sono funghi privi di setti, sono multinucleati, e spesso ospitano endobatteri nel loro citoplasma [15, 71], ma possiedono anche caratteristiche uniche: sono simbionti biotrofici obbligati, in quanto dipendono dal carbonio organico ottenuto dalle piante ospiti e non possono pertanto concludere il loro ciclo vitale in assenza di una pianta ospite. I funghi AM interagiscono con un gran numero di piante: epatiche, felci, gimnosperme (dalla *Ginkgo biloba* al *Cupressus*) e angiosperme (da alberi, come il pioppo, alle erbe e agli arbusti), ma solo grazie al sequenziamento dei loro genomi abbiamo finalmente imparato a conoscere qualcosa di più sulla loro biologia. I loro genomi sono tra i più grandi nel regno dei funghi, spaziando da 125 Mbp per il ceppo A1 di *Rhizophagus irregularis* [70] alle dimensioni inaspetta-

te di 570 Mbp di *Gigaspora rosea* [52] e 770 Mbp di *G. margarita* [74]. Al contrario, il numero di geni (circa 25.000-26.000) è paragonabile tra le specie finora sequenziate, anche se nei genomi più grandi la dimensione viene amplificata da un'enorme quantità di elementi trasponibili, che occupano fino al 70% dei loro genomi. Tuttavia, *Paraglomus occultum* che appartiene all'ordine dei Paraglomales, un gruppo evolutivamente antico, ha un genoma assai ridotto, di circa 39,6 Mbp, possiede meno geni, ma – come gli altri funghi AM – manca dei geni coinvolti nella produzione di acidi grassi e zuccheri (vedi sotto), suggerendo che l'antenato comune dei funghi AM fosse già un biotrofo vegetale obbligato [48]. Il genoma dell'isolato *R. irregularis* DAOM197198 analizzato con la tecnologia del Long Nanopore Read ha rivelato nuovi dati strutturali: il DNA è organizzato in 33-32 cromosomi, di cui 23 sono stati mappati da telomero a telomero [78] e nel suo genoma aploide si identificano due compartimenti: uno definito eucromatico, che contiene i geni con funzionalità di base, e uno eterocromatico, fortemente metilato, ricco di sequenze ripetute, ma anche di geni che codificano per le proteine espresse *in planta*, come gli effettori. Questi due compartimenti sono in realtà ben riconoscibili al microscopio elettronico, come descritto nel passato e molto prima delle analisi molecolari [43]. Una analisi filostratigrafica ha anche permesso di assegnare una data di nascita ad alcuni dei geni fungini. Il 34% ha omologhi con tutti gli organismi viventi, confermando la base comune del funzionamento cellulare. Tra i geni specifici per i funghi, quelli che codificano per trasportatori associati all'assunzione dei nutrienti sono molto antichi, e precedono l'emergenza dei Glomeromycotina, suggerendo che tale funzione – in comune con tutti i saprotrofi – sia stata una condizione necessaria per la sopravvivenza, prima ancora dell'associazione con le piante. Al contrario, i geni più specifici sono datati in parallelo alla comparsa dei Glomeromycotina, e mostrano una sorta di esplosione, tale da costituire una vera innovazione genetica caratteristica del gruppo. In questo contesto, è interessante osservare che molti geni coinvolti nel metabolismo del fosfato sono sotto il controllo di meccanismi epigenetici, quali un basso grado di 6 metil-adenina [49, 78].

Come in molti patogeni vegetali, i genomi dei funghi AM codificano per un gran numero di effettori, piccole molecole proteiche che potrebbero garantire la comunicazione tra i funghi e i loro ospiti, e per una presenza limitata di enzimi che degradano la parete cellulare della pianta. Questo tratto può essere coinvolto nell'eludere la difesa dell'ospite e nel mantenere la vitalità delle cellu-

le ospiti. I funghi AM dipendono completamente dai lipidi di origine vegetale, poiché i loro genomi mancano di un complesso citosolico di sintesi degli acidi grassi comune ai funghi (FASI), ma possiedono un FASII mitocondriale per la sintesi dell'acido lipoico [15]. Questa caratteristica, insieme all'apparente mancanza della via biosintetica che porta alla tiamina e al limitato assorbimento di zuccheri dal suolo [70], contribuisce a definire i funghi AM come biotrofi obbligati. Tuttavia, *R. irregularis* è stato coltivato con successo su un terreno addizionato con acidi grassi, tra cui miristato [41, 68], suggerendo che l'arricchimento del mezzo nutritivo con le giuste molecole possa permettere di superare - almeno parzialmente - lo stato di biotrofia. Alcuni genomi di funghi AM hanno rivelato la presenza di vie che portano alla sintesi di metaboliti secondari, come i polichetidi [73], anche se al momento tale capacità sembra limitata.

Lo stato multinucleato dei funghi AM da un lato complica le procedure di trasformazione e dall'altro solleva molti dibattiti sul loro livello di variabilità genetica. Le sequenze del genoma e un'analisi approfondita dei loci MAT, che sono correlati agli eventi sessuali dei funghi, hanno rivelato che mentre la maggior parte degli isolati sono omocariotici, cioè contengono nuclei di un nucleotipo geneticamente simile, alcuni sono dicariotici, cioè contengono nuclei di due nucleotipi geneticamente divergenti [42, 59]. In effetti, l'analisi dei 4 ceppi dicariotici finora identificati mostra due genomi che coesistono con differenze strutturali ed epigenetiche [66]. Inoltre, la disponibilità di più ceppi sequenziati della stessa specie ha rivelato un'impressionante variabilità intraspecifica (i ceppi di *R. irregularis* condividono solo circa 8000 geni conservati), suggerendo che il concetto di "pangenomi" sia ora da usare anche per descrivere i funghi AM [50].

In conclusione, le opinioni attuali indicano una lunga storia evolutiva dei funghi AM che rispecchia la loro vita all'interno dei tessuti delle piante ospiti più diverse, la loro capacità di adattarsi ai cambiamenti ambientali e di interagire con endobatteri e con altri batteri che vivono sulla superficie delle loro ife [23]. Tuttavia, a causa dello stato multinucleato dei funghi AM, la funzionalità dei loro geni non può essere facilmente testata, con la rara eccezione dei geni fungini coinvolti nell'assorbimento del Pi [77]. Di conseguenza, la nostra attuale conoscenza sperimentale è ancora pianta-centrica; molte delle sorprendenti caratteristiche biologiche dei funghi AM (cioè biotrofia obbligata, condizione multinucleata, stato sessuale sconosciuto) rendono questi microorganismi un materiale sperimentalmente ancora intrattabile.

