

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE



**DiSIT-Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica
Dottorato di ricerca in Scienze Ambientali (Acque interne e agroecosistemi)
XXVII Ciclo**

Interazioni tra piante e endofiti fungini: effetti di PGP-HSF e di nuovi isolati su organismi modello

Tutor:

Prof. Graziella Berta

Prof. Guido Lingua

Ph.D. Student:

Dott. Francesco Dovana

Coordinatore:

Prof. Giorgio Malacarne

Indice

Primo capitolo	3
Introduzione	3
Materiali e metodi.....	7
1. Isolamento dei funghi endofiti	7
2. Identificazione molecolare	8
2.1. Estrazione del DNA	8
2.2. Identificazione dei campioni e realizzazione dei un albero filogenetico che evidenzi le relazioni tra i diversi isolati.....	10
3. Semina di <i>Arabidopsis thaliana</i> e inoculo degli endofiti	11
3.1. Protocollo per la semina di <i>Arabidopsis</i> e l'inoculo degli isolati fungini	11
3.2. Analisi dei pesi freschi e pesi secchi	14
3.3. Analisi dell'apparato radicale	14
4. Quantificazione dell'acido indol-3-acetico (IAA) nei filtrati colturali dei funghi studiati.....	16
5. Analisi statistica	17
Risultati.....	17
1. Identificazione molecolare degli endofiti isolati da <i>M. aquatica</i>	17
2. Effetto sulle biomasse	21
3. Relazioni tra le biomasse nei due differenti esperimenti.....	27
4. Area radicale, profondità radicale e IDR.	29
5. Relazioni tra parametri radicali e biomasse	35
6. Effetto di dieci funghi endofiti sull'architettura radicale	38
7. Confronto tra i due precedenti metodi di analisi radicale.	41
8. Concentrazione di IAA dei filtrati colturali.	42
Discussione	43
Bibliografia.....	53
Secondo capitolo	60
Introduzione	60
Materiali e metodi.....	64
1. Identificazione molecolare	64

2. Sterilizzazione dei semi di basilico nella prova di germinazione e nei microbox....	64
3. Coltivazione di PGP-HSF in coltura liquida	65
4. Prova di germinazione condotta su basilico.....	65
5. Coltivazione del basilico inoculato con PGP-HSF in microbox.....	65
6. Coltura in vitro delle piante di basilico.....	67
7. Analisi radicale condotta su piante di basilico coltivate in microbox.....	70
8. Analisi microscopiche per valutare le interazioni pianta fungo	70
9. Analisi statistica.....	72
Risultati.....	72
1. Inquadramento sistematico del fungo PGP-HSF e risultati delle analisi molecolari	72
2. Prove di germinazione.....	75
3. Effetto sull'apparato radicale delle piante di basilico in microbox	76
4. Analisi microscopiche condotte sulle piante in microbox.....	79
5. Effetto sullo sviluppo delle biomasse in vitro di due cultivar di basilico in tubi.	80
7. Effetto sullo sviluppo di basilico "italiko" in capsule quadrate	84
Discussione	86
Bibliografia.....	93
Articoli allegati:.....	96

Primo capitolo

Introduzione

Le piante, organismi caratterizzati da grande plasticità dello sviluppo ed adattabili a diverse condizioni ambientali, interagiscono con numerosi microrganismi che ne influenzano la loro crescita e la loro capacità di adattamento all'ambiente (Vandenkoornhuysen et al., 2015). Tra questi microrganismi vi sono i funghi endofiti, in grado di colonizzare la maggior parte delle specie incluse nel regno Plantae (Rodriguez et al. 2009). Sebbene con il termine endofita De Bary nell'ottocento (De Bary, 1866) considerasse "ogni organismo presente nei tessuti delle piante", attualmente questo termine ha subito una notevole evoluzione (Hyde and Soyong, 2008). Una delle definizioni più comuni è quella proposta da Petrini (1991), secondo cui gli endofiti sono "*Tutti gli organismi abitanti gli organi della pianta che in un dato momento della loro vita riescono a colonizzare i tessuti interni della pianta senza causare danni evidenti all'ospite*", anche se la letteratura propone diverse alternative. Sebbene queste definizioni possano includere nell'accezione più generale anche i funghi micorrizici, questi ultimi vengono esclusi a causa della loro differente "ecologia" (Hyde and Soyong, 2008). Malgrado questa distinzione, alcuni funghi possono assumere entrambi i comportamenti, come *Cenococcum geophilum*, in grado di comportarsi sia da endofita fogliare sia da fungo micorrizico (Arnold, 2007).

Tradizionalmente i funghi endofiti *sensu stricto* vengono suddivisi in due categorie: endofiti clavicipitacei (C-endophytes), o di Classe 1, che colonizzano la famiglia delle Poaceae e nonclavicipitacei (NC-endophytes) in grado di instaurare simbiosi con la

maggior parte delle piante, dalle felci alle Angiosperme alle Gimnosperme. I primi sono costituiti da un gruppo di specie affini da un punto di vista filogenetico, difficili da coltivare in laboratorio e in grado di colonizzare la parte epigea della pianta dove possono causare infezioni sistemiche (Bischoff & White, 2005). I secondi, rappresentano un gruppo molto numeroso, polifiletico, le cui specie appartengono principalmente alla divisione Ascomycota, e il cui ruolo ecologico non è ancora stato chiarito completamente.

Gli endofiti nonclavicipitacei vengono divisi in ulteriori tre classi. Le specie, appartenenti alla Classe 2 sono in grado di colonizzare: radici, fusti, rizomi e semi, e proprio grazie a questo sono in grado di diffondersi anche in modo verticale attraverso i semi, come gli endofiti clavicipitacei. Gli endofiti di Classe 3 colonizzano unicamente la parte epigea mentre gli endofiti di Classe 4 si sviluppano nelle radici (Rodriguez et al. 2009).

Molti studi sono stati condotti sull'interazione tra piante terrestri e funghi, sia micorrizici che endofiti non micorrizici, mentre molti meno lavori sono stati condotti su piante acquatiche o che vivono in ambiente di parziale sommersione (Sandberg et al., 2014). Nel presente studio, sono stati isolati funghi endofiti da menta acquatica (*Mentha aquatica* L.), pianta conosciuta per le sue capacità di fitodepurare le acque contaminate dai metalli pesanti e che ha la capacità di adattarsi a diverse condizioni di disponibilità idrica, di ossigeno nel terreno e contenuto di metalli pesanti; per queste ragioni è stata studiata nei monitoraggi degli ecosistemi delle aree umide (Branković et al., 2012). Questa attitudine alla fitodepurazione di *M. aquatica* è garantita da un

appartato radicale molto sviluppato in grado di rilasciare nella rizosfera sostanze capaci di inibire lo sviluppo di batteri coliformi fecali (Avelar et al., 2014). Inoltre *M. aquatica* tollera condizioni di asciutta prolungata, tipiche delle zone umide allagate solo stagionalmente (Hamann et al., 2013).

La presenza di funghi endofiti in altre specie di *Mentha* è stata precedentemente documentata (Mucciarelli et al., 2003; Zubeck and Błaszowski, 2009), ma attualmente non esistono lavori che riportino funghi endofiti in *M. aquatica*. Oltre a fornire un contributo sulla biodiversità di specie fungine associate a questa specie, è d'interesse isolare endofiti da *M. aquatica* allo scopo di testarne gli effetti sulla medesima e altre specie, con l'aspettativa di trovare funghi, facilmente coltivabili, in grado di promuovere lo sviluppo vegetativo dell'ospite. Proprio la facilità e la velocità di coltivazione di molti funghi endofiti li può rendere un'alternativa ai funghi AM, che per essere propagati richiedono tempi maggiori e la presenza della specie vegetale associata.

La disponibilità di endofiti adattati ad ambienti sommersi potrebbe rappresentare una risorsa nel campo della fitodepurazione, ove, essi potrebbero esplicitare effetti benefici sullo sviluppo delle piante e magari incrementarne il potere "depurante".

Per testare l'effetto dei diversi isolati, si è scelta la coltura *in vitro* per meglio monitorare gli effetti sulle piante in condizione gnotobiotiche, evitando di sommare l'effetto dell'isolato studiato a quello di altri microorganismi e per potere analizzare al meglio lo sviluppo radicale grazie alla trasparenza del mezzo di coltura. A causa delle scarse conoscenze sullo sviluppo della *M. aquatica in vitro*, e della sua lentezza di crescita, si

è scelto di testare l'effetto dei funghi endofiti su *Arabidopsis thaliana*. Tale scelta è stata influenzata da diverse considerazioni: *A. thaliana* è una specie modello ben conosciuta sia da un punto di vista morfologico sia fisiologico; è una pianta dal ciclo vegetativo molto breve e facilmente coltivabile; si presta alla coltura *in vitro*; è una specie ampiamente colonizzata da una grande varietà di specie endofitiche non micorriziche in grado di modificarne la crescita (Peskan-Berghofer et al. 2004, Contreras-Cornejo et al., 2009; Salas-Marina et al., 2011; Martinuz et al., 2015); è stata precedentemente usata per saggiare gli effetti di funghi endofiti sullo sviluppo vegetativo (Mandyam and Jumpponen, 2015; Contreras-Cornejo et al., 2015; Sherameti et al., 2008). Inoltre, almeno nel caso di DSE, gli effetti indotti dai funghi su *A. thaliana* erano paragonabili a quelli indotti sulla specie ospite originaria (Mandyam and Jumpponen, 2015).

Gli scopi di questo lavoro erano: descrivere parte della bio-diversità degli endofiti presenti in *M. aquatica*; valutare eventuali effetti sullo sviluppo di piante di *Arabidopsis* usate come sistema modello, indotti dalla presenza dei funghi; valutare se le modificazioni indotte dai funghi sull'apparato radicale (sviluppo complessivo e profondità radicale) siano un parametro correlato alle biomasse ottenibili in un sistema *in vitro*; valutare se gli endofiti isolati dall'apparato radicale siano maggiormente in grado di influenzare lo sviluppo dell'apparato radicale rispetto a quelli isolati dai fusti; comparare l'effetto complessivo indotto dagli endofiti isolati rispetto ai controlli.

Materiali e metodi

1. Isolamento dei funghi endofiti

Venti piante di *M. aquatica* sono state raccolte in un corso d'acqua naturale, a lento scorrimento e fondale melmoso, situato al bordo di un bosco di salici presso la località Moiola sita nel comune di Demonte (CN) in Valle Stura di Demonte ad una quota di 680 m s.l.m.. La raccolta delle piante, non trattandosi di specie protette, non ha richiesto alcuna forma di autorizzazione. Una volta giunti in laboratorio, dopo aver lavato le piante, i fusti sono stati separati dalle radici e privati dalle foglie.

Sia i fusti che le radici sono stati tagliati in segmenti di circa 4-5 cm e successivamente rilavati in acqua corrente per circa due ore e successivamente incubati per 1 h in una soluzione acquosa al 4% (v/v) di PPM™.

Il processo di sterilizzazione della superficie dei fusti e delle radici è stato condotto secondo due modalità diverse. I segmenti di fusto sono stati trattati con etanolo al 70% per 90s, poi con una soluzione di candeggina commerciale al 40% e Tween 20 allo 0.01% per 5 min e successivamente lavati con H₂O sterile. Le radici sono state immerse in etanolo al 95% per 30 s, poi in una soluzione di candeggina al 6% e Tween 20 allo 0.01% per 10 min e successivamente lavate in H₂O sterile.

Le porzioni di fusto e radice, sono state ulteriormente tagliate in porzioni di circa 1 cm di lunghezza e poi incubate, alla temperatura di 23±1°C, in capsule Petri contenenti Malt Extract Agar (MEA).

Malt Extract Agar (MEA). Dosi per preparare un litro di soluzione.

- Estratto di malto 20 g

- Peptone 2 g
- Glucosio 20 g
- Agar 20 g
- Acqua distillata fino al volume di 1 L

Dopo circa una settimana di incubazione a 20°C costanti si è iniziato l'isolamento dei funghi che si sviluppavano in prossimità delle porzioni vegetali precedentemente sterilizzate.

Gli isolati sono stati mantenuti in coltura pura con subcolture a cadenza mensile con verifica della sterilità, al fine anche di disporre di colture giovani da impiegarsi per l'allestimento degli inoculi delle piante e delle colture in liquido.

Inoltre è stata effettuata la coltura su mezzo MEA in tubi di vetro da batteriologia per allestire colture di riserva a lungo termine, mantenute in celle climatiche alla temperatura di 20 °C.

I funghi in crescita sul terreno di coltura, sono stati preliminarmente raggruppati su base morfologica utilizzando lo stereomicroscopio.

2. Identificazione molecolare

2.1.Estrazione del DNA

Il micelio fungino è stato prelevato con un bisturi sterile da coltura pura cresciuta su MEA per circa due settimane, al buio e ad una temperatura di circa 25°C. Dopo essere stato trattato in azoto liquido (N₂), il campione è stato frantumato attraverso un mortaio e un pestello. L'estrazione del DNA è avvenuta usando il Kit "Qiagen Mini Kit",

seguendo le indicazioni del produttore.

2.1.1. Amplificazione e sequenziamento

L'amplificazione delle regioni ITS1-5.8s-ITS2 è avvenuta utilizzando i *primer* ITS1f/ITS1 (Gardes e Bruns, 1993) e ITS4 (White et al., 1990) riportati in Tab.1.

Tab.1. Primer utilizzati per amplificare la regione ITS1-5.8s-ITS2

Nome <i>primer</i>	Sequenza nucleotidica 5'-3'
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS1f	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Il DNA è stato amplificato per mezzo di un termociclatore Biometra T Personal48 e l'amplificazione è stata confermata con una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% in tampone TAE (1%). I cicli di amplificazione per ogni coppia di primer sono riportati in Tab .2.

Tab.2. Cicli di amplificazione per sequenza ITS1-5.8s-ITS2

Coppie <i>primer</i> /fasi ciclo	ITS1/ITS4	ITS1f/ITS4
denaturazione iniziale	94°C 5min	94°C 5min
ripetizioni ciclo	40	40
denaturazione iniziale	94°C 40 sec	94°C 15 sec
<i>annealing</i>	55°C 45 sec	53°C 30 sec
estensione	72°C 90 sec	72°C 90 sec
estensione finale	72°C 07 min	72°C 10 min

Il prodotto PCR è stato purificato e sequenziato da MacroGen Inc. (Amsterdam, Europe) utilizzando i *primer* utilizzati in PCR.

I cromatogrammi relativi alle sequenze complementari sequenziate, sono stati assemblati con il software Geneious v. 8.1.2 (Kearse et al. 2012). La sequenza complementare "reverse" è stata convertita in sequenza complementare e successivamente allineata con quella "forward". Da questo allineamento si è originata una sequenza di consenso che è stata aggiustata manualmente eliminando incongruenze e gli estremi delle sequenze di bassa qualità a causa dell'effetto "overload".

2.2. Identificazione dei campioni e realizzazione di un albero filogenetico che evidenzia le relazioni tra i diversi isolati

Le sequenze consenso così ottenute sono state utilizzate per i confronti con altre sequenze (BLAST) e poi sottomesse in GenBank sotto il numero di accessione riportato in Tab.3a.

Partendo dall'analisi condotta su Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) per la ricerca delle sequenze omologhe, si è provveduto a comparare le sequenze ottenute con quelle maggiormente simili.

Per la realizzazione dell'albero filogenetico, gli allineamenti sono stati condotti con MAFFT v 7.017 (Katoh et al. 2002) utilizzando i parametri di default. L'analisi filogenetica Bayesiana è stata condotta con MRBAYES v. 3.2.4 (Huelsenbeck & Ronquist 2003). Nel presente studio l'identità maggiore uguale al 98% delle regioni ITS1-5.8s-ITS2 è stata ritenuta sufficiente per l'identificazione su base molecolare.

3. Semina di *Arabidopsis thaliana* e inoculo degli endofiti

3.1. Protocollo per la semina di *Arabidopsis* e l'inoculo degli isolati fungini

Sono state allestite colture in vitro di *A. thaliana* var. Col-0 al fine di procedere con gli inoculi fungini. Il terreno utilizzato per l'esperimento è stato il "Murashige e Skoog" (1962) (MS). I macronutrienti sono stati utilizzati ad una concentrazione pari ad 1/5 rispetto alla formulazione originale (Contreras-Cornejo et al., 2009). Il pH del terreno è stato corretto a 5,7 con KOH 1N prima dell'aggiunta dell'agar.

Un litro di terreno MS è stato preparato utilizzando:

- 20 ml di Macronutrienti (stock solution 10 x)
- 10 ml di Micronutrienti (stock solution 100 x)
- 5 ml di Ferro EDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,78 g/100 ml)
- 2 ml di Inositolo (stock solution 5 mg/ml)
- 0,1 ml di Glicina (stock solution 0,2 mg/100 μl)
- 5 g di Saccarosio
- 10 g di Agar
- Acqua distillata fino al volume di 1 L

Le specifiche relative alla semina in sterilità delle piante sono riportate nel protocollo seguente:

- 1) Trasferimento dei semi in provetta eppendorf
- 2) Lavaggio con alcool etilico 70% v/v per 90''
- 3) Risciacquo in H_2O d per 10''
- 4) Lavaggio con soluzione di ipoclorito di sodio 10% v/v +2 μl di tween 20 per 5 min

- 5) Lavaggio con H₂O sterile per 3-4 volte tramite l'utilizzo di pipette Pasteur sterili con zaffo in cotone

Dopo i risciacqui in acqua distillata i semi sono stati depositati sulla superficie del terreno MS, in capsule petri quadrate 120×120×17mm. In ogni piastra sono stati posti 11 semi allineati a circa 1 cm di distanza tra loro e 2,5 cm dal bordo superiore della piastra (Fig.1).

La semina di *Arabidopsis* è stata seguita da un processo di stratificazione fredda, al fine di indurre e sincronizzare la germinazione dei semi, per 72 ore a 4°C al buio. Quindi le piastre sono state trasferite in posizione orizzontale in cella climatica alla temperatura di 23±1°C ed un fotoperiodo di 18/6 ore luce/buio per ulteriori 24 ore fino al completamento della germinazione. L'illuminazione della cella era garantita dal funzionamento di 18 lampade fluorescenti Sylvania Philips GroLux light che garantivano un'intensità luminosa di 150 μmol m⁻² s⁻².

Le plantule di *Arabidopsis*, dopo 4 giorni dalla germinazione sono state inoculate con i ceppi fungini isolati da *M. aquatica* secondo le seguenti procedure:

- 1) Per i funghi che non producono conidi in modo abbondante, sono stati introdotti 2 *plug* di micelio cresciuto su MEA (diametro di 6,7 mm) per piastra a distanza di circa 7 cm dagli apici radicali delle plantule di *Arabidopsis* e a circa 6 cm di distanza tra loro (Figura 1).
- 2) Per gli isolati di *Penicillium*, i conidi sono stati risospesi in acqua distillata sterile e 50 μl di questa sospensione sono stati inoculati con l'ausilio di un micropipettatore

e puntali sterili all'interno di due fori praticati nel substrato nelle stesse posizioni come riportato al punto precedente.



Fig. 1: Disposizione delle piante di *Arabidopsis* e dei rispettivi inoculi fungini su piastra di terreno MS.

Le piastre, dopo essere state sigillate con Parafilm sono state poste nella medesima cella climatica e inclinate di 70 gradi rispetto al piano di appoggio. Le piastre di controllo, sono state inoculate con dischetti di MEA o acqua sterile a seconda dei due metodi. Per ogni endofita e il controllo, sono state allestite otto piastre, di queste, quattro sono state analizzate dopo 14 giorni dall'inoculo e le restanti dopo 21 giorni.

3.2. Analisi dei pesi freschi e pesi secchi

Per ogni trattamento quattro gruppi di tre piante sono state pesate. Dopo la raccolta, le piante sono state asciugate con carta assorbente e private dei residui di agar e subito pesate per ottenere il peso fresco. Per ottenere il peso secco le piante sono state seccate alla temperatura di 60°C e successivamente poste all'interno di un essiccatoio dove prima della pesata sono state raffreddate a temperatura ambiente. La percentuale di sostanza secca (% s.s.) è stata calcolata come rapporto tra il peso fresco e il peso secco moltiplicato per 100.

3.3. Analisi dell'apparato radicale

Ogni capsula è stata scansionata con uno scanner Epson Perfection V300 scanner (EpsonAmerica, USA) a 600 dpi usando Adobe Photoshop software (Adobe Systems, USA). Le immagini, con riferimento micrometrico sono state salvate in formato "tiff". Per le analisi della profondità radicale e sviluppo della superficie radicale sono state considerate 5 aree rettangolari, per trattamento, scelte random della larghezza di 20 mm e una lunghezza che includesse la zona del colletto e l'intero apparato radicale. La profondità radicale (**PR**) è stata calcolata come la differenza tra due punti proiettati su un generico asse verticale, rispettivamente posti nel colletto e all'estremità distale della radice più lunga (Fig.2). L'area radicale (**AR**) è stata calcolata come la superficie in mm² occupata dalla radice nell'area considerata.

Le analisi di immagine sono state condotte con ImageJ 1.48v.

Le analisi sono state condotte dopo 14 giorni e 21 giorni dall'inoculo.

L'indice di Densità Radicale (**IDR**) è stato calcolato come il rapporto tra AR e PR.

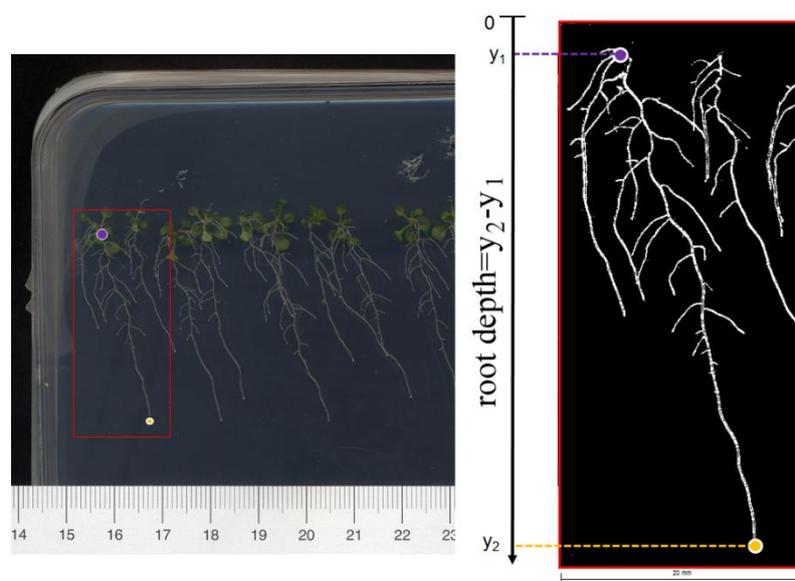


Fig. 2: Esempio di area utilizzata per l'analisi di immagine. Il punto viola è posizionato sul colletto e il punto giallo all'estremità della radice principale più lunga.

Per i dieci isolati che avevano maggiormente influenzato le biomasse fresche e secche nei due esperimenti, è stata condotta una misurazione su sei piante per trattamento, dei seguenti parametri descrittivi dell'architettura radicale:

- 1) Numero di radici laterali (RL) di primo ordine
- 2) Lunghezza della radice primaria (mm)
- 3) Lunghezza totale delle RL della radice primaria (mm): somma della lunghezza delle RL di primo e secondo ordine (mm)
- 4) Lunghezza totale dell'apparato radicale (mm): somma delle lunghezze di tutte le tipologie di radici che compongono il sistema radicale
- 5) Densità assoluta di RL della radice primaria (Root Branching) rapporto tra il numero di RL di primo ordine e la lunghezza totale della radice primaria (mm)
- 6) Lunghezza della radice principale interessata da ramificazioni (mm) BR-zone

4. Quantificazione dell'acido indol-3-acetico (IAA) nei filtrati colturali dei funghi studiati

La concentrazione di acido indol-3-acetico (IAA), prodotta dai funghi è stata determinata sul filtrato della coltura liquida contenente il micelio fungino.

Per ogni fungo e il controllo si sono preparate tre beute contenenti 100 ml di terreno M102 senza l'aggiunta di antibiotico (Bacon et al., 1977). Il pH del terreno è stato corretto ad un valore di 6.0. In ogni beuta, ad eccezione di quelle usate come controllo, si sono aggiunti due plugs contenenti micelio precedentemente coltivato su MEA. Le beute sono state incubate per 10 giorni in agitatore (160 rpm) alla temperatura di $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e controllate dopo 72 ore per evidenziare eventuali contaminazioni. La coltura liquida è stata centrifugata a 2500 rpm per 5 min. per facilitare la sedimentazione del micelio. Il surnatante, separato dal micelio, è stato successivamente filtrato utilizzando carta da filtro. Il micelio, dopo essere stato essiccato in stufa alla temperatura di 60°C per 3 giorni, è stato pesato.

Ad 1 ml di filtrato è stato aggiunto 1ml di reagente di Salkowski (FeCl_3 0.138 M and H_2SO_4 7.9 M) (Glickmann e Dessaux, 1995) e successivamente incubato al buio a temperatura ambiente per 30 minuti. Per ogni campione, è stata determinata l'assorbanza a 530 nm attraverso l'uso di uno spettrofotometro (Beckman DU@530). Le concentrazioni di IAA sono state calcolate dopo avere generato una curva di taratura utilizzando il terreno di coltura M102 e dosi crescenti di IAA (Sigma-Aldrich , St.

Louis, MO). I contenuti di IAA sono stati espresse come $\mu\text{g/ml}$ di IAA su terreno di coltura e come $\mu\text{g/g}$ di IAA su grammi di micelio secco.

5. Analisi statistica

La variabilità dei dati, e la comparazione rispetto al controllo è stata rappresentata con i boxplot usando la funzione “BOXPLOT” in R (version 3.1.2). Le differenze tra i trattamenti e i controlli sono state valutate utilizzando l’analisi ANOVA seguita dal Dunnett test utilizzando il pacchetto “MULTCOMP” in R.

Le differenze sono state considerate significative per livelli di $p < 0.05$.

Per equalizzare le varianze e normalizzare i dati, le biomasse e i parametri dell’architettura radicale, prima di essere analizzati sono stati trasformati in Log10; mentre le percentuali della s.s. sono state precedentemente convertite in arcsin square. Per lo studio di correlazione tra le medie dei diversi parametri considerati sono stati calcolati i valore di R^2 e di p .

Risultati

1. Identificazione molecolare degli endofiti isolati da *M. aquatica*

Diciannove endofiti sono stati caratterizzati su base molecolare. L’analisi della regione ITS (ITS1-5.8s-ITS2) ha evidenziato la presenza di 17 diversi profili genetici e 16 differenti specie. Le sequenza di nove funghi, hanno mostrato un identità del 100% con altre sequenze depositate in GenBank (Tab.3a) e sono corrispondenti alle seguenti specie: *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud (FE), *Cadophora luteoolivacea* (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew (FA, FL), *Cladosporium*

halotolerans Zalar, de Hoog & Gunde-Cim. (FT2), *Colletotrichum destructivum* O'Gara (FL23), *Nemania serpens* (Pers.) Gray (RT6c), *Penicillium resedanum* McLennan & Ducker (RL3), *Penicillium solitum* Westling (RT5a), *Sarocladium strictum* (W. Gams) Summerb (FS) (Tab.3b).

Gli isolati FA e FL, appartenenti alla specie *Cadophora luteo-olivacea*, e RT10 e RT14 appartenenti alla stessa specie inclusa nel subphyla Mucoromycotina, ma di impossibile identificazione a livello specifico sulla base delle sequenza ITS, si sono caratterizzati per lo stesso profilo genetico, mentre i due isolati RT6c e RT9, appartenenti alla specie *Nemania serpens* si sono differenziati per un nucleotide.

Tra le sedici specie isolate, 15 sono state incluse alla Divisione Ascomycota e solo una al subphyla Mucoromycotina.

Il 38% delle specie si posizionavano classe Sordariomycetes, mentre il 31% sono state incluse in Dothideomycetes, il 12% in Eurotiomycetes, il 6% in Leotiomycetes e il 13% attualmente non sono state collocate all'interno di una classe precisa. Considerando le diverse tipologie di espanto, la maggior parte delle specie isolate da fusto, il 62%, sono state incluse nella classe Dothideomycetes mentre il 43% delle specie isolate da radici sono appartenute alla classe Sordariomycetes.

In Fig. 3 è rappresentato un albero filogenetico che evidenziava le relazioni tra i diversi isolati, appartenenti a nove differenti ordini.

Tabella 3a. Codici di accesso ITS riferiti alle specie sequenziate depositate in GenBank e sequenze utilizzate nella comparazione diretta.

Acronimo isolato	BLASTn closest match (Accession No.)	ITS length (query/reference) (Similarità, %)	GenBank Accessions dei funghi
FA	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (GQ214536)	626/626 (100%)	KU141395
FB	<i>Phoma macrostoma</i> (GU237740)	484/485 (99%)	KU141382
FE	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FN868454)	600/600 (100%)	KU141396
FL	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (GQ214536)	607/607 (100%)	KU141394
FL23	<i>Colletotrichum destructivum</i> (JQ005764)	518/518 (100%)	KU141392
FO	Pleosporaceae sp. (KF636768)	554/555 (99%)	KU141381
FT2	<i>Cladosporium halotolerans</i> (LN834365)	549/549 (100%)	KU141393
FT3	Pleosporales sp. (FN548157)	598/600 (99%)	KU141380
FS	<i>Sarocladium strictum</i> (KC311519)	553/553 (100%)	KU141379
RL3	<i>Penicillium resedanum</i> (JN689345)	580/580 (100%)	KU141384
RL6	Fungal sp. (HM123626)	572/648 (88%)	KU141390
RT5a	<i>Penicillium solitum</i> (JN642222)	547/547 (100%)	KU141383
RT5b	<i>Ophiosphaerella narmari</i> (KP690979)	452/495 (91%)	KU141388
RT6c	<i>Nemania serpens</i> (EF155504)	600/600 (100%)	KU141386
RT9	<i>Nemania serpens</i> (EF155504)	602/603 (99%)	KU141385
RT9b	<i>Chaetomium funicola</i> (EU552109)	545/555 (98%)	KU141378
RT10	Mucoromycotina sp. (HQ406814)	372/408 (91%)	KU141387
RT13	<i>Cercophora coprophila</i> (AY999136)	489/528 (93%)	KU141391
RT14	Mucoromycotina sp. (HQ406814)	372/408 (91%)	KU141389

Tabella:3b. Elenco delle specie isolate da *M. aquatica*.

Acronimo isolato	Identificazione proposta	Classe	divisione
FA	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew	Leotiomycetes	Ascomycota
FB	<i>Phoma macrostoma</i> Mont.	Dothideomycetes	Ascomycota
FE	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud	Dothideomycetes	Ascomycota
FL	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew	Leotiomycetes	Ascomycota
FL23	<i>Colletotrichum destructivum</i> O'Gara	Sordariomycetes	Ascomycota
FO	Pleosporaceae	Dothideomycetes	Ascomycota
FT2	<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.	Dothideomycetes	Ascomycota
FT3	Pleosporales	Dothideomycetes	Ascomycota
FS	<i>Sarocladium strictum</i> (W. Gams) Summerb.	Sordariomycetes	Ascomycota
RL3	<i>Penicillium resedanum</i> McLennan & Ducker	Eurotiomycetes	Ascomycota
RL6	Ascomycota	-	Ascomycota
RT5a	<i>Penicillium solitum</i> Westling	Eurotiomycetes	Ascomycota
RT5b	Pleosporales	Dothideomycetes	Ascomycota
RT6c	<i>Nemania serpens</i> (Pers.) Gray	Sordariomycetes	Ascomycota
RT9	<i>Nemania serpens</i> (Pers.) Gray	Sordariomycetes	Ascomycota
RT9b	<i>Chaetomium sp.</i>	Sordariomycetes	Ascomycota
RT10	Mucoromycotina		Mucoromycotina (subphylum)
RT13	Sordariomycetes	Sordariomycetes	Ascomycota
RT14	Mucoromycotina		Mucoromycotina (subphylum)

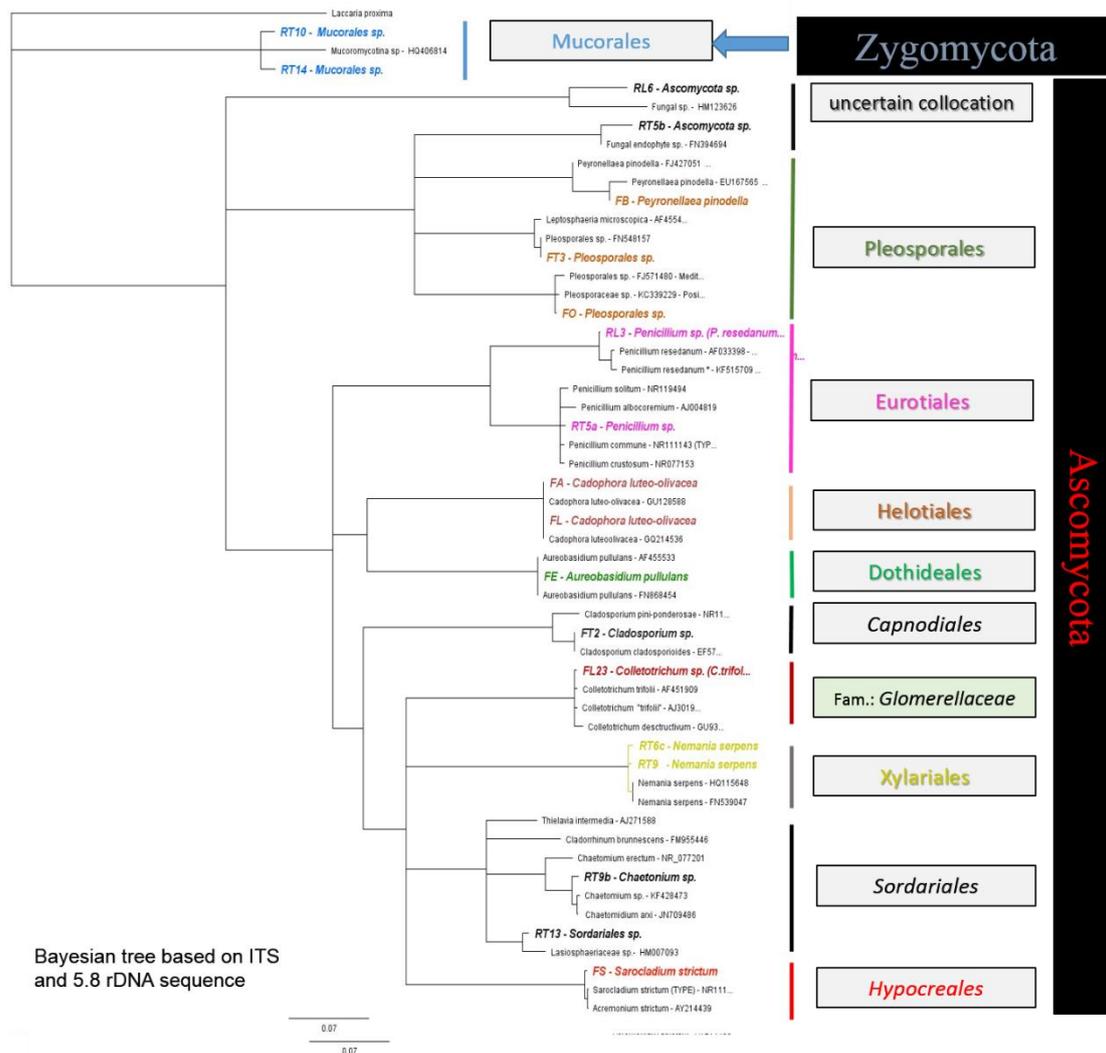


Fig. 3: Relazioni tra le diverse specie isolate; albero bayesiano basato sull'analisi delle sequenza ITS.

2. Effetto sulle biomasse

Gli isolati fungini hanno influenzato sia lo sviluppo delle biomasse fresche sia secche in entrambi i tempi (Fig.4-5).

2.1. Effetto sulle biomasse e sul contenuto di sostanza secca dopo 14 giorni dall'inoculo

Dopo 14 gg di crescita, 2 isolati, FS e RT6c, hanno incrementato le biomasse fresche rispettivamente del 31% e del 21% rispetto al controllo; mentre 6 isolati, RT5a, FE, RL3, FL, FO, FT2, hanno ridotto le biomasse fresche rispettivamente del 67%, 48%,

41%, 35%, 31% e 29% (Fig. 4-a).

I due isolati RT10 e RT14 (Mucoromycotina), non hanno influenzato le biomasse fresche; mentre per *Cadophora luteo-olivacea*, FL ha ridotto il peso fresco mentre FA non ha esercitato alcun effetto; l'isolato RT6c di *Nemania serpens* ha incrementato la biomassa fresca mentre RT9 ha ridotto la biomassa media ma in modo non significativo.

Cinque isolati, RT6c, RT5b, FB, FS e FL23, hanno influenzato in modo positivo i pesi secchi dopo 14 gg rispettivamente del 55%, 48%, 48%, 46% e 45% (Fig. 5-a). L'isolato RT5a è stato l'unico a ridurre la biomassa secca media delle piante di circa il 60%.

Solo FS-*Acremonium strictum* e RT6c-*Nemania serpens* hanno influenzato in modo significativo sia biomassa fresca che secca.

Sia gli isolati RT10 e RT14 (Mucoromycotina), che FA e FL di *C. luteo-olivacea* non hanno influenzato le biomasse secche; considerando i due isolati di *N. serpens*, mentre RT6c ha indotto il maggior incremento percentuale, l'isolato RT9 ha indotto un incremento prossimo al 9% non significativo.

Tutti i funghi hanno influenzato in modo positivo i valori medi della percentuali di sostanza secca, tra questi, otto isolati, RL6, RT10, FT3, FO, FT2, FL, RL3, FE ne hanno incrementato i valori rispettivamente del 25%, 34%, 37%, 34%, 52%, 82%, 83% e 84% in modo significativo (Fig. 6).

I due isolati, FS e RT6c, che hanno incrementato sia biomassa fresca che secca non hanno influenzato in modo significativo il contenuto di sostanza secca.

Considerando gli isolati Mucoromycotina e quelli di *C. luteo-olivacea* solo uno dei due per specie ha influenzato positivamente i valori di sostanza secca.

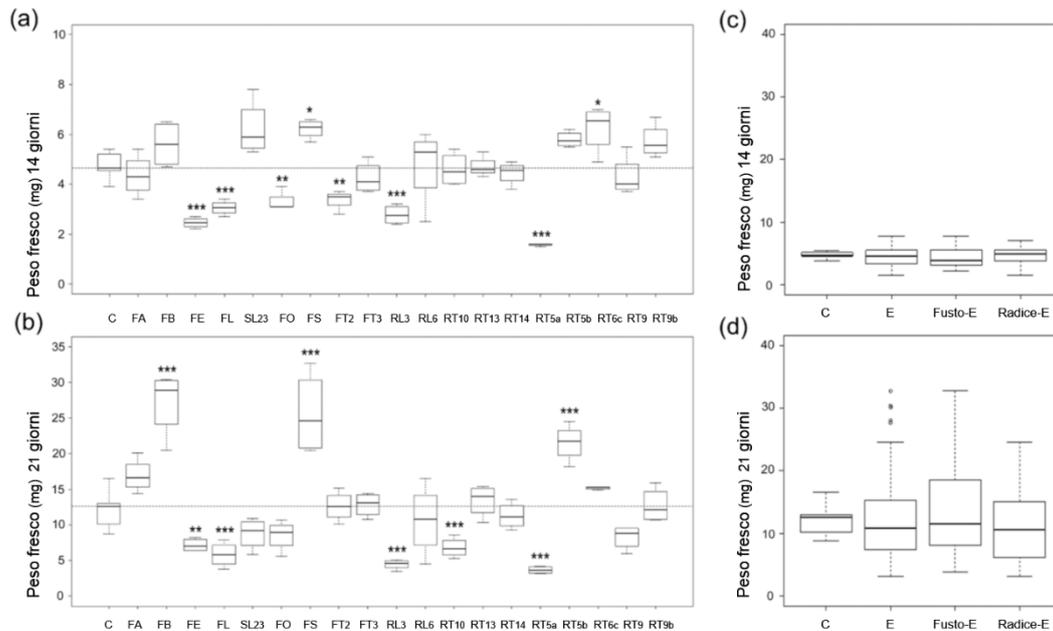


Fig. 4: Effetto degli endofiti sui pesi freschi delle piante. (a, b) Boxplots che illustrano la variabilità dei pesi freschi delle piante di *Arabidopsis* trattate con gli endofiti e delle piante usate come controllo, dopo 14 giorni (a) e dopo 21 giorni (b) dall'inoculo. La linea orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli. Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi secondo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Boxplots dei dati aggregati dei controlli (C), tutti gli endofiti (E), endofiti isolati da fusto (Fusto-E), endofiti isolati da radice (Radice-E); rispettivamente dopo 14 giorni (c) dall'inoculo e dopo 21 giorni (d).

2.2. Effetto sulle biomasse e sul contenuto di sostanza secca dopo 21 giorni dall'inoculo

I tre isolati FB, FS e RT5b hanno incrementato le biomasse fresche medie rispettivamente del 124%, 111% e 77%; diversamente i 5 isolati, RT5a, RL3, FL, RT10 e FE, hanno ridotto le biomasse rispettivamente del 70%, 63%, 52%, 44% e 40% (Fig. 4a).

Tra gli isolati appartenenti alla stessa specie, solo RT10 (*Mucoromycotina*) ha influenzato le biomasse; nel caso di *C. luteo-olivacea* l'isolato FA, a differenza di FL, aveva fatto registrare un incremento medio del 40%.

Entrambi gli isolati di *N. serpens* non hanno influenzato la biomassa fresca.

Sette isolati, FA, FT2, FS, FL23, FB, RT6c e RT5b, hanno incrementato il contenuto di

sostanza secca rispettivamente del 56%, 77%, 78%, 81%, 84%, 111% e 116%; quattro isolati RT5a, RL3, FL e FO hanno ridotto le biomasse del 64%, 51%, 33% e 26% (Fig. 5).

Entrambi gli isolati RT10 e RT14 non hanno influenzato la biomassa secca; i due isolati di *C. luteo-olivacea* hanno evidenziato comportamenti opposti, mentre solo l'isolato RT6c di *N. serpens* influenzava positivamente il peso secco.

Sei isolati, RL3, FL, RT6c, FT2, RT10 e FL23, hanno incrementato il contenuto di sostanza secca rispettivamente del 33%, 39%, 66%, 75%, 113% e 149%, mentre nessun isolato ne ha ridotto in modo significativo il contenuto (Fig. 6).

Considerando gli isolati di Mucoromycotina, *C. luteo-olivacea* e *N. serpens*, solo uno per specie, RT10, FL e RT6c hanno incrementato il valore di sostanza secca.

I tre isolati che hanno incrementato sia la biomassa fresca che secca, FB, FS e RT5b, non hanno influenzato la percentuale di sostanza secca, confermando i dati precedentemente ottenuti, che gli endofiti promotori delle biomasse, non hanno alterato la percentuale di sostanza secca in modo significativo e di conseguenza l'idratazione delle piante.

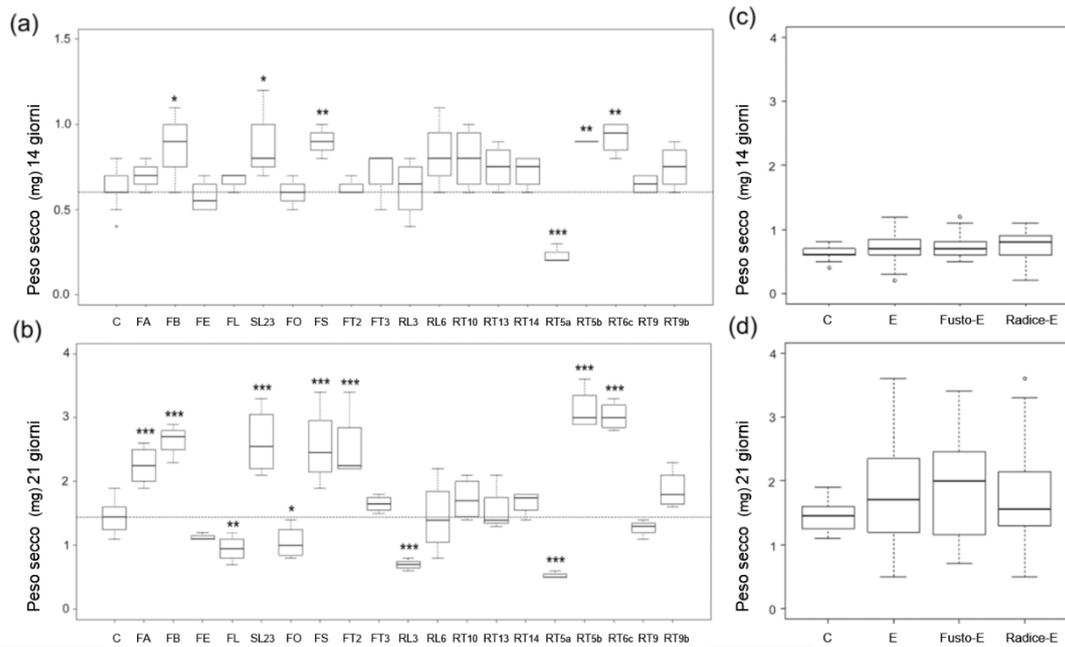


Fig. 5: Effetto degli endofiti sui pesi secchi delle piante. (a, b) Boxplots che illustrano la variabilità dei pesi secchi delle piante di *Arabidopsis* trattate con gli endofiti e delle piante usate come controllo, dopo 14 giorni dall'inoculo (a) e dopo 21 giorni (b). La linea orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli.

Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi seguendo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Boxplots dei dati aggregati dei controlli (C), tutti gli endofiti (E), endofiti isolati da fusto (Fusto-E), endofiti isolati da radice (Radice-E); rispettivamente dopo 14 giorni (c) dall'inoculo e dopo 21 giorni (d).

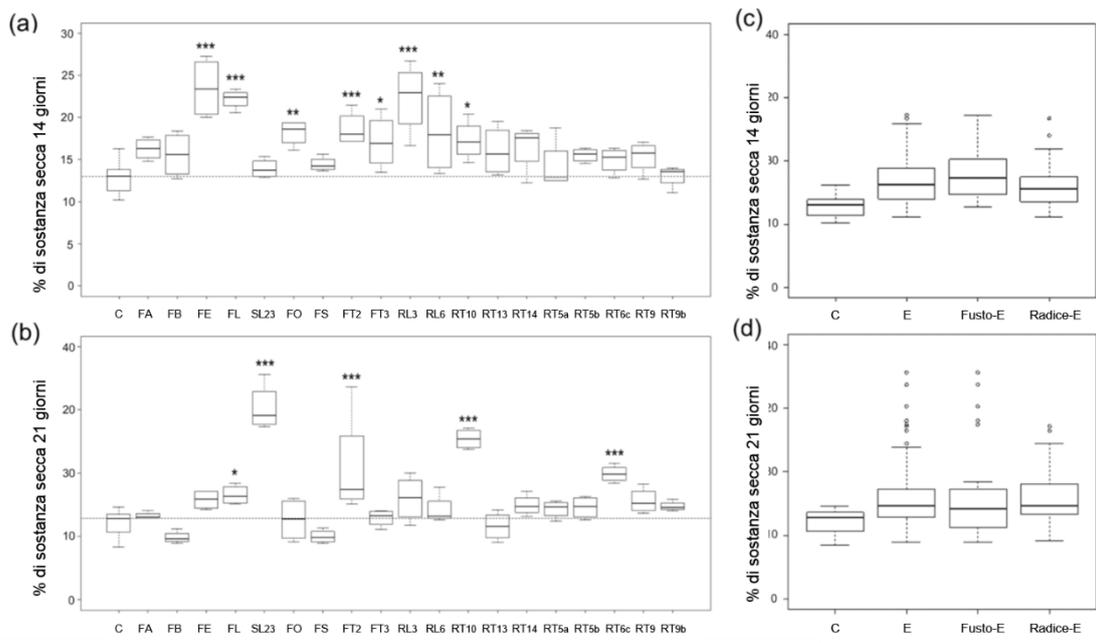


Fig. 6: Effetto degli endofiti sulle percentuali di sostanza secca. (a, b) Boxplots che illustrano la variabilità delle percentuali di s.s. delle piante di *Arabidopsis* trattate con gli endofiti e delle piante usate come controllo, dopo 14 giorni dall'inoculo (a) e dopo 21 giorni (b). La barra orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli.

Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi seguendo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Boxplots dei dati aggregati dei controlli (C), tutti gli endofiti (E), endofiti isolati da fusto (Fusto-E), endofiti isolati da radice (Radice-E); rispettivamente dopo 14 giorni (c) dall'inoculo e dopo 21 giorni (d).

3. Relazioni tra le biomasse nei due differenti esperimenti.

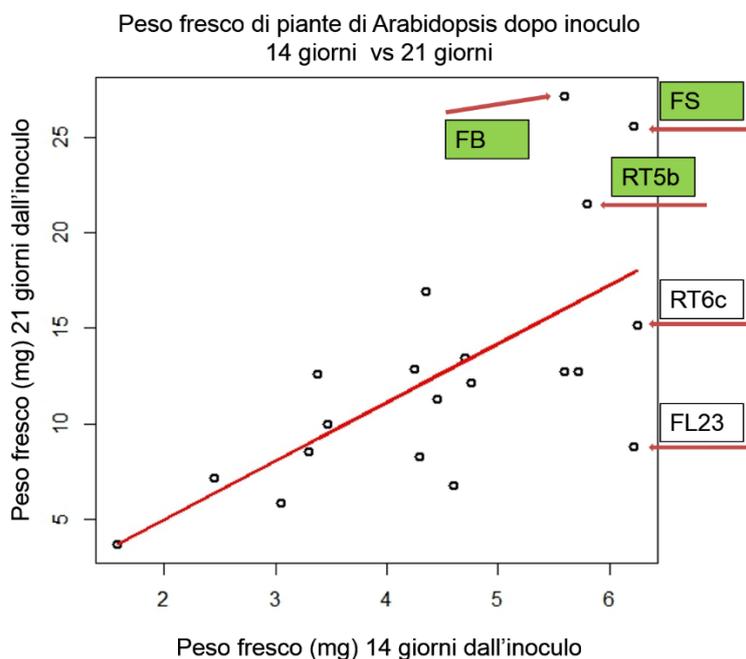


Fig. 7: Scatter Plot delle medie dei pesi freschi delle piante di Arabidopsis dopo 14 giorni e 21 giorni dall'inoculo. $R^2 = 0.428$; p-value: 0.0018. I campioni etichettati in verde corrispondono ad un incremento significativo delle biomasse dopo 21 giorni dall'inoculo.

L'analisi condotta sulla relazione che intercorre tra la media delle biomasse fresche dopo 14 gg rispetto alla media dopo 21 gg ha evidenziato una relazione lineare positiva descritta da un modesto valore di R^2 ($R^2 = 0.428$; $p=0.0018$). Il grafico in Fig. 7 ha evidenziato la modesta relazione che è intercorsa tra i pesi freschi dei due esperimenti considerando i funghi che avevano indotto un maggior sviluppo nel primo tempo.

L'ampia dispersione dei punti sull'asse Y per valori di peso fresco superiori o uguali a 5mg sull'asse X, evidenziava che non esisteva relazione lineare diretta tra la prima e la seconda prova nelle piante che avevano maggiormente influenzato le biomasse. I tre isolati che avevano avuto un maggior effetto positivo sul valore medio delle biomasse fresche dopo 14gg (di cui due, in modo significativo) avevano successivamente

mostrato un comportamento differente e solo uno, FS, aveva avuto un effetto positivo sulle biomasse fresche delle piante; confermando il modesto valore di R^2 .

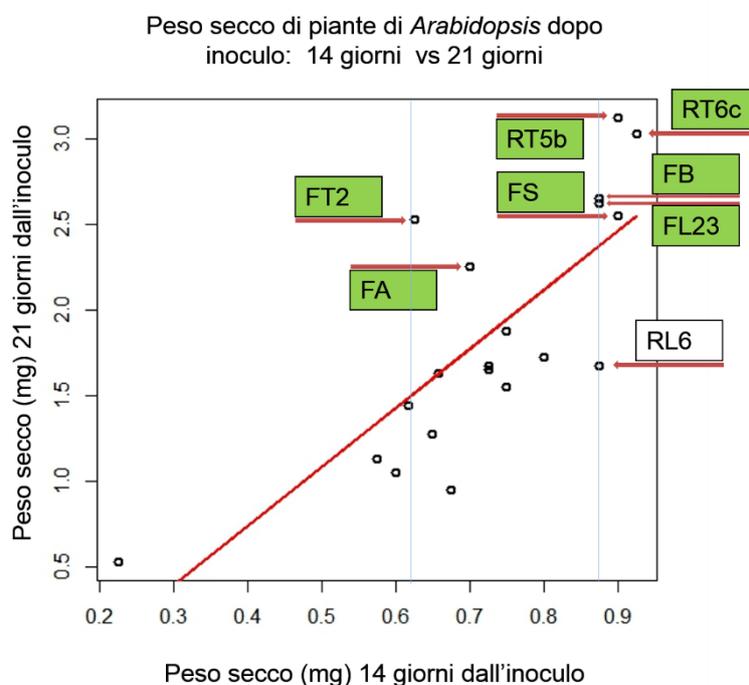


Fig. 8: Scatter Plot delle medie dei pesi secchi delle piante di *Arabidopsis* dopo 14 giorni vs 21 giorni dall'inoculo. $R^2= 0.5776$; p-value: $6.103e-05$.

La relazione che intercorreva tra le medie del peso secco dopo 14 gg vs 21gg, evidenziava una correlazione positiva descritta da un coefficiente R^2 : 0.5776 e un valore di $p < 6.103e-05$. Tale coefficiente risultava maggiore rispetto a quello del peso fresco. Gli isolati FB, FL23, FS, RT5b, RT6c che avevano avuto un effetto positivo sulle biomasse nel primo tempo avevano evidenziato un effetto promotore anche nel periodo temporale più lungo; gli isolati FT2 e FA pur non avendo influenzato il peso secco dopo 14 gg, avevano evidenziato un aumento delle biomasse secche dopo 21gg indicando un incremento di biomassa importante solo nelle ultime fasi di contatto con il fungo.

4. Area radicale, profondità radicale e IDR.

Dopo 14 giorni dall'inoculo, cinque isolati, RT9b, RT6c, RT13, FS, RT9, hanno causato l'incremento della superficie radicale rispettivamente del 37%, 37%, 35%, 33% e 33%; mentre sei isolati, RT5a, RL3, FL, FE, FO, FT2, avevano ridotto rispettivamente le aree del 85%, 73%, 62%, 60%, 54% e 45%. Otto isolati non avevano influito sullo sviluppo radicale (Fig. 9a).

I due isolati *Mucoromycotina*, non avevano influenzato in modo significativo la superficie radicale dopo 14gg, anche se i valori medi avevano evidenziato un maggior sviluppo delle piante trattate con RT14 (incremento del 30% rispetto ai controlli) rispetto a RT10 (incremento del 4%). Nel caso di *C. luteo-olivacea*, l'isolato FL aveva ridotto in modo significativo l'area radicale mentre FA non aveva influenzato questo parametro significativamente, facendo riscontrare un aumento dello sviluppo del 7%. I due isolati di *N. serpens*, RT9 e RT6c, avevano entrambi aumentato significativamente l'area radicale.

Cinque isolati, RT6c, FS, FA, RT13 e FB, dopo 21 giorni dall'inoculo, avevano influenzato positivamente la superficie radicale rispettivamente del 68%, 89%, 90%, 109%, 160%; l'isolato FL23 è stato l'unico a ridurre l'area radicale (riduzione media del 81%). Per gli isolati RL3 (Fig. 10) e RT5a, non è stato possibile eseguire l'analisi della superficie radicale e della profondità a causa della massiva diffusione del fungo, principalmente in forma conidica, che aveva reso impossibile compiere l'analisi.

I due isolati *Mucoromycotina* non avevano influenzato in modo significativo la superficie radicale dopo 21gg, i valori medi, avevano evidenziato un maggior sviluppo delle piante trattate con RT14 (incremento del 38% rispetto ai controlli) rispetto a RT10 (decremento del 47%), evidenziando la tendenza dei due isolati a comportarsi in modo diverso, come

precedentemente indicato dalla risposta dopo 14gg.

Mentre l'isolato FA di *C. luteo-olivacea* aveva incrementato lo sviluppo radicale, l'isolato FL ne riduceva lo sviluppo medio del 54%, pur non facendo registrare una differenza significativa rispetto al controllo.

Nel caso di *N. serpens*, solo l'isolato RT6c riduceva lo sviluppo radicale, mentre RT9 ne aveva solo influenzato il valore medio ma non in maniera significativa.

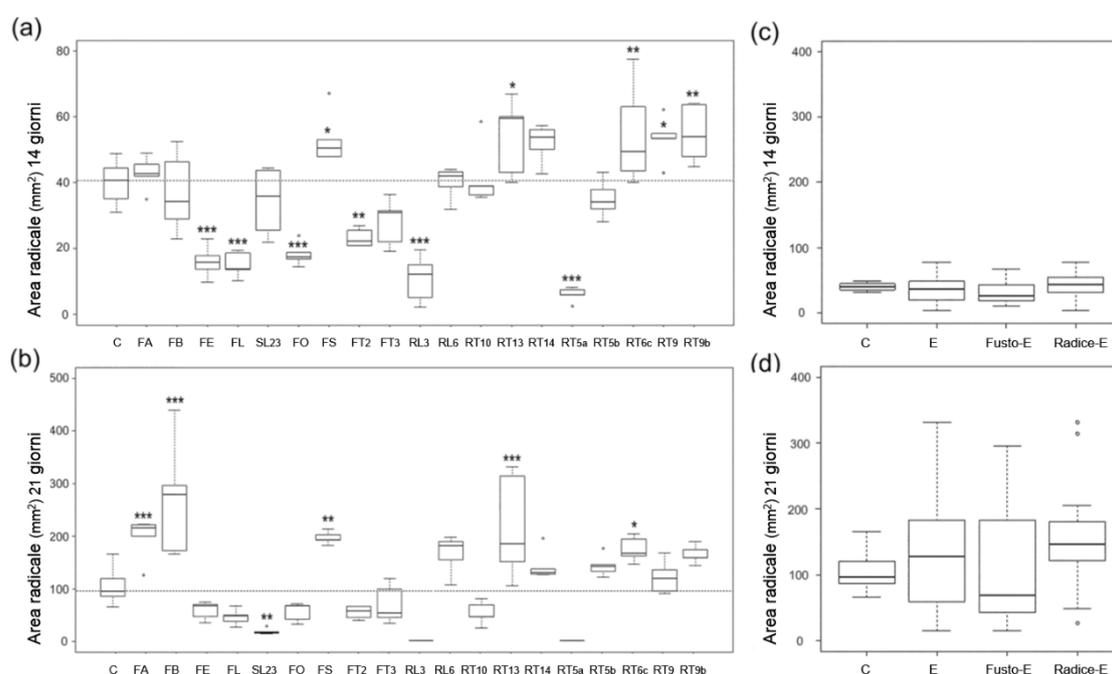


Fig. 9: Effetto degli endofiti sull'area radicale. (a, b) Boxplots che illustrano la variabilità delle aree radicali delle piante di *Arabidopsis* trattate con gli endofiti e delle piante usate come controllo, dopo 14 giorni dall'inoculo (a) e dopo 21 giorni (b). La barra orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli. Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi seguendo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Boxplots dei dati aggregati dei controlli (C), tutti gli endofiti (E), endofiti isolati da fusto (Fusto-E), endofiti isolati da radice (Radice-E); rispettivamente dopo 14 giorni (c) dall'inoculo e dopo 21 giorni (d).

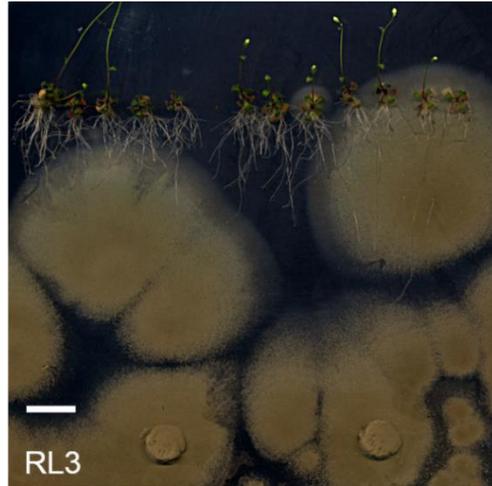


Fig. 10: Piante di Arabidopsis inoculate con RL3 dopo 21 giorni dall'inoculo. Lunghezza della barra=10mm.

Dopo 14 giorni dall'inoculo, tutti gli isolati avevano ridotto questo parametro con una variazione percentuale negativa media compresa tra il 28% (RT13) e il 71% (FE) (Fig. 11-a), ad eccezione di RL6 e RT9b, che non avevano influenzato la profondità radicale. Dopo 21 giorni dall'inoculo, tre isolati, FB, RT9b e RL6, avevano aumentato la profondità radicale, rispettivamente del 20%, 30% e 58%; gli altri, ad esclusione di RT13 che non aveva influenzato la profondità radicale, ne avevano ridotto lo sviluppo rispetto al controllo con percentuali comprese tra il 26% (RT6c) e il 75% (FL) (Fig. 11-b).

Tutti gli isolati di Mucoromycotina, *C. luteo-olivacea* e *N. serpens*, avevano ridotto la profondità radicale.

Considerando gli isolati che avevano promosso questo carattere dopo 21 giorni, si notava che nell'esperimento precedente (14 giorni), RL6 e RT9b non avevano influenzato la profondità radicale, mentre FB risultava un forte inibitore. Tale dato ha evidenziato la capacità di alcuni funghi di modificare in modo significativo lo sviluppo

della radice della pianta solo nell'ultima fase di sviluppo.

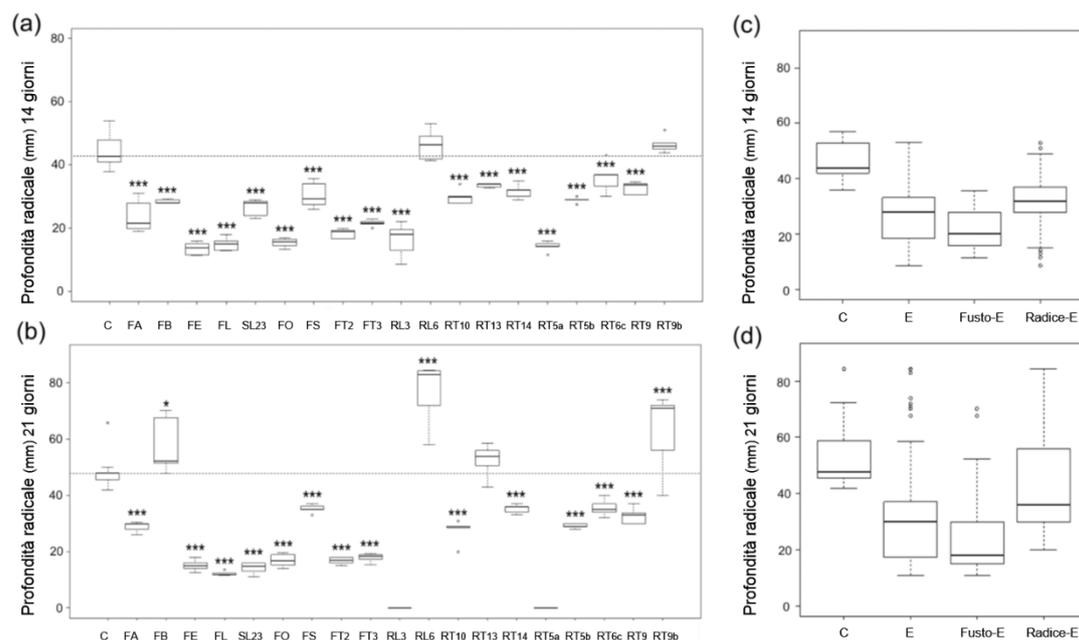


Fig. 11: Effetto degli endofiti sulla profondità radicale. Boxplots che illustrano la variabilità delle profondità radicali delle piante di *Arabidopsis* trattate con gli endofiti e delle piante usate come controllo, dopo 14 giorni dall'inoculo (a) e dopo 21 giorni (b). La barra orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli.

Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi seguendo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Boxplots dei dati aggregati dei controlli (C), tutti gli endofiti (E), endofiti isolati da fusto (Fusto-E), endofiti isolati da radice (Radice-E); rispettivamente dopo 14 giorni (c) dall'inoculo e dopo 21 giorni (d).

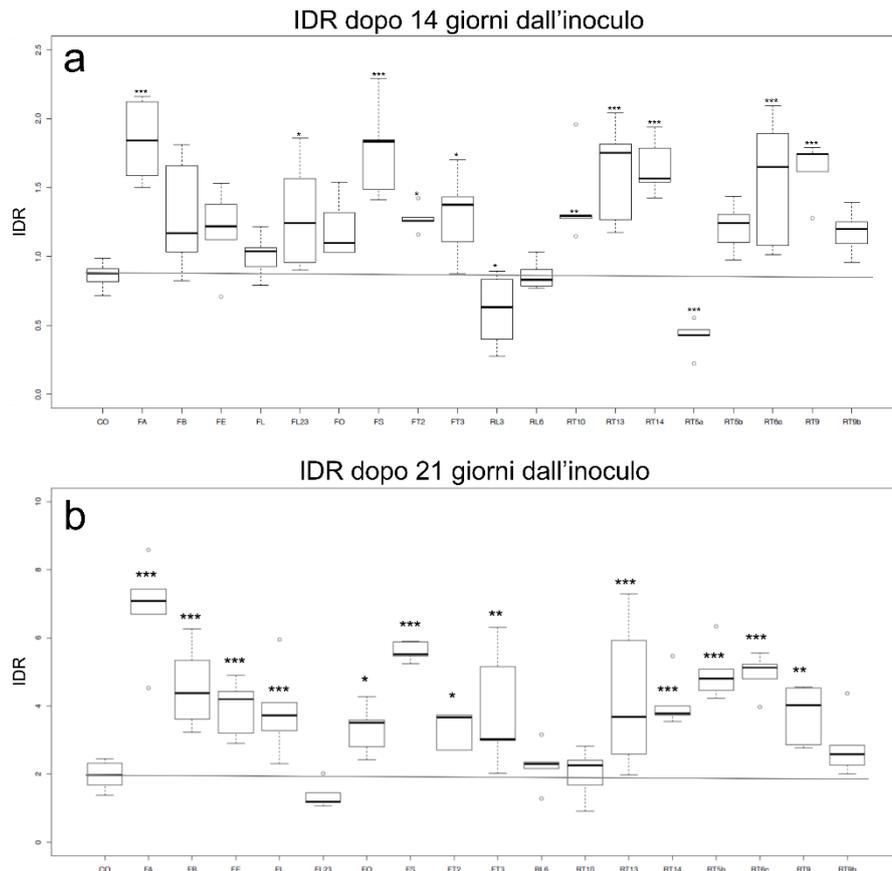


Fig. 12: Effetto degli endofiti sul'IDR. Boxplots che illustrano la variabilità del rapporto area radicale (mm^2)/profondità radicale(mm) delle piante di *Arabidopsis* trattate con gli endofiti e delle piante usate come controllo, dopo 14 giorni dall'inoculo (a) e dopo 21 giorni (b). La barra orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli.

Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi seguendo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 .

L'indice IDR, dopo 14 giorni dall'inoculo, è stato influenzato positivamente da 9 isolati, FL23, FT3, RT10, RT6c, RT13, RT9, RT14, FS e FA rispettivamente del 51%, 51%, 62%, 77%, 87%, 89%, 91%, 103% e 109%. Solo RL3 e RT5b avevano ridotto questo parametro rispettivamente del 22% e 50%, evidenziando una bassa capacità di colonizzare il mezzo.

Tutti gli isolati, Mucoromycotina e *N. serpens*, hanno incrementato questo parametro mentre nel caso di *C. luteo-olivacea* solo l'isolato FA ha influenzato positivamente questo carattere; l'isolato FL aveva indotto un incremento medio del 18% non

significativo.

Dopo 21 gg, 13 isolati, FT2, FO, RT9, FL, FE, FT3, RT14, RT13, FB, RT6c, RT5b, FS e FA hanno influenzato positivamente la media dell'IDR rispettivamente del 50%, 56%, 73%, 78%, 83%, 84%, 90%, 92%, 116%, 128%, 130%, 159%, e 217%. Nessun fungo comunque ha ridotto l'IDR, ma i due isolati RL3 e RT5a che avevano ridotto questo rapporto dopo 14 gg, non sono stati analizzati. Sebbene con differenti effetti promotori, entrambi gli isolati di *C. luteo-olivacea* e *N. serpens* avevano modificato in modo positivo il rapporto, mentre l'isolato RT14 (Mucoromycotina) ha esercitato un effetto promotore e l'isolato RT10 non ne ha modificato il rapporto rispetto al controllo inducendo una riduzione media dell'8%. L'isolato FL23 che riduceva il valore medio del rapporto del 37% in maniera non significativa, con RT10, faceva registrare un cambio di effetto in quanto promotori dopo 14gg. Gli isolati RT9b e RL6, come dopo 14 gg., non ne alteravano il rapporto rispetto al controllo.

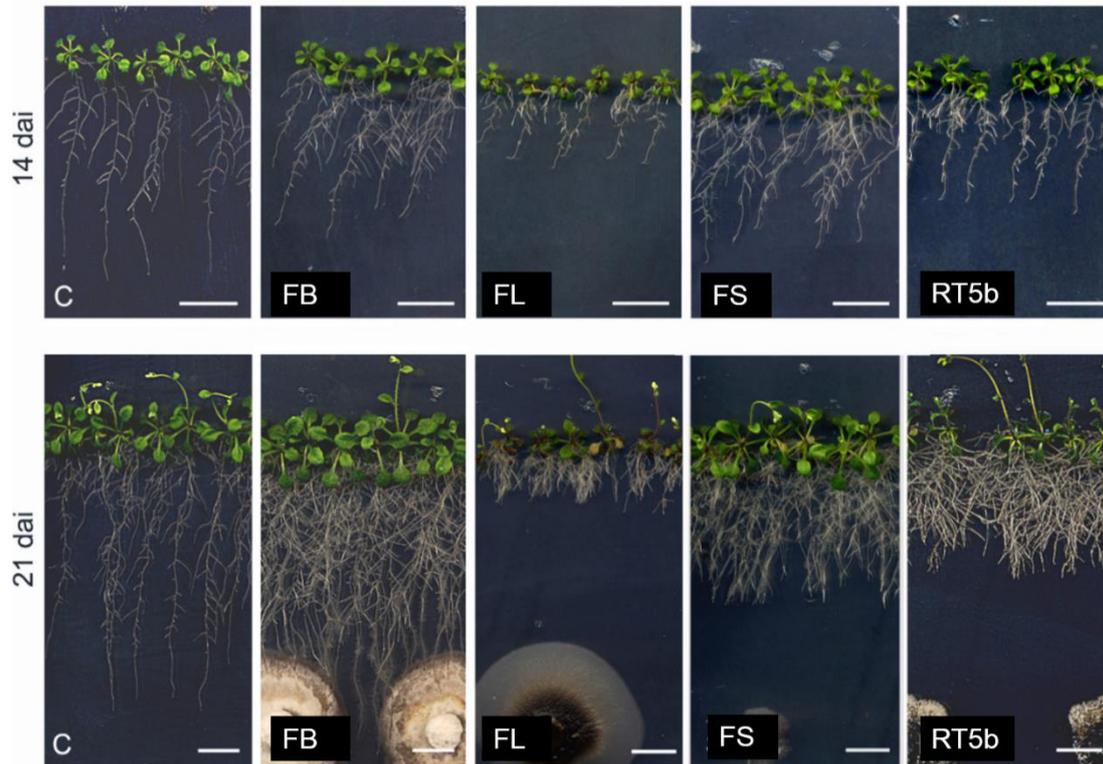


Fig. 13: Effetto degli endofiti su piante di *Arabidopsis*; dopo 14 giorni dall'inoculo nella parte superiore; dopo 21 giorni dall'inoculo nella parte inferiore.

5. Relazioni tra parametri radicali e biomasse

E' stata condotta un'analisi di correlazione tra le medie dei parametri radicali (area radicale e profondità) e le medie delle biomasse fresche e secche nei due diversi tempi per valutare se lo sviluppo radicale fosse in relazione con le biomasse. I dati mostravano una scarsa correlazione tra i parametri morfometrici radicali considerati e le biomasse. Il maggiore valore di R^2 era stato evidenziato nella relazione tra Area radicale rispetto biomasse secche dopo 14 gg (Fig. 14a); tale valore in parte era attribuibile alla presenza dell'isolato RT5a, caratterizzato da un modesto sviluppo sia in termini di area che di biomassa, che esercitando un effetto "leva" sovrastimava la correlazione attraverso un coefficiente di determinazione $R^2=0.4036$. Dall'eliminazione di questo isolato (Fig.