Segnali molecolari e relazioni cellulari nelle simbiosi AM

L'instaurarsi della simbiosi AM e il processo di colonizzazione sono stati studiati in grande dettaglio, mostrando modalità evolutivamente conservate, con solo piccole variazioni a seconda dei partner vegetali e fungini coinvolti [21, 30]. La germinazione delle spore fungine viene attivata in risposta a condizioni ottimali di umidità e temperatura e genera un micelio che cresce per alcuni giorni a spese dei lipidi immagazzinati nelle spore. Le ife risultanti esplorano il terreno circostante alla ricerca di una radice ospite: in seguito al riconoscimento reciproco pianta-fungo che si realizza attraverso uno scambio di molecole diffusibili, le ife fungine a contatto con l'epidermide radicale sviluppano strutture di adesione rigonfie e spesso ramificate chiamate *ifopodi* (Figura 1). In risposta agli stimoli sia chimici che fisici prodotti dall'ifopodio, la cellula epidermica sviluppa una struttura intracellulare, chiamata *apparato di prepenetrazione*, o PPA [29]: è questa un'aggregazione citoplasmatica colonnare che concentra dictiosomi e un complesso di vescicole esocitiche, e anticipa il percorso dell'ifa che attraverserà la cellula epidermica. L'esocitosi associata al PPA guida la biogenesi dell'interfaccia simbiotica, un nuovo compartimento cellulare circondato da un'estensione della membrana plasmatica ospite, che circonda tutte le ife intracellulari. Una volta attraversato lo strato epidermico, le ife possono ramificarsi e crescere sia a livello intercellulare che intracellulare per raggiungere i tessuti corticali interni dove ramificandosi formano la struttura che per antonomasia caratterizza questa simbiosi: l'*arbuscolo*, cioè un piccolo albero (Figura 1).

I funghi AM percepiscono la vicinanza di un ospite tramite molecole essudate dalla radice che inducono la germinazione delle spore e la ramificazione delle ife, come già dimostrato da una delle pioniere della ricerca micorrizica, Barbara Mosse, nei suoi classici esperimenti in cui essudati di trifoglio stimolavano la crescita e la ramificazione di *Funneliformis mosseae* [10]. Ora sappiamo bene che le molecole rilasciate dalle radici e riconosciute come segnali per i funghi AM sono soprattutto dei fitormoni derivati dai carotenoidi, chiamati strigolattoni (SL) e che hanno un ruolo primario nello sviluppo delle piante [2, 60]. I funghi AM rilevano gli SL negli essudati radicali a concentrazioni fino a 10 nM e rispondono in primis aumentando la ramificazione ifale. Le risposte molecolari al GR24, un analogo sintetico degli SL [6], includono la stimolazione dell'attività mitocondriale, un rapido aumento di ATP e NADH, la proliferazione nucleare e un aumento della concentrazione di Ca²⁺ [1, 7,

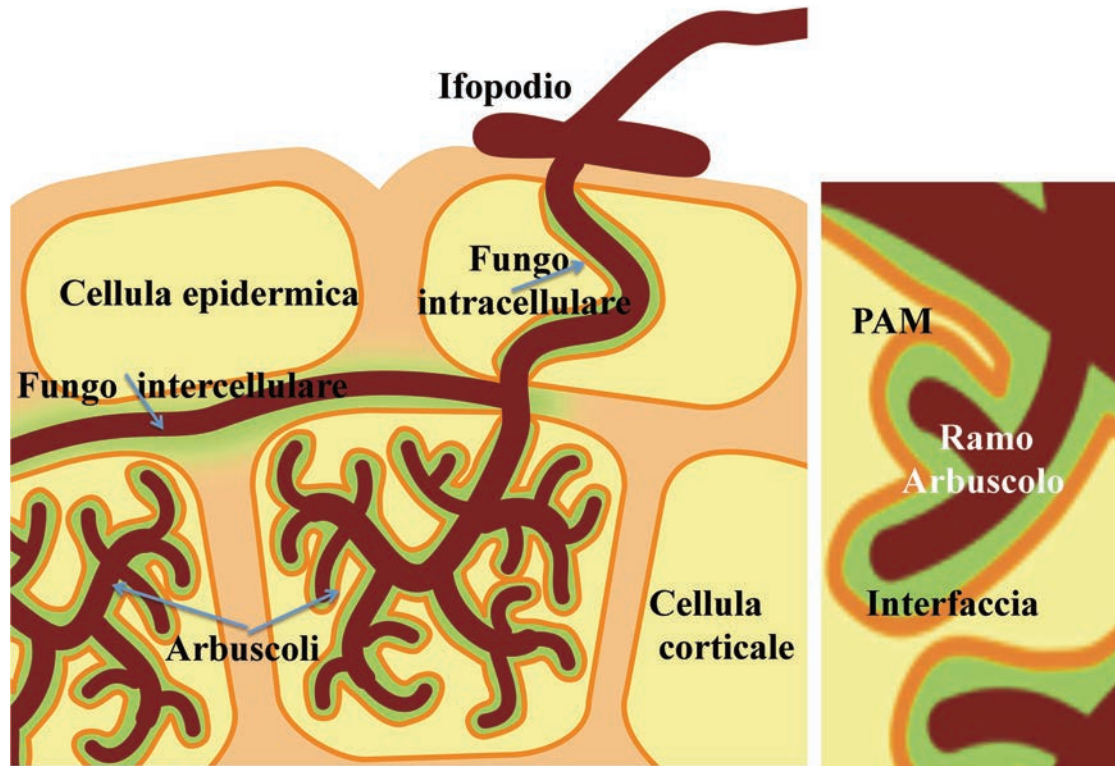


Fig. 1. Lo schema a sinistra riassume il processo di colonizzazione del fungo AM, che dopo aver formato un ifopodio (marrone) sulla superficie della cellula epidermica penetra al suo interno, causando la proliferazione della membrana plasmatica (arancio) che lo avvolge completamente. Il fungo si approfonda nei tessuti radicali grazie a ife intercellulari, quindi penetra negli strati più profondi del tessuto corticale ramificandosi e formando gli arbuscoli. Lo schema a destra mostra l'interfaccia (verde) tra la membrana periarbuscolare (PAM) della cellula vegetale e il ramo sottile dell'arbuscolo (modificata da Genre et al. 2020).

61]. Sebbene i recettori dei funghi AM per gli SL rimangono sconosciuti, in *Cryphonectria parasitica*, un patogeno che ben risponde agli SL, è stata dimostrata la presenza di un recettore, CpD14, che è un omologo strutturale del recettore degli SL nelle piante, e che con esso condivide un'attività α/β idrolitica *in vitro* contro l'analogo sintetico GR24 [26].

Dal canto loro, anche i funghi AM rilasciano molecole segnale che innescano risposte simbiotiche delle piante, tra cui la regolazione trascrizionale, i segnali di spiking del calcio nel nucleo della cellula epidermica, l'accumulo di amido nelle radici, la formazione delle radici laterali [27, 44]. Le molecole bioattive responsabili di tali risposte delle piante sono state identificate come tetra e penta-chito-oligosaccaridi (CO4 e CO5) [28] e come lipo-chito-oligosaccaridi (LCO), molto simili ai fattori di nodulazione (Nod) rilasciati da rizobi azoto fissatori [47]. Quando applicati come molecole purificate, tali fattori Myc imitano l'attività degli essudati fungini nelle radici dell'ospite, stimolando i picchi di Ca^{2+} nucleare,

che è il mediatore centrale degli eventi di signaling e la regolazione dei geni legati alla simbiosi. È interessante notare che il rilascio di CO4 e CO5 nell'essudato di *R. irregularis* viene potenziato dal trattamento con GR24 [28], suggerendo l'esistenza di un circuito positivo tra la percezione del segnale della pianta e del fungo e la produzione di questi oligosaccaridi [44]. Negli ultimi anni le ricerche si sono focalizzate sui recettori di queste molecole bioattive importanti sia per la simbiosi micorrizica che per quella fissatrice di azoto. Grande attenzione è data a complessi recettoriali, identificati come receptor-like chinasi, come LysM CERK1 e MYR1 [37, 51] che percepiscono i CO a catena corta e lunga [79], e portano all'attivazione di risposte simbiotiche o legate alla difesa delle piante [20].

Mentre CO e LCO a struttura corta vengono considerati come segnali simbiotici, i CO più lunghi come gli ottameri (CO8) sono riconosciuti come stimolatori dell'immunità vegetale, innescando un percorso di trasduzione basato su un rapido afflusso di Ca^{2+} nella cel-

lula vegetale. Tuttavia, nuovi dati suggeriscono che questa visione possa essere eccessivamente semplicistica. Si sa che i CO8 attivano i picchi nucleari di Ca²⁺ nelle radici di *Medicago truncatula* [25, 79], mentre i CO4 innescano lievi risposte legate all'immunità delle piante, come l'attivazione di specie reattive dell'ossigeno [17]. Allo stesso modo, un recente studio ha indagato l'andamento del Ca²⁺ in risposta ai diversi segnali fungini e ha dimostrato che CO8, CO4 e mycLCO inducono un rapido afflusso di Ca²⁺ citosolico, seguito da un picco di Ca²⁺ nucleare più duraturo nelle radici di *Lotus japonicus* [8]. Combinando approcci farmacologici e genetici, si è dimostrato che l'afflusso di Ca²⁺ nel citosol è correlato all'immunità delle piante e funzionalmente disaccoppiato dall'effetto simbiotico dello spiking nucleare di Ca²⁺. Inoltre, l'ampiezza dell'afflusso di Ca²⁺, così come il livello di induzione dei geni marcatori dell'immunità, dipendono in modo critico dalla concentrazione dell'elicatore [8]. Questi dati confermano risultati precedenti [25, 79] e delineano un quadro complesso in cui sia le risposte legate all'immunità sia quelle legate alla simbiosi sono determinate dalle stesse molecole fungine, ma modulate diversamente attraverso distinti cambiamenti del Ca²⁺ intracellulare, che può essere citoplasmatico o nucleare. Tali circuiti di comunicazione intrecciati tra fungo e pianta evidenziano un continuum tra gli elicitori fungini e i segnali mediati dal Ca²⁺ nelle vie di trasduzione che mediano la difesa e la simbiosi delle piante e suggeriscono che la classica separazione binaria delle molecole fungine derivate dalla chitina in segnali simbiotici e patogeni in base alla loro lunghezza e decorazioni non rifletta la complessità della comunicazione chimica pianta-fungo, dove i segnali basati sulla chitina sono solo una parte di un sistema di comunicazione più ampio [32].

Lo studio dei meccanismi di segnalazione delle piante coinvolti nella percezione dei segnali fungini AM è stato sviluppato in legumi come *Medicago truncatula* o *Lotus japonicus*, in gran parte seguendo la ricerca sulla segnalazione dei fattori Nod rizobiali. Tali indagini comparative hanno rivelato l'esistenza di una cosiddetta "via di segnalazione simbiotica comune" (CSSP), che comprende diversi geni essenziali per entrambe le simbiosi [33, 53], ma che può coinvolgere anche altre associazioni micorriziche [30]. Il CSSP è stato oggetto di bellissime ricerche, in quanto 20 anni di studi hanno dimostrato come esso sia la struttura scheletrica portante per capire le interazioni AM in tutte le piante e non solo nelle leguminose. Il CSSP inizia sulla membrana cellulare vegetale, con una receptor-like chinasi, con ripetizioni di leucina

(LRR), che in *Lotus japonicus* è identificata come SYMRK. Si ritiene che SYMRK sia in grado di formare complessi con i recettori del fattore Nod o del fattore Myc. Le altre proteine del CSSP finora conosciute sono localizzate a valle, nell'involucro nucleare e nel nucleoplasma: tre nucleoporine – NUP85, NUP133 e NENA e sono probabilmente coinvolte nel targeting nucleare degli attori CSSP a valle, come il canale ionico localizzato nella membrana nucleare CASTOR/POLLUX e la Ca²⁺-ATPasi MCA8 di tipo SERCA. Il picco di Ca²⁺ nucleare, descritto nel paragrafo precedente, è interpretato dalla proteina chinasi CCaMK dipendente dal Ca²⁺ e dalla calmodulina localizzata nel nucleoplasma. La sua attivazione regola l'espressione genica attraverso la proteina interagente CYCLOPS e i fattori di trascrizione NSP1, NSP2, NIN e RAM1 [31, 53]. Tuttavia, questo percorso ampiamente caratterizzato grazie a numerosi mutanti, probabilmente non è esclusivo [13] e alcuni dati suggeriscono la presenza di segnali aggiuntivi, indipendenti dal CSSP. Su questa linea Gutjahr e colleghi [34] hanno identificato una perdita di reattività ai funghi AM in un mutante del riso, che era confermata anche dall'assenza di contatto fisico e di risposte trascrizionali caratteristiche dei segnali fungini AM. Il gene responsabile della mutazione, DWARF 14 LIKE (D14L), codifica per un'idrolasi alfa/beta coinvolta nella percezione delle karrichine e non correlata al riconoscimento di fattori Myc noti, dimostrando quindi l'esistenza di strategie parallele di riconoscimento fungino nelle piante ospiti AM.