14b) si è ottenuto un $R^2=0.2693$ che evidenziava una scarsa correlazione tra queste variabili. La relazione tra profondità radicale e biomassa secca evidenziava un $R^2=0.2534$ indicando una bassa relazione tra queste variabili (Fig. 14c).

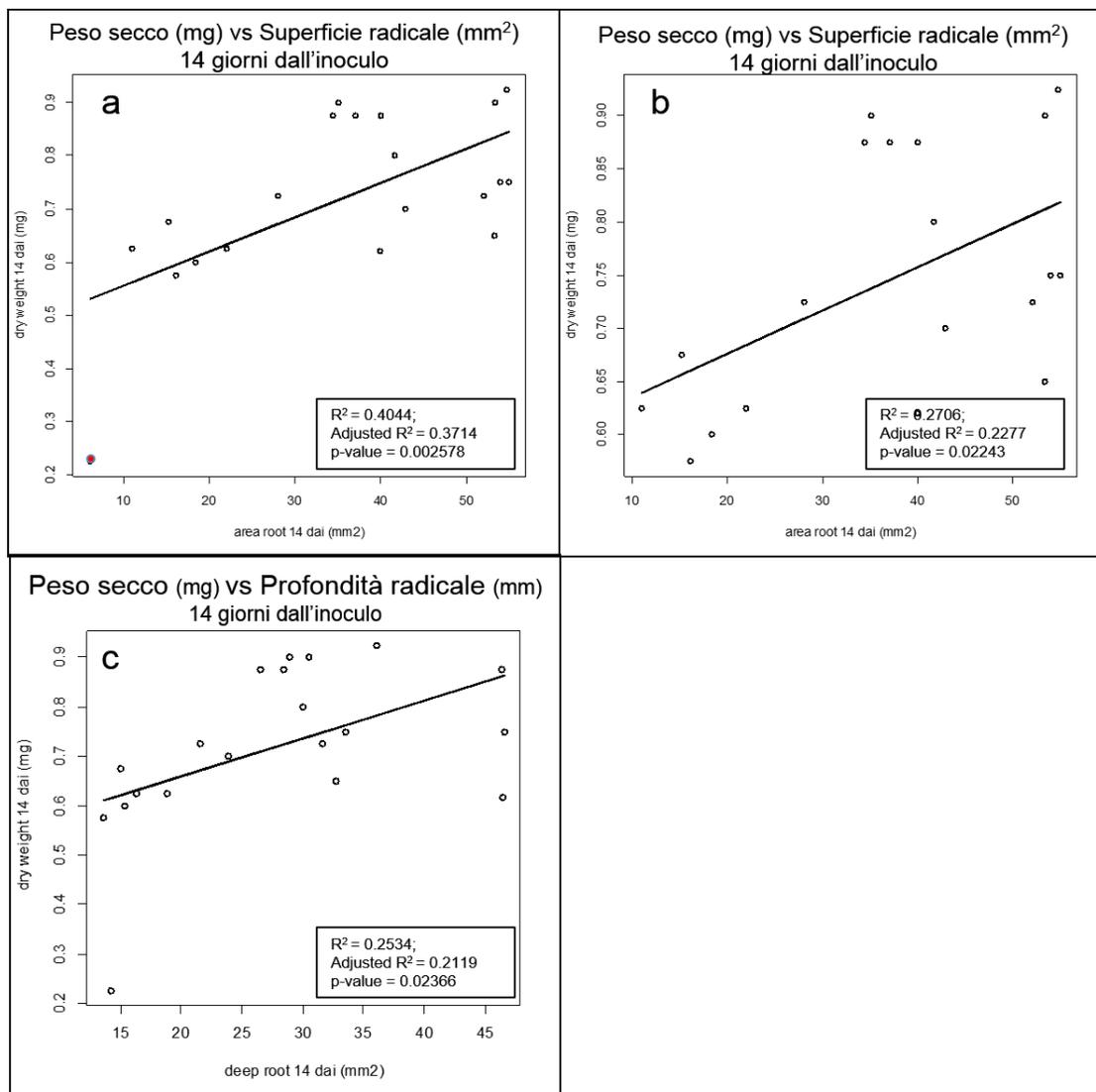


Fig. 14: Scatter Plot delle medie dei pesi secchi (mg) delle piante di Arabidopsis vs medie delle aree radicali (mm²) dopo 14 giorni con tutti i valori (a), e privati del campione RT5a(b). Scatter Plot delle medie dei pesi secchi (mg) delle piante di Arabidopsis vs profondità radicale (mm) dopo 14 giorni con tutti i valori (c).

Inoltre erano state studiate la relazione tra i due parametri radicali esaminati, superficie e profondità radicale del primo tempo rispetto alle biomasse secche del secondo tempo per valutare se lo sviluppo radicale dopo 14gg fosse un buon carattere per prevedere la biomassa secca finale della pianta. Le relazioni avevano indicato anche in questo caso

una bassa correlazione, evidenziando lo scarso potere predittivo di entrambi i caratteri considerati rispetto alla biomassa secca della pianta. Il coefficiente $R^2=0.2731$ dell'area radicale mostrava di descrivere leggermente meglio le relazioni con le future biomasse rispetto al valore $R^2=0.2534$ della profondità radicale.

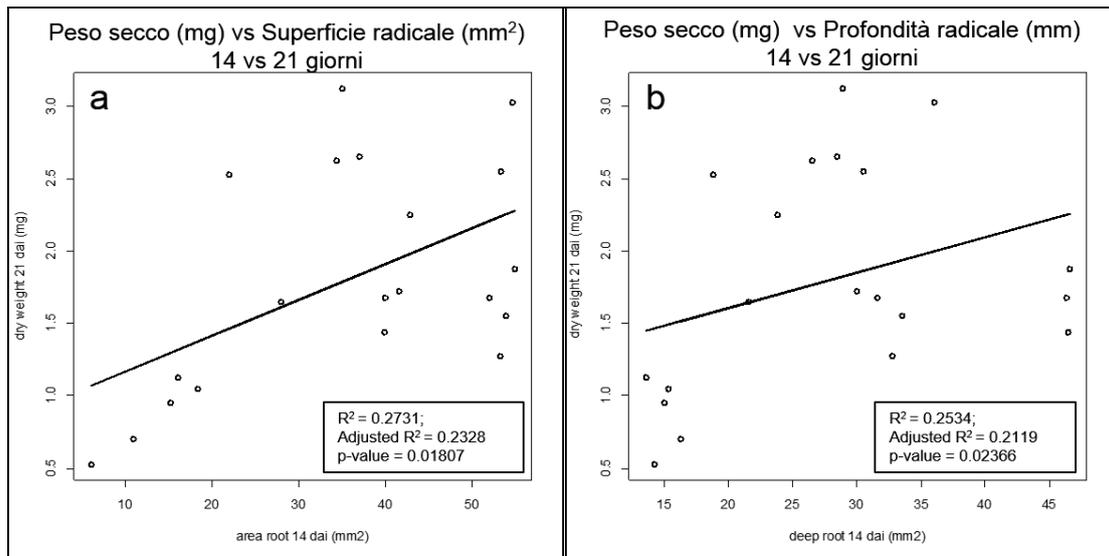


Fig. 15: Scatter Plots delle medie dei pesi secchi (mg) delle piante di Arabidopsis dopo 21 giorni vs medie delle aree radicali (mm²) dopo 14 (a). Scatter Plots delle medie dei pesi secchi (mg) delle piante di Arabidopsis dopo 21 giorni vs profondità radicale (mm) dopo 14 giorni (b).

L'analisi di correlazione tra Superficie radicale e profondità radicale (Fig. 16a-b), rispetto alla biomassa secca, evidenziava una assenza di correlazione descritta da un coefficiente R^2 rispettivamente pari a 0.143 (p=0.1217) e 0.06 (p=0.7552).

Tale risultato evidenziava come lo sviluppo radicale, col passare del tempo non rappresenti un fattore limitante della crescita delle piante.

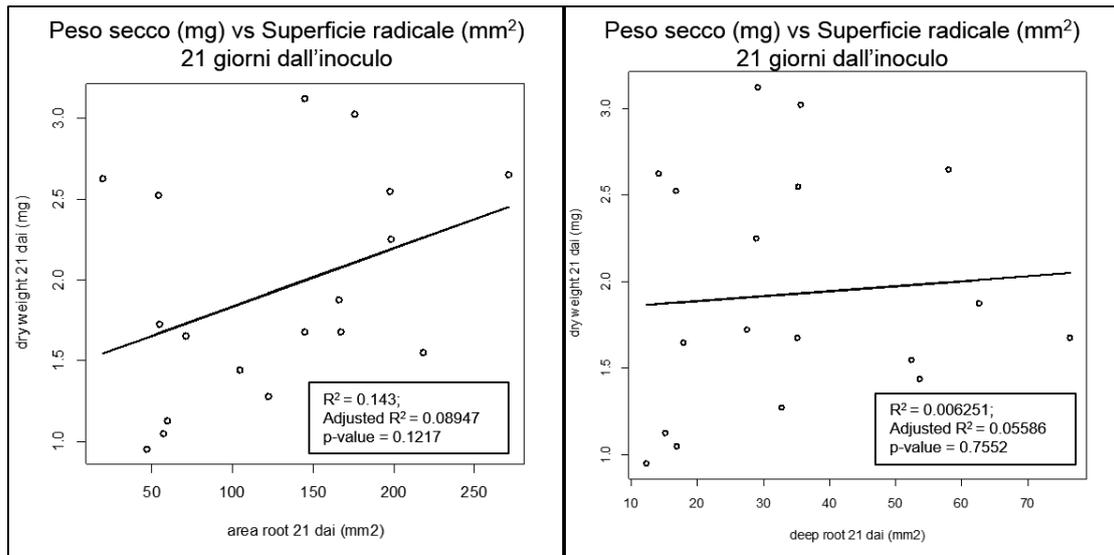


Fig. 16: Scatter Plots delle medie dei pesi secchi (mg) delle piante di Arabidopsis vs medie delle aree radicali (mm²) dopo 21 (a). Scatter Plots delle medie dei pesi secchi (mg) delle piante di Arabidopsis vs profondità radicale (mm) dopo 21 giorni (b).

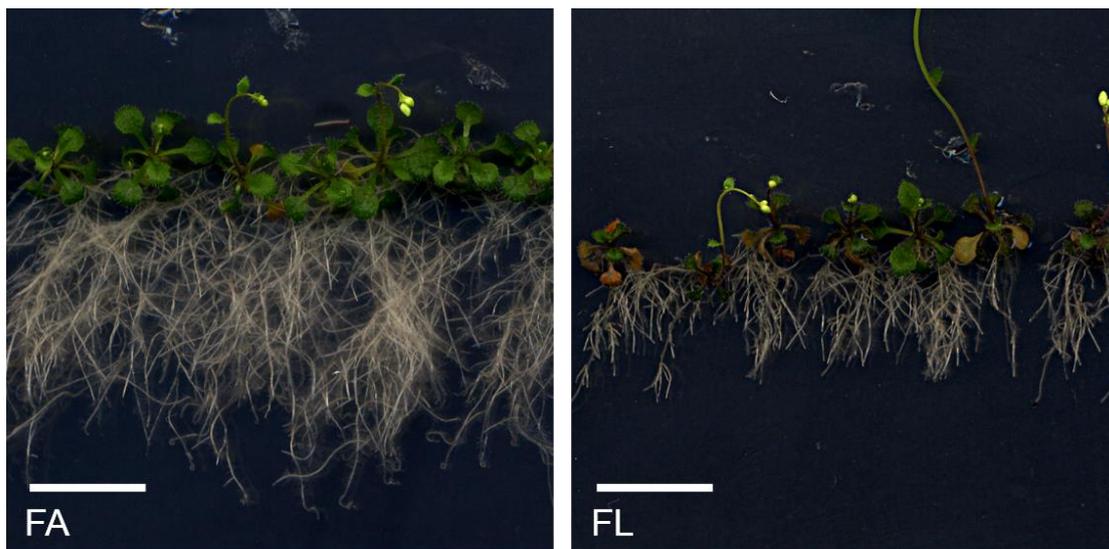


Fig. 17: Piante di Arabidopsis coltivate in vitro dopo 21 giorni dall'inoculo con *Cadophora luteo-olivacea*, isolato FA (a) e isolato FL (b). Lunghezza della barra=10mm.

6. Effetto di dieci funghi endofiti sull'architettura radicale

Tutti i funghi hanno ridotto il numero medio di radici laterali di primo ordine, tra questi, RT5a, RL3, FE e FL, (Fig. 18-a) hanno indotto un decremento significativo del numero medio di RL rispettivamente pari al 72%, 57%, 55% e 37%.

Tutti e quattro i funghi che hanno ridotto il numero di radici laterali hanno anche ridotto mediamente il peso fresco delle piante; RT5a aveva anche ridotto il peso secco rispetto al controllo.

Gli isolati FS e RT6c, che hanno incrementato sia la biomassa fresca che secca, non hanno ridotto in modo significativo il numero di laterali di primo ordine.

Quattro isolati, RT5a, FE, RL3, FL, hanno ridotto la lunghezza totale dell'apparato radicale (Fig. 18-b) rispettivamente del 81%, 72%, 67% e 51% mentre, RT6c ne ha incrementato la lunghezza del 29%. RT5a, FE, RL3, FL hanno anche ridotto le biomasse fresche, ma solo RT5a anche la biomassa secca; RT6c ha fatto aumentare sia la biomassa fresca che secca. FS non ha incrementato la lunghezza radicale in modo significativo ma ha incrementato sia la biomassa fresca che secca, evidenziando che l'incremento delle biomasse non è sempre legato ad una maggior lunghezza radicale (confermando i dati ottenuti dalla correlazione aree radicali vs biomasse).

I due isolati di *Cadophora luteo-olivacea* hanno esercitato un differente effetto su questo parametro.

Otto isolati, FE, FL, RT5a, RL3, FL23, FA, RT5b, FS, hanno ridotto la lunghezza della radice principale (Fig. 18-c) rispetto al controllo e rispettivamente del 67%, 58%, 57%, 50%, 33%, 32%, 28% e 23%. Solo FB e RT6c non hanno ridotto la lunghezza della radice principale in modo significativo.

Questi ultimi due isolati hanno incrementato la biomassa secca, e RT6c anche la biomassa fresca. FS pur avendo ridotto la lunghezza della radice principale aveva indotto un aumento sia della biomassa fresca che secca.

Tutti i funghi che hanno ridotto la biomassa fresca hanno anche ridotto la lunghezza della radice principale. Mentre tra i funghi che hanno incrementato in modo significativo sia biomassa fresca che secca, FS ha ridotto la lunghezza media del 23%, mentre RT6c non ha influenzato la lunghezza della radice principale in modo significativo. Tali dati hanno evidenziato l'assenza di relazione tra il parametro precedentemente descritto e le biomasse.

Sebbene sei isolati hanno mostrato un incremento medio del branching (Fig. 18d) rispetto al controllo, solo FL ha prodotto un incremento significativo del 51% di questo parametro.

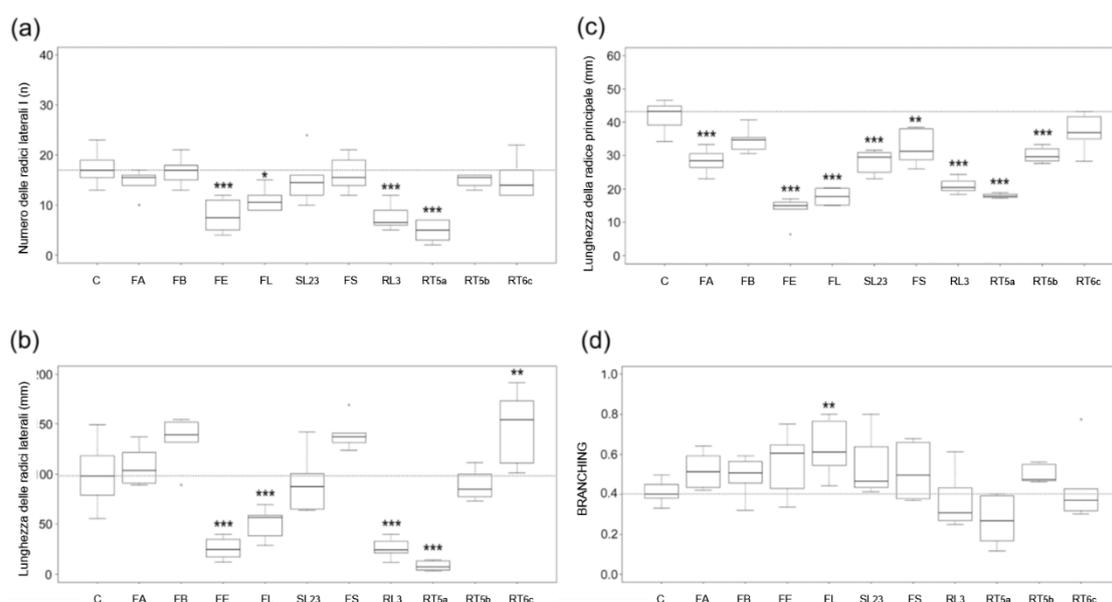


Fig. 18: Effetto degli endofiti su parametri radicali. Boxplots che illustrano la variabilità: del numero delle radici laterali (a); delle lunghezze delle radici laterali (mm) (b); delle lunghezze delle radici principali (c); del Branching (d) dopo 14 giorni dall'inoculo. La barra orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli. Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi seguendo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 .

Sei isolati, FE, RT5a, FL, RL3, FL23, FA, hanno ridotto la lunghezza della BR-zone (Fig. 19) rispettivamente del 71%, 62%, 57%, 50%, 30%, 29%.

Nessuno, tra gli isolati considerati, ha mostrato di influenzare positivamente questo parametro. Tutti i funghi che hanno ridotto la biomassa fresca hanno anche influenzato negativamente la BR-zone. FS e RT6c che hanno incrementato sia il peso medio fresco che secco delle piante, non hanno ridotto la lunghezza della BR-zone in modo significativo. In termini di numero di isolati, questo parametro risultava statisticamente meno influenzato rispetto alla lunghezza totale della radice, dove otto isolati avevano indotto modificazioni significative.

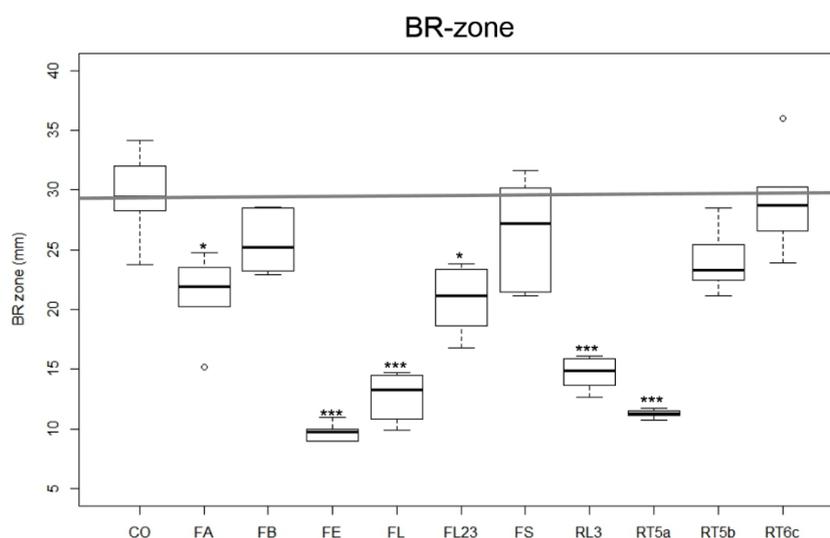


Fig. 19: Boxplots che illustrano la variabilità della BR-zone dopo 14 giorni dall'inoculo. La barra orizzontale rappresenta il valore della mediana dei controlli. Le differenze delle medie dei trattati, rispetto ai controlli, sono state evidenziate con asterischi seguendo il seguente criterio: *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 .

7. Confronto tra i due precedenti metodi di analisi radicale.

I dati riferiti alla lunghezza radicale media, risultavano ben correlati con i valori delle aree radicali con un valore $R^2 = 0.9237$ e un valore di $p = 2.504e^{-06}$ (Fig. 20).

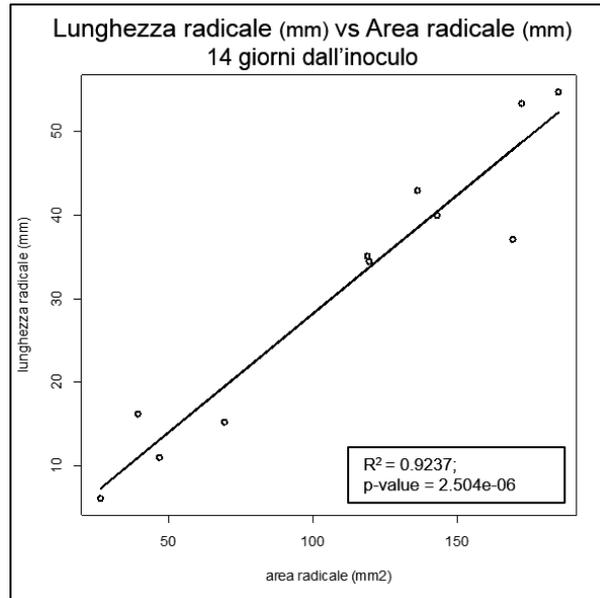


Fig. 20: Scatter Plot delle medie delle lunghezze radicali dell'apparato radicale di Arabidopsis (mm) vs medie delle aree radicali (mm²) dopo 14 giorni.

In modo analogo, si evidenziava una buona correlazione lineare positiva tra la lunghezza della radice principale e la profondità radicale massima misurata nei box di 20 mm di larghezza, ($R^2 = 0.934$ e $p = 1.29 \times 10^{-6}$; Fig. 21).

8. Concentrazione di IAA dei filtrati culturali.

Dopo 10 giorni di incubazione tutti i funghi si erano sviluppati nel mezzo di coltura.

Solo nel caso dell'isolato FA (*C. luteo-olivacea*) si è rilevata una produzione di IAA pari a 0.055 µg/ml di filtrato e 4.69 µg/g di micelio secco.

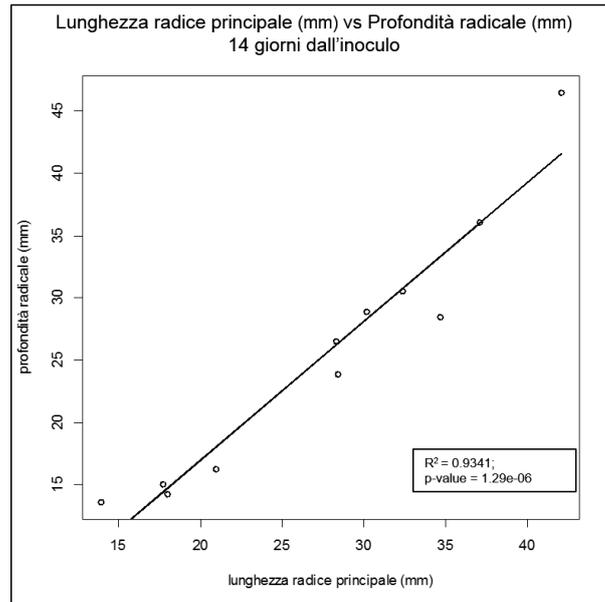


Fig. 21: Scatter Plot delle medie delle lunghezze radicali dell'apparato radicale di *Arabidopsis* (mm) vs medie delle aree radicali (mm²) dopo 14 giorni..

Discussione

L'isolamento dei funghi dalle piante di *M. aquatica* ha evidenziato la presenza di endofiti appartenenti principalmente alla divisione Ascomycota, e una sola specie inclusa nel subphylum Mucoromycotina. Complessivamente sono state isolate 16 specie rappresentative di 9 diversi ordini.

Parte di questi funghi erano già noti come ospiti di piante, e risultano presenti in diverse tipologie di habitat. *A. pullulans*, per esempio, è considerato un endofita "non-clavicipitaceo" di classe 2 (Rodriguez et al., 2009), conosciuto anche come epifita, in grado di colonizzare foglie, fusti, radici e semi di diverse specie di piante (Botella e Diez, 2011). In modo analogo, *S. strictum* è un endofita di diverse specie officinali (Su et al., 2014) e in fusti di *Salicornia europaea* (Okane e Nakagiri, 2015).

Altri funghi isolati da *M. aquatica*, sono in grado di colonizzare habitat molto diversi comportandosi da saprotrofi. Ne è un esempio *C. halotolerans*, che è una specie

conosciuta come endofita di fusti e foglie di *Hypericum perforatum*, ma anche come saprotrofo di ambienti salmastri o ipersalini (Zalar et al., 2007).

I funghi endofiti, quando a diretto contatto della pianta, possono comportarsi in modo difficilmente prevedibile, da mutualisti o semplici saprotrofi a patogeni più o meno virulenti (Johnson et al., 1997; Mandyam et al., 2013; Mandyam e Jumpponen, 2015). Per questa ragione, in questo studio, si era cercato di limitare il contatto diretto tra fungo e pianta per evitare l'insorgere di comportamenti eccessivamente aggressivi da parte dei funghi (fig. 1). Solo nel caso di FB, isolato che aveva evidenziato la sua capacità di promuovere lo sviluppo radicale, e dei due isolati appartenenti al genere *Penicillium*, RT5a e RL3, in grado di produrre abbondanti conidi, il contatto diretto tra le radici di *Arabidopsis* e funghi non era stato evitato.

Come ci si poteva aspettare, considerando l'effetto sulle biomasse delle piante, alcuni isolati si sono comportati da promotori mentre altri da inibitori, e altri ancora non hanno avuto effetto su questo parametro.

In alcuni casi, come per l'isolato FS- *S. strictum*, l'effetto osservabile sullo sviluppo di *Arabidopsis* era in accordo con la letteratura, che lo riportava come promotore di crescita di diverse piante (Jaber e Vidal, 2010, Wang et al., 2014). In modo differente, l'isolato da *M. aquatica* FB, geneticamente affine al patogeno *P. macrostoma*, conosciuto per la sua azione come produttore di sostanze erbicide (Bailey et al., 2011), nel nostro esperimento si comportava da promotore sia delle biomasse che dello sviluppo radicale. In modo contrario ai dati forniti dalla letteratura, gli isolati FE-A-*pullulans*, RT5a-*P. solitum* e RL3-*P. resedanum*, avevano un effetto negativo sullo

sviluppo delle piante di *Arabidopsis*, sebbene *A. pullulans* sia descritto come agente di controllo biologico in grado di esplicare effetti positivi sulla specie ospitante (Wachowska e Glowacka, 2014; Rai et al., 2014) e gli isolati di *P. resedanum* e *P. solitum* sono stati segnalati rispettivamente come promotori in *Capsicum annuum* (Khan et al., 2013) e funghi “neutrali” su piante di *Solanum lycopersicum* (Gravel et al., 2006). Le differenze riscontrate rispetto alla letteratura possono essere legate alle diverse condizioni sperimentali, oppure dipendere delle diverse attitudini degli isolati fungini; inoltre, a differenza del dato in letteratura, nell’esperienza con *Arabidopsis* il fungo nella maggior parte dei casi non era a diretto contatto con la pianta.

Comunque, la capacità di influenzare in modo diverso lo sviluppo delle piante, da parte di isolati diversi appartenenti alla stessa specie è riportato dalla letteratura, come nel caso di *P. solitum* (Gravel et al., 2006; Pitt et al., 1991) e *C. luteo-olivacea* (Gramaje e Armengol, 2011; Rosa et al., 2010). I nostri risultati, in accordo con quanto presente in letteratura, mostravano un comportamento nettamente differente su *Arabidopsis* dei due isolati FA e FL di *C. luteo-olivacea*.

L’isolato FA aveva incrementato in modo significativo la biomassa fresca, secca e lo sviluppo radicale, mentre l’isolato FL, dopo 21 giorni, aveva ridotto in modo significativo tutti i parametri, confermando che isolati diversi della stessa specie possono comportarsi in modo diverso sullo sviluppo di piante di *Arabidopsis* (Mandyam e Jumpponen, 2015).

La diversa interazione tra isolati diversi della stessa specie, è conosciuta anche nel caso di funghi patogeni, ove le forme ipovirulente, come nel caso di *Cryphonectria*

parasitica, sono in grado di arrestare l'evoluzione dei cancri in atto causati da funghi appartenenti alla stessa specie, ma dotati di maggiore virulenza. Recenti studi evidenziano che il fenomeno dell'ipovirulenza è mediato dalla presenza di virus, e che per tanto è trasferibile da ceppi infetti a ceppi non infetti, trasformandoli in ipovirulenti (Turina e Rostagno, 2007).

Anche nel caso di un endofita, appartenente al genere *Curvularia*, isolato da piante di *Dichantelium lanuginosum* cresciute in ambienti caratterizzati da alte temperature del suolo, la capacità di conferire resistenza alla pianta alle alte temperature è riscontrabile solo se il fungo è infettato dal virus; l'infezione è reversibile e tale capacità può perdersi e venire riacquistata successivamente (Márquez et al., 2007).

Considerando la complessità delle dinamiche biologiche, i diversi comportamenti mostrati da ceppi appartenenti alla stessa specie possono essere influenzati da un notevole numero di variabili, spesso difficilmente spiegabili senza studi approfonditi. Ad esempio, fattori responsabili di queste differenze possono dipendere dalla presenza in un determinato isolato fungino di batteri e/o virus (Herrero et al. 2009; Naumann et al. 2010), normalmente non rilevabili dalle normali procedure di indagine in microscopia ottica. Inoltre, va sempre considerata la variabilità genetica intraspecifica degli isolati stessi.

Per quel che concerne le biomasse, i funghi endofiti sono stati in grado di influenzarne lo sviluppo in modo evidente sia dopo 14 giorni che 21 giorni dall'inoculo, sia in termini positivi che negativi. Le maggiori differenze si sono riscontrate dopo 21 giorni dall'inoculo, dove le variazioni rispetto al controllo erano particolarmente evidenti. I

funghi che hanno maggiormente influenzato i pesi secchi sono stati l'isolato RT5a che ha fatto registrare una diminuzione media del 64% e l'isolato RT5b che ha indotto un incremento medio del 117% di peso secco rispetto al controllo. La bassa correlazione tra i pesi dopo 14 giorni rispetto a quelli rilevati dopo 21 giorni dall'inoculo ha evidenziato una scarsa proporzionalità tra i tassi di crescita in diverse fasi di sviluppo. Questo dato evidenziava che per valutare l'effetto di un fungo endofita è necessario studiarne le interazioni durante tutte le fasi di sviluppo della pianta, per comprenderne l'effetto complessivo sull'intero ciclo vegetale.

Tutti gli isolati da menta hanno incrementato la percentuale di sostanza secca dopo 14 giorni dall'inoculo, principalmente a causa dell'incremento del peso secco, rispetto al controllo, non seguito da un aumento proporzionale del peso fresco.

Le variazioni delle biomasse in seguito all'inoculazione di funghi sono ampiamente documentate per quel che concerne pesi freschi e secchi (Contreras-Cornejo et al., 2009; Martinuz et al., 2015; Murphy et al., 2015; Vaz et al., 2012), mentre meno dati sono disponibili per l'impatto sulla percentuale di sostanza secca. Comunque, endofiti promotori come *Piriformospora indica* (Dolatabadi et al., 2011) e l'isolato PGP-HSF (Mucciarelli et al., 2002; Mucciarelli et al. 2003) aumentano principalmente il peso fresco piuttosto che il peso secco, rispettivamente di *Thymus vulgaris* e *Mentha x piperita*, mentre altri endofiti influenzano il peso secco e fresco in modo proporzionale (Dolatabadi et al., 2011; Sati e Arya, 2010).

L'incremento delle biomasse secche non corrispondente a quelle fresche, che si è osservato negli isolati di menta FL23, FT2, RT6c e RT10, è difficile da spiegare. E'

possibile che un certo numero di endofiti, si comportassero da blandi patogeni quando posti in prossimità delle piante di *Arabidopsis*, come avviene nel caso di infezione di endofiti non sistemici (Okubara e Paulitz, 2005; Wani et al., 2015).

In risposta a tale pressione esercitata dal fungo, la pianta potrebbe aver ridotto la distensione cellulare, incrementando il numero di cellule per unità volumetrica e/o incrementando lo spessore della parete cellulare (Ludwig-Muller, 2015).

Gli endofiti isolati da *M. aquatica* influenzavano in modo significativo lo sviluppo radicale (Area), sia in termini positivi che negativi, ma quasi tutti riducevano la profondità radicale già dopo 14 giorni dall'inoculo con i funghi. Quest'ultimo dato era in accordo con la riduzione della lunghezza della radice principale. Per gli isolati sottoposti all'analisi dei parametri dell'architettura radicale, la riduzione del numero di radici laterali, associata ad una diminuzione della lunghezza della principale, non ha influenzato in modo significativo il Branching, ovvero il rapporto tra numero di radici laterali e lunghezza della radice principale (mm), fatta eccezione per l'isolato FS-S. *strictum*, dove a parità di numero di radici laterali si è osservata una riduzione della lunghezza della radice principale.

Per quel che concerne il rapporto tra apparato radicale e biomasse, i risultati hanno evidenziato una scarsa correlazione tra questi parametri. Mentre dopo 14 giorni, è presente una modesta correlazione tra questi valori, dopo 21 giorni i coefficienti R^2 che descrivevano la relazione lineare tra area radicale e profondità radicale, verso biomassa secca erano rispettivamente pari a 0.143 ($p=0.1217$) e 0.06 ($p=0.7552$), indicando praticamente una assenza di correlazione. Anche le relazioni tra sviluppo radicale e

relativa profondità radicale, dopo 14 giorni, verso il peso secco dopo 21 giorni, non evidenziavano una buona correlazione tra questi parametri. Quest'ultima relazione era stata studiata per valutare se lo sviluppo radicale dopo 14 giorni fosse un predittore dello sviluppo successivo delle biomasse; i risultati ottenuti, evidenziano l'inutilità di questo parametro come indice di potenzialità produttiva.

Di conseguenza, uno sviluppo radicale ridotto poteva rappresentare un elemento limitante solo nelle prime fasi di sviluppo della pianta. Questo risultato avrebbe potuto indicare che le piante si erano avvantaggiate da uno sviluppo radicale precoce, che garantiva l'assorbimento delle sostanze nutritive, in particolare di quelle poco solubili e disponibili, come ad esempio i fosfati, che per essere assorbiti devono entrare a diretto contatto della radice. Una riduzione della lunghezza radicale, come evidenziata dalla sperimentazione condotta, può portare a un maggiore irrigidimento della parete cellulare e una conseguente maggior resistenza rispetto all'effetto di agenti patogeni (Ludwig-Muller, 2015). Inoltre va considerato che l'architettura radicale, può influenzare la composizione e la quantità di essudati radicali prodotti dalla pianta (Haichar et al., 2014) che a loro volta possono influenzare le condizioni chimico-fisico della rizosfera e di conseguenza le dinamiche di scambio tra radici e substrato.

Gli endofiti isolati da menta hanno mostrato la capacità di influenzare lo sviluppo di tutti i parametri radicali considerati. Per quel che concerne le auxine, i funghi endofiti possono influenzare il fenotipo delle piante direttamente, rilasciando auxina, o indirettamente influenzando: la sintesi, l'omeostasi e la recettività cellulare all'ormone

endogeno (Contreras-Cornejo et al., 2009; Fusconi A., 2014; Sukumar et al., 2013; Vadassery et al., 2008)

Siccome uno degli effetti maggiormente significativi indotti dagli endofiti di menta era stato l'accorciamento della radice principale, che è generalmente associato ad alte concentrazioni di auxina (Contreras-Cornejo et al., 2009; López-Bucio et al., 2002), è stata misurata la produzione di IAA da parte dei funghi. Ad esclusione di FA, uno degli isolati di *C. luteo-olivacea*, in grado di produrre fino a 0.055 µg/ml di IAA in coltura liquida, gli altri isolati non avevano prodotto concentrazioni ormonali in quantità rilevabili. Comunque la concentrazione di IAA precedentemente riportata, risultava nettamente inferiore rispetto ad altri dati forniti dalla letteratura per endofiti produttori di IAA (Fouda et al., 2015; Waqas et al., 2015).

Le piante di *Arabidopsis* inoculate con l'isolato FA hanno evidenziato un incremento significativo del peso secco e dell'area radicale dopo 21 giorni e una riduzione della lunghezza della radice principale e della profondità radicale riscontrabile già dopo 14 giorni dall'inoculo.

Sebbene le modificazioni indotte da FA fossero almeno in parte spiegabili dalla produzione di auxina da parte del fungo (López-Bucio et al., 2002), anche FS ha indotto modificazioni simili senza produrre IAA in coltura liquida, anche se la reale presenza di auxina nelle situazione colturale *in vitro*, non era stata verificata. E' possibile supporre che la capacità dei funghi di modulare l'architettura radicale sia collegata a diversi fenomeni indipendenti dalla sola presenza dell'auxina. Inoltre non si esclude

che gli essudati dei funghi siano stati in grado di degradare parte dei componenti del substrato, influenzando in questo modo lo sviluppo delle piante.

Questo risultato solo apparentemente esclude che l'auxina, ormone fondamentale per la normale regolazione dello sviluppo delle piante, ma anche nelle risposte verso i patogeni (Ludwig-Muller, 2015) abbia giocato un ruolo nell'influenzare il fenotipo delle piante di *Arabidopsis*. Diversi studi condotti in vitro evidenziano che i funghi che producono alte concentrazioni di auxina sono in grado di colonizzare più velocemente e maggiormente gli apici radicali, rispetto ai funghi che ne producono quantità minori (Gay et al. 1994; Rudawska e Kieliszewska-Rokicka, 1997; Tranvan et al. 2000), ma i funghi stessi o gli essudati sono in grado di influenzare lo sviluppo radicale indipendentemente dalla quantità di auxina prodotta evidenziando che altre molecole giocano un ruolo fondamentale nell'interazione fungo-pianta (Niemei et al., 2002).

L'uso di mutanti di *Arabidopsis* associato all'uso di tecniche di trascrittomica in studi futuri, potrebbe meglio spiegare le cause di queste modificazioni fenotipiche indotte dagli endofiti.

I risultati scaturiti dal lavoro hanno evidenziato che tutti gli endofiti in forma aggregata non avevano influenzato in modo nettamente positivo o negativo sia le biomasse secche che fresche, ma semplicemente ne avevano aumentato la variabilità, evidenziando la presenza di funghi che mostravano effetti contrapposti; tale andamento era praticamente analogo a quello che si evidenziava considerando l'effetto aggregato separato di funghi isolati da fusto e da radice. Tale effetto aggregato era parzialmente simile considerando lo sviluppo radicale. In questo caso però, dopo 21 giorni

dall'inoculo, i funghi isolati da radice mostravano di incrementare la superficie radicale maggiormente rispetto agli isolati da fusto. Tale effetto è risultato particolarmente visibile anche in ragione dell'eliminazione dei due campioni di *Penicillium* (RL3 e RT5a), palesemente soppressori dello sviluppo delle piante e della radice, come già precedentemente evidenziato dopo 14 giorni, che a causa della colonizzazione diffusa da parte dei conidi avevano reso impossibile l'analisi d'immagine. Per quel che concerne la profondità radicale, l'effetto aggregato degli endofiti ne riduceva il valore; dal grafico in Fig.11 si evidenziava come sia dopo 14 giorni che dopo 21 dall'inoculo, gli isolati da fusto esercitavano una riduzione maggiore di questo parametro radicale rispetto agli isolati da radice.

Dall'analisi di immagine, il rapporto area radicale /profondità radicale (espresso in mm² per mm), ovvero l'indice di densità radicale media (IDR), ha evidenziato che sebbene gli endofiti complessivamente riducessero lo sviluppo in profondità della radice, generalmente incrementavano l'IDR, evidenziando un aumento della superficie assorbente nella fascia interessata dalle radici. Tale dato, indicava che gli endofiti, oltre a modificare i parametri tipici dell'architettura radicale, erano in grado di modificare l'assetto globale di crescita radicale; tale effetto, se confermato in coltura in terreno solido potrebbero influenzare lo sviluppo delle piante diversamente.

I parametri tipici dell'architettura radicale sono stati considerati solo dopo 14 giorni dall'inoculo, in quanto dopo 21 giorni la complessità dello sviluppo radicale delle diverse piante rendeva impossibile l'analisi a causa dell'intrecciarsi delle radici appartenenti a individui diversi. L'analisi dello sviluppo dell'area radicale, all'interno

di un rettangolo di base costante scelto in modo arbitrario della lunghezza di 20 mm, aveva permesso di confrontare lo sviluppo radicale altrimenti non analizzabile. Questa metodologia, a differenza dello studio della radice singola, coltivata in modo indipendente dalle altre, valuta la capacità del pool di piante coltivate di colonizzare il substrato, meglio descrivendo una dinamica reale di campo.

Inoltre il parametro RDM permette di calcolare un indice che esprime l'intensità di colonizzazione da parte delle radici per unità di terreno considerato, che non può essere valutato utilizzando l'altra metodologia.

I valori medi delle aree radicali, per i diversi trattamenti e il controllo erano ben correlati ai valori medi delle lunghezze radicali calcolate, e descritte da un elevato valore di R^2 pari a 0.923. Questo valore associato ad un $p = 2.504e^{-06}$ evidenziava che questo approccio, particolarmente veloce, può essere un buon indicatore dello sviluppo radicale, in modo analogo al calcolo diretto della lunghezza radicale. Questo parametro, è influenzato positivamente dallo spessore radicale e dalla presenza di peli radicali particolarmente sviluppati ed evidenti che vengono inclusi nell'analisi e computati come area radicale.

Bibliografia

Arnold A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21 (2): 51-66.

Avelar F.F., de Matos A.T., de Matos M.P., Borges A.C. (2014). Coliform bacteria removal from sewage in constructed wetlands planted with *Mentha aquatica*. *Environ Technology*, 35: 2095–2103.

Bacon C.W., Porter J.K., Robbins J.D., Luttrell E.S. (1977). *Epichloe typhina* from

- toxic tall fescue grasses. *Applied Environmental Microbiology*, 34: 576-581.
- Bailey K.L., Pitt W.M., Leggett F., Sheedy C., Derby J. (2011). Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. *Biological Control*, 59: 268–276.
- Bischoff J.F., White J.F. (2005). Evolutionary development of the Clavicipitaceae. In: Dighton J., White J.F., Oudemans P., eds. *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem*. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis, 505–518.
- Botella L. e Diez J.J. (2011). Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*, 47: 9–18.
- Branković S., Pavlović-Muratspahić D., Topuzović M., Glisić R., Milivojević J., Dekić V. (2012). Metals concentration and accumulation in several aquatic macrophytes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26: 2731-2736.
- Contreras-Cornejo H.A., Macias-Rodriguez L., Cortes-Penagos C., Lopez-Bucio J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxindependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149, 1579–1592.
- Contreras-Cornejo H.A., Macias-Rodriguez L., Vergara A.G., Lopez-Bucio J. (2015). *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul*, 34: 425–432.
- De Bary A. (1879). Die Erscheinung der Symbiose. In: Trubner KJ, ed. *Vortrag auf der Versammlung der Naturforscher und Ärzte zu Cassel*. Strassburg, Germany: Verlag, 1–30.
- Dolatabadi H.K., Goltapeh E.M., Moieni A., Jaimand K., Sardrood B.P., Varma A. (2011). Effect of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on plant growth and essential oil yield in *Thymus vulgaris* in vitro and in vivo experiments. *Symbiosis*, 53: 29–35.
- Fouda A.H., Hassan S.E.D., Eid A.M., Ewais E.E. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Sciences*, 60: 95–104.
- Fusconi A. (2014). Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: what role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation ?. *Annals of Botany*, 113: 19–33.
- Gay, G., L. Normand, R. Marmeisse, B. Sotta and J.C. Debaud. 1994. Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. *New Phytology*, 121: 645–657.

Gardes M. e Bruns T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113–118.

Glickmann E, Dessaux Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 793-6.

Gramaje D. e Armengol J. (2011). Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 95: 1040–1055.

Gravel V., Antoun H., Tweddell R.J. (2006). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 1968–1977.

Haichar F.E., Santaella C., Heulin T., Achouak W. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology Biochemistry*, 77: 69–80.

Hamann E. e Puijalon S. (2013). Biomechanical responses of aquatic plants to aerial conditions. *Ann Bot*, 112: 1869–1878.

Herrero, N., Sánchez Márquez, S., & Zabalgoeazcoa, I. (2009). Mycoviruses are common among different species of endophytic fungi of grasses. *Archives of Virology*, 154(2), 327–30.

Hyde K.D. e Soyong K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163.

Jaber L.R. e Vidal S. (2010). Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. *Ecological Entomology*, 35: 25–36.

Johnson, N. C., Graham, J. H., & Smith, F. A. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135(4): 575–586.

Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30: 3059–3066.

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647–1649.

- Khan A.L., Waqas M., Hamayun M., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A., Lee I.J. (2013). Co-synergism of endophyte *Penicillium resedanum* LK6 with salicylic acid helped *Capsicum annuum* in biomass recovery and osmotic stress mitigation. *BMC Microbiology*, 13: 51.
- López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M.F., Simpson J., Herrera-Estrella L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiologists*, 129: 244–256.
- Ludwig-Muller J. (2015). Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. *Journal of Plant Physiology*, 172: 4–12.
- Mandyam K.G., Roe J., Jumpponen A. (2013). *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biology*, 117: 250-260.
- Mandyam K.G. e Jumpponen A. (2015). Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Front Microbiology*, 5: 1–13.
- Márquez Luis., Regina Redman., Russell Rodriguez., Marilyn J. Roossinck. (2007). A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, 315 (5811): 513–5.
- Martinuz A., Zewdu G., Ludwig N., Grundler F., Sikora R.A., Schouten A. (2015). The application of *Arabidopsis thaliana* in studying tripartite interactions among plants, beneficial fungal endophytes and biotrophic plant-parasitic nematodes. *Planta*, 241: 1015–1025.
- Mucciarelli M., Scannerini S., Berteà C.M., Maffei M. (2002). An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha x piperita* L.: biological features and molecular studies. *Mycologia*, 94: 28–39.
- Mucciarelli M., Scannerini S., Berteà C., Maffei M. (2003). In vitro and in vivo peppermint (*Mentha x piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytologist*, 158: 579–591.
- Murashige T. e Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Murphy B.R., Doohan F.M., Hodkinson T.R (2015). Fungal root endophytes of a wild barley species increase yield in a nutrient-stressed barley cultivar. *Symbiosis*, 65: 1–7.
- Naumann M, Schüßler A, Bonfante P (2010). The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the Mollicutes. *ISME J* 4(7): 862–871.

Niemi, K., Vuorinen, T., Ernstsén, a, & Häggman, H. (2002). Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings in vitro. *Tree Physiology*, 22(17): 1231–9.

Okane I. e Nakagiri A. (2015). Assemblages of endophytic fungi on *Salicornia europaea* disjunctively distributed in Japan: towards clarification of the ubiquity of fungal endophytes on halophytes and their ecological roles. *Current Science*, 108: 1–10.

Okubara P.A. e Paulitz T.C. (2005). Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. *Root physiology: from gene to function. Plant and Soil*, 4: 215–226.

Peskan-Berghofer T., Shahollari B., Giong P.H., Hehl S., Markert C., Blanke V. (2004). Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum*, 122: 465–477.

Petrini O., (1991). Fungal endophytes of tree leaves, pp. 185-187. In: *Microbial ecology of the leaves* (Fokkema N., van den Heuvel J., Eds.). Cambridge University Press., Cambridge, UK.

Pitt J.I., Spotts R.A., Holmes R.J., Cruickshank R.H. (1991). *Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit. *Phytopathology*, 81: 1108–1112.

Rai M., Rathod D., Agarkar G., Dar M., Brestic M., Pastore G.M. (2014). Fungal growth promoter endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. *Symbiosis*, 62: 63–79.

Rodriguez R.J., White J.F Jr, Arnold A.E. (2009). Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182: 314–330.

Ronquist, F. e Huelsenbeck J.P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.

Rosa L.H., Vieira M.L.A., Santiago I.F., Rosa C.A. (2010). Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 73: 178–189.

Rudawska, M. and B. Kieliszewska-Rokicka. 1997. Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* in relation to their IAA-synthesizing activity. *New Phytology*, 137: 509–517.

Salas-Marina M.A., Silva-Flores M.A., Cervantes-Badillo M.G., Rosales-Saavedra M.T., Islas-Osuna M.A., Casas-Flores S. (2011). The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *J. Microbiology Biotechnology*, 21: 686–696.

Sandberg D.C., Battista L.J., Arnold A.E. (2014). Fungal endophytes of aquatic macrophytes: diverse host-generalists characterized by tissue preferences and geographic structure. *Microbial Ecology*, 67: 735–747.

Sati S.C. e Arya P. (2010). Assessment of root endophytic aquatic hyphomycetous fungi on plant growth. *Symbiosis*, 50:143–149.

Sherameti I., Venus Y., Drzewiecki C., Tripathi S., Dan VM., Nitz I. (2008). PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J*, 21: 799–807.

Su H, Kang J.C., Cao J.J., Mo L., Hyde K.D. (2014). Medicinal plant endophytes produce analogous bioactive compounds. *Chiang Mai J Sc*, 41: 1–13.

Sukumar P., Vlegué V., Vayssières A., Martin F., Tuskan G.A., Kalluri U.C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant Cell Environ*, 36: 909–919.

Tranvan, H., Y. Habricot, E. Jeannette, G. Gay and B. Sotta. 2000. Dynamics of symbiotic establishment between an IAA-overproducing mutant of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* and *Pinus pinaster*. *Tree Physiol*. 20:123–129.

Turina M. e Rostagno L. (2007). Virus-induced hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*: still an unresolved conundrum *Journal of Plant Pathology*, 89 (2): 165-178.

Vadassery J., Ritter C., Venus Y., Camehl I., Varma A., Shahollari B. (2008). The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 21: 1371–1383.

Vandenkoornhuysen P., Quaiser A., Duhamel M., Le Van A., Dufresne A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206: 1196-1206

Vaz A.B.M., Sampedro I., Siles J.A., Vasquez J.A., García-Romerac I., Vierheilig H. (2012). Arbuscular mycorrhizal colonization of *Sorghum vulgare* in presence of root endophytic fungi of *Myrtus communis*. *Applied Soil Ecology*, 61: 288–294.

Wachowska U. e Glowacka K. (2014). Antagonistic interactions between *Aureobasidium pullulans* and *Fusarium culmorum*, a fungal pathogen of winter wheat. *Biocontrol*, 59: 635–64.

Wang X.M., Yang B., Wang H.W., Yang T., Ren C.G., Zheng H.L. (2014). Consequences of antagonistic interactions between endophytic fungus and bacterium on plant growth and defense responses in *Atractylodes lancea*. *J of Bas Microbiol*, 55: 659–670.

Wani Z.A., Nasheeman A., Tabasum M., Riyaz-Ul-Hassan S. (2015). Plant-endophyte

symbiosis, an ecological perspective. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 2955–2965.

Waqas M., Khan A.L., Kamra M., Hamayu M., Kang S.M., Kim Y.H. (2015). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 9: 10754–10773.

White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. United States: Academic Press, pp. 315–322.

Zalar P., de Hoog G.S., Schroers H.J., Crous P.W., Groenewald J.Z., Gunde-Cimerman N. (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol*, 58: 157–183.

Zubek S. e Blaszkowski J. (2009). Medicinal plants as hosts of arbuscular mycorrhizal fungi and dark septate endophytes. *Phytochemistry Rev*, 8: 571–580

Secondo capitolo

Introduzione

Alcuni anni fa a Torino è stato isolato, da coltura *in vitro* di meristemi di *Mentha x piperita*, un endofita denominato PGP-HSF. Gli effetti di tale fungo su menta sono diversi in relazione alla tipologia di coltivazione. Sia in coltura *in vitro* che in terra il PGP-HSF induce un aumento della lunghezza nei fusti di menta (Mucciarelli et al., 2003). Nel primo caso tale effetto è imputabile sia all'aumento del numero di nodi che della lunghezza degli internodi mentre per le piante coltivate in vaso l'allungamento del fusto è influenzato unicamente dall'aumento del numero dei nodi. Complessivamente si evidenzia un effetto stimolante del PGP-HSF che porta all'aumento della massa secca di foglie, fusti e radici; in queste ultime promuove un'intensa ramificazione verosimilmente legata ad una variazione ormonale.

Oltre a variazioni di tipo quantitativo come l'aumento del L.A.I. (Leaf Area Index) nelle piante inoculate si nota una variazione della forma della lamina ed in particolare del margine fogliare. Le piante di menta piperita cresciute a contatto del micelio sono più ricche del terpene mentolo e presentano superiori caratteristiche sensoriali e commerciali. In presenza di PGP-HSF le piante di menta piperita convertono più velocemente precursori metabolici come il limonene e, più avanti nella sintesi, il mentone in mentolo ed isomentolo, accelerando così il processo che porta alla formazione di molecole tipiche delle piante "mature". Le proprietà del PGP-HSF come promotore di crescita sono confermate anche su colture *in vitro* di *Vetiveria zizanioides*,

una monocotiledone con meccanismo fotosintetico C4, che in seguito al trattamento con il fungo endofita promotore migliora l'efficienza fotosintetica (Mucciarelli, 1997).

Attualmente si sa che PGP-HSF è in grado di produrre in coltura pura gibberelline e acido indolacetico anche in assenza di triptofano nel mezzo di coltura. Successivamente è stato anche testato l'effetto su un'altra specie appartenente allo stesso genere: *M. spicata* (Dho, 2005) nella quale i terpenoidi più caratteristici dell'olio essenziale sono il trans-carveolo e il carvone (spearmint).

Quando le piante di *M. spicata*, crescono a contatto di PGP-HSF presentano un numero maggiore di foglie per pianta rispetto alle piante di controllo, anche se le foglie delle piante trattate con il fungo risultano più piccole rispetto a quelle delle piante non inoculate. Come in *M. x piperita*, l'effetto dell'endofita su *M. spicata* induce un generale effetto promotore promuovendo oltre che le biomasse anche lo sviluppo radicale (Dho, 2005).

Per quel che concerne la morfologia, il PGP-HSF presenta ife ialine di diametro generalmente compreso tra 1,5 e 1,8 μm , *Acremonium* simili, provviste di setto poco evidente. Le ife si sviluppano in modo differente a seconda del terreno di coltura: possono disporsi in modo omogeneo oppure raggrupparsi in cordoni miceliari. Il micelio coltivato su diversi substrati e mantenuto in condizioni ambientali differenti non ha mai prodotto spore né conidi (Mucciarelli et al., 2002). Questo ha impedito l'identificazione morfologica del campione e ha reso necessario il ricorso alle tecnologie molecolari.

Dallo studio condotto da Mucciarelli et al. (2002) della zona 18s rDNA si arriva alla conclusione che tale campione è un membro dei Pyrenomycetes appartenente alla subclasse Sordariomycetidae, affine al genere *Ophiostoma*. Nel 2005, dalle analisi condotte dalla Dott.ssa. Wanda Camusso (comunicazione personale), sempre riguardanti sequenze parziali 18S rDNA, l'isolato PGP-HSF si posiziona come sister-clade delle Magnaporthaceae, ben separato dalle Ophiostomatales. Sempre dalla stessa fonte, dall'analisi delle regioni ITS1 e ITS2 si evidenzia una certa somiglianza al genere *Phaeoacremonium*. Dalle analisi precedentemente condotte non si giunge a risultati conclusivi sebbene risulti ipotizzabile che il PGP-HSF si collochi all'interno della classe Sordariomycetes.

Lo scopo principale del seguente studio è quello di valutare l'effetto di PGP-HSF sullo sviluppo di due cultivar di basilico ("italiko" e "lattuga") comparandolo con quello indotto su *Mentha x piperita*.

Per saggiare l'effetto dell'endofita su basilico, sono state condotte due differenti prove, una utilizzando plantule coltivate su sabbia di quarzo in condizioni di sterilità in microbox e l'altra *in vitro*.

Il primo metodo ha il vantaggio di valutare l'effetto del fungo su piante dotate di una radice fittonante e non avventizia, simulando maggiormente una situazione naturale; di contro, tale metodologia evidenziava lo svantaggio di trattare piante diverse da un punto di vista genetico e potenzialmente più ricche di altri endofiti, che date le condizioni colturali sarebbero potuti rimanere latenti per tutta la prova senza manifestarsi in modo evidente. La coltura *in vitro* aveva il vantaggio di ottenere piante omogenee da un punto

di vista genotipico, e meglio private di eventuali endofiti provenienti dalla pianta stessa; questo perché durante le fasi di micropropagazione su terreni nutritivi gli endofiti possono svilupparsi e le piante contaminate o le porzioni delle stesse vengono eliminate. Di contro, la coltura in vitro è una tecnica molto distante dalle condizioni di campo del basilico. La coltura in vitro “classica” in tubi può limitare lo sviluppo epigeo delle piante, in quanto impone una crescita particolarmente contenuta alle foglie. Inoltre la limitata superficie di scambio con l’aria per volume di terreno, in particolar modo, in presenza di funghi endofiti in grado di compiere respirazione aerobia, potrebbe rappresentare un ambiente ostile alla crescita delle piante.

Pertanto, si è preferito testare l’effetto dell’endofita su talee di basilico, anziché nei tubi, in capsule quadrate in modo analogo a quanto fatto nella prima prova su *Arabidopsis*.

Scopi del lavoro:

Alla luce di quanto precedentemente esposto, il presente lavoro si prefiggeva di effettuare:

1. Una revisione dello status tassonomico del PGP-HSF alla luce delle nuove sequenze depositate in GenBank; riamplicazione e sequenziamento della regione ITS per confermare l’identità del fungo dopo diversi anni di propagazione.
2. Una valutazione degli effetti dell’endofita sulla germinazione del basilico
3. Una valutazione della capacità dell’endofita di indurre modificazioni simili a quelle osservate in menta piperita anche in piante di basilico, coltivate nelle due diverse modalità su menzionate

Materiali e metodi

1. Identificazione molecolare

L'amplificazione della regione ITS è stata condotta seguendo il protocollo riportato nel capitolo precedente, e confrontata con quelle analizzate per lo stesso isolato in anni precedenti, per confermare l'identità dell'endofita. Le sequenze ITS ottenute, e la sequenza precedentemente ottenuta SSU in Mucciarelli et al. (2002) sono state confrontate con quelle presenti in GenBank usando l'algoritmo Blastn in Blast ([www.http://blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

L'allineamento delle sequenze omologhe è stato condotto con MAFFT v 7.017 (Katoh et al., 2002). I modelli evolutivo sono stati scelti sulla base dei valori di AIC e BIC stimati con Mega6.06 (Tamura et al., 2013).

L'analisi filogenetica, Maximum likelihood e Bayesiana è stata condotta rispettivamente con RAxML v.7.2.8. (Stamatakis, 2006) and MRBAYES v. 3.2.4 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

2. Sterilizzazione dei semi di basilico nella prova di germinazione e nei microbox

I semi sono stati posti in una provetta nella quale si è aggiunta acqua purificata e sterilizzata. Dopo 5 minuti di agitazione, l'acqua è stata eliminata con una pipetta posizionando la porzione distale della stessa, in fondo alla provetta. Tale operazione è stata ripetuta tre volte (lavaggio). Successivamente si è aggiunta una soluzione di ipoclorito di sodio al 1% e dopo aver agitato per 5 minuti è stato eliminato utilizzando

un setaccio precedentemente sterilizzato. E' stato eseguito un lavaggio abbondante. I semi sono stati posti a contatto dell'acqua sterile per 40 minuti prima di essere utilizzati.

3. Coltivazione di PGP-HSF in coltura liquida

Un dischetto di un centimetro di diametro, prelevato dalla zona di crescita del fungo coltivato su piastre contenenti MEA e stato messo in una beuta sterile contenente 100 ml di ME precedentemente sterilizzato in autoclave. La beuta, dopo essere stata chiusa con tappo di cotone è stata messa in agitazione a 180 rpm. Ogni dieci giorni, 2 ml di terreno contenente il fungo sono stati travasati in una nuova beuta contenete 200 ml di ME.

4. Prova di germinazione condotta su basilico

Cento semi sterili di basilico "italiko" sono stati posizionati in tre capsule petri del diametro di 15 cm contenenti due fogli di carta da filtro sterili imbevuti con 6-7 ml di acqua distillata. Nel caso del trattato con PGP-HSF, si sono aggiunti 2 ml di acqua distillata e 6 ml di terreno liquido (ME) con l'endofita. Le capsule, dopo essere state chiuse con parafilm, sono state poste in cella climatizzata alla temperatura di 24°C per 7 giorni.

5. Coltivazione del basilico inoculato con PGP-HSF in microbox

Le plantule di basilico sono state coltivate in modo analogo a quanto riportato nella prova di germinazione, includendo un controllo e un trattato in fase pre-germinativa.

Le plantule dopo 7 giorni, sempre sotto cappa sterile, sono state trapiantate nei contenitori di plastica; ognuna è stata trapiantata al centro del microbox utilizzando una

spatola sterile per ricoprire le radici con il quarzo.

I microbox erano stati precedentemente riempiti con 300 ml di sabbia di quarzo e 100 ml di soluzione LONG ASHTON (L.A.) in modo da inumidire in modo omogeneo la sabbia. Nella soluzione L.A. è stata ridotta la % di bifosfato di sodio NaH_2PO_4 (Trotta et al., 1996) .

La concentrazione finale dei nutrienti presenti nella soluzione L.A. È riportata in Tab. 1.

Tab. 1: soluzione LONG ASHTON (L.A.)	
Sostanza	Conc. finale
<u>MACRONUTRIENTI</u>	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,75 mM
KNO_3	2 mM
NaH_2PO_4	32 μM
FeNaEDTA	50 μM
<u>MICRONUTRIENTI</u>	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 μM
H_2BO_3	40 μM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 μM
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 μM
NaCl	100 μM

I microbox prima del trapianto sono stati sterilizzati in autoclave.

Parte dei trattati sono stati inoculati direttamente da seme (S) mentre un altro gruppo è stato inoculato tre giorni dopo il trapianto, con applicazioni fogliari e al colletto (P). Per

le applicazioni fogliari sono stati aggiunti 0.2 ml prelevati da beuta come nella precedente prova. Per parte dei trattati si è effettuato un successivo rinforzo dopo dieci giorni dal trapianto (SI: un inoculo su seme e uno successivo su pianta e PI: un inoculo su plantula ed uno su pianta) per meglio facilitare il contatto fungo-pianta ed esaltarne le eventuali interazioni.

Per ogni trattamento e il controllo sono state utilizzate cinque piante, seguendo lo schema sintetizzato in Tab. 2, le piante sono state espianate per le analisi dopo 37 giorni dal trapianto.

Tab. 2: Schema dell'esperimento	
C	nessun contatto con PGP
SO	inoculo del seme
PO	inoculo della plantula al momento del travaso in microbox
SI	inoculo del seme e successivo reinoculo della plantule
PI	inoculo della plantula e successivo reinoculo

6. Coltura in vitro delle piante di basilico

Le piante che sono state utilizzate per la propagazione vegetativa, sono state prodotte a partire da una semina, effettuata sotto cappa sterile, secondo il seguente schema:

- 6) Trasferimento dei semi in becker contenente etanolo al 70 % per 4'
- 7) Risciacquo in H₂O d per 10''
- 8) Lavaggio con soluzione di ipoclorito di sodio 5% v/v +2 µl di tween 20 allo 0.01% per 5 min

- 9) Risciacquo in H₂O d per 5'
- 10) Lavaggio con soluzione di ipoclorito di sodio 5% v/v +2 µl di tween 20 allo 0.01% per 5 min
- 11) Lavaggio con H₂O d sterile per 3-4 volte tramite l'utilizzo di pipette Pasteur sterili con zaffo in cotone
- 12) I semi sono stati messi a germinare in scatole magenta riempite con circa 200 ml di mezzo MS agarizzato.

Le magenta dopo la semina sono state trasferite in cella climatica impostando un fotoperiodo di sedici ore di luce, ad intensità di illuminazione di $100 \cdot 10^{-6} \text{ mol/m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, e una temperatura di 26 °C nella fase di luce e di 22 °C nella fase notturna. Tutte le sperimentazioni su basilico in vitro sono state condotte in questa cella e a queste condizioni.

Le colture sono state mantenute in queste condizioni per circa 50 giorni fino allo sviluppo di piante con gemme ascellari. Gli apici e i nodi di queste ultime sono state utilizzati come espianti per l'allestimento delle colture in vitro.

Dagli apici si sono ottenute le talee utilizzate per la parte sperimentale condotta su basilico "Italiko" (Fig 1b).

Per il basilico "lattuga", sono state utilizzate delle talee di fusto, comprendenti un nodo con i due meristemi (Fig 1a).

Per le colture in vitro in tubo si sono utilizzati tubi in veto del diametro di 3 cm riempiti con circa 30 ml di MS.

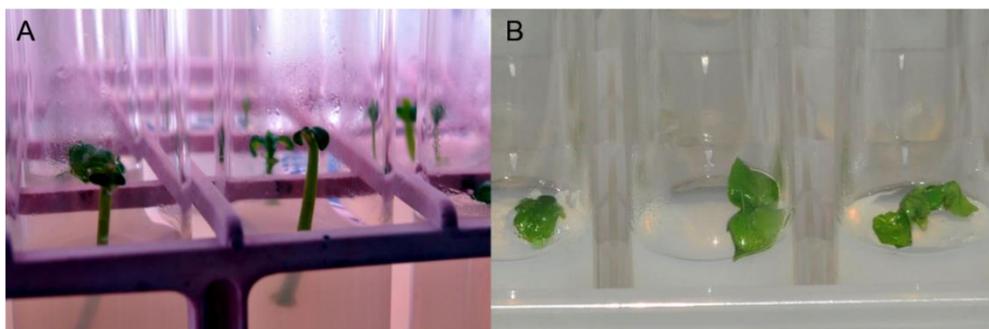


Fig. 1: A: Talee di fusto con doppia gemma ascellare di basilico “lattuga”. B: Talee di basilico “italiko”.

6.1. COLTURA DI PGP-HSF E INOCULO

Il fungo PHP-HSF è stato mantenuto in piastre contenenti terreno MEA a 20 °C e al buio mediante trapianto di porzioni di micelio su mezzo fresco ogni 20 giorni. Prima di essere inoculato, piccole porzioni di micelio sono state trasferite in tubi contenenti MS, per “acclimatare” il fungo alle nuove condizioni, e solo dopo la colonizzazione del mezzo il fungo è stato utilizzato. Per gli inoculi, si è utilizzata una porzione circolare di 5-6 mm di diametro di terreno contenente il fungo che è stata posizionata in prossimità della porzione basale della pianta, spingendo il propagulo nel mezzo.

6.2. Esperimento su basilico inoculato con PGP-HSF in tubi

Otto talee di fusto di basilico “lattuga” sono state trapiantate in tubi; dopo una settimana, in 4 tubi, è stato inoculato PGP-HSF.

Quattordici apici vegetativi, di basilico italico sono stati trapiantati in tubi; dopo una settimana, in 7 tubi, è stato inoculato il fungo.

Dopo 50 giorni dall’inoculo, dopo l’espianto, sono state misurate le biomasse secche dell’apparato radicale, del germoglio, e calcolati i pesi secchi delle piante.

6.3. Esperimento su basilico italico inoculato con PGP-HSF in capsule quadrate

Venti apici di basilico italico sono stati trasferiti al centro di altrettante piastre quadrate 120 x 120 mm contenenti MS. Metà delle capsule sono state inoculate e successivamente le capsule sono state posizionate verticalmente. Dopo 35 giorni dall'inoculo si è proceduto all'espianto e si sono misurati i seguenti caratteri: peso secco e fresco del germoglio e delle radici, lunghezza dell'apparato radicale, numero di radici laterali, numero di foglie, numero di nodi e superficie fogliare. Inoltre sono stati calcolati: rapporto peso secco radice/ peso secco germoglio.

7. Analisi radicale condotta su piante di basilico coltivate in microbox

Le plantule sono state lavate, immerse in capsule di vetro contenenti acqua e scannerizzate ottenendo un file in formato tiff.; successivamente analizzate con il software WinRHIZO™.

I parametri considerati, per 5 piante per trattamento, prelevate random dalle tre capsule per trattamento, sono stati:

- Lunghezza totale dell'apparato radicale
- Numero di apici per apparato radicale
- Indice di Radicazione (IR) calcolato come il rapporto tra la lunghezza radicale (cm) e il numero di apici radicali.

8. Analisi microscopiche per valutare le interazioni pianta fungo

Una prima analisi è stata condotta in acqua osservando sezioni di fusti, foglie e radici. Successivamente i campioni sono stati colorati con Blu lattico, Rosso congo e Floxin B per evidenziare la presenza delle ife.

Per le osservazioni radicali, si è anche proceduto con la chiarificazione dei campioni in una soluzione acquosa di KOH al 10%, ad una temperatura di 60 °C per 30 minuti. Questo procedimento aveva lo scopo di decolorare i tessuti vegetali consentendo, al momento dell'analisi al microscopio, una migliore osservazione delle strutture fungine. I campioni sono stati poi sciacquati in acqua deionizzata, successivamente immersi nel colorante per qualche secondo, tamponati su carta bibula e decolorati in acido lattico, quando precedentemente colorati in Blu lattico. Infine sono stati montati su vetrino, in acido lattico, o acqua e sono stati osservati al microscopio ottico.

Il blu lattico permette di evidenziare le pareti del fungo, che rimangono colorate di un blu intenso, e quindi di valutare l'area colonizzata dalle ife fungine.

Per la microscopia a fluorescenza sono stati preparati dei campioni seguendo la seguente metodologia proposta da Eddine et al. (2002): sono state eseguite delle sezioni di fusto, foglie e radici; dopo essere state lavate in acqua distillata sono state incubate con una soluzione al 2% (p/v) di BSA in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente, poi lavate tre volte con PBS/Tween 20 e poi incubati con FITC-coniugato WGA (0.1 mg ml⁻¹ in PBS, 1% (p/v) (BSA). La metodologia sopracitata, grazie alla capacità del WGA di legarsi a residui di N-acetilglucosamina presenti nelle pareti cellulare dei funghi, permette di evidenziare la presenza delle ife anche all'interno dei tessuti vegetali.

Le osservazioni sono state fatte con un microscopio Nikon Eclipse 400.

9. Analisi statistica.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma Statview 4.5 ed il programma Microsoft® Excel (versione 2013) per tutti gli esperimenti ad eccezione della prova condotta *in vitro* in capsule quadrate dove è stato utilizzato il software R.

Per le analisi condotte *in vitro*, dove è stato fatto un confronto tra un controllo e un trattato, si è utilizzato il **test di Student**. Per le analisi condotte nell'esperimento in microbox, ove era presente un controllo e più trattamenti è stata eseguita una ANOVA e nel caso vi fossero state differenze significative, con valori di $p < 0.05$, si è proceduto con l'analisi a posteriori PLDS di Fisher. Per $p \leq 0,05$ le differenze, tra i parametri presi in esame, si sono considerate significative; per valori di $p \leq 0,001$ si sono considerate altamente significative; per valori superiori a 0,05 non significative. Negli istogrammi la barra rappresenta l'errore standard. Nel caso del test di germinazione è stato utilizzato il test χ^2 .

Risultati

1. Inquadramento sistematico del fungo PGP-HSF e risultati delle analisi molecolari

L'analisi della regione ITS ha fornito una sequenza di 579 bp con omologia al 100% con la sequenza precedentemente depositata in GenBank di PGP-HSF (DQ227290) confermando l'identità del fungo. Dal confronto con BLASTn, altre 5 sequenze presentavano un'omologia maggiore/uguale al 99%. Tutte le 5 sequenze appartengono a funghi endofiti di piante terrestri o acquatiche. L'analisi della regione ITS, non aveva

fornito omologie maggiori o uguali al 97%, soglia generalmente accettata come “cut-off” per una identificazione a livello specifico, con altre sequenze referenziate.

Dall’analisi filogenetica condotta sulla regione SSU rDNA, sia l’analisi Bayesiana, che Maximum likelihood producevano la stessa tipologia di albero. Di seguito viene presentato solo l’albero Bayesiano con i riferimenti di BPP e MLB (Fig. 1). Per la realizzazione dei due alberi di era scelto il modello GTR+G+I.

Questo albero, confermava la collocazione di PGP-HSF all’interno della Classe Sordariomycetes in accordo con uno studio precedente (Mucciarelli et al., 2002); Il campione PGP-HSF si è collocato come sister clade di Magnaporthaceae, con valori di MLB = 55 e BPP = 0.90; l’intero clade della Famiglia Magnaporthaceae considerato e il campione PGP-HSF, hanno formato il sister clade dell’Ordine Ophiostomatales con valori di MLB = 82 e BPP = 1.00. Tali risultati, non hanno permesso di includere con certezza PGP-HSF in alcuna famiglia all’interno della Classe Sordariomycetes, posizionandolo tra due differenti Famiglie. Successive analisi, di altre regioni, potranno forse chiarire il posizionamento del campione all’interno dei Sordariomycetes.