In conclusione, gli ultimi 20 anni di ricerca ci hanno dimostrato che il processo di colonizzazione si può descrivere non solo come una successione di eventi morfologicamente e geneticamente definiti grazie all'uso dei mutanti, ma che ogni tappa richiede l'intervento di specifici geni che almeno per quanto riguarda la pianta sono relativamente ben conosciuti [27 con la sua Figura 2]. Con tecniche di filogenomica, Bravo e i suoi colleghi [18] analizzarono i genomi di 50 piante e dal confronto con *Medicago truncatula*, come pianta modello per la simbiosi AM trovarono 138 geni che si ipotizza siano conservati per la funzionalità della simbiosi e 15 di questi hanno un ruolo ben definito. Allo stesso modo, Radhakrishnan et al [57] analizzando 271 trascrittomi e 116 genomi di piante che coprono l'intera diversità vegetale hanno dimostrato l'alto grado di conservazione dei geni coinvolti nel CSSP, importanti non solo nelle piante che formano AM ma anche per quelle che formano micorrize ericoidi e delle orchidee.

L'interfaccia tra pianta e fungo: una novità cellulare frutto della simbiosi

I ricercatori che negli anni 70-80 del secolo scorso osservavano le cellule micorrizzate al microscopio elettronico a trasmissione guardavano con sorpresa al profondo rimaneggiamento della cellula vegetale che ospitava l'arbuscolo fungino. Il vacuolo centrale era scomparso, il nucleo voluminoso trovava posto tra i rami fungini, i dictiosomi erano abbondanti come le membrane del reticolo, l'amido non era più presente negli amiloplasti, ma soprattutto il fungo era costantemente circondato da una membrana di origine vegetale che sembrava essere in continuità con la membrana periferica (Figura 1). Si veniva così a creare un'ampia zona di contatto tra pianta e fungo, ma il fungo era sempre compartimentato all'interno di questa membrana [9, 10]. Queste osservazioni portarono i ricercatori dell'epoca a definire l'*interfaccia simbiotica*, come un nuovo compartimento cellulare limitato dalla sottile parete del fungo intracellulare e dalla membrana perifungina o periarbuscolare, a seconda se il fungo fosse in forma di ifa o di arbuscolo). Grazie a tecniche di immunomarcatura si descrisse come questo sottile spazio delimitasse un compartimento apoplastico dove erano depositate molecole per lo più correlate con la parete cellulare della pianta, ma non strutturate in modo ordinato [4, 9, 35]. Questo compartimento ha continuato e continua ad essere un centro di attenzione perchè rappresenta la zona dove avviene la maggior parte degli scambi di segnali e nutrienti [10, 21, 46]. La sintesi della nuova membrana è quindi una delle attività più importanti della cellula micorrizzata, come anche emerge da recenti dati basati su analisi di RNA sequencing spaziale [63]. Ma non solo: la membrana che avvolge il fungo è funzionalmente diversa dalla membrana periferica della cellula ospite perchè è arricchita di proteine direttamente coinvolte nello scambio di nutrienti. Per una analisi dettagliata delle proteine presenti (dalla ATPasi protonica ai trasportatori del fosfato e dell'ammonio) nonché delle funzionalità ad esse associate si rimanda a Duan et al (2024, Figure 2-3) [23]. Ma le analisi cellulari e genetiche hanno anche permesso di rivelare come l'interfaccia e quindi la costruzione della membrana perifungina sia strettamente legata agli eventi di riconoscimento e all'attivazione del CSSP. Tutto parte dal momento in cui la cellula epidermica contattata dall'ifopodio fungino sviluppa il PPA [29], che guidando i processi di esocitosi porta alla biogenesi della membrana plasmatica ospite. E la genetica dimostra che i mutanti che non permettono l'attivazione del CSSP non rispondono allo

stimolo fisico dell'ifopodio, non danno via ai processi di rimodellamento cellulare e la simbiosi non si stabilisce.

In conclusione, il processo di riconoscimento, i diversi momenti della colonizzazione fungina, le risposte cellulari che portano allo sviluppo dell'interfaccia – vera novità biologica frutto della simbiosi – sono tutti eventi concatenati che si dipanano tuttavia con tempi diversi, dai minuti alle ore ai giorni.

Conclusioni

Una rapida carrellata attraverso la parola «micorriza» ci dimostra in modo convincente che le piante davvero non vivono da sole; esse vivono circondate da una miriade di microorganismi batterici e fungini (il plant microbiota) con cui intessono relazioni più o meno stabili. In questa grande varietà ci sono tuttavia elementi costanti, in quanto il 72% delle piante terrestri ospita nelle loro radici dei funghi simbiotici, i funghi AM, che le colonizzano seguendo delle modalità straordinariamente conservate: dall'epatica *Marchantia paleacea* alla felce *Pteris vittata*, dal «fossile vivente» *Ginkgo biloba* al moderno mais. In tutti questi vegetali i funghi AM sviluppano un processo di colonizzazione molto simile che culmina nella formazione di un arbuscolo. Quando si analizzano le basi genetiche, si osserva che i geni richiesti per la colonizzazione sono relativamente pochi e anche questi conservati [57], almeno nelle piante finora studiate. Un'analisi che risale ormai a parecchi anni fa [75], non solo dimostrò che tre geni appartenenti al CSSP erano presenti in sei briofite, ma anche che una di queste sequenze, il gene *DMI3*, che codifica per una calcio/calmodulina-kinasi dipendente (CCaMK), e che agisce a valle del calcio spiking, era in grado di ripristinare – in esperimenti di complementazione funzionale – la capacità di fare simbiosi in mutanti *dmi3* della dicotiledone *Medicago*. Questi dati sono sufficientemente solidi da poter affermare che i geni del CSSP erano già presenti nelle prime piante terrestri e che hanno conservato la loro funzionalità durante l'evoluzione. Da una parte quindi si osserva una straordinaria biodiversità dell'ospite vegetale (più di 300 000 specie di piante), e dall'altra una relativa omogeneità filogenetica dei partner fungini che – almeno per le nostre conoscenze attuali – appartengono tutti a un unico taxon fungino e mostrano strutture di colonizzazione conservate.