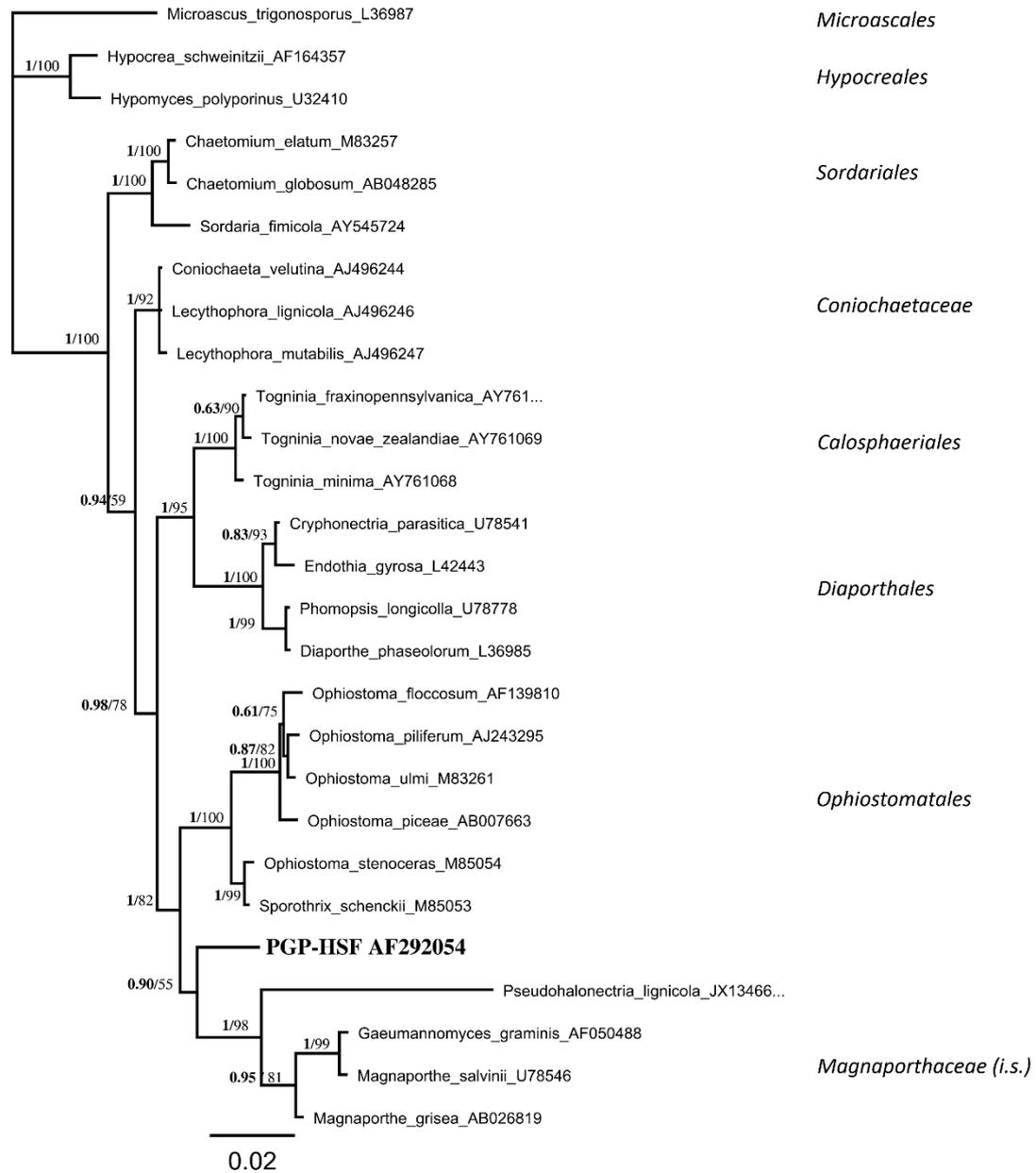


Fig. 2: . Albero Bayesiano ottenuto dall'analisi della regione LSU. *Microascus trigonosporus* è stato usato come outgroup. Solo i valori di BPP maggiori di 0.50 (in grassetto) e i valori MLB sopra il 50% sono stati indicati. PGP-HSF è evidenziato in grassetto.

2. Prove di germinazione.

Basilico		
CONTROLLO	n°semi	%
Germinati	69	81.2
non germinati	16	18.8
TOTALE	85	100

Basilico		
Trattato con PGP	n°semi	%
germinati	41	78.8
non germinati	11	21.2
TOTALE	52	100

Tab.3: Percentuali di germinazione delle piante di basilico “italiko”

I semi di basilico, trattati con PGP-HSF e terreno di coltura ME, hanno mostrato una percentuale di germinabilità del 79% rispetto all’81% del controllo non evidenziando influenze significative. In entrambi i casi si sono notate delle plantule con sviluppo radicale anomalo, ove l’apice radicale seguiva un geotropismo negativo e gli apici si presentavano necrotizzati (Fig. 3).

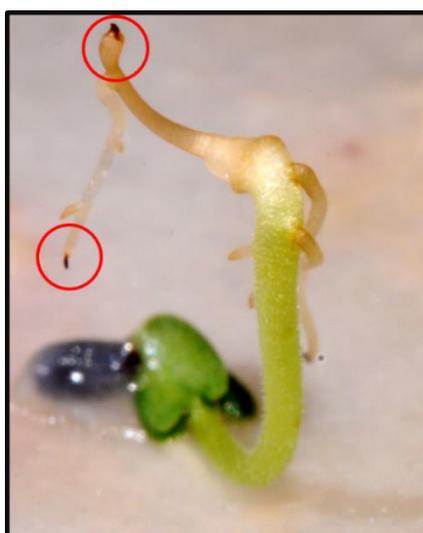


Fig. 3: Plantule di basilico “italiko”, cresciute a contatto di PGP-HSF coltivato in ME, che presentano geotropismo negativo e apici radicali necrotici.

Basilico		
CONTROLLO	n°semi	%
plantule	63	91.3
plantule aberranti	6	8.7

Basilico		
PGP - substrato	n°semi	%
germinati senza anomalie	27	65.9
germinati con anomalia	14	34.1

Tab.4: Percentuali di piante che presentano geotropismo negativo in basilico.

Il contatto con la coltura liquida contenete PGP-HSF, aveva incrementato la percentuale delle piante con questa anomalia passando dal 9% del controllo al 34% del trattato in modo altamente significativo.

3. Effetto sull'apparato radicale delle piante di basilico in microbox

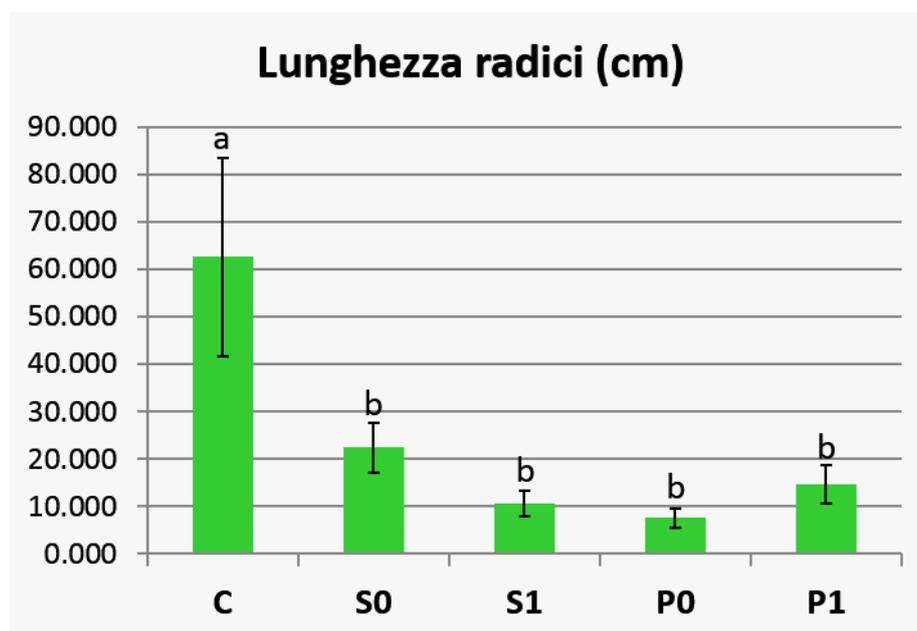


Fig. 4: Lunghezza dell'apparato radicale in piante di basilico "italiko" coltivate in microbox. C: piante non inoculate; SO: piante inoculate alla germinazione; S1: piante inoculate alla semina e sul germoglio; PO: piante inoculate sul germoglio; P1: piante inoculate due volte sul germoglio. Le lettere indicano le differenze evidenziate dal test PLDS di Fisher per $p < 0,05$.

Tutti i trattamenti, PO, SI, PI e SO, avevano indotto una riduzione nella lunghezza dell'apparato radicale rispettivamente del 88%, 83%, 77% e del 64% in modo significativo rispetto al controllo (Fig.4). Le diverse modalità di inoculo non avevano influenzato in modo diverso questo parametro.

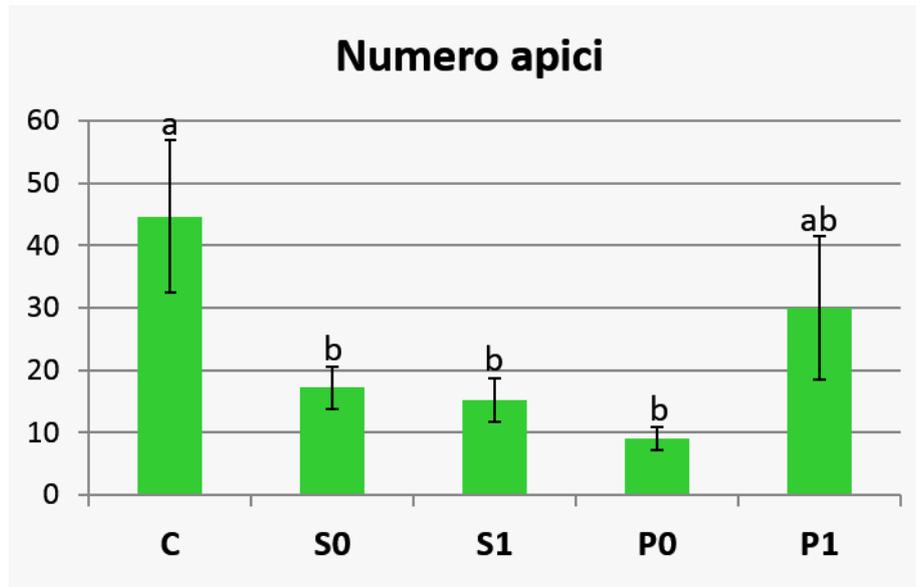


Fig. 5: Numero di apici radicali su piante di basilico italico coltivate in microbox. C: piante non inoculate; SO: piante inoculate alla germinazione; S1: piante inoculate alla semina e sul germoglio ;PO: piante inoculate sul germoglio; P1: piante inoculate due volte sul germoglio. Le lettere indicano le differenze evidenziate dal test PLDS di Fisher per $p < 0,05$.

Tre trattamenti, PO, SI e SO avevano negativamente influenzato in modo significativo il numero di apici radicali, riducendoli rispettivamente del 80%, 66% e 61% (Fig.5). Il doppio trattamento alle plantule e successivamente alle piantine, ne aveva ridotto il numero del 33%, ma non in modo significativo, comportandosi in modo intermedio tra trattamento e controlli. L'alto valore di errore standard delle piante "PI" evidenziava comunque una risposta diversificata nelle cinque piante trattate.

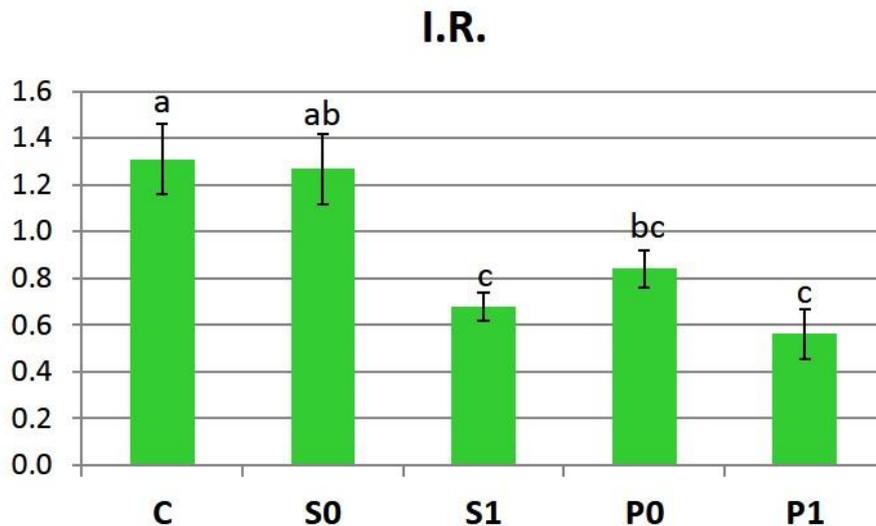


Fig. 6: Indice di Radicazione (IR) calcolato come il rapporto tra la lunghezza radicale (cm) e il numero di apici radicali su piante di basilico italico coltivate in microbox. C:piante non inoculate; S0: piante inoculate alla germinazione; S1: piante inoculate alla semina e sul germoglio ;P0: piante inoculate sul germoglio; P1: piante inoculate due volte sul germoglio. Le lettere indicano le differenze evidenziate dal test PLDS di Fisher per $p < 0,05$.

Il rapporto tra la lunghezza radicale e il numero degli apici radicali (I.R.), è stato ridotto in modo significativo nei trattamenti PI, SI e PO rispettivamente del 54%, 46% e 39% (Fig. 6). I.R. è rimasto praticamente invariato rispetto al controllo, quando l'inoculo avveniva unicamente al momento della germinazione.

Le immagini in Fig. 7 mostrano due piante rappresentative, una appartenete al controllo e l'altra inoculata due volte sulla parte epigea (PI). Nell'immagine si nota la presenza massiccia di lunghi peli radicali presenti nella pianta trattata con PGP-HSF.

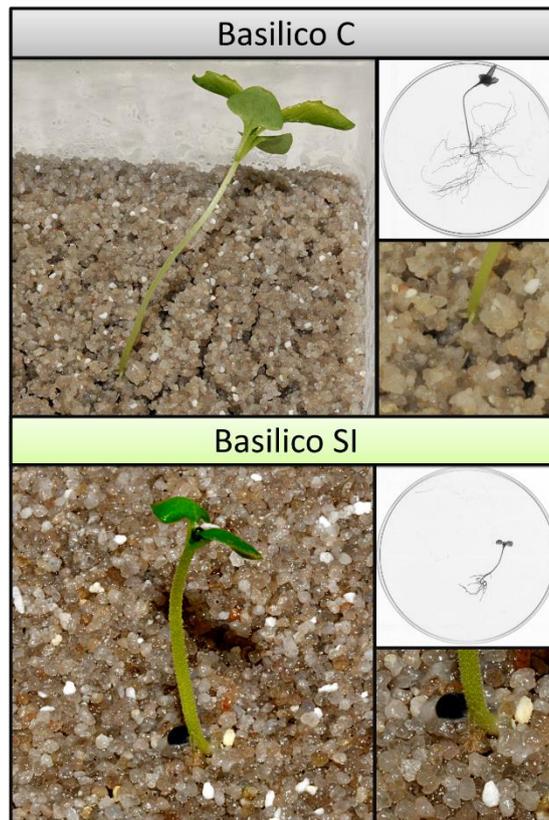


Fig. 7: Piante di basilico coltivate in microbox dopo 44 giorni dalla semina. C: controllo; S1: pianta che è stata inoculata alla semina e successivamente sulla talea. Nella foto in alto si nota una radice in prossimità del colletto liscia (C). Nella foto in basso in evidenza una radice fortemente tomentosa per la presenza di abbondanti peli radicali (S1).

Complessivamente tutti i trattamenti hanno ridotto lo sviluppo radicale.

4. Analisi microscopiche condotte sulle piante in microbox

Le analisi non hanno evidenziato l'entrata del fungo e la sua presenza negli spazi intercellulari sia nella parte epigea che ipogea. Dall'analisi microscopica è emerso uno stato necrotico degli apici radicali e di parte degli abbozzi presenti sulla radice principale simili a quelli osservati nella prova di germinazione.

5. Effetto sullo sviluppo delle biomasse in vitro di due cultivar di basilico in tubi.

Nei Boxplot, i controlli sono stati colorati in verde e i trattati con PGP-HSF in rosso

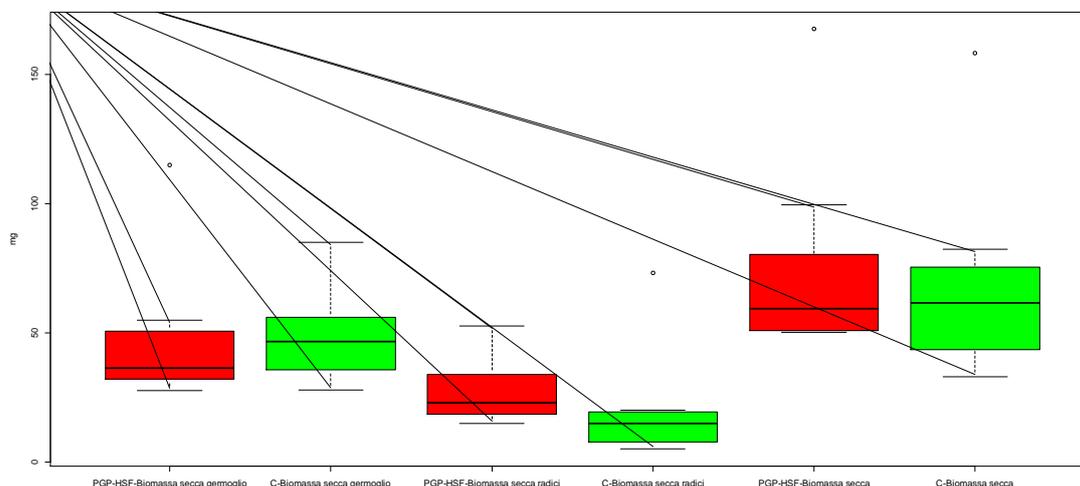


Fig. 8: Box plots mostranti l'effetto sulle biomasse secche (mg) del germoglio, della radice e dell'intera pianta di piante di basilico italico classico. I Box plots mostrano le differenze tra le piante utilizzate come controllo (C; box verde) e le piante inoculate con PHP-HSF (PGP; box rosso). Gli asterischi posti sopra il box indicano le differenze dei trattati rispetto ai controlli calcolate con il t-test: $p < 0.05$ * and $p < 0.01$ **.

Il contatto con PGP-HSF non ha influenzato in modo significativo le biomasse secche delle piante di basilico "italiko" coltivate in tubi (Fig.8). Malgrado l'assenza di variazioni significative, nel caso del perso secco delle radici e dell'intera pianta si era registrato un aumento rispettivamente del 32% e del 10%.

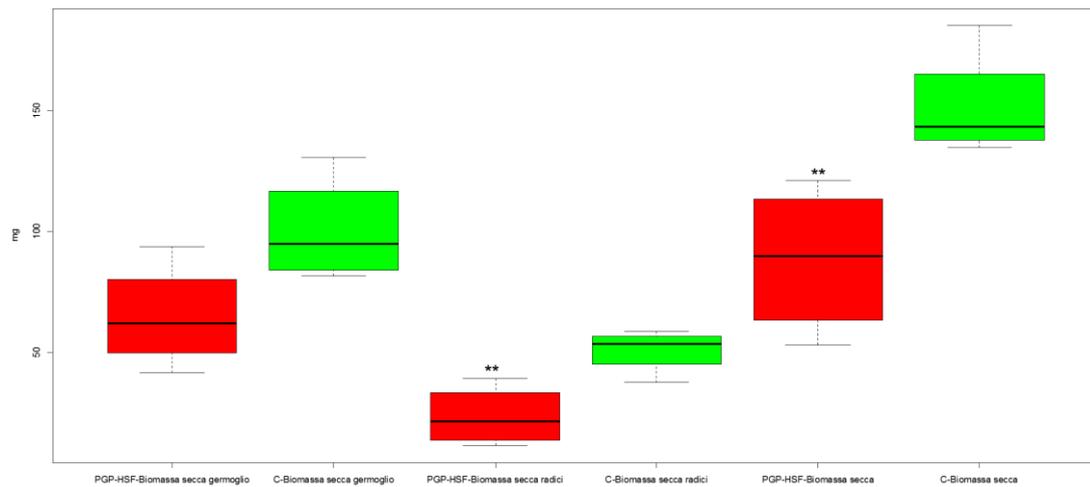


Fig. 8: Box plots mostranti l'effetto sulle biomasse secche (mg) del germoglio, della radice e dell'intera pianta di piante di basilico "lattuga" dopo 50 giorni dall'inoculo. I Box plots mostrano le differenze tra le piante utilizzate come controllo (C; box verde) e le piante inoculate con PHP-HSF (PGP; box rosso). Gli asterischi posti sopra il box indicano le differenze dei trattati rispetto ai controlli calcolate con il t-test: $p < 0.05$ * and $p < 0.01$ **.

Nel Basilico "lattuga", il fungo PGP-HSF ha fatto registrare una diminuzione significativa delle biomassa secca delle radici e del peso totale della pianta (Fig.8) riducendole rispettivamente del 54% e 42% rispetto al controllo.

6. Analisi microscopiche condotte sulle piante coltivate in vitro

Le analisi, come nell'esperimento precedente, non hanno evidenziato l'entrata del fungo e la sua presenza negli spazi intra e intercellulari sia nella parte epigea che ipogea. A livello morfologico, in entrambe le cultivar, è stato osservato in alcune piante inoculate un inspessimento delle radici (Fig.9b-10) rispetto a quello tipico della maggior parte delle piante (Fig.9a). In un caso, nella tipologia radicale inspessita, si è riscontrata una modesta presenza di lieviti, frutto di una probabile contaminazione, mentre negli altri casi l'analisi microscopica, non aveva evidenziato la presenza di altri microrganismi.



Fig. 9: A: radice di basilico italiko coltivato in tubo. B: radice di basilico italiko coltivato in tubo con la presenza del fungo PHP-HSF



Fig. 10: Radici “atipiche” di piante di basilico “lattuga” coltivate in tubi con presenza di PHP-HSF con radici laterali corte e ingrossate.

Le piante che presentavano un apparato radicale ispessito, morfologicamente simile a quello indotto dai funghi ectomicorrizici, presentavano una parziale degenerazione e sfaldamento dell’epidermide e dello strato sottostante della corteccia. I peli radicali, nelle radici “tipiche” presentavano forma cilindrica, mentre nelle radici che avevano mostrato anomalie assumevano forme variabili, da lageniformi, a nettamente allargati

e deformati nella parte centrale del pelo. In alcuni casi si erano evidenziati dei peli con apice ingrossato.

Probabilmente, nel caso di queste radici “anomale”, la pianta era entrata in una condizione di ipossia, forse anche a causa del consumo di ossigeno da parte dei funghi.

Il dimorfismo dei peli radicali non si è mai presentato nel caso di radici verdi.

7. Effetto sullo sviluppo di basilico “italiko” in capsule quadrate

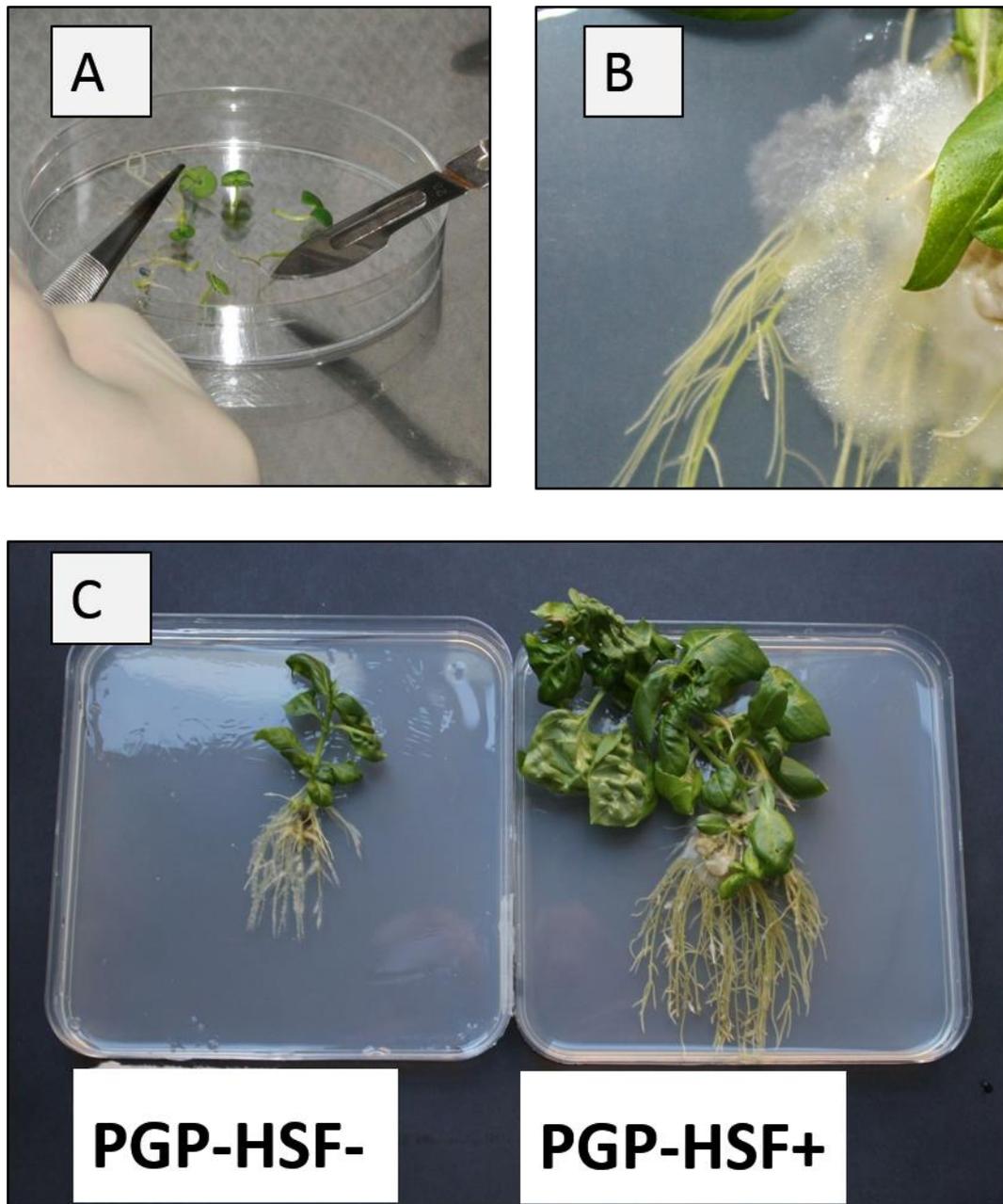


Fig. 11: A: Talee utilizzate per avviare la coltura in vitro del basilico “italiko”. B: micelio del fungo endofita PGP-HSF cresciuto a diretto contatto dell’apparato radicale. C: piante di basilico dopo 35 giorni di coltura in vitro in capsule quadrate con ME, crescita senza endofita (sinistra) e con endofita (destra).

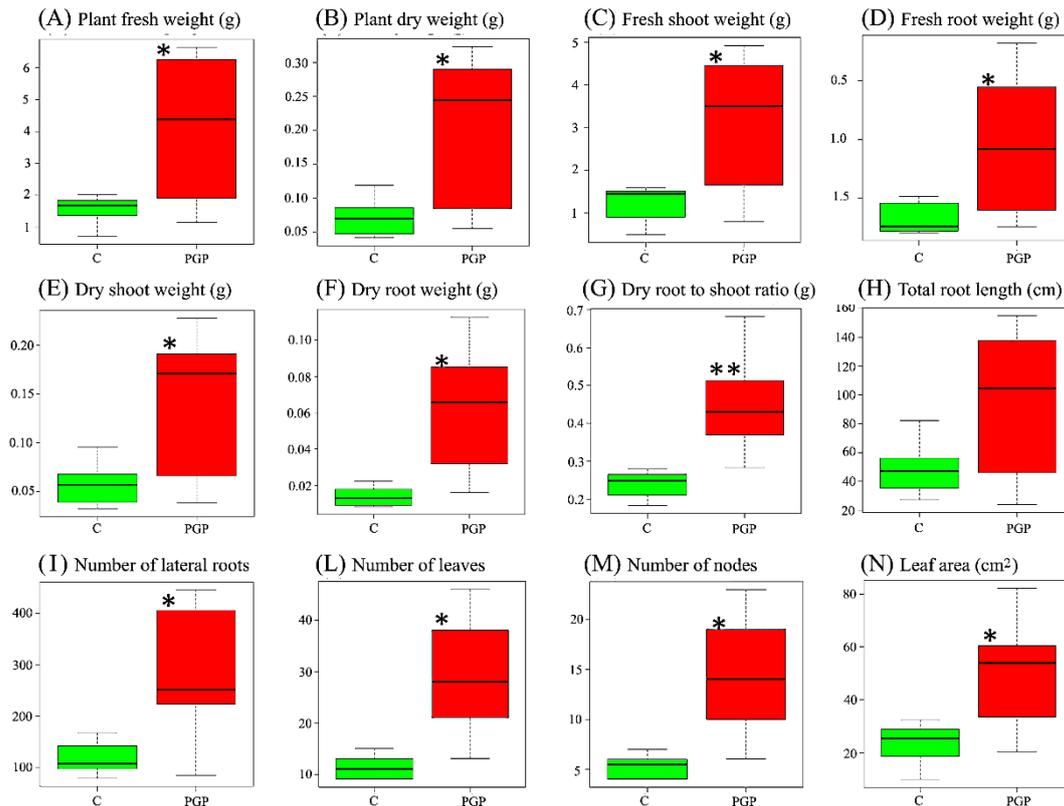


Fig. 13: Effetto di PGP-HSF sui diversi parametri analizzati dopo 35 giorni dall'inoculo in coltura in vitro in capsule quadrate. I Box plots mostrano le differenze tra le piante utilizzate come controllo (C; box verde) e le piante inoculate con PHP-HSF (PGP; box rosso). A: Peso fresco delle piante (g). B: Peso secco delle piante (g). C: Peso fresco del germoglio (g). D: Peso fresco della radice (g). E: Peso secco del germoglio (g). F: Pesos secco della radice (g). G: Rapporto peso secco radice/peso secco germoglio (g). H: Lunghezza della radice (cm). I: Numero di radici laterali. L: Numero di foglie sviluppate. M: Numero di nodi. N: Superficie fogliare (cm²)

Gli asterischi posti sopra il box indicano le differenze dei trattati rispetto ai controlli calcolate con il t-test: $p < 0.05$ * and $p < 0.01$ **.

Le piante complessivamente presentavano un buono sviluppo (Fig 11 C), in nessun caso erano presenti radici con i segni di sofferenza osservati negli esperimenti nei tubi. Nelle capsule trattate, il fungo PGP-HSF era cresciuto in abbondanza avvolgendo parzialmente l'apparato radicale (Fig. 11 B).

Il peso fresco e peso secco delle piante di basilico mostravano un aumento del valore medio (Fig. 12 A,B) rispettivamente del 160% e 181% rispetto al controllo, a causa dell'incremento del peso fresco e secco sia delle radici che del germoglio (Fig. 12C-F).

La presenza dell'endofita influenzava anche il numero di foglie che passavano da 11 nei controlli a 29 nei trattati registrando un aumento significativo medio del 153%. Anche il numero di nodi e la superficie fogliare erano incrementati in modo significativo rispettivamente del 165% e 116% (Fig.12 M,N).

Il rapporto tra il peso secco radicale e il peso secco del germoglio subiva un aumento significativo (Fig. 12 G) del'88% nel trattato passando da 0.24 a 0.57.

Per quanto concerne l'apparato radicale, l'inoculo con PGP-HSF ha indotto un aumento significativo di numero di apici radicali (Fig. 12 I) del 129% e un aumento quasi doppio della lunghezza radicale con un valore di $p = 0.059$ (Fig. 2H). Escludendo quest'ultimo carattere tutti i parametri considerati presentavano un incremento significativo con valori di p compresi tra 0.05 e 0.01, ad eccezione del rapporto tra biomassa secca della radice e del germoglio che presentava un incremento descritto da un valore di $p < 0.01$ evidenziando una netta differenza tra trattato e controllo.

Discussione

Gli effetti di PGP-HSF sulle piante di basilico sono stati diversi e fortemente influenzati dalle tecniche di coltura e dalle due cultivars utilizzate. L'aggiunta della coltura liquida contenente l'endofita ai semi non aveva evidenziato effetti sul tasso di germinazione, mentre si riscontrava un aumento di piante dallo sviluppo radicale atipico, ovvero con geotropismo negativo e con la tendenza degli apici radicali di diventare necrotici. Era ipotizzabile che le radici, allontanandosi dalla carta umida si trovassero in situazione di stress idrico, tale fenomeno poteva anche essere accentuato dalla presenza di zuccheri

residui nel mezzo di coltura dei funghi che riducevano ulteriormente la quantità di acqua disponibile. D'altra parte, oltre all'effetto potenziale indotto da molecole direttamente prodotte da PGH-HSF o dall'interazione con le sostanze presenti nel mezzo di coltura, non si può escludere che la presenza di sostanze glucidiche nel mezzo fosse in grado di promuovere lo sviluppo di eventuali altri microorganismi sopravvissuti alla tecnica di sterilizzazione adottata, anche se non si evidenziava la presenza di altri funghi in prossimità delle radici. Comunque non era possibile attribuire una causa certa a questo fenomeno che veniva influenzato positivamente dall'inoculo. La coltura in microbox, aveva evidenziato un effetto negativo sullo sviluppo degli apparati radicali, sia in termini di lunghezza totale sia di numero di laterali, in qualsiasi tipologia di inoculo adottato e in modo indipendente dall'utilizzo del rinforzo. Il parametro I.R. subiva un decremento significativo in tutti i trattamenti ad eccezione del solo trattamento al seme. Questa risposta poteva essere spiegata dal fatto che la pianta, dopo una prima fase tendesse a riacquistare la struttura originaria, mentre, lo stress indotto in modo più protratto nel tempo, non permetteva di recuperare l'assetto tipico dell'apparato radicale.

Non sono stati eseguiti studi sulle biomasse delle plantule ma l'analisi visiva evidenziava uno sviluppo ridotto delle piante come osservabile in Fig. 7. Considerando l'effetto fungicida di diversi oli essenziali (Simon et al. 1990; Griffin et al. 1999; Pascual-Villalobos e Ballesta-Acosta 2003), non si può escludere che la risposta del fungo PHP-HSF a tali sostanze abbia influito negativamente allo sviluppo delle piante.

La coltura *in vitro* in tubi, riproposta in modo analogo a quella utilizzata per testare

l'effetto di PGP-HSF su microtalee di *M. x piperita*, su basilico non evidenziava l'effetto promotore riscontrato su menta. Per tale prova si era testato l'effetto su due differenti cultivar di basilico, e con tecniche di propagazione diverse. I risultati non sono stati concordanti. Nel caso del basilico "lattuga", propagato attraverso talee di fusto, la presenza del fungo ha ridotto in modo significativo la biomassa secca totale e quella radicale, mentre ha ridotto il valore medio di biomassa secca del germoglio ma non in modo significativo, evidenziando un effetto soppressore principalmente legato alla radice. Nel caso del basilico "italiko", non si sono osservate differenze significative delle biomasse secche, anche se la biomassa radicale media è stata influenzata positivamente nel trattato di circa il 30% rispetto ai controlli.

Su alcune piante di basilico trattate con PGP-HSF si era riscontrata la presenza di radici morfologicamente "atipiche": inspessite all'apice, con molte ramificazioni e caratterizzate da un punto di vista microscopico dalla presenza di peli radicali a forma variegata, e dalla parziale alterazione dell'epidermide radicale. Queste alterazioni morfologiche, anche se in modo meno evidente erano state osservate anche su alcune piante di basilico durante la fase di produzione degli espanti dopo lunga permanenza nei tubi.

Un'ipotesi è stata che l'endofita, entrasse in competizione con la radice per quel che concerneva la disponibilità di ossigeno, inducendo un ambiente asfittico nel mezzo agarizzato. E' possibile che una maggior suscettibilità all'asfissia radicale del basilico "lattuga", dovuta alla genetica, o/e alla differente tecnica di propagazione abbia influenzato lo sviluppo delle piante, esasperando la competizione con il fungo.