Pur nella consapevolezza che sappiamo ancora troppo poco dei funghi AM, è possibile ipotizzare – sulla base dei reperti fossili e delle analisi filogenomiche e molecolari – che l'associazione pianta-funghi AM abbia pre-

ceduto il grande successo ecologico delle piante vascolari che si registra a partire dal tardo Devoniano (~380–360 milioni di anni fa, MYA), in quanto in queste ere i valori atmosferici registrano un forte aumento di ossigeno, una caduta nella concentrazione di CO₂ e il successivo raffreddamento dell'atmosfera, in accordo con la 'Devonian cooling hypothesis' [22]. Purtroppo i dati fossili di piante delle ere precedenti (Ordoviciano-Siluriano, fino a 450 milioni di anni fa) sono limitati a spore e frammenti di tessuti di piante non vascolari [22, 67]. Bisogna arrivare al primo Devoniano, attorno ai 400 milioni di anni fa, per avere i bellissimi reperti fossili di piante pre-vascolari scoperte nel deposito scozzese del Rhynie Chert Lagerstätten e datato attorno ai 407 MYA. Fin dagli anni 20 del XX secolo i rizomi di queste piante alte fino a 50 cm hanno rivelato la presenza di strutture fungine molto simili agli attuali funghi AM [67]. Questi reperti fossili mostrano quindi che la simbiosi AM ha preceduto gli eventi di speciazione che hanno portato prima alla comparsa delle Gimnosperme e poi nel Cretaceo (125-100 milioni di anni fa) allo straordinario successo delle Angiosperme. Sembra pertanto che durante la loro lunga storia evolutiva le piante abbiano attraversato ere geologiche caratterizzate da cataclismi ambientali drammatici, siano passate da una generazione dominante gametofitica a quella sporofitica, da una diffusione per spore a quella per semi, ma abbiano costantemente mantenuto il pacchetto di geni richiesti per la micorrizzazione AM [18, 57]. E in questo lungo viaggio si sono sempre portati appresso nelle radici o nei loro organi ipogei, come i rizomi, i funghi AM, che hanno attualmente una distribuzione ubiquitaria. I dati più recenti mostrano che le piante che non hanno attualmente funghi AM nelle loro radici, come le Ericales e molte piante di alto fusto portatrici di ectomicorrize, derivano in realtà da piante che all'inizio ospitavano funghi AM [30]. E una analisi recente [45] suggerisce che molti geni presenti nelle piante AM si trovano nel genoma delle piante che ora formano ectomicorrize. Quindi davvero la micorrizza AM è la madre di tutte le simbiosi, come scrisse Martin Parniske anni fa [56]. Se si accettano queste ipotesi, la micorrizzazione dovrebbe essere considerato un carattere sinapomorfo delle Embriofita, cioè un carattere condiviso da due o più taxa e dall'ultimo antenato comune [14].

Si potrebbe suggerire quindi che la simbiosi AM non sia tanto frutto di una coevoluzione, come spesso affermato [14], ma di un evento parzialmente diverso, in cui – a partire da una interazione pianta-fungo già esistente – le forze evolutive hanno agito soprattutto sul partner ve-

getale. Ma che è accaduto al fungo AM durante l'evoluzione? Si può pensare che all'interno dei tessuti vegetali, e per di più in un ambiente meno esposto dell'aria, come il suolo, il fungo abbia mantenuto per lo più inalterati i suoi caratteri e che i processi di speciazione siano stati relativamente limitati nel tempo [14]. Questo potrebbe ben spiegare perché al momento il livello di specificità genetica tra fungo AM e ospite è molto limitata, anche se poi la risposta funzionale alla simbiosi può essere assai diversa quando i partner cambiano. Ma questa ipotesi apre ovviamente molte domande a cui è difficile dare risposte non avendo fossili di quelle piante non vascolari che sono state probabilmente le prime colonizzatrici della terra nel Siluriano. I funghi AM esistevano prima delle piante vascolari del Devoniano, come quelle trovate in Scozia? e quindi *prima dell'evento simbiotico* avevano una modalità di vita saprotrofica? Tanti indizi portano in questa direzione: in primis bellissimi fossili di funghi filamentosi con parete chitinnica sono stati trovati in Congo e datati a circa 800 MYA [16], confermando la possibilità che funghi filamentosi associati a particolari substrati fossero già presenti prima della comparsa delle piante sulla terra, magari all'interno di quelle comunità microbiche definite «croste»[67]. I funghi AM attuali sviluppano sia in natura sia in condizioni di laboratorio una cospicua rete di ife che si irradiano dalle spore germinate e che sono in grado di crescere e svilupparsi soprattutto quando fattori, come l'acido miristico, viene loro fornito. Inoltre poiché le ife che esplorano il suolo offrono una nicchia ricca di nutrienti a vantaggio di complesse comunità di batteri ifosferici, non si può escludere una complementarietà funzionale proprio da questi batteri associati [23]. Sembra quindi che i funghi AM mantengano una componente strutturale tipica dei saprotrofi e ben testimoniata nel loro genoma da tutti i trasportatori che sembrano essere codificati da geni molto antichi che precedono l'emergenza dei Glomeromycota [49]. Le loro limitate capacità di degradare polisaccaridi complessi, come quelli presenti nella parete cellulare delle piante, possono essere il risultato della delezione specifica di geni che mettevano in crisi la stabilità dell'interazione con l'ospite. Più difficile capire perché i funghi AM abbiano perso la capacità di sintetizzare lipidi a causa dell'assenza di una Fatty acid synthetase, gene che è stato perso quando si è instaurata la simbiosi, in accordo con le datazioni di Manley e colleghi [49]. I Mucoromycota a cui i funghi AM appartengono sono funghi che sintetizzano molti lipidi (*oleaginous filamentous fungi*) importanti anche nelle produzioni industriali e in realtà le ife dei funghi AM sono ricche di lipidi,

che tuttavia derivano dalla pianta [40]. Il confronto con altri funghi biotrofici obbligati non è di grande aiuto, perché quelli conosciuti ad oggi sono patogeni foliari, appartengono a gruppi diversi, da *Blumeria* che è una *Erisiphales* (*Pezizomycotina*) a *Puccinia* o *Ustilago* che sono Basidiomiceti, ma appartenenti a subphyla diversi [65]. Come *Dicarya*, questi funghi hanno origini molto più recenti dei *Mucomycota*, che collettivamente vanno negli *early diverging fungal taxa* [64]. Inoltre, nel loro ciclo vitale non sviluppano strutture al di fuori della foglia o di altri tessuti vegetali: dalla spora o dai conidi che atterrano sulla foglia e quindi dall'appressorio prendono subito origine le ife di infezione. L'analisi del genoma e dei metabolismi di questi patogeni identifica le peculiarità tipiche degli organismi biotrofici obbligati [65], e qui le somiglianze con i funghi AM sono interessanti e numerose: il loro genoma è ricco di trasposoni, ma povero di geni per degradare la parete cellulare, come pure di geni per la sintesi della tiamina; infine l'austorio è strettamente avvolto dalla membrana di origine ospite. È interessante osservare che il patogeno biotrofo obbligato *Golovinomyces cichoracerum* anch'esso riceve lipidi dall'ospite [40] suggerendo che il trasferimento di carbonio ridotto dalla pianta al fungo biotrofo sotto forma di grassi non sia esclusivo degli antichi AM, anche se geni per la FAS sono presenti nel genoma degli *Erisiphales* patogeni [65]. Dal confronto sembra quindi che i patogeni biotrofici siano biotrofici obbligati, dipendenti dalla pianta ospite al 100% e che le tracce del loro potenziale passato saprotrofico siano più tenui rispetto ai funghi AM.

In conclusione, si può quindi ipotizzare che la simbiosi AM sia frutto di una relazione solo parzialmente simmetrica: a partire dalle prime interazioni avvenute in condizioni ambientali molto critiche per la pianta (il suolo non era ancora formato, gli elementi minerali erano limitanti), il fungo, che possiamo immaginare fosse perfettamente adattato all'ambiente, ha dato un apporto indispensabile grazie alle sue capacità saprotrofiche, ma ha anche trovato una nicchia sicura e protetta dentro i tessuti vegetali, che lo hanno spinto a perdere alcuni dei suoi tratti di fungo free-living. Dal canto suo, la pianta ha accettato un ospite relativamente poco costoso [36] per un autotrofo, permettendogli di seguirla nella sua molto più complicata storia evolutiva.

Il mondo delle micorrize continua ad aprire mille interrogativi. Considerando l'attuale situazione di cambiamenti globali e il bisogno di realizzare una transizione ecologica che rispetti l'ambiente e che limiti l'uso delle risorse non rinnovabili, senza impattare in modo eccessivo la produttività, le micorrize sono viste come stru-

menti importanti. Esse offrono potenziali benefici grazie alla funzionalità di biofertilizzanti e bioprotettori dei funghi AM, parametri importanti per promuovere un'agricoltura sostenibile e rispettosa dell'ambiente. Tuttavia, nonostante anni di applicazioni, il grande passo a scala globale non è ancora avvenuto. Forse perché non sappiamo ancora dire se le piante micorrizzate che si trovano in natura, o nei campi, rispondono davvero ai funghi AM come le piante in laboratorio. Sarà importante capire se davvero tutte le piante hanno mantenuto i geni necessari per la colonizzazione, e quanto le condizioni dell'attuale agricoltura industriale siano compatibili con gli scambi di nutrienti durante la simbiosi [23]. Un grande contributo potrebbe venire dal capire se i funghi AM davvero possiedono la doppia firma nutrizionale qui ipotizzata (simbionte obbligato con un passato saprotrofo): insomma se davvero sono in grado di attuare una doppia strategia che rappresenta l'assicurazione per il loro successo.

Ringraziamenti

Paola Bonfante desidera ringraziare tutte le colleghe, i colleghi e i dottorandi/e che dagli anni 80 del XX secolo fino al 2020 hanno collaborato con lei o fatto parte del suo gruppo di ricerca. A questo gruppo composito deve moltissimo, per non dire tutto! Un ringraziamento particolare a Marco Giovannetti per la collaborazione nelle ricerche più recenti, a Pietro Spanu, Andrea Genre e Luisa Lanfranco per la lettura critica delle conclusioni, e a Mara Novero per la pazienza infinita dimostrata in 25 anni di collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AKIYAMA Kohki, Ken-Ichi MATSUZAKI, Hideo HAYASHI (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435:824-827
- [2] AL-BABILI Salim, Harro J. BOUWMEESTER (2015). Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Ann Rev Plant Biol* 66:161-18
- [3] ANTONELLI Alexandre *et al.* (2023). State of the World's Plants and Fungi (2023). *Royal Botanic Gardens, Kew*. DOI: <https://doi.org/10.34885/wnwn-6s63>
- [4] BALESTRINI Raffaella, Paola BONFANTE P. (2014). Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism. *Frontiers in Plant Science* 5: 237
- [5] BAR-ON Yinon M, Rob PHILLIPS, Ron MILO (2018). The biomass distribution on Earth. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:6506-6511