Per questa ragione, si era scelto di cambiare tecnica di coltura facilitando gli scambi gassosi delle radici, utilizzando delle capsule quadrate poste verticalmente, come utilizzate nell'esperimento con *Arabidopsis* nel capitolo I. In questo caso, la radice, grazie alle condizioni di coltura non si approfondiva in aree lontane dalla superficie libera a contatto con l'aria.

L'esperimento condotto con talee di basilico italiko, evidenziava che PGP-HSF era in grado di espletare un effetto positivo sullo sviluppo delle piante, almeno parzialmente simile a quello che mostrava in *M. x piperita*.

Dopo 35 giorni dall'inoculo, il micelio di PGP-HSF era cresciuto in modo abbondante nel terreno MS a contatto delle radici del basilico.

Il peso fresco e secco delle piante trattate, presentava un incremento medio rispettivamente del 160% e del 181% rispetto ai controlli, a causa dell'incremento significativo sia del germoglio che dell'apparato radicale. Il numero medio delle foglie sviluppate era quasi triplicato e il numero di nodi era incrementato di oltre il 160%.

Dall'inoculo, si evidenziava un aumento significativo del numero delle radici laterali e del numero totale degli apici radicali. Dall'osservazione dei blox plots in fig.13. si era notato che l'endofita aumentava la variabilità della risposta della pianta ai diversi parametri considerati, ma sempre con valori maggiori rispetto al controllo.

Dal confronto con i risultati ottenuti da studi precedenti, che consideravano l'effetto di PGP-HSF su piante di *M. spicata* e *M. x piperita*, emergevano effetti solo parzialmente differenti.

In accordo con quanto osservato dall'esperimento su basilico in capsule quadrate, PGP-

HSF in entrambe le specie di menta influenza positivamente: lo sviluppo delle biomasse fresche e secche, la lunghezza del fusto, il numero delle radici laterali di primo ordine e del numero totale degli apici radicali.

Anche i funghi micorrizici arbuscolari (AM), come evidenziato in Copetta et al (2006 a, b) che considera tre diverse specie, *Gigaspora rosea*, *Gigaspora margarita* e *Glomus mosseae*, sono in grado di influenzare lo sviluppo di piante di basilico fornendo delle risposte solo parzialmente simili rispetto ai dati ottenuti con PGP-HSF.

In accordo a quanto era stato osservato per PGP-HSF, i funghi arbuscolari possono influenzare positivamente le biomasse sia del germoglio che della radice, il grado di ramificazione laterale e, *G. mosseae* e *G. rosea* influenzano positivamente la lunghezza radicale (Copetta et al., 2006 a).

Diversamente, considerando il rapporto tra il peso secco della parte ipogea rispetto a quella epigea, PHP-HSF ne esercitava un effetto positivo, che era opposto ai dati ottenuti dall'inoculo con i funghi arbuscolari, che influenzano questo rapporto principalmente negativamente o in modo neutrale. Tale dato evidenzia che i funghi AM sono in grado di promuovere maggiormente lo sviluppo della parte verde in grado di compiere la fotosintesi rispetto all'apparato radicale; questo è spiegato dalla capacità dei funghi AM di sostituirsi parzialmente alla radice nelle funzioni assorbenti, specialmente legate ai nutrienti poco solubili nella soluzione circolante (es: fosforo) e alla loro successiva richiesta di molecole organiche fornite in abbondanza da un maggior sviluppo della parte fotosintetizzante della pianta (Smith & Read 2008).

Il fungo PGP-HSF non sembra essere in grado di aumentare la nutrizione fosfatica della

pianta associata, infatti in *M. x piperita* inoculata con PGP-HSF non si evidenziano differenze significative tra le percentuali di P nei tessuti delle piante inoculate e quelle dei controlli anche se l'effetto di diluizione sulla concentrazione di P connessa alla maggiore crescita della pianta non può essere escluso (Fusconi et al 2010). Il basilico, come la maggior parte delle Lamiaceae, fa parte di una categoria di piante medicinali. Queste sono conosciute per essere una risorsa di sostanze fitochimiche, o di composti attivi naturali che sono fortemente richiesti per le loro proprietà (Rasouili-Sadghiani et al 2010). Gli oli essenziali, contenuti in questa tipologia di piante, sono un gruppo complesso di molecole rappresentate da monoterpeni, sesquiterpeni e fenilpropanoidi (Rasouili-Sadaghiani et al 2010) e lo studio del miglioramento qualitativo e quantitativo della produzione di queste molecole rappresenta un area di notevole interesse commerciale (Copetta et al 2006 a,b).

La coltura in vitro di piante appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae ha importanti aspetti applicativi in quanto permette di eliminare la variabilità individuale, dovuta all'eterogeneità biochimica e genetica (Shetty 1997; Saha et al 2010). Inoltre, specialmente in fase sperimentale, la coltura *in vitro* permette di ottenere un numero elevato di piante in tempi brevi, potendo sviluppare linee clonali con relativa facilità e superando il problema legato a quelle piante difficilmente propagabili per via vegetativa "classica".

La micropropagazione del basilico, può avvenire attraverso germogli (Ahuja et al., 1982; Begum et al., 2000; Shahzad and Siddiqui, 2000), foglie (Phippen and Simon, 2000) e gemme ascellari (Begum et al., 2000, 2002). Quindi un incremento elevato di

gemme ascellari e nodi, come si era riscontrato con l'aggiunta di PGP-HSF, poteva ridurre i tempi necessari per la micropropagazione, rappresentando una notevole riduzione dei costi di propagazione.

Nel caso pratico della micropropagazione, utilizzando dei funghi endofiti sarà comunque necessario considerare che le piante micropropagate conterranno il fungo e nel caso vengano usate per altri tipi di sperimentazioni l'effetto complessivo dovrà considerare l'interferenza dell'endofita. D'altra parte, una volta prodotte le talee si potrebbe eliminare il fungo attraverso un fungicida; in questo caso il fungo potrebbe essere usato unicamente come uno strumento per ridurre i tempi di micropropagazione. Inoltre l'incremento del rapporto radice/fusto che si evidenziava con l'uso di PGP-HSF in vitro potrebbe giocare un ruolo importante nel facilitare l'acclimatazione delle piante micropropagate dopo il trapianto in terra.

Complessivamente, le varie prove condotte su piante di basilico hanno evidenziato delle risposte contraddittorie tra i diversi esperimenti evidenziando una certa analogia con la teoria del "mutualismo-parassitismo-continuum" (Johnson et al., 1997) secondo la quale l'interazione tra i due bionti all'interno della simbiosi può passare dal mutualismo al parassitismo in funzione delle diverse condizioni ambientali. Prove condotte con DSE, funghi endofiti di Classe 4, confermano quanto evidenziato in altre specie capaci di formare micorrize (Johnson et al., 1997), dove riducendo l'intensità luminosa, ovvero la disponibilità energetica del sistema, cambia il costo relativo della simbiosi, e di conseguenza lo sviluppo della pianta, a differenza di quello che avviene normalmente, viene penalizzato dalla presenza del fungo (Mandyam e Jumpponen, 2015).

Diversamente, le micorrize esplicano il loro effetto positivo principalmente nelle situazioni di bassa disponibilità di nutrienti (es: P, Cu e Zn); nel caso di suoli fertili i costi della simbiosi possono superare i benefici indotti dal fungo riducendo lo sviluppo della pianta a differenza di quello che accade nei suoli meno dotati di nutrienti dove la presenza del fungo ne promuove la crescita (Johnson et al., 1997).

Nel caso del basilico, a differenza di quello che avviene in menta, non si era rilevata la colonizzazione dei tessuti da parte dell'endofita PHP-HSF, anche se non era stato possibile escluderla. Questi risultati potrebbero evidenziare che le interazioni studiate nella teoria del "mutualismo-parassitismo-continuum" possano essere valide anche nel caso di interazioni fungo-pianta anche quando il micelio non penetra nei tessuti vegetali. Per quello che riguarda l'identificazione molecolare, lo studio filogenetico condotto sulla regione SSU aveva confermato l'appartenenza dell'isolato alla classe Sordariomycetes senza però poterlo collocare all'interno di una famiglia precisa. Nuovi studi saranno necessari per chiarire la reale collocazione del campione all'interno della classe Sordariomycetes. Il confronto con sequenze ITS disponibili non è stato in grado di migliorare l'identificazione del fungo, ma ha evidenziato l'ampia diffusione della specie come endofita su diverse altre piante.

Bibliografia

Ahuja A., Verma M., Grwal, S. (1982). Clonal propagation of *Ocimum* species by tissue culture. Indian J. Experimental. Biology, 20: 455-458.

Begum F., Amin M.N., Azad M.A.K. (2000). In vitro clonal propagation of Holy Basil-*Ocimum sanctum* L. Plant Tissue Culture, 10: 31-37.

Begum F., Amin M.N., Azad M.A.K. (2002). In vitro rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. Plant Tissue Culture, 12: 27-35.

Copetta A., Lingua G., Berta G. (2006).a. Effect of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L.var. Genovese. Mycorrhiza, 16: 485-494.

Copetta A., Lingua G., Berta G., Bardi L., Masoero G. (2006).b. Three arbuscular mycorrhizal fungi differently affect growth, distribution of glandular trichomes and essential oil composition in *Ocimum basilicum* var. Genovese. In “Acta Horticulture” Cervelli, C., Ruffoni B., Guida C.D., Minuto G. (Eds.), 723: 151-156.

Dho S. (2005). Effetti dell'inoculo con il micelio PGP-HSF in *Mentha spicata* L. Tesi di laurea in Scienze Biologiche. Università di Torino. Anno Accademico 2004-2005.

Eddine N., Gueddari, E., Rauchhaus U., Moerschbacher B. M., Deising H. B. (2002). Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of Plant pathogenic fungi, New Phytologist, 103–112.

Fusconi A., Trotta A., Dho S., Camusso W., Mucciarelli M. (2010). *In vitro* interaction between *Mentha piperita* L. and a non-mycorrhizal endophyte: root morphogenesis, fungus development and nutritional relationship. Journal of Plant interactions, 5: 179-188.

Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour and Fragrance J, 14: 322–332.

Johnson, N. C., Graham J.H., Smith F.A. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. New Phytologist, 135: 575-586.

Katoh K., Misawa K., Kuma K, Miyata T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucl Acids Res, 30: 3059–3066.

Mandyam K.G. e Jumpponen A. (2015). Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. Front Microbiology, 5: 1–13.

Mucciarelli M. (1997). Il Deuteromicete PGP-HSF modula *in vivo* e *in vitro* la crescita e la produttività di *Mentha x piperita* L. Tesi di dottorato di ricerca in biologia e biotecnologia. Università di Torino.

Mucciarelli M., Scannerini S., Berteà C.M., Maffei M. (2002). An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha piperita* L.: biological features and molecular studies. Mycologia, 94: 28-39.

- Mucciarelli M., Scannerini S., Berteà C., Maffei M. (2003). In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by non mycorrhizal fungal colonization. *New Phytologist*, 158, 579–591.
- Pascual-Villalobos M.J., Ballesta-Acosta M.C. (2003). Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics Ecology*, 31:673–679.
- Phippen W.B., Simon J.E. (2000). Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.), *In Vitro Cell. Dev. Biology Plant*, 36:250-254.
- Rasouli-Sadghiani M.H., Hassani A., Barin M., Danesh Y.R., Sefidkon F. (2010). Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on growth, essential oil production and nutrients uptake in basil. *J. Medicinal Plants Research*, 21: 2222-2228.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003). MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574
- Saha S., Ghosh P.D., Sengupta C. (2010). An efficient method for micropropagation of *Ocimum basilicum* L. *Indian Journal of Plant Physiology*, 15: 168-172.
- Shahzad A. e Siddiqui S.A. (2000). In vitro organogenesis in *Ocimum sanctum* L.- A multipurpose herb. *Phytomorphology*, 50: 27-35.
- Shetty, K. (1997). Biotechnology to harness the benefits of dietary phenols: focus on Lamiaceae. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 6: 162-171.
- Simon J.E., Quinn J., Murray R.G. (1990). Basil: a source of essential oils. In: Janick J, Simon J.E. (eds) *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, OR, pp 484–489.
- Smith S.E. e Read D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press (3 eds), London.
- Stamatakis A. (2006). “RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models”, *Bioinformatics*, 22: 2688–2690.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Trotta A., Varese G.C., Gnani E., Fusconi E., Sampo' S., Berta G. (1996) Interaction between the soil-borne pathogen *Phytophthora parasitica* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil*, 185: 199–209.

Articoli allegati:

Sottomesso per la pubblicazione

“Effect of a Non-Mycorrhizal Endophyte Isolated from *Mentha piperita* on in Vitro Culture of *Ocimum basilicum* Cuttings” Dovana F., Fusconi A., Berta G., Camusso W., Mucciarelli M. Acta Horticulturae Book.

Pubblicato:

“In Vitro Morphogenesis of Arabidopsis to Search for Novel Endophytic Fungi Modulating Plant Growth” Dovana, F., Mucciarelli, M., Mascarello, M., Fusconi, A. (2015). *Plos One*, 10(12).

Effect of a Non-Mycorrhizal Endophyte Isolated from *Mentha piperita* on in Vitro Culture of *Ocimum basilicum* Cuttings

F. Dovana¹, A. Fusconi², G. Berta¹, W. Camusso², and M. Mucciarelli^{2a}

¹Department of Sciences and Innovative Technology, University of Piemonte Orientale, Viale T. Michel 11, 15121 Alessandria, Italy;

²Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Torino, Viale P.A. Mattioli 25, 10125 Torino, Italy

^aE-mail: marco.mucciarelli@unito.it

Abstract

Fungi form different types of long-term associations with plants, from mutualistic to pathogenic. Fungal endophytes, which live within host tissues, may confer stress tolerance to the associated plants increasing plant fitness and biomass. In vitro micropropagation and large scale production of aromatic and medicinal plants may benefit from endophyte inoculation. Beside increasing plant growth, fungal endophytes may allow for a reduction of the amount of plant growth regulators in culture media and can be employed to increase the survival rates of micropropagated plants during acclimatization in soil and alleviate the transplantation shock. Previous experiments have shown that a plant growth promoter-hyaline sterile fungus (PGP-HSF) isolated from *Mentha piperita* L. increased plant growth and influenced the essential oil composition in the same species. In this paper we analysed the *SSU* rDNA regions of PGP-HSF to determine/confirm its systematic position, which is still uncertain, and investigated the effect of the fungus on in vitro sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cuttings cultured on a diluted MS medium. The Bayesian and maximum likelihood analysis of *SSU* rDNA regions confirmed the previously recognized collocation of PGP-HSF in the Sordariomycetes, positioning it as a sister taxon of clade *Ophiostomataceae*. After 35 days of co-culture of *O. basilicum* with the fungus, most of the growth parameters were significantly increased. Plant fresh and dry weights, number of leaves, as well as the total leaf area per plant showed an increase greater or equal to 100% in inoculated plants as compared with non-inoculated control plants. The root-to-shoot biomass ratio also increased. These results encourage us to deepen the effects of this endophyte on basil, by studying its influence on the production of essential oils and the post-in vitro culture.

Keywords: Ascomycota, fungal endophytes, Lamiaceae, morphometry, root system, sweet basil

INTRODUCTION

In natural and agro-ecosystems most herbaceous plants are symbiotically associated with mycorrhizal fungi and/or other fungal endophytes which influence the development and fitness of their hosts. Among them, arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are obligate biotrophs of the roots of almost all herbaceous plant species and usually promote plant growth by improving plant uptake of P and other immobile nutrients (Smith and Read, 2008). Besides mycorrhizal fungi, many other fungal endophytes are involved in symbiotic interactions with plants and can be isolated from different host tissues as roots, stems and leaves (Rodriguez et al., 2009). In general, fungal endophytes play an important role in determining host resistance to fungal pathogens and pests, to optimize the absorption of nutrients and to increase the tolerance to abiotic stress such as temperature, pH, salt stress (Smith and Read, 2008). A peppermint endophyte, the ascomycetous plant growth promoter-hyaline sterile fungus (PGP-HSF), isolated from the host stem, has shown to enhance vegetative growth and to positively modify the essential oil composition in peppermint (Mucciarelli et al., 2003).

It is known that Lamiaceae species, including basil, show a high individual variability, due to genetic and biochemical heterogeneity (Shetty, 1997). Moreover seed-derived plants are not true to type, due to cross pollination. Micropropagation techniques are suitable for the rapid and large-scale propagation of medicinal and aromatic plants, and for testing the effect of beneficial fungi. AM fungi have been shown to significantly affect plant growth, density of glandular trichomes and the quality and quantity of essential oil in sweet basil (Copetta et al., 2006); nevertheless, these fungi are not always amenable to inoculate plants in vitro.

The objective of the present study was to verify the effect of PGP-HSF in sweet basil in order to assess the possible use of this fungus to improve the micropropagation of this economically important aromatic and medicinal species.

MATERIALS AND METHODS

Plugs from the young part of mature colonies of PGP-HSF grown on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) were co-cultured with shoot cuttings of *Ocimum basilicum* L. "Italiko" (Fig. 1A) in squared Petri plates containing a 0.2× MS medium. Control plants were not inoculated. Plates were placed vertically in a growing chamber (26/22±1°C, 16/8h light/dark photoperiod, 90 µmol·m⁻²sec⁻¹). After 35 days of culture, the fresh and dry weights of shoots and roots of 10 plants per treatment were determined. Root systems and leaves were scanned; root length and leaf area were measured by image analysis. The numbers of roots of each order and of leaves were counted and the degree of root branching was calculated.

All parameters analysed were compared between inoculated and non-inoculated plants using Student's t-test. Statistical analyses were performed using R.

In phylogenetic analysis, SSU PGP-HSF sequence was compared with those available in Genbank used for previous phylogenetic studies in Sordariomycetidae. The alignment was carried out using MAFFT v 7.017 (Kato et al., 2002) with default conditions. Phylogenies (Bayesian and Maximum-likelihood analysis; BPP = Bayesian posterior probabilities and MLB = maximum likelihood bootstrap) were inferred with

MrBayes v. 3.2.4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) and RAxML v.7.2.8. (Stamatakis, 2006). MEGA v.6.06 (Tamura et al., 2013) was used to estimate the best-fit models of nucleotide substitution. The GTR + G + I model was chosen for both analyses. Bayesian inference (BI) was performed with four incrementally heated simultaneous Monte Carlo Markov Chains (MCMC) run over one million generations; trees were sampled every 200 generations and the first 25% trees were discarded as “burn-in”. The MP bootstrap analysis was conducted using 1000 replicates with rapid bootstrapping.

RESULTS AND DISCUSSION

After 35-d inoculation, the mycelium of the fungal endophyte PGP-HSF had grown into the MS medium in contact with sweet basil roots (Fig. 1B). By this time, sweet basil plants were healthy and their total biomass was statistically different from uninoculated plants (Fig. 1C). Plant fresh and dry weights showed an average 160% and 181% increase over the control plants (Fig. 2A,B), due to an increase of the fresh and dry weights of both roots and shoots (Fig. 2C-F).

Plant growth stimulation by the fungal endophyte occurred along with a significant increase of the average number of leaves (from 11 in control plants to 29 in treated plants) and of stem nodes per plant (+153% and +165% respectively; $p < 0.01$; Fig. 2L,M).

Sweet basil micropropagation is usually achieved by axillary shoot proliferation from nodal explants (Ahuja et al., 1982; Begum et al., 2000; Shahzad and Siddiqui, 2000), shoot tip explants, leaf explants (Phippen and Simon, 2000) and axillary buds (Begum et al., 2000, 2002). A greater number of axillary buds and nodes per plants as those obtained after PGP-HSF inoculation will thus improve the process of micropropagation of sweet basil, by shortening the time required for each multiplication cycle with an expected reduction of production costs.

Higher number of nodes and leaves resulted in a significantly larger (116%; $p < 0.01$) total leaf area per plant (Fig. 2N), which was also observed in peppermint after inoculation with the same fungus (Mucciarelli et al., 2003).

With regards to the root system of sweet basil plants, PGP-HSF inoculation resulted in a significant increase of the number of roots (+129%; $p < 0.01$) (Fig. 2I), and the mean length of the whole root apparatus was almost twice the control, although at $p = 0.059$ (Fig. 2H). PGP-HSF inoculation of sweet basil plants resulted in a greater root-to-shoot ratio (Fig. 2G) as a consequence of the increase of biomass, greater in roots than in shoots, as it occurs in peppermint plants (Mucciarelli et al., 2003). This parameter reflects the different investment of photosynthates between the shoot and root compartment of the plant and can be affected by different biological and non-biological factors.

AM symbiosis generally lowers the root-to-shoot ratio. The fungus improves plant P uptake; and, in turn, it absorbs a significant proportion of organic carbon from the host. As a result, AM symbiosis forces plants to develop more the photosynthetic organs than the roots (Feddermann et al., 2010). The opposite response obtained with PGP-HSF inoculation, indicates the lack of nutrient transfer from the fungus to the plant. Accordingly, previous works on the effects of PGP-HSF on *M. piperita* led us to exclude the involvement of the fungus on plant mineral nutrition and to hypothesize a saprophytic

behaviour of PGP-HSF with a one-way transfer of sugars from the plant (Fusconi et al., 2010). Alternatively, the interaction with the fungus may affect the allocation of assimilates and favour the production of hormones or other chemical compounds which could alter plant physiology and be responsible for the observed plant growth promotion.

In vitro roots normally improve the water status of micropropagated plants by ameliorating the water uptake capacity of the plant. Increases in water status derive not only from the presence of a well-developed root system but also from the amount of roots relative to shoot biomass. Larger root-to-shoot ratios in tissue cultures, for example, are positively correlated with transpiration rate and shoot water relative content (Díaz-Pérez et al., 1995).

For in vitro initiation of roots, sweet basil shoots are usually cultured on MS media containing different concentrations of auxins (Siddique and Anis, 2007; Saha et al., 2010) which are known as key regulators of root growth and lateral root formation (Fusconi, 2014). A well-developed root apparatus relative to the shoot size as that obtained with PGP-HSF without the use of auxins, can improve the propagation of this species ameliorating its water status and plant survival during acclimatization and ex vitro transplantation.

Beneficial microbial inoculants can be employed also to stimulate the production of useful active plant metabolites. Tada et al. (1996) reported greater production of rosmarinic acid in hairy root cultures than in intact plants of *O. basilicum*. Rosmarinic acid is an important and commercially valuable active compound possessing important anti-inflammatory and antioxidant properties (Kintzios et al., 2003). Moreover significant improvement of the growth and essential oil yield has been reported after inoculation of *Ocimum* spp. with endophytic bacteria (Tiwari et al., 2010; Singha et al., 2013) and AM fungi (Copetta et al 2006). Therefore, after PGP-HSP inoculation, a larger production of essential oils in vitro is likely. The observed increase of root tips and root weight in the presence of the fungal endophyte PGP-HSF, could thus represent an interesting alternative to transformed hairy root cultures for improving the in vitro production of rosmarinic acid in sweet basil.

In the phylogenetic study of SSU rDNA regions both Bayesian and Maximum likelihood analyses produced the same topology; therefore only the Bayesian tree with both BPP and MLB values is shown (Fig. 3).

The new phylogenetic analysis of the SSU rRNA sequences confirmed the previously recognized collocation of PGP-HSF in the Sordariomycetes (Mucciarelli et al., 2002); in both MP and Bayesian trees, PGP-HSF was related to the Magnaporthaceae family with weak support (MLB = 55; BPP = 0.90). The Magnaporthaceae family together with PGP-HSF constitute a well-supported sister clade of Ophiostomatales (MLB = 82; BPP = 1.00). Further studies including other genomic regions will be needed to refine the phylogeny of this fungus and to achieve a better understanding of its ecological role in nature.

In conclusion, the use of PGP-HSF for in vitro propagation of sweet basil has shown to be a valid tool for a rapid clonal multiplication of this species when high genetic uniformity is required.

Moreover, the features of the plants co-cultured with PGP-HSF have shown to be compatible with a good adaptability of sweet basil after transplantation and prompted us to study the influence of the fungus on the production of essential oils.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial funding from the University of Torino (EX 60%) are gratefully acknowledged.

Literature Cited

- Ahuja, A., Verma, M., and Grwal, S. (1982). Clonal propagation of *Ocimum* species by tissue culture. *Indian J. Exp. Biol.* *20*, 455-458
- Begum, F., Amin, M.N., and Azad, M.A.K. (2000). In vitro clonal propagation of Holy Basil – *Ocimum sanctum* L. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* *10*, 31–37.
- Begum, F., Amin, M.N., and Azad, M.A.K. (2002). In vitro rapid clonal propagation of *Ocimum basilicum* L. *Plant Tissue Culture Biotechnol.* *12*, 27-35.
- Copetta, A., Lingua, G., and Berta, G. (2006). Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza* *16*, 485–94 <http://dx.doi.org/10.1007/s00572-006-0065-6>.
- Díaz-Pérez, C., Shackel, K.A., and Sutte, E.G. (1995). Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *Amer. Soc. Hort. Sci.* *120*, 435-440.
- Feddermann, N., Finlay, R., Boller, T., and Elfstrand, M. (2010). Functional diversity in arbuscular mycorrhiza - the role of gene expression, phosphorous nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology* *3*, 1–8 <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.003>.
- Fusconi, A. (2014). Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: what role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation *Ann. Bot.* *113*, 19-33 <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mct258>.
- Fusconi, A., Trotta, A., Dho, S., Camusso, W., and Mucciarelli M. (2010). In vitro interactions between *Mentha piperita* L. and a non-mycorrhizal endophyte: root morphogenesis, fungus development and nutritional relationships. *J. Plant Interact.* *5*, 179- 188 <http://dx.doi.org/10.1080/17429140903487560>.
- Huelsenbeck, J.P., and Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* *17*, 754-755 <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucl. Acids Res.* *30*, 3059–3066 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
- Kintzios, S., Makri, O., Panagiotopoulos, E., and Scapeti M. (2003). In vitro rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biotechnol. Lett.* *25*, 405–408 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022402515263>.
- Mucciarelli, M., Scannerini, S., Berteà, C., and Maffei, M. (2003). In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytol.* *158*, 579–591 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469->

8137.2003.00762.x.

- Mucciarelli, M., Scannerini, S., Berteà, C., and Maffei, M. (2002). An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha piperita* L.: Biological features and molecular studies. *Mycologia* 94, 28–39. <http://dx.doi.org/10.2307/3761843>
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Phippen, W.B., and Simon, J.E. (2000). Shoot regeneration of young leaf explants from basil (*Ocimum basilicum* L.), *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36, 250-254. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-000-0046-y>
- Rodriguez, R.J., White, J.F. Jr., Arnold, A.E., and Redman, R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182, 314–330 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>.
- Saha, S., Ghosh, P.D., and Sengupta, C. (2010). An efficient method for micropropagation of *Ocimum basilicum* L. *Indian J. Plant Physiol.* 15, 168-172.
- Shahzad A., and Siddiqui, S.A. (2000). In vitro organogenesis in *Ocimum sanctum* L. – A multipurpose herb. *Phytomorphology* 50, 27-35.
- Shetty, K. (1997). Biotechnology to harness the benefits of dietary phenols: focus on Lamiaceae. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.* 6, 162–171.
- Siddique, I., and Anis, M. (2007). Rapid micropropagation of *Ocimum basilicum* using shoot tip explants pre-cultured in thidiazuron supplemented liquid medium. *Biol. Plant.* 51, 787-790 <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-007-0161-2>.
- Singha, R., Sonib, S.K., Patela, R.P., and Kalrab, A. (2013). Technology for improving essential oil yield of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions. *Ind. Crops Prod.* 45, 335– 342 <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.003>.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd edn. (London, UK: Academic Press). pp.139.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models, *Bioinformatics* 22, 2688–2690 <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>.
- Tada, H., Murakami, Y., Omoto, T., Shimomura, K., and Ishimaru, K. (1996). Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 42, 431–434 [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00005-2](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(96)00005-2).
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729 <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Tiwari, R., Kalra, A., Darokar, M.P., Chandra, M., Aggarwal, N., Singh, A.K., and Khanuja, S.P.S. (2010). Endophytic bacteria from *Ocimum sanctum* and their yield enhancing capabilities. *Curr. Microbiol.* 60, 167-171 <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-009-9520-x>

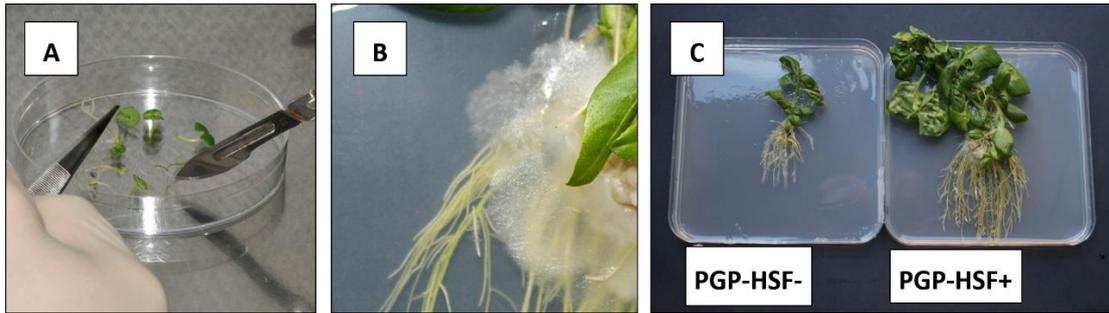


Figure 1. A: shoot cuttings of *O. basilicum* L. B: PGP-HSF in contact with sweet basil roots. C: two 35-days old plants of sweet basil, grown with PGP-HSF (on the right) and without (on the left)

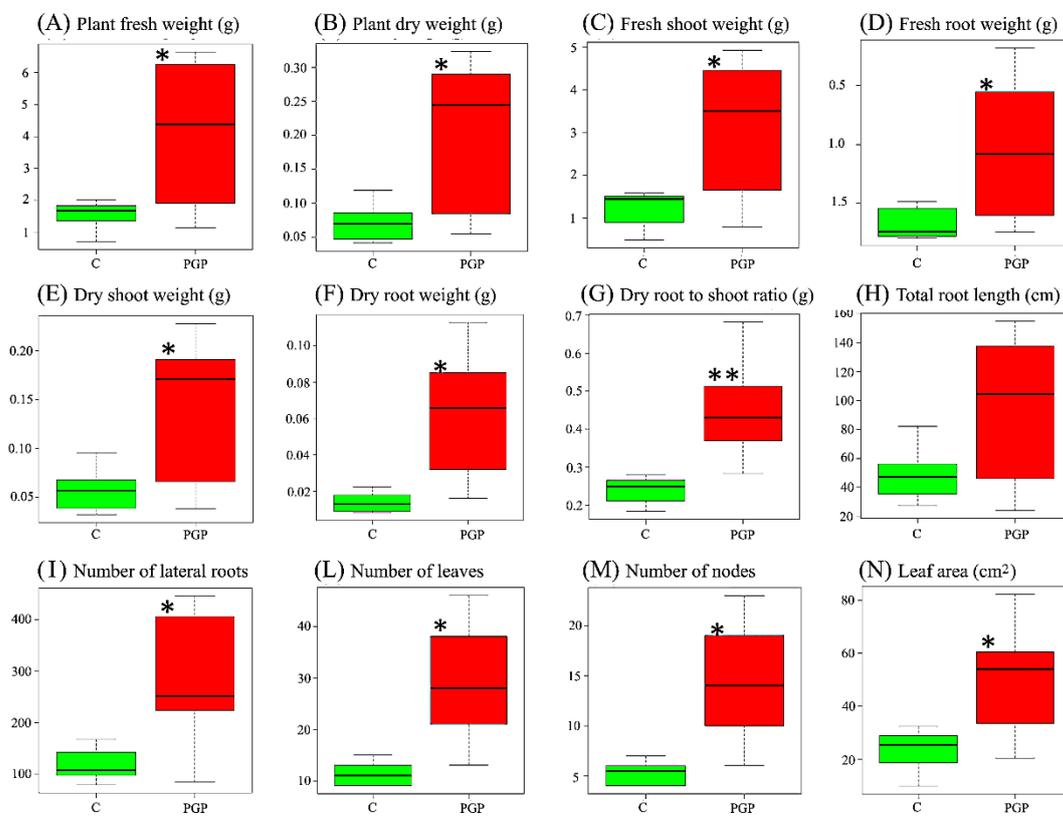


Figure 2. Sweet basil response to PGP-HSF after 35-d inoculation. Box plots show significant differences of plant growth parameters in controls (C) and with PGP-HSF (PGP). Asterisks indicate treatment difference from the control based on t-test at $p < 0.05$ * and $p < 0.01$ **.

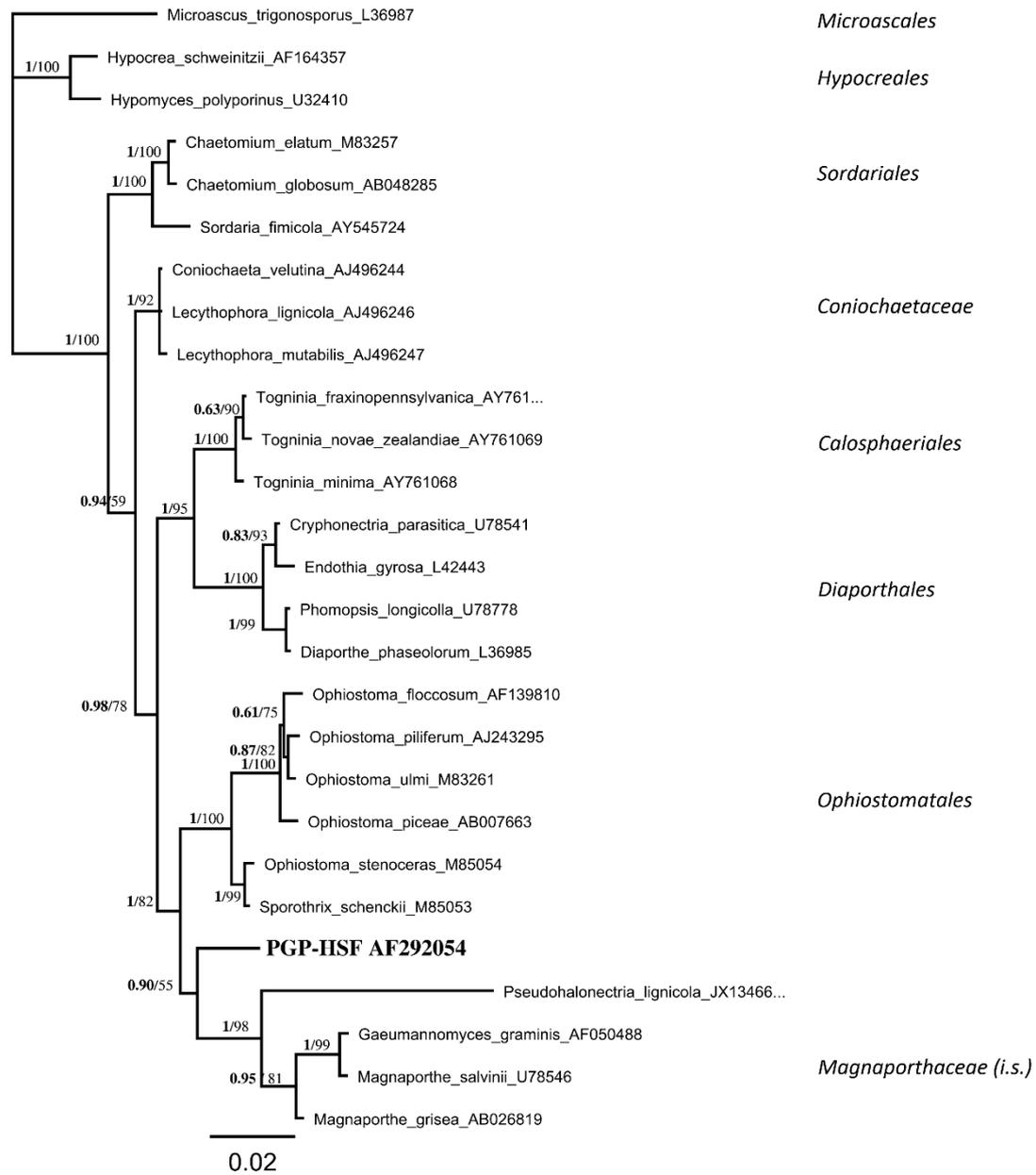


Figure 3. Bayesian phylogram obtained from 18s partial sequences. *Microascus trigonosporus* was used as outgroup taxon. Only BPP values over 0.50 (in bold) and MLB values over 50% are given above clade branches. PGP-HSF is in bold.

RESEARCH ARTICLE

In Vitro Morphogenesis of *Arabidopsis* to Search for Novel Endophytic Fungi Modulating Plant Growth

Francesco Dovana¹, Marco Mucciarelli²*, Maurizio Mascarello², Anna Fusconi²

1 Department of Sciences and Innovative Technology, University of Piemonte Orientale, Alessandria, Italy, **2** Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Torino, Torino, Italy

✉ These authors contributed equally to this work.

* marco.mucciarelli@unito.it



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Dovana F, Mucciarelli M, Mascarello M, Fusconi A (2015) *In Vitro* Morphogenesis of *Arabidopsis* to Search for Novel Endophytic Fungi Modulating Plant Growth. PLoS ONE 10(12): e0143353. doi:10.1371/journal.pone.0143353

Editor: Massimo Labra, University of Milano Bicocca, ITALY

Received: August 26, 2015

Accepted: November 3, 2015

Published: December 7, 2015

Copyright: © 2015 Dovana et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Fungal gene sequences are deposited in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) and accession numbers are listed in [Table 1](#).

Funding: A. Fusconi and M. Mucciarelli were supported by Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Fungal endophytes have shown to affect plant growth and to confer stress tolerance to the host; however, effects of endophytes isolated from water plants have been poorly investigated. In this study, fungi isolated from stems (stem-E) and roots (root-E) of *Mentha aquatica* L. (water mint) were identified, and their morphogenetic properties analysed on *in vitro* cultured *Arabidopsis* (L.) Heynh., 14 and 21 days after inoculation (DAI). Nineteen fungi were analysed and, based on ITS analysis, 17 isolates showed to be genetically distinct. The overall effect of water mint endophytes on *Arabidopsis* fresh (FW) and dry weight (DW) was neutral and positive, respectively, and the increased DW, mainly occurring 14 DAI, was possibly related to plant defence mechanism. Only three fungi increased both FW and DW of *Arabidopsis* at 14 and 21 DAI, thus behaving as plant growth promoting (PGP) fungi. E-treatment caused a reduction of root depth and primary root length in most cases and inhibition-to-promotion of root area and lateral root length, from 14 DAI. Only *Phoma macrostoma*, among the water mint PGP fungi, increased both root area and depth, 21 DAI. Root depth and area 14 DAI were shown to influence DWs, indicating that the extension of the root system, and thus nutrient uptake, was an important determinant of plant dry biomass. Reduction of *Arabidopsis* root depth occurred to a great extent when plants were treated with stem-E while root area decreased or increased under the effects of stem-E and root-E, respectively, pointing to an influence of the endophyte origin on root extension. *M. aquatica* and many other perennial hydrophytes have growing worldwide application in water pollution remediation. The present study provided a model for directed screening of endophytes able to modulate plant growth in the perspective of future field applications of these fungi.

Introduction

Plants are sessile organisms characterized by developmental plasticity, which allows them to adapt to environmental conditions. In recent years, it has become clear that plants do not live

alone, but are a component of the “holobiont”, “the host organism and all its symbiotic microbiota” [1] with associated microorganisms having a remarkable role in plant adaptation and survival [1]. A large group of plant-associated microorganisms is represented by endophytic fungi (Petrini 1986, see e.g. [2]) which, in natural ecosystems are hosted by most or, perhaps, all plants. Fungal endophytes may be mycorrhizal or non-mycorrhizal, the latter are primarily formed up by Ascomycota and include the clavicipitaceous endophytes of grasses and the more heterogeneous group of the nonclavicipitaceous (NC) endophytes [2]. According to Brundrett [3], mycorrhizal associations differ from the non-mycorrhizal ones because of the construction of a specialized interface to transfer nutrients between hosts. Moreover, whilst the development of mycorrhizal fungi is restricted to roots, non-mycorrhizal endophytes may grow into the roots (e.g. the dark septate endophytes (DSE) [4]) or the stem-leaf system, or both [2].

Diversity and abundance of non-mycorrhizal endophytes is very high, even in the same population, plant and organ [2], and become enormous when considering the number of fungal strains of each species. However, despite their widespread occurrence, ecological role and the benefits of endophytic associations are still poorly understood, the responses of plants spanning from negative to positive. These latter, which mainly consist in increased stress tolerance towards biotic and abiotic stresses and plant growth, have generally been ascribed to modulation of nutrient uptake, plant phytohormones and antioxidant responses [5–7]. Moreover, some NC endophytes, growing in a stressful environment, have shown to confer habitat-adapted benefits to the host growing under the same, but not other, type of stress [2].

Endophytes have been mostly studied in terrestrial plants and their occurrence in water environments, as well as their effects on the aquatic hosts, is comparatively less known [8].

In the present study, a culture-dependent isolation method was applied to analyse *in planta* the effects of fungal endophytes inhabiting shoots and submerged roots of water mint (*Mentha aquatica*). This plant is a facultative hydrophyte, which has been used in monitoring water ecosystems quality [9]. It is a good candidate for water phytodepuration in constructed wetlands because it presents large root surface supporting the growth of beneficial microbes and secretes substances into the rhizosphere that have shown to inhibit coliform bacteria [10]. Besides, water mint tolerates prolonged dry conditions typical of seasonally flooded wetlands and intermittent streams [11].

Because little is known about growth and development of water mint *in vitro*, we assessed the effects of its endophytes on *in vitro* cultured *Arabidopsis thaliana* to address the following questions: (1) are the overall effects of water mint endophytes on plant growth positive, neutral or negative? (2) is plant biomass influenced by the fungal-related root phenotype? and (3) does *Arabidopsis* growth response differ between endophytes isolated from roots and shoots?

The use of a non-host plant for this study was justified by the intrinsic characteristics of *Arabidopsis* and by its susceptibility to be colonized by a large variety of non-mycorrhizal symbiotic microorganisms [12–15] thus becoming a model plant to investigate endophytic interactions [4, 16–19]. Moreover, almost for the DSE, the results obtained on model and native plants have shown to be similar [4].

Materials and Methods

Fungal endophytes isolation

Fungal endophytes were isolated from stems (stem-E) and roots (root-E) of 20 individuals of *M. aquatica* growing in a water stream siding Demonte river, in the Valle Stura di Demonte, Cuneo, Italy (44°18.350'N, 7°22.296'E; 680 m a.s.l.). No specific permissions were required to take samples of *M. aquatica* at this location; the collection of live specimens was limited to five individuals per person a day as regulated by Regional legislation (Piedmont, Italy). The field

studies did not involve endangered or protected species. Three pieces (4–5 cm long) for each plant and type of organ were washed under running tap water for at least two h and then incubated for 1 h in a 4% PPM™ (v/v) water solution. Hereafter, stem explants were sterilized with 70% ethanol for 90 s, and 40% bleach plus 0.01% Tween 20 for 5 min; roots were sterilized with 95% ethanol for 30 s, 6% bleach plus 0.01% Tween 20 for 2 min and 2% chloramine T (w/v) in water plus 0.01% Tween 20 for 10 min. After five washes in distilled water, stems and roots pieces were cut in 10 mm-long segments, plated on Malt Extract Agar (MEA) medium and incubated at $23\pm 1^\circ\text{C}$. Fungal colonies were isolated in pure cultures collecting aerial mycelia and classified according their morphology and growth rate in order to screen for different isolates. An imprint of the sterilized root or stem tissue was made on Potato Dextrose Agar (PDA) medium to check for effectiveness of sterilization. Water mint endophytes were grown and maintained on MEA medium and subcultured regularly.

Molecular identification of endophytic fungi

Fungal mycelia were scraped from pure cultures grown on MEA medium for 2 weeks at 25°C in the dark and ground to a fine powder with liquid nitrogen using a mortar and pestle. Total DNA was extracted using the Qiagen Mini Kit following manufacturer's instructions. The ITS region was amplified with primers ITS1F/ITS1 [20] and ITS4 [21]. PCR was performed in 25 μl reaction volume following [20]. The PCR products were purified and sequenced by Macrogen Inc. (Amsterdam, Europe). Sequences were assembled and edited in Geneious v. 8.1.2 [22] and then submitted to GenBank. Blast database searches were performed with ITS-fragments queries to reveal relationships to published sequences.

Plant material and growth conditions

Endophytes were evaluated *in vitro* for their effects on *Arabidopsis* Col-0 ecotype. Seeds were surface sterilized with 75% ethanol for 90 s and 10% bleach plus 0.01% Tween 20 for 5 min. After five washes in distilled water, seeds were sown and grown on square agar plates (120×120×17 mm) containing 0.2×MS medium [23] with the addition of 0.5% myo-inositol (w/v), 0.02% glycine (w/v), 0.5% sucrose (w/v) (pH corrected to 5.7 with NaOH) and incubated at $7\pm 1^\circ\text{C}$ for 72 h. Thereafter, plants were placed in a plant growth chamber with a photoperiod of 18 h of light/6 h darkness, light intensity of $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-2}$, and temperature of $23\pm 1^\circ\text{C}$. Plates were placed at an angle of 70° to allow root growth along the agar surface and to prompt aerial growth of the hypocotyls.

Plant and fungal co-cultures

Two mycelial plugs (7 mm diameter) cut with a sterile cork borer in non-sporulating fungal cultures were aseptically placed at a 7 cm distance from the root tip of 4-d-old germinated *Arabidopsis* seedlings (13 seedlings per plate). Exact plugs positioning was determined in a previous experiment to avoid as much as possible any contact between fungal mycelia and growing plants. In the case of sporulating isolates of *Penicillium*, fungal spore density of 10^6 were inoculated with a sterile pipette inside two holes cored in the agar medium (50 μl each) in the same position as the mycelial plugs. Plates were doubled sealed with Parafilm. E-treated plants consisted of eight plates for each endophyte, cultured for and analysed at two different sampling periods: 14 and 21 DAI. Control plates were inoculated with plugs of MEA medium or 100 μl sterile water. Endophyte-treated plants (E-treatments) and controls were cultured at the same conditions used for germination and analysed 14 and 21 DAI.

Plant fresh and dry weights

Four groups of three plants were measured for each treatment. Immediately after harvest, plants were blotted dry on a paper towel to remove excess of agar and water, and fresh weight (FW) measured on an analytical scale. Plant dry weights (DW) were obtained after drying plant material in a ventilated oven at 60°C to a constant weight. DWs were measured after allowing plant material to cool down to room temperature inside a desiccator. Percentage of dry-to-fresh mass were also calculated as the % ration between FWs and DWs.

Root system morphology

Images of the whole plants were acquired with an Epson Perfection V300 scanner (Epson America, USA) at 600 dpi, using Adobe Photoshop software (Adobe Systems, USA) and saved in TIFF format. At each sampling time, to evaluate the capacity of the root system to explore the growth medium, the root area and the root depth were determined. The root area was determined as the total root surface included in a rectangular frame having a 20 mm width; five frames for each treatment were analysed. Within each frame, root depth was measured as the length of projection on a Y axes of the distance between the root collar and the more distal root apex (S1 Fig). Images were processed with ImageJ 1.48v.

Root system architecture (RSA) was determined 14 DAI on E-treatments showing significant alterations in FW and/or DW in relation to controls and at both sampling times. The total number and length of 1st order lateral roots, and the length of the primary root were measured in 6 plants per treatment. Branching of the primary root was calculated as the ratio between the number of emerged laterals and primary root length (mm).

Statistical analysis

Data variability and comparison with controls were represented by using boxplots drawn in R (version 3.1.2). Variability of aggregated values of plant fresh and dry weights, % dry weights, root areas and root depths were also presented for stem endophytes (stem-E), root endophytes (root-E) and all fungi (E). The significance of differences between the control and E-treatments was statistically evaluated by ANOVA with Dunnett's test for multiple comparison of means implemented in R package *multcomp*. Differences were considered significant at a probability level of $p < 0.05$. To equalize variances, biomasses and RSA parameters were \log_{10} transformed. Percentage data of dry weights were transformed to arcsin square root percentage before analysis.

To look for correlations between root morphometric parameters and plant biomasses, linear regression analysis (adjusted R^2) on mean values at 14 and 21 DAI were performed.

Results

Molecular identification of water mint endophytes

Nineteen isolates were chosen for their morphological and growth characteristics. ITS sequence data analysis led to the genetic differentiation of 17 isolates, among these, nine fungi showed a 100% identity with sequences deposited in GenBank (Table 1) and corresponded to the following species: *Aureobasidium pullulans* (de Bary & Löwenthal) G. Arnaud (SE), *Cadophora luteo-olivacea* (J.F.H. Beyma) T.C. Harr. & McNew (SA, SL), *Cladosporium halotolerans* Zalar, de Hoog & Gunde-Cim. (ST2), *Colletotrichum destructivum* O'Gara (SL23), *Nemania serpens* (Pers.) Gray (RT6c), *Penicillium resedanum* McLennan & Ducker (RL3), *Penicillium solitum* Westling (RT5a), *Sarocladium strictum* (W. Gams) Summerb. (SS).

Table 1. Closest match of fungal isolate ITS sequence inferred from Blastn search in GenBank.

Fungal acronyms	Organ source of isolation	BLASTn closest match (Accession No.)	ITS length (query/reference) (Similarity, %)	GenBank Accessions of fungi from this study
SA	stem	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (GQ214536)	626/626 (100%)	KU141395
SB	stem	<i>Phoma macrostoma</i> (GU237740)	484/485 (99%)	KU141382
SE	stem	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FN868454)	600/600 (100%)	KU141396
SL	stem	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> (GQ214536)	607/607 (100%)	KU141394
SL23	stem	<i>Colletotrichum destructivum</i> (JQ005764)	518/518 (100%)	KU141392
SO	stem	Pleosporaceae sp. (KF636768)	554/555 (99%)	KU141381
ST2	stem	<i>Cladosporium halotolerans</i> (LN834365)	549/549 (100%)	KU141393
ST3	stem	Pleosporales sp. (FN548157)	598/600 (99%)	KU141380
SS	stem	<i>Sarocladium strictum</i> (KC311519)	553/553 (100%)	KU141379
RL3	root	<i>Penicillium resedanum</i> (JN689345)	580/580 (100%)	KU141384
RL6	root	Fungal sp. (HM123626)	572/648 (88%)	KU141390
RT5a	root	<i>Penicillium solitum</i> (JN642222)	547/547 (100%)	KU141383
RT5b	root	<i>Ophiosphaerella narmari</i> (KP690979)	452/495 (91%)	KU141388
RT6c	root	<i>Nemania serpens</i> (EF155504)	600/600 (100%)	KU141386
RT9	root	<i>Nemania serpens</i> (EF155504)	602/603 (99%)	KU141385
RT9b	root	<i>Chaetomium funicola</i> (EU552109)	545/555 (98%)	KU141378
RT10	root	Mucoromycotina sp. (HQ406814)	372/408 (91%)	KU141387
RT13	root	<i>Cercophora coprophila</i> (AY999136)	489/528 (93%)	KU141391
RT14	root	Mucoromycotina sp. (HQ406814)	372/408 (91%)	KU141389

doi:10.1371/journal.pone.0143353.t001

Two fungi, *Cadophora luteo-olivacea* (SA and SL) and *Nemania serpens* (RT6c and RT9) included two isolates each (Table 1). The ITS sequence of isolate RT9 differed only by one nucleotide from *N. serpens* RT6c isolate and was considered the same species. In the case of *P. solitum* and related taxa, the ITS region is highly conserved [24] thus the precise attribution at the species level of the isolate RT5a is still under study.

Plant fresh and dry weights

The effects of the different endophytes on *Arabidopsis* FW varied considerably, and ranged from significant plant promotion to inhibition, at both 14 and 21 DAI (Fig 1a and 1b).

Co-culture of *Arabidopsis* with the fungal isolate SS and RT6c increased the FW of about 30% in relation to the controls, while SE, SL, SO, ST2, RL3 and RT5a decreased significantly it (Fig 1a). The highest inhibition, of about 67%, was induced by the fungal isolate RT5a, while the reduction of plant biomasses due to the other fungi ranged between 29 and 49%.

Only a few fungal endophytes which significantly affected FW 14 DAI, affected it also 21 DAI; they were: SS, which significantly increased FW, and SE, SL, RL3 and RT5a, which negatively affected it (Fig 1b). Some fungal isolates significantly increased (SB and RT5b) or decreased (RT10) FW 21 DAI only (Fig 1b). A significant correlation was found between FWs of the 1st and 2nd sampling time ($R^2 = 0.396$; $P = 0.002$) and the analysis of pooled data on FW

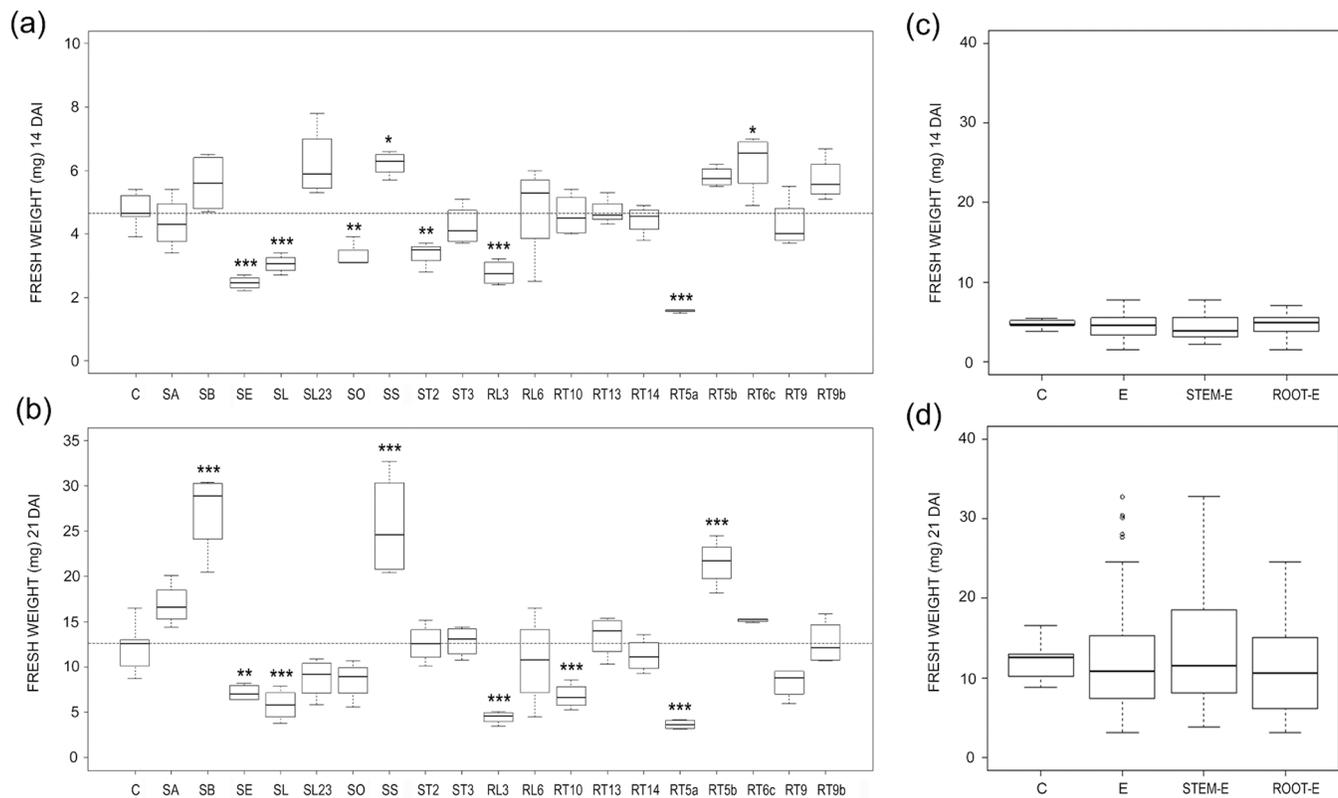


Fig 1. Endophyte effects on fresh weights. (a, b) Boxplots illustrating variability of fresh weight in E-treated and control (C) *Arabidopsis* plants 14 (a) and 21 (b) DAI. The reference hatched line represents the median of controls. Differences were considered significant at a probability level of *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; and ***: $p < 0.001$. (c, d) Pooled data for controls (C) and plants treated with all (E), stem (stem-E) and root (root-E) endophytes and 14 (a) and 21 (b) DAI.

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g001

did not indicate any significant difference between controls and E-treated plants, despite a slight decrease was found in relation to controls (Fig 1c and 1d).

Water mint endophytes affected *Arabidopsis* DW in a different manner. In fact, most fungal isolates increased significantly or had a neutral effect on DW, 14 and 21 DAI (Fig 2a and 2b). This led to a general increase in DW as confirmed in the analysis of pooled data (Fig 2c and 2d). All isolates that significantly increased DW 14 DAI (SB, SL23, SS, RT5b and RT6c) showed the same effect 21 DAI, others (SA and SS) increased significantly DW 21 DAI only (Fig 2a and 2b). Except for the isolate RT5a none of the fungal endophytes significantly decreased the DW of *Arabidopsis* 14 DAI, while three isolates in addition to RT5a, namely SL, SO and RL3, reduced significantly plant DW 21 DAI. Data obtained 21 DAI were strictly correlated to those at 14 DAI ($R^2 = 0.578$; $P = 0.000$).

Overall, both FW and DW were significantly increased by three fungi (SB, SS and RT5b) at 14 and 21 DAI, and lowered by other three (SL, RL3 and RT5a), 21 DAI (Figs 1 and 2). Among the latter, RL3 and RT5a early sporulated and the mycelium extensively grew on the roots making impossible root measurements, thus they were excluded from morphometric analysis 21 DAI.

The % dry-to-fresh biomass of *Arabidopsis* increased in relation to controls, and this was striking 14 DAI, when it occurred in all E-treatments, significantly in almost half of them (Fig 3a); most effects were instead neutral 21 DAI and by this time only 5 fungal isolates caused a

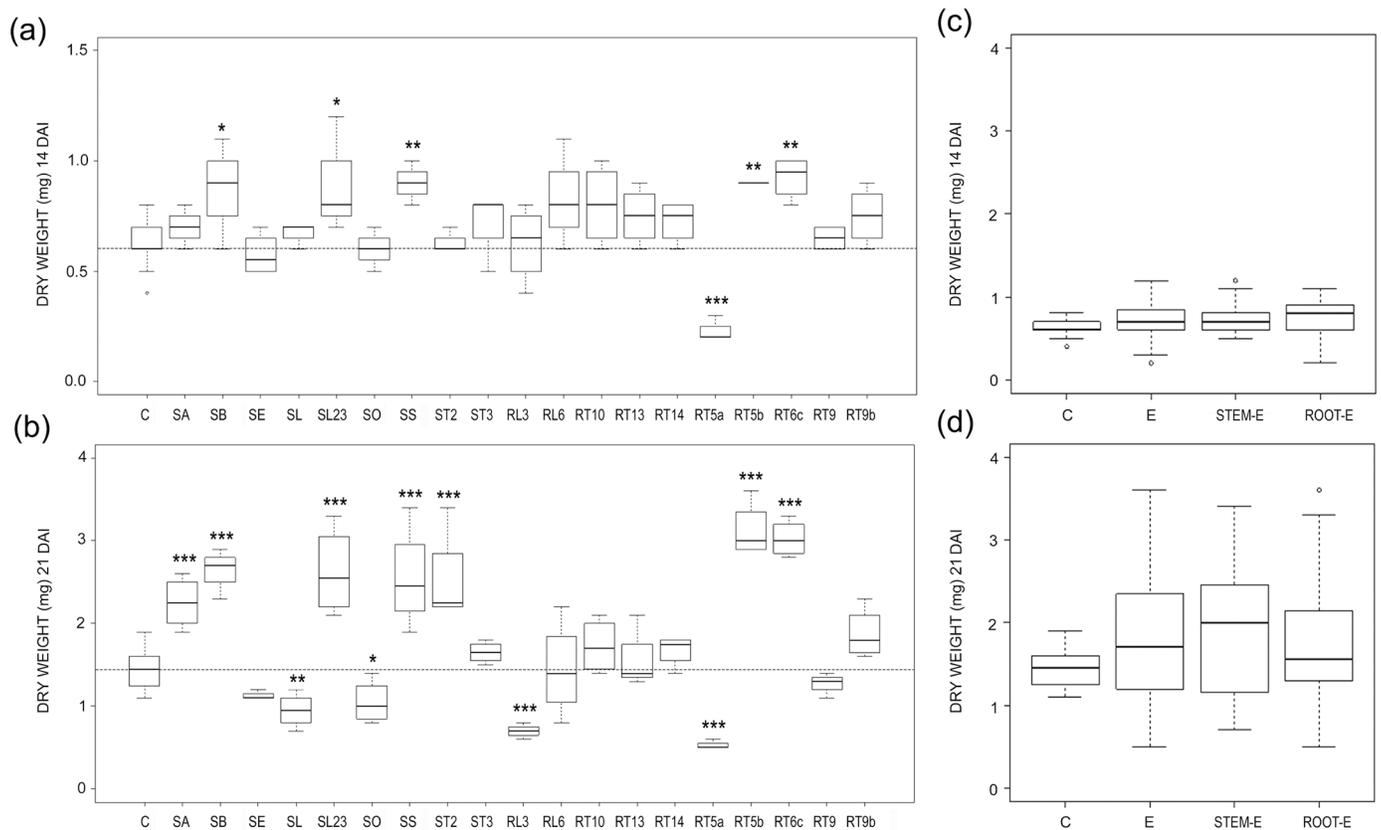


Fig 2. Endophyte effects on dry weights. (a, b) Boxplots illustrating variability of dry weight in E-treated and control (C) *Arabidopsis* plants 14 (a) and 21 (b) DAI. The reference hatched line represents the median of controls. Differences were considered significant at a probability level of *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Pooled data for controls (C) and plants treated with all (E), stem (stem-E) and root (root-E) endophytes and 14 (a) and 21 (b) DAI.

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g002

significant increase of the % dry-to-fresh mass of *Arabidopsis* (Fig 3b). The analysis of pooled data showed a % dry-to-fresh mass increase in E-treated plants in relation to controls by 14 DAI (Fig 3c and 3d).

The two isolates of *C. luteo-olivacea* (SA and SL) showed a different effect on *Arabidopsis* weights. The fungal isolate SA had little effects on these parameters, showing a significant DW increase 21 DAI only, and neutral effect on both fresh and % dry-to-fresh biomass; on the contrary, SL decreased significantly FW 14 and 21 DAI, and DW 21 day, leading to a significant increase of the % dry-to-fresh biomass at both sampling times.

Extension of the root system: root area and root depth

Arabidopsis root system extension changed considerably and significantly 14 and 21 DAI with water mint endophytes (Fig 4). Six isolates decreased root area significantly, while five significantly increased it, 14 DAI (Fig 5a). At the end of the experiment, although the number of stimulating or repressing fungi was about the same, only SL23 decreased significantly root area (Fig 5b). Five fungi significantly increased root area 21 DAI, including SB (Fig 4b and 4b') and SS (Fig 4d and 4d'), which significantly increased FW and DW at both sampling times. An increase of root area in relation to controls, i.e. a reduction of the negative effects or an increase of the positive ones, was found between the 1st and 2nd samplings in most E-treatments (Fig 5a

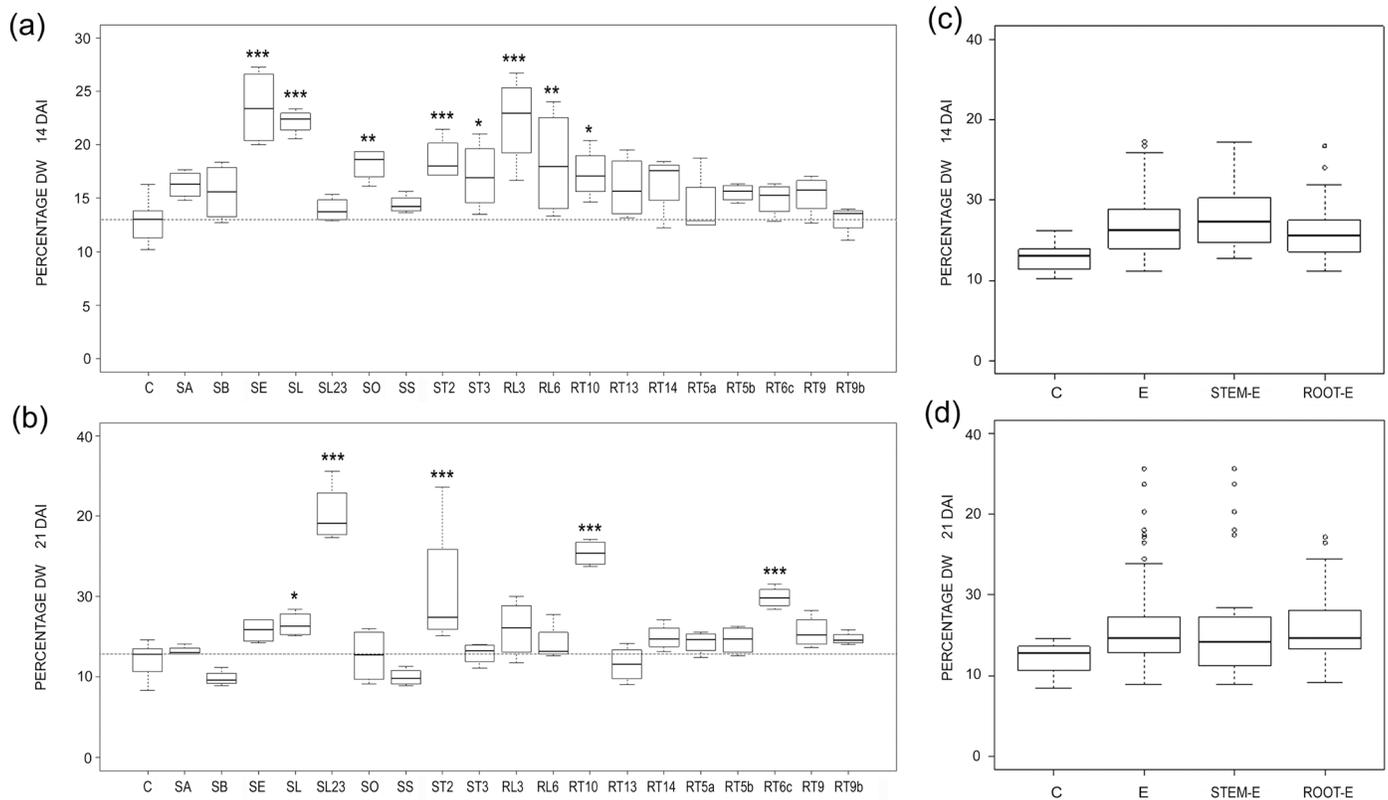


Fig 3. Endophyte effects on percentage dry weights. (a, b) Boxplots illustrating variability of percentage dry weight in E-treated and control (C) *Arabidopsis* plants 14 (a) and 21 (b) DAI. The reference hatched line represents the median of controls. Differences were considered significant at a probability level of *: $P < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Pooled data for controls (C) and plants treated with all (E), stem (stem-E) and root (root-E) endophytes and 14 (a) and 21 (b) DAI.

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g003

and 5b). This trend was confirmed by the analysis of pooled data. Stem-E reduced *Arabidopsis* root area, while root-E tended to increase it (Fig 5c and 5d).

On the contrary, a consistent, significant decrease of root depth with respect to controls occurred, at both samplings and in almost all E-treated plants (Figs 4c–4e, 4c'–4e' and 6a and 6b). *Arabidopsis* root apparatus depth was significantly decreased 14 DAI by almost all water mint fungi (Fig 6a). Root depth increased only slightly between 14 and 21 DAI with most fungi and 21 DAI all isolates except four continued to significantly reduce the parameter (Fig 6b). Exceptions were represented by fungal isolates RL6 and RT9b, whose positive effect become significant 21 DAI only, and by SB (Fig 4b') which increased significantly the parameter (Fig 6b). Accordingly, the analysis of pooled data showed a decrease of root depth in E-treated plants at both samplings, which was more pronounced when stem-E fungi were considered (Fig 6c and 6d).

Both isolates of *C. luteo-olivacea* strongly reduced root depth (Fig 6a and 6b), however, SA increased root area, significantly 21 DAI, while SL showed a repressive effect on this parameter, significant 14 DAI (Figs 5a and 5b and 7a and 7b).

Root system architecture (RSA)

The morphometric parameters related to RSA of *Arabidopsis* were analysed 14 DAI on ten E-treatments that were characterized by coherent and significant alterations in FW and/or DW

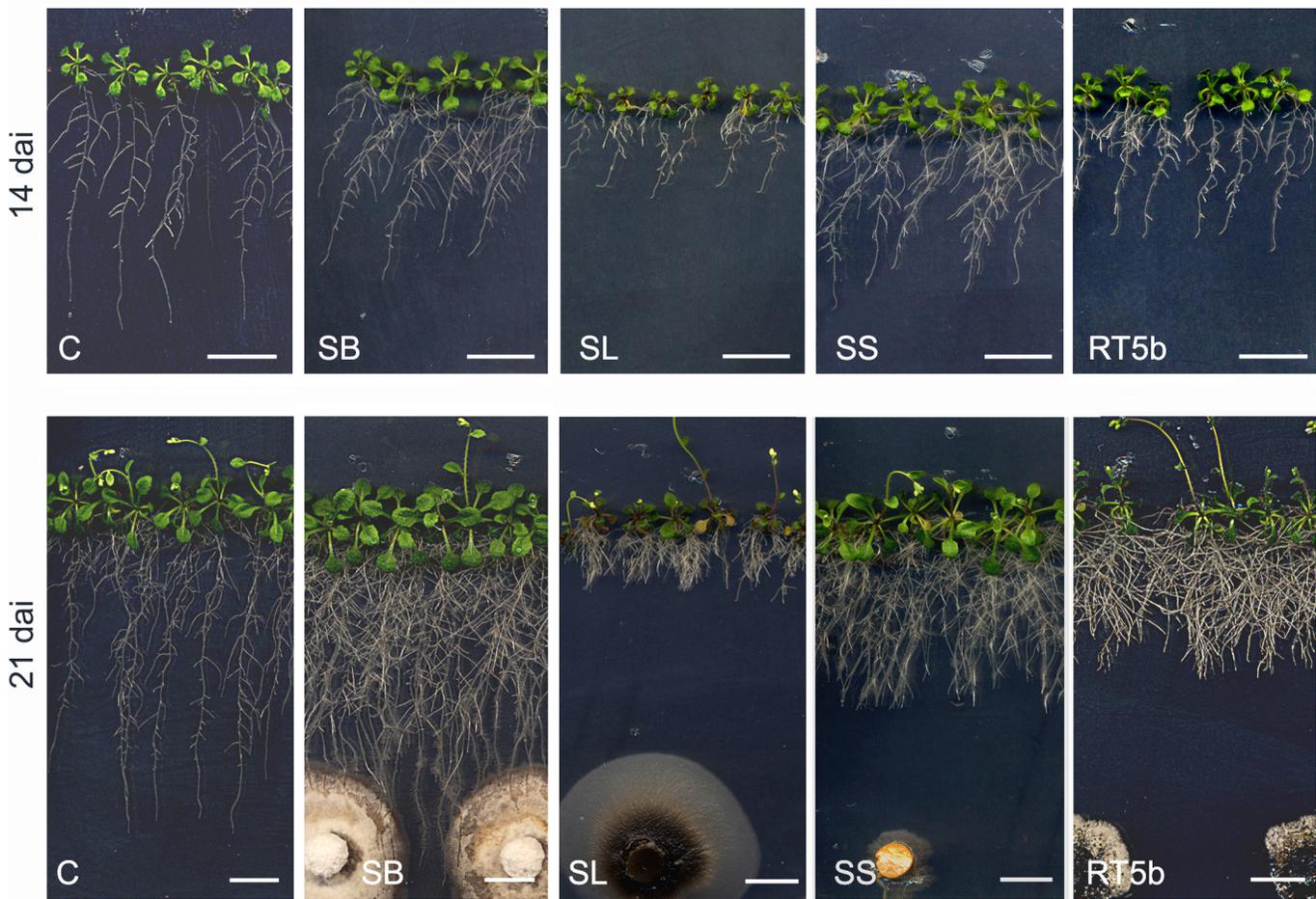


Fig 4. Endophyte-related root phenotypes in *Arabidopsis*. Plants and fungus co-cultures 14 DAI (top row, a-f) and 21 DAI (bottom row, a'-f').