- [6] BESSERER Arnaud, Guillaume BECARD G., Christophe ROUX C. *et al.* (2008) GR24, a synthetic analogue of strigolactones, stimulates mitosis and growth of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea* by boosting its energetic metabolism. *Plant Physiol* 148:402-413
- [7] BESSERER Arnaud, Virginie PUECH-PAGES, Patrick KIEFER *et al.* (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol* 4:1239-1247
- [8] BINCI Filippo, Elisabetta OFFER, Andrea CROSINO *et al.* (2024). Spatially and temporally distinct Ca²⁺ changes in *Lotus japonicus* roots orient fungal-triggered signalling pathways towards symbiosis or immunity. *Journal of Experimental Botany* 75: 605-619.
- [9] BONFANTE Paola (2001). At the Interface Between Mycorrhizal Fungi and Plants: the Structural Organization of Cell Wall, Plasma Membrane and Cytoskeleton. In: HOCK B. (ed) *Fungal Associations*. The Mycota, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 45-61
- [10] BONFANTE Paola (2018). The future has roots in the past: the ideas and scientists that shaped mycorrhizal research. *New Phytol* 220:982-995
- [11] BONFANTE Paola (2024). *Piante, Ambiente, Società*. Bardi Editore Roma, ISSN: 2612-1301. ISBN: 9788894810851
- [12] BONFANTE Paola, Andrea GENRE (2015). Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak 'plantish' or 'fungish'? *Trends Plant Sci* 20:150-154
- [13] BONFANTE Paola, Natalia REQUENA (2011). Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 14:451-457
- [14] BONFANTE Paola, Marc-Andre SELOSSE (2010). A glimpse into the past of land plants and of their mycorrhizal affairs: from fossils to evo-devo. *New Phytologist*, 186: 267-270. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03196.x>
- [15] BONFANTE Paola, Francesco VENICE (2020). Mucoromycota: going to the roots of plant interacting fungi. *Fungal Biology Reviews* 34:100-113
- [16] S. BONNEVILLE, F. DELPOMDORF, A. Preat *et al.* (2020). Molecular identification of fungi microfossils in a Neoproterozoic shale rock. *Sci. Adv.* 6, eaax7599 DOI: 10.1126/sciadv.aax7599
- [17] BOZSOKI Zoltan, Jeryl CHENG, Feng FENG *et al.* (2017). Receptor-mediated chitin perception in legume roots is functionally separable from Nod factor perception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19;114(38):E8118-E8127. doi: 10.1073/pnas.1706795114. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28874587; PMCID: PMC5617283.
- [18] BRAVO Armando, Thomas YORK, Nathan PUMPLIN *et al.* (2016). Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nat Plants.* 18;2: 15208. doi: 10.1038/nplants.2015.208. PMID: 27249190.
- [19] CHIALVA Matteo, Luisa LANFRANCO, Paola BONFANTE (2022). The plant microbiota: composition, functions, and engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 73 135-142, ISSN 0958-1669, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.003>.
- [20] CHIU Chai H., PASZKOWSKY Uta (2021). How membrane receptors tread the fine balance between symbiosis and immunity signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 118:e2106567118
- [21] CHOI Jeongmin, William SUMMER, Uta PASZKOWSKY (2018). Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Annual Review of Phytopathology* 56:135-160.
- [22] DAHL Taiss W, Susanne KN ARENS (2020). The impacts of land plant evolution on Earth's climate and oxygenation state – An interdisciplinary review. *Chemical geology*, 2020-08, Vol .547, p. 119665, Article 119665 10.1016/j.chemgeo.2020.119665
- [23] DUAN Shilong, Gu FENG, Erik LIMPENS *et al.* (2024). Cross-kingdom nutrient exchange in the plant-arbuscular mycorrhizal fungus-bacterium continuum. *Nature Reviews Microbiology* <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01073-7>
- [24] EISENHAEUER Nico, Paola BONFANTE, Francois BUSCOT F. *et al.* (2022). Biotic Interactions as Mediators of Context-Dependent Biodiversity-Ecosystem Functioning Relationships. *Research Ideas and Outcomes* 8: e85873
- [25] FENG, Feng, Johngo SUN, Guru V. RADHAKRISHNAN *et al.* (2019). A combination of chitoooligosaccharide and lipochitoooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in *Medicago truncatula*. *Nat Commun* 10, 5047 <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12999-5>
- [26] FIORILLI Valentina, Marco FORGIA, Alexandre DE SAINT GERMAIN *et al.* (2022). A structural homologue of the plant receptor D14 mediates responses to strigolactones in the fungal phytopathogen *Cryphonectria parasitica*. *New Phytol.* 234(3):1003-1017. doi: 10.1111/nph.18013. Epub 2022 Feb 26. PMID: 35119708; PMCID: PMC9306968.
- [27] GENRE Andrea, Serena CAPITANIO, Paola BONFANTE (2024). Signals and host cell remodeling in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The Mycota*, Volume 9: *Fungal Associations*. DOI:10.1007/978-3-031-41648-4_9
- [28] GENRE Andrea, Mireille CHABAUD, Coline BALZERGUE C. *et al.* (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol* 198:190-202
- [29] GENRE Andrea, Mireille CHABAUD, Ton TIMMERS *et al.* (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* 17:3489-3499
- [30] GENRE Andrea, Luisa LANFRANCO, Silvia PEROTTO, Paola BONFANTE (2020) Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 18:649-660
- [31] GENRE Andrea, Giulia RUSSO (2016). Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions. *Front Plant Sci* 7:96
- [32] GIOVANNETTI Marco, Filippo BINCI, Lorella NAVAZIO, Andrea GENRE (2024). Nonbinary fungal signals and calcium-mediated transduction in plant immunity and symbiosis. *New Phytologist* 241:1393-1400.
- [33] GOBBATO Enrico (2015) Recent developments in arbuscular mycorrhizal signaling. *Curr Opin Plant Biol* 26:1-7
- [34] GUTJAHN Caroline, Enrico GOBBATO, Jeongmin CHOI *et al.* (2015). Rice perception of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi requires the karrikin receptor complex. *Science* 350:1521-1524
- [35] GUTJAHN Caroline, Martin PARNISKE (2013). Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Ann Rev Cell Develop Biol* 29:593-617