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g004

in relation to controls at both samplings. The fungal isolate SA of *C. luteo-olivacea* was added to be compared with SL, of the same species. The selected isolates were: SA, SB, SE, SL, SL23, SS, RL3, RT5a, RT5b and RT6c.

None of the selected endophytes increased the number of first order lateral roots of *Arabidopsis* with respect to the control plants, and decreases were significant for four of them: SE, SL, RL3 and RT5a (Fig 8a). The same four fungi reduced significantly, between 51 and 81%, the total lateral root length of *Arabidopsis*, while RT6c significantly increased it (Fig 8b). A substantial reduction of the length of the primary root occurred in all E-treatments of *Arabidopsis*; this decrease was almost always significant, and ranged between 23 and 67%; only SB and RT6c caused a non-significant reduction of this parameter (Fig 8c). Variations in primary and total lateral root lengths in relation to controls were tightly related to those found for root depth and root area, respectively (adjusted $R^2 = 0.93$; $p < 0.001$; adjusted $R^2 = 0.92$; $p < 0.001$).

The general reduction in both the primary root length and in the number of lateral roots led to a not-significant effect on the primary root branching of *Arabidopsis* in most cases. In fact, lateral root density of the primary root was modified significantly only by the SL fungal isolate of *C. luteo-olivacea*, which increased it due to the strong shortening of the primary root (Figs 4c and 8d).

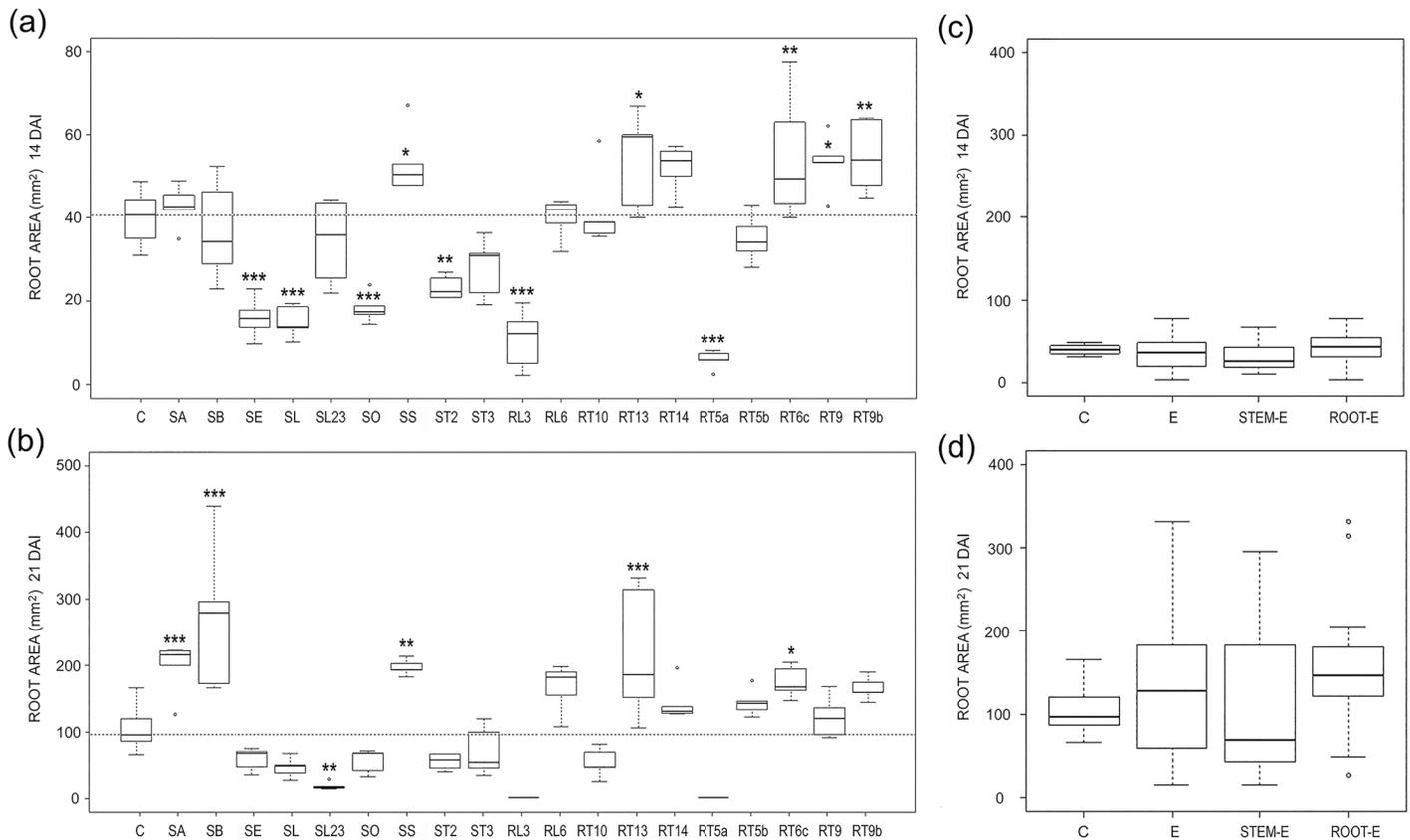


Fig 5. Endophyte effects on root areas. (a, b) Boxplots illustrating root area variability in E-treated and control (C) *Arabidopsis* plants 14 (a) and 21 (b) DAI. The reference hatched line represents the median of controls. Differences were considered significant at a probability level of *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Pooled data for controls (C) and plants treated with all (E), stem (stem-E) and root (root-E) endophytes and 14 (a) and 21 (b) DAI.

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g005

Interestingly, fungal isolates SL and SA of *C. luteo-olivacea* modified the number of lateral roots and primary root length of *Arabidopsis* with the same trend, by reducing them, and both had a positive effect on root branching. However, the effects exerted by SL were comparatively higher and only SL reduced significantly the lateral root length (Figs 7 and 8a–8d).

Discussion

In this study, for the first time, the effects of number of endophytes isolated from healthy stems and submerged roots of *M. aquatica* L. (water mint) were analyzed in order to compare and comprehensively evaluate their effects on growth and root architecture in *Arabidopsis*. Although the use of microbial inoculants naturally associated with the host plant is advisable [25], in nature *Arabidopsis* may be colonized by a very large variety of microorganisms, and it has become a recognized model to analyse non-mycorrhizal plant-microbe interactions [4, 12, 26].

Fungal endophytes of water mint

A few of the water mint endophytes had previously been reported in other plant hosts and in different habitats. The water mint fungal isolate SE of *Aureobasidium pullulans*, for example,

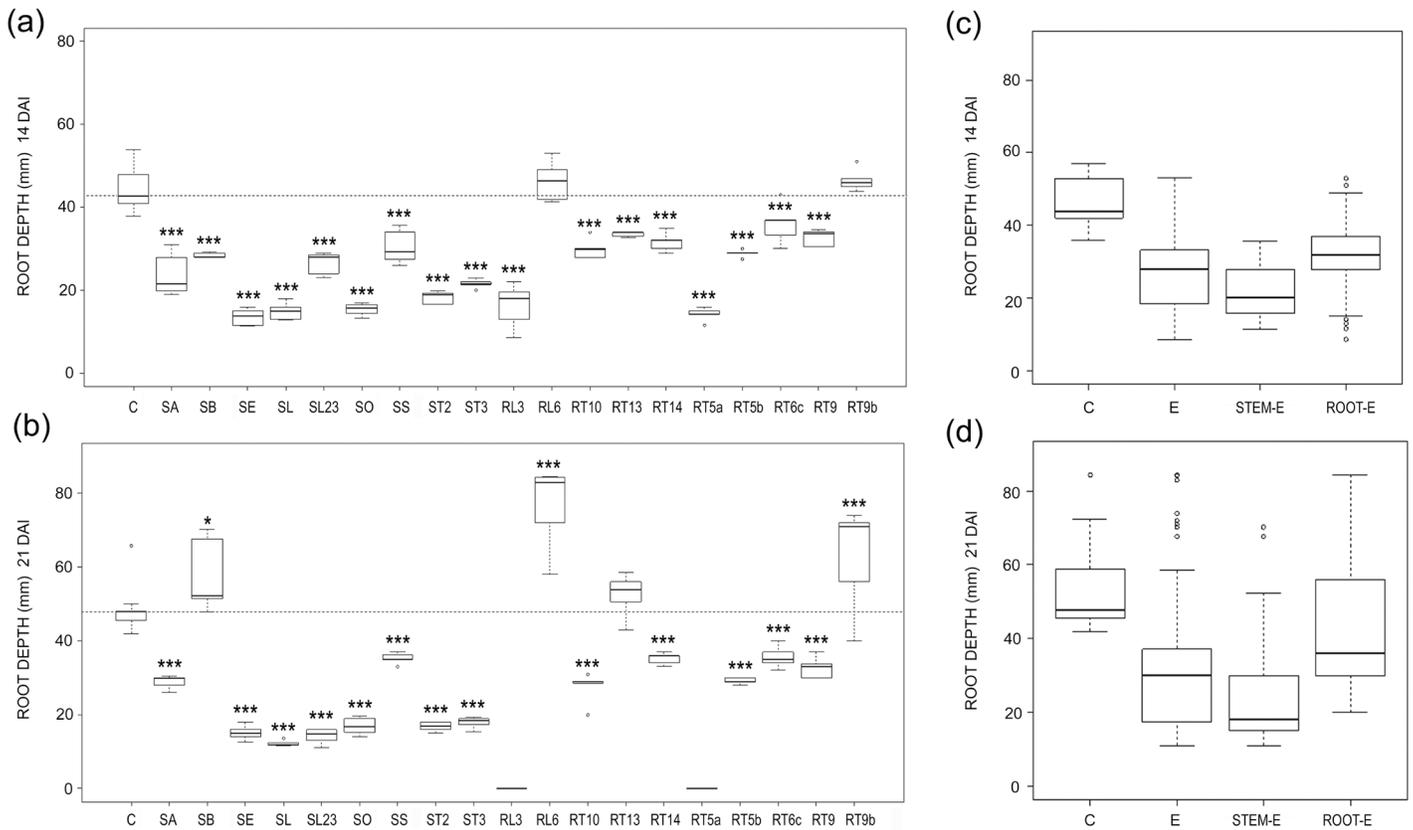


Fig 6. Endophyte effects on root depth. (a, b) Boxplots illustrating variability of root depth in E-treated and control (C) *Arabidopsis* plants 14 (a) and 21 (b) DAI. The reference hatched line represents the median of controls. Differences were considered significant at a probability level of *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 . (c, d) Pooled data for controls (C) and plants treated with all (E), stem (stem-E) and root (root-E) endophytes and 14 (a) and 21 (b) DAI.

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g006

belongs to the NC-endophytes of class 2 *sensu* [2], as it is epiphytic and endophytic in healthy leaves, stems, roots and seeds of different host species [27]. Similarly, the fungal isolate SS of *Sarocladium strictum* is an endophyte in the roots of several medicinal plants [28], and in stems of *Salicornia europaea* [29].

Other water mint endophytes are ecologically more variable being also described in literature as saprobes in different habitats. The fungal isolate ST2, here referred as *Cladosporium*



Fig 7. *Cadophora luteo-olivacea* related root phenotypes in *Arabidopsis*. Plants and fungus co-cultures 21 DAI with SA (a) and SL (b).

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g007

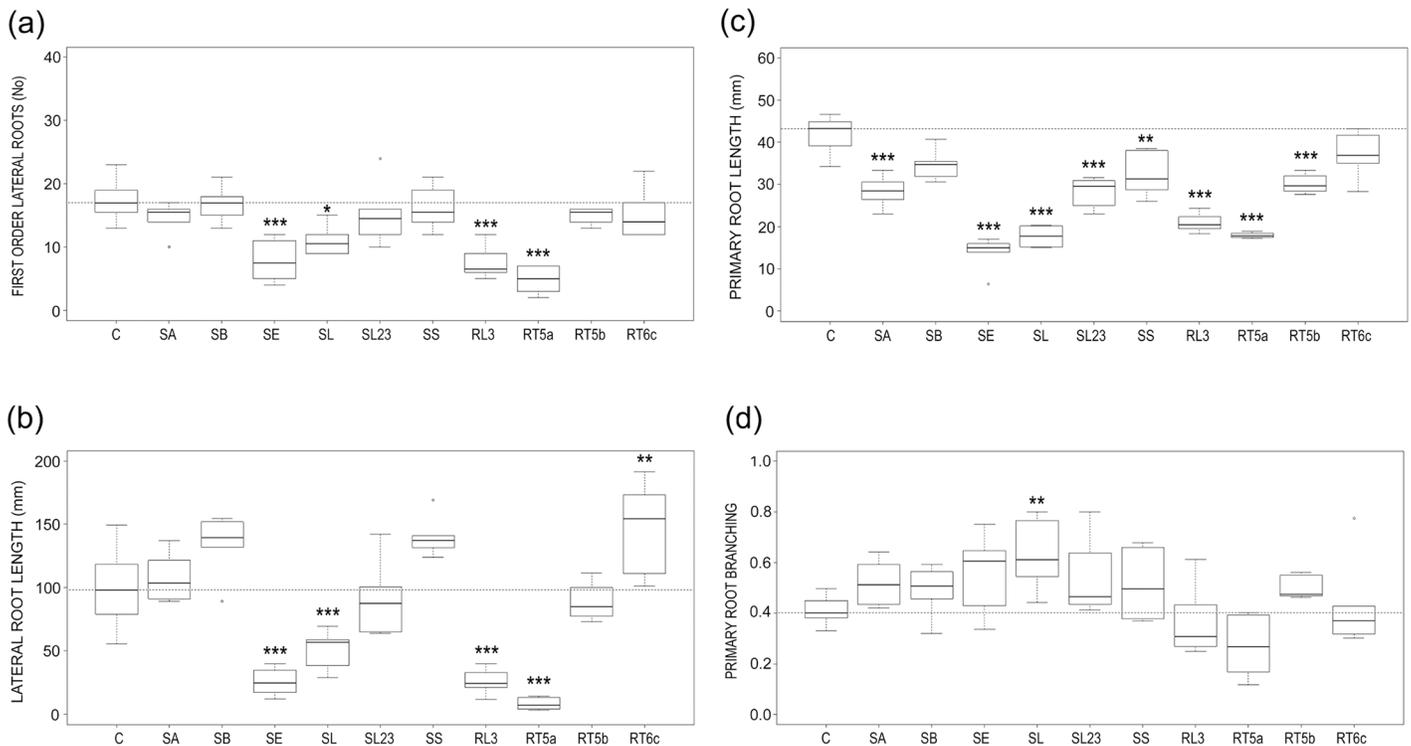


Fig 8. Endophyte effects on root system architecture. Boxplots illustrating root system architecture variability in E-treated and control (C) *Arabidopsis* plants, 14 DAL. (a) number of first order lateral root; (b) total length of lateral root; (c) primary root length and (d) primary root branching. The reference hatched line represents the median of controls. Differences were considered significant at a probability level of *: $p < 0.05$; **: < 0.01 ; and ***: < 0.001 .

doi:10.1371/journal.pone.0143353.g008

halotolerans, is an endophyte of healthy stems and leaves of *Hypericum perforatum* but also found saprobe in salty or hypersaline environments [30].

The effects of the fungal isolates on *Arabidopsis* growth

Fungal endophytes in culture can manifest a wide range of lifestyles, including weak pathogens and dormant saprobes. For such reason, we synchronized co-cultures of fungi and *Arabidopsis* in order to limit the physical contact between the two partners (Fig 4). Only in the case of the root promoter isolate SB (Fig 4b and 4b') and of the sporulating fungi RT5a and RL3, contact between the fungal colony and *Arabidopsis* roots occurred by the end of experiment.

As expected, in terms of plant biomass, the effects of water mint endophytes ranged from inhibition to promotion of *Arabidopsis* growth (Figs 1a and 1b and 2a and 2b). In some cases the effects observed were consistent with the literature as it happened for *S. strictum* (SS) which showed a PGP effect on *Arabidopsis* (Fig 4d and 4d') and other hosts [31–32]. On the contrary, the water mint isolate SB, genetically close to the pathogen *Phoma macrostoma* with bioherbicidal activity [33], in our study turned to be a PGP fungus (Fig 4b'). The opposite occurred with the water mint isolates SE, RT5a and RL3, which affected negatively *Arabidopsis* plant biomass, although *A. pullulans* was described as a biological control agent capable of beneficial effects on hosts [34, 35], and *P. resedanum* and *P. solitum* strains showed to be beneficial or neutral when associated to *Capsicum annuum* [36] and *Solanum lycopersicum* [37], respectively.

Differences between our results and those of the literature can rely on different experimental procedures. However, fungal isolates belonging to the same species may behave differently.

Variability of plant host effects among different isolates of the same species has been documented in the literature for *P. solitum* [37, 38] and *C. luteo-olivacea* [39, 40]. Accordingly, in our work the two isolates of *C. luteo-olivacea* exerted a strong and opposite influence on *Arabidopsis* growth. In fact, SA significantly increased FW, DW and root area while SL decreased the same characters, 21 DAI (Fig 7), indicating that different isolates of the same species may behave differently even when isolated from the same plant organ.

As a whole, water mint endophytes exerted a neutral/beneficial effect on plant growth (see FW and DW pooled data, Figs 1c and 1d and 2c and 2d). This contrasts with results from a recent meta-analysis conducted on DSE, where the response of total biomass to fungal inoculation was about 18% lower than non-inoculated controls [6], despite the observed PGP effect of a number of DSE [41].

All water mint endophytes induced an increase of % dry-to-fresh biomass 14 DAI at least (Fig 3a), mainly due to a general increase in DW (Fig 2a–2d). Variation of plant biomass following fungus inoculation is frequently expressed as variations in fresh or dry weights [12, 14, 42, 43] and % dry-to-fresh biomass has been rarely reported. However, PGP endophytes such as *P. indica* [44] and PGP-HSF [45, 46], increased more the fresh than the dry biomasses of *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita*, respectively, while in other cases the influence of endophytes on the % in DW and FW were rather similar [44, 47]. Thus, the increase in the DW unrelated to FW observed in our work (SL23, ST2, RT6c and RT10; compare Figs 1b and 3b) is difficult to explain. We suspected that a number of water mint isolates behaved as mild pathogens when co-cultured with *Arabidopsis*, as generally occurs during non-systemic endophyte infection [48, 49 and references therein]. In response, plants may have reduced cell elongation, thus producing more cells per volume unit, and/or increased cell wall thickness [50]). Auxin, which is known to be extremely important not only in plant development [51, 52] but also in plant-pathogen interactions and plant defence mechanisms (reviewed by [50]), could tentatively be involved in this response.

Water mint endophytes affected significantly *Arabidopsis* root shape and extension and a significant decrease of root depth with respect to control plants occurred by 14 DAI, in almost all treatments (Fig 6a and 6b). This accorded with the substantial and consistent reduction of the primary root length induced by the ten selected fungi 14 DAI (Fig 8c). Because this occurred along with a general reduction of the number of lateral roots (Fig 8a), root branching did not change significantly with most endophytes (Fig 8d).

A comparison of the effects of the different fungi on *Arabidopsis* root development 14 DAI showed that the reduction in root depth and total root area with respect to control plants was related to plant growth on a DW basis (adjusted $R^2 = 0.21$; $P = 0.024$ and adjusted $R^2 = 0.37$; $P = 0.003$, respectively). On the contrary, significant relations were not found among the same parameters 21 DAI. This indicates that the effect exerted by a number of endophytes on DW could depend on a root system more or less efficient in nutrient absorption in the early growth stages.

However, it is worth noting that alterations in RSA can influence plant growth independently of nutrient uptake by regulating plant-microorganism interactions. A reduction in root length, as above explained, may be related to more rigid cell walls and greater resistance towards pathogens [50]. Moreover, RSA plays a significant role in determining composition and quantity of exudates (reviewed by [53]). Water mint isolates, by changing the proportion of apical, elongating and mature root zone, may regulate the release of nutrients, gases, anti-microbial or signalling compounds, which are important chemical mediators between plant and rhizospheric microorganisms and, as already discussed, can also affect the phytodepurative properties of the plant [10].

Microbial endophytes can influence plant morphogenesis directly, by releasing auxins, or indirectly, through regulating auxin biosynthesis, homeostasis and signalling in host tissues [14, 52, 54, 55]. Because one of the most striking effect of E-treatment on *Arabidopsis* was primary root shortening, which is typically induced by high concentrations of auxin [14, 56], we estimated the presence of IAA derivatives in water mint endophytes growth medium. None of the water mint endophytes produced IAA derivatives in liquid culture, with the exclusion of SA (*C. luteo-olivacea*), whose IAA-derivatives level (0.055 µg/ml; S1 Text) was however lower than the range of concentrations reported for other fungal endophytes [57–59]. The response of *Arabidopsis* to SA was characterized by a significant increase of DW and root area, only 21 DAI, and by a strong reduction in the length of the primary root and root depth, without a significant branching increase (14 DAI). Therefore, growth alterations produced by SA accorded only in part with the production of auxin by the fungus [56] and were similar to those induced e.g. by SS, whose auxin levels were not detectable. This led us to suppose the influence of other factors on root development, although a more specific auxin content quantification, and the use of auxin synthesis and signaling *Arabidopsis* mutants are needed to draw any conclusion.

Plant tissues and organs represent different ecological niches with regard to endophyte diversity, favouring host-specific and organ-specific endophytes [8]. Fungal endophytes have been shown to produce and release different substances according to the tissue or organ of origin [60]. Our results pointed to a dependence of *Arabidopsis* root morphogenesis on the organ source of endophytes. In fact, although pooled data showed comparable effects of stem-E and root-E on FW (Fig 1c and 1d), the increase in dry biomasses of E-treatments was mainly ascribable to stem-E, 21 DAI (Fig 2d). Moreover, *Arabidopsis* root area decreased or increased under the effects of stem-E and root-E, respectively (Fig 5c and 5d) and reduction of root depth occurred to a great extent when plants were treated with stem-E (Fig 6c and 6d).

Conclusions

We proposed a model for the occurrence of plant growth-modulating traits in water mint-associated fungi, contributing to elucidate the role on plant growth of fungi living in an aquatic environment.

Our analyses allowed us to recognize three PGP fungi, SB, SS and RT5b, which increased both FW and DW of *Arabidopsis* at 14 and 21 DAI. However, effects of these fungi on root extension were variable: two of them, SB and SS, increased root area significantly 21 DAI, while only SB enhanced root depth 21 DAI. In general, although *Arabidopsis* responses to inoculation varied significantly according to the fungal endophyte, with effects ranging from inhibition to promotion of plant growth, we were able to establish that: (1) *Arabidopsis* growth responses under the influence of water mint endophytes in terms of FW and DW were neutral and positive, respectively; the effect on DW addressing to a typical plant response toward non-systemic and potentially pathogenic infections; (2) a consistent decrease in root depth and primary root length were the main features of root extension modulation which influenced DWs 14 DAI; (3) Root extension was likely related to the source organ (shoot or root), although this aspect need further confirmation.

Many questions remain unresolved; nevertheless this model could be used for screening the ability of other endophytes to modulate *Arabidopsis* RSA, in the perspective of future field applications of these fungi.

Water mint is a facultative hydrophyte that, due to its relatively high biomass, fast growth and depurative capacity, is useful for phytodepuration in constructed wetlands [61]. In these systems, plant health is affected by the toxicity of contaminants and other environmental stresses, such as frequent fluctuation in water depth, which reduce biomass production and

thus limits the purification process. Some endophytes have shown to reduce stress [2] and those with PGP activity, such as the water mint isolates SA, SB and SS, may improve the process of phytodepuration through enhancing plant growth. Moreover, larger root areas, other than increase plant nutrient and contaminant absorption, may give greater chances of establishing beneficial associations with rhizobacteria [62]. Root growth modulation by fungal endophytes towards more efficient and stress tolerant plants would be therefore tested in watermint and other macrophytes to withstand the pollutant loading and the stresses associated with these aquatic treatment systems. Future studies will be also addressed to the exploitation in field of fungal-related plant phenotypes to produce environmentally friendly bio-inoculants and enhance phytodepurative properties of plants.

Supporting Information

S1 Dataset. Effects of water mint endophytes: weights and morphometric data.
(XLS)

S1 Fig. The method used to measure root area and root depth of *Arabidopsis* plants grown *in vitro*.
(TIF)

S1 Text. Levels of IAA derivatives in cultures of *Cadophora luteo-olivacea* (SA).
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: M. Mucciarelli AF FD. Performed the experiments: M. Mucciarelli AF FD M. Mascarello. Analyzed the data: FD M. Mucciarelli. Contributed reagents/materials/analysis tools: AF M. Mucciarelli. Wrote the paper: AF M. Mucciarelli.

References

1. Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 2015; 206: 1196–1206. doi: [10.1111/nph.13312](https://doi.org/10.1111/nph.13312) PMID: [25655016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25655016/)
2. Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 2009; 182: 314–330. doi: [10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x) PMID: [19236579](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19236579/)
3. Brundrett M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2004; 79: 473–495. PMID: [15366760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15366760/)
4. Mandyam KG, Jumpponen A. Mutualism-parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. *Front Microbiol.* 2015; 5: 1–13.
5. Goh CH, Vallejos DFV, Nicotra AB, Mathesius U. The impact of beneficial plant-associated microbes on plant phenotypic plasticity. *J Chem Ecol.* 2013; 39: 826–839. doi: [10.1007/s10886-013-0326-8](https://doi.org/10.1007/s10886-013-0326-8) PMID: [23892542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23892542/)
6. Mayerhofer MS, Kernaghan G, Harper KA. The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 2013; 23: 119–28. doi: [10.1007/s00572-012-0456-9](https://doi.org/10.1007/s00572-012-0456-9) PMID: [22983627](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22983627/)
7. Khan AL, Hussain J, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee JJ. Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Crit Rev Biotechnol.* 2015; 35: 62–74. doi: [10.3109/07388551.2013.800018](https://doi.org/10.3109/07388551.2013.800018) PMID: [23984800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23984800/)
8. Sandberg DC, Battista LJ, Arnold AE. Fungal endophytes of aquatic macrophytes: diverse host-generalists characterized by tissue preferences and geographic structure. *Microb Ecol.* 2014; 67: 735–747. doi: [10.1007/s00248-013-0324-y](https://doi.org/10.1007/s00248-013-0324-y) PMID: [24402358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24402358/)
9. Branković S, Pavlović-Muratspahić D, Topuzović M, Glisnić R, Milivojević J, Dekić V. Metals concentration and accumulation in several aquatic macrophytes. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2015; 26: 2731–2736.

10. Avelar FF, de Matos AT, de Matos MP, Borges AC. Coliform bacteria removal from sewage in constructed wetlands planted with *Mentha aquatica*. *Environ Technol*. 2014; 35: 2095–2103. PMID: [24956804](#)
11. Hamann E, Puijalón S. Biomechanical responses of aquatic plants to aerial conditions. *Ann Bot*. 2013; 112: 1869–1878. doi: [10.1093/aob/mct221](#) PMID: [24187030](#)
12. Martinuz A, Zewdu G, Ludwig N, Grundler F, Sikora RA, Schouten A. The application of *Arabidopsis thaliana* in studying tripartite interactions among plants, beneficial fungal endophytes and biotrophic plant-parasitic nematodes. *Planta* 2015; 241: 1015–1025. doi: [10.1007/s00425-014-2237-5](#) PMID: [25548000](#)
13. Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Cervantes-Badillo MG, Rosales-Saavedra MT, Islas-Osuna MA, Casas-Flores S. The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *J Microbiol Biotechnol*. 2011; 21: 686–696. PMID: [21791954](#)
14. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J. *Trichoderma vires*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2009; 149: 1579–1592. doi: [10.1104/pp.108.130369](#) PMID: [19176721](#)
15. Peskan-Berghofer T, Shahollari B, Giong PH, Hehl S, Markert C, Blanke V, et al. Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiol Plant*. 2004; 122: 465–477.
16. Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Vergara AG, López-Bucio J. *Trichoderma* modulates stomatal aperture and leaf transpiration through an abscisic acid-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *J Plant Growth Regul* 2015; 34: 425–432.
17. Hung R, Lee S, Bennett JW. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol*. 2013; 6: 19–26.
18. Sherameti I, Tripathi S, Varma A, Oelmüller R. The root colonizing endophyte *Piriformospora indica* confers drought tolerance in *Arabidopsis* by stimulating the expression of drought stress—related genes in leaves. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2008; 21: 799–807. doi: [10.1094/MPMI-21-6-0799](#) PMID: [18624643](#)
19. Sherameti I, Venus Y, Drzewiecki C, Tripathi S, Dan VM, Nitz I, et al. PYK10, a β -glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J*. 2008; 21: 799–807.
20. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*. 1993; 2: 113–118. PMID: [8180733](#)
21. White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. United States: Academic Press. 1990; pp. 315–322.
22. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647–1649. doi: [10.1093/bioinformatics/bts199](#) PMID: [22543367](#)
23. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962; 15: 473–497.
24. Skouboe P, Taylor JW, Frisvad JC, Lauritsen D, Larsen L, Albaek C, et al. Molecular methods for differentiation of closely related *Penicillium* species. In: Samson RA, Pitt JI, editors. *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*. Netherlands: Harwood Academic Publishers; pp 179–188.
25. Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *PLoS One* 2008; 3: e2702. doi: [10.1371/journal.pone.0002702](#) PMID: [18628963](#)
26. Mandyam KG, Roe J, Jumpponen A. *Arabidopsis thaliana* model system reveals a continuum of responses to root endophyte colonization. *Fungal Biol*. 2013; 117: 250–260. doi: [10.1016/j.funbio.2013.02.001](#) PMID: [23622719](#)
27. Botella L, Diez JJ. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Divers*. 2011; 47: 9–18.
28. Su H, Kang JC, Cao JJ, Mo L, Hyde KD. Medicinal plant endophytes produce analogous bioactive compounds. *Chiang Mai J Sc*. 2014; 41: 1–13.

29. Okane I, Nakagiri A. Assemblages of endophytic fungi on *Salicornia europaea* disjunctively distributed in Japan: towards clarification of the ubiquity of fungal endophytes on halophytes and their ecological roles. *Curr Sc*. 2015; 108: 1–10.
30. Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Stud Mycol*. 2007; 58: 157–183. doi: [10.3114/sim.2007.58.06](https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.06) PMID: [18490999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18490999/)
31. Wang XM, Yang B, Wang HW, Yang T, Ren CG, Zheng HL, et al. Consequences of antagonistic interactions between endophytic fungus and bacterium on plant growth and defense responses in *Atractylodes lancea*. *J of Bas Microbiol*. 2014; 55: 659–670.
32. Jaber LR, Vidal S. Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. *Ecol Entomol*. 2010; 35: 25–36.
33. Bailey KL, Pitt WM, Leggett F, Sheedy C, Derby J. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. *Biol Control* 2011; 59: 268–276.
34. Wachowska U, Glowacka K. Antagonistic interactions between *Aureobasidium pullulans* and *Fusarium culmorum*, a fungal pathogen of winter wheat. *Biocontrol*. 2014; 59: 635–64.
35. Rai M, Rathod D, Agarkar G, Dar M, Brestic M, Pastore GM, et al. Fungal growth promoter endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. *Symbiosis* 2014; 62: 63–79.
36. Khan AL, Waqas M, Hamayun M, Al-Harrasi A, Al-Rawahi A, Lee IJ. Co-synergism of endophyte *Penicillium resedanum* LK6 with salicylic acid helped *Capsicum annuum* in biomass recovery and osmotic stress mitigation. *BMC Microbiol*. 2013; 13: 51. doi: [10.1186/1471-2180-13-51](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-51) PMID: [23452409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23452409/)
37. Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol Biochem*. 2006; 39: 1968–1977.
38. Pitt JI, Spotts RA, Holmes RJ, Cruickshank RH. *Penicillium solitum* revived, and its role as a pathogen of pomaceous fruit. *Phytopathol*. 1991; 81: 1108–1112.
39. Gramaje D, Armengol J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Dis*. 2011; 95: 1040–1055.
40. Rosa LH, Vieira MLA, Santiago IF, Rosa CA. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol*. 2010; 73: 178–189. doi: [10.1111/j.1574-6941.2010.00872.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00872.x) PMID: [20455944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20455944/)
41. Newsham KK. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. *New Phytol*. 2011; 10: 783–793.
42. Vaz ABM, Sampedro I, Siles JA, Vasquez JA, García-Romerac I, Vierheilig H, et al. Arbuscular mycorrhizal colonization of *Sorghum vulgare* in presence of root endophytic fungi of *Myrtus communis*. *Appl Soil Ecol*. 2012; 61: 288–294.
43. Murphy BR, Doohan FM, Hodkinson TR. Fungal root endophytes of a wild barley species increase yield in a nutrient-stressed barley cultivar. *Symbiosis* 2015; 65: 1–7.
44. Dolatabadi HK, Goltapeh EM, Moieni A, Jaimand K, Sardrood BP, Varma A. Effect of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on plant growth and essential oil yield in *Thymus vulgaris* in vitro and in vivo experiments. *Symbiosis* 2011; 53: 29–35.
45. Mucciarelli M, Scannerini S, Berteà CM, Maffei M. An ascomycetous endophyte isolated from *Mentha piperita* L.: biological features and molecular studies. *Mycologia* 2002; 94: 28–39. PMID: [21156475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21156475/)
46. Mucciarelli M, Scannerini S, Berteà C, Maffei M. In vitro and in vivo peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytol*. 2003; 158: 579–591.
47. Sati SC, Arya P. Assessment of root endophytic aquatic hyphomycetous fungi on plant growth. *Symbiosis* 2010; 50:143–149.
48. Okubara PA, Paulitz TC. Root defense responses to fungal pathogens: a molecular perspective. *Root physiology: from gene to function*. *Plant Soil* 2005; 4: 215–226.
49. Wani ZA, Nasheeman A, Tabasum M, Riyaz-Ul-Hassan S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 2955–2965. doi: [10.1007/s00253-015-6487-3](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6487-3) PMID: [25750045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25750045/)
50. Ludwig-Muller J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. *J Plant Physiol*. 2015; 172: 4–12. doi: [10.1016/j.jplph.2014.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.01.002) PMID: [25456606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25456606/)
51. Hodge A, Berta G, Doussan C, Merchan F, Crespi M. Plant root growth, architecture and function. *Plant Soil* 2009; 321: 153–187.

52. Fusconi A. Regulation of root morphogenesis in arbuscular mycorrhizae: what role do fungal exudates, phosphate, sugars and hormones play in lateral root formation? *Ann Bot.* 2014; 113: 19–33. doi: [10.1093/aob/mct258](https://doi.org/10.1093/aob/mct258) PMID: [24227446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24227446/)
53. Haichar FE, Santaella C, Heulin T, Achouak W. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biol Biochem.* 2014; 77: 69–80.
54. Sukumar P, Vlegué V, Vayssières A, Martin F, Tuskan GA, Kalluri UC. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant—microorganism interactions. *Plant Cell Environ.* 2013; 36: 909–919. doi: [10.1111/pce.12036](https://doi.org/10.1111/pce.12036) PMID: [23145472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23145472/)
55. Vadassery J, Ritter C, Venus Y, Camehl I, Varma A, Shahollari B, et al. The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008; 21: 1371–1383. doi: [10.1094/MPMI-21-10-1371](https://doi.org/10.1094/MPMI-21-10-1371) PMID: [18785832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18785832/)
56. López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* 2002; 129: 244–256. PMID: [12011355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12011355/)
57. Fouda AH, Hassan SED, Eid AM, Ewais EED. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Ann Agric Sci.* 2015; 60: 95–104.
58. Waqas M, Khan AL, Lee IJ. Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *J Plant Inter.* 2014; 9: 478–487.
59. Waqas M, Khan AL, Kamra M, Hamayu M, Kang SM, Kim YH, et al. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 2015; 9: 10754–10773.
60. Mucciarelli M, Camusso W, Maffei M, Panicco P, Bicchi C. Volatile terpenoids of endophyte-free and infected peppermint (*Mentha piperita* L.): chemical partitioning of a symbiosis. *Microb Ecol.* 2007; 54: 685–696. PMID: [17370029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17370029/)
61. Zurayk R, Sukkariyah B, Baalbaki R, Ghanem DA. Common hydrophytes as bioindicators of nickel, chromium and cadmium pollution. *Water Air Soil Pollut.* 2002; 139: 355–364.
62. Remans T, Thijs S, Truyens S, Weyens N, Schellingen K, Keunen E, et al. Understanding the development of roots exposed to contaminants and the potential of plant-associated bacteria for optimization of growth. *Ann Bot.* 2012; 110: 239–252. doi: [10.1093/aob/mcs105](https://doi.org/10.1093/aob/mcs105) PMID: [22634257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22634257/)