- [36] HAWKINS Hedi-Jayne, Rachel IM CARGILL, Michael E. VAN NULAND, *et al.* (2023). Mycorrhizal mycelium as a global carbon pool. *Curr Biol.* 5:33(11): R560-R573. doi: 10.1016/j.cub.2023.02.027. PMID: 37279689.
- [37] HE Jiangman, Chi ZHANG, Huiling DAI *et al.* (2019) A LysM Receptor Heteromer Mediates Perception of Arbuscular Mycorrhizal Symbiotic Signal in Rice. *Molecular Plant* 12:1561-1576
- [38] HYDE Kevin D. (2022). The numbers of fungi. *Fungal Diversity* 114:1
- [39] IVANOV Sergey, Jotham AUSTIN, Howard R. BERG *et al.* (2019) Extensive membrane systems at the host-arbuscular mycorrhizal fungus interface. *Nat. Plants.* 5:194-203
- [40] JIANG Yina, Wanxiao WANG, Qiujin XIE *et al.* LIU L., WANG D., ZHANG X, YANG C., CHEN X., TANG D., WANG E. Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science.* 2017 Jun 16;356(6343):1172-1175. doi: 10.1126/science.aam9970. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28596307.
- [41] KAMEOKA Hiromu, Ippo TSUTSUI, Katsuharu SAITO *et al.* (2019). Stimulation of asymbiotic sporulation in arbuscular mycorrhizal fungi by fatty acids. *Nat. Microbiol.* 4:1654-1660
- [42] KOKKORIS Vasilis, Pierre-Luc CHAGNON, Gokalp YILDIRIR *et al.* (2021). Host identity influences nuclear dynamics in arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Biology* 31:1531-1538
- [43] LANFRANCO Luisa, Paola BONFANTE P. (2023). Lessons from arbuscular mycorrhizal fungal genomes. *Current Opinion in Microbiology* 2023, 75:102357 <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102357>
- [44] LANFRANCO Luisa, Paola BONFANTE, Andrea GENRE (2016). The mutualistic interaction between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiology Spectrum.* 4:1-20
- [45] LI, Huchen, Yueyang GE, Zhiyong ZHANG *et al.* (2024). Arbuscular mycorrhizal conserved genes are recruited for ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 242: 1860-1864. <https://doi.org/10.1111/nph.19657>
- [46] LUGINBUEHL Leonie H., Giles E. OLDROYD (2017). Understanding the arbuscule at the heart of endomycorrhizal symbioses in plants. *Curr. Biol.* 27:R952-R963
- [47] MAILLET Fabienne, Verena POINSOT, Olivier ANDRÉ *et al.* (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469:58-63
- [48] MALAR Mathu C., Yan WANG, Jason STAJICH *et al.* (2022). Early branching arbuscular mycorrhizal fungus *Paraglomus occultum* carries a small and repeat-poor genome compared to relatives in the Glomeromycotina. *Microbial Genomics* 8:000810
- [49] MANLEY Bethan F, Jaruwatana S. LOTHARUKPONG, Josué BARRERA-REDONDO *et al.* (2023). A highly contiguous genome assembly reveals sources of genomic novelty in the symbiotic fungus *Rhizophagus irregularis*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 13, jkad077, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkad077>
- [50] MATHIEU Stefanie, Loic CUSANT *et al.* (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi: intraspecific diversity and pangenesomes. *New Phytol* <https://doi.org/10.1111/nph.15275>
- [51] MIYATA Kana, Toshinori KOZAKI, Yusuke KOUZAI *et al.* (2014). The bifunctional plant receptor, Os CERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant and Cell Physiology* 55: 1864-1872
- [52] MORIN Emmanuelle S., Shingo MIYAUCHI, Helene SAN CLEMENTE *et al.* (2019) Comparative genomics of *Rhizophagus irregularis*, *R. cerebriforme*, *R. diaphanus* and *Gigaspora rosea* highlights specific genetic features in Glomeromycotina. *New Phytol* 222:1584-1598
- [53] OLDROYD Giles ED (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Rev Microbiol* 11:252-263
- [54] OLDROYD Giles ED, Leye OTTOLINE (2020) A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science* 368, DOI: 10.1126/science.aba0196
- [55] ÖZÇAM, M., LYNCH, S.V. The gut-airway microbiome axis in health and respiratory diseases. *Nat Rev Microbiol* 22, 492-506 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01048-8>
- [56] PARNISKE Martin (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol.* 6(10):763-75. doi: 10.1038/nrmicro1987. PMID: 18794914.
- [57] RADHAKRISHNAN Guru V., Jean KELLER, Melanie K. RICH *et al.* (2020). An ancestral signalling pathway is conserved in intracellular symbioses-forming plant lineages. *Nature Plants* 6: 280-289.
- [58] REMY Winfried, Thomas TAYLOR, Hagen HASS, Hand KERP (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(25):11841-11843
- [59] ROPARS Jeanne, Kinga S. TORO, Jessica NOEL *et al.* (2016). Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nat Microbiol.* 1:16033
- [60] RUYTER-SPIRA Carolien, Salim AL-BABILI, Sander VAN DER KROL *et al.* (2013). The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci* 18:72-83
- [61] SALVIOLI, Alessandra, Stefano GHIGNONE, Mara NOVERO *et al.* Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *ISME J* 10, 130-144 (2016). <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.91>
- [62] SCHÜßLER Arthur (2012). The *Geosiphon-Nostoc* Endosymbiosis and Its Role as a Model for Arbuscular Mycorrhiza Research. In: Hock B (ed) *Fungal Associations. The Mycota*, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 77-91
- [63] SERRANO Karen, Margaret BEZRUTCZYK, M., Danielle GOUDEAU *et al.* Spatial co-transcriptomics reveals discrete stages of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nat. Plants* 10, 673-688 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41477-024-01666-3>
- [64] SPATAFORA Joseph W., Ying CHANG, Gerald L. BENNY *et al.* (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* 108:1028-1046.
- [65] SPANU Pietro D. (2012). The Genomics of Obligate (and Nonobligate) Biotrophs. *Annual Review of Phytopathology*, 50:91-109 <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173024>
- [66] SPERSCHNEIDER Jana, Gopalk YILDIRIR *et al.* (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi heterokaryons have two nuclear populations with distinct roles in host-plant interactions. *Nat Microbiol* 8, 2142-2153. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01495-8>
- [67] STRULLU-DERRIEN Christine, Marc-Andre SELOSSE MA, Paul KENRICK P, Francis MARTIN (2018). The origin and evolution

- of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytol.* 220(4):1012-1030. doi: 10.1111/nph.15076.
- [68] SUGIURA Yuta, Rei AKIYAMA, Sachiko TANAKA *et al.* (2020). Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117:25779-25788
- [69] TEDERSOO Leho, Santiago SÁNCHEZ-RAMÍREZ, Urmas KÖLJALG *et al.* (2018). High-level classification of the *Fungi* and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity* 90:135-159
- [70] TISSERANT Emilie, Mathilde MALBREIL M., Alan KUO A. *et al.* (2013). Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110:20117-20122
- [71] UEHLING Jessica K., Alessandra SALVIOLI *et al.* 2023 Bacterial endosymbionts of Mucoromycota fungi: Diversity and function of their interactions S.P. TIMOTHY James (Ed.), *The Mycota*, Springer Nature (2023)
- [72] VAN DER HEIJDEN Marcel, John KLIRONOMOS *et al.* (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72
- [73] VENICE Francesco, Alessandro DESIRÒ A *et al.* (2020a) The Mosaic Architecture of NRPS-PKS in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita* Shows a Domain With Bacterial Signature. *Frontiers in Microbiology* 11:581313
- [74] VENICE Francesco, Stefano GHIGNONE, Alessandra SALVIOLI *et al.* (2020b) At the nexus of three kingdoms: the genome of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* provides insights into plant, endobacterial and fungal interactions. *Environ Microbiol* 22:122-141
- [75] WANG Bin, YEUN Li Huey *et al.* 2010. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytol* 186: 514-525
- [76] WILSON Edward O. (2016). We must keep every scrap of nature in and around our cities. Nature holds the key to our aesthetic, intellectual, cognitive and even spiritual satisfaction. *Landscapes* 18: 26-35.
- [77] XIE Xianan, Wenzhen LAI *et al.* (2022). A SPX domain-containing phosphate transporter from *Rhizophagus irregularis* handles phosphate homeostasis at symbiotic interface of arbuscular mycorrhizas. *New Phytol*, 234:650-671
- [78] YILDIRIR Gokalp, Jana SPERSCHNEIDER *et al.* (2022). Long reads and Hi-C sequencing illuminate the two-compartment genome of the model arbuscular mycorrhizal symbiont *Rhizophagus irregularis* *New Phytol* 2022 233 3 1097-1107 doi: 10.1111/nph.17842
- [79] ZHANG Chi, Jiangman HE *et al.* (2021). Discriminating symbiosis and immunity signals by receptor competition in rice. *Proc Nat Acad Sci USA* 118: e2023738118