

Muresu, Rosella; Sulas, Leonardo; Caredda, Salvatore (2003) *Simbiosi leguminose - Rhizobium in campo: problematiche e prospettive dell'inoculazione*. Rivista di agronomia, Vol. 37 (1), p. 33-45. ISSN 0035-6034.

<http://eprints.uniss.it/3758/>

Simbiosi leguminose - *Rhizobium* in campo: problematiche e prospettive dell'inoculazione

Rossella Muresu, Leonardo Sulas, Salvatore Caredda

Riassunto

I rizobi sono presenti nel suolo in funzione della distribuzione naturale o della coltivazione delle leguminose ed hanno un ruolo chiave per la loro produttività. È fondamentale valutare, sempre, se l'inoculazione di una leguminosa in un dato sito è necessaria. L'inoculazione può avvenire apportando un apposito formulato contenente il rizobio direttamente sul suolo oppure inoculando la semente. Per agevolare l'impiego, i rizobi sono usualmente incorporati in un substrato solido; la torba è la matrice più impiegata. La forma fisica (in polvere, granulare, liquida) del substrato varia in funzione del metodo di applicazione dell'inoculante, delle modalità e delle macchine impiegate per la semina. Lo sviluppo e la produzione commerciale di inoculi efficaci e di qualità richiede l'integrazione di fattori fisici chimici e biologici.

Il successo dell'inoculazione dipende da come il ceppo introdotto si adatta alle nuove condizioni ambientali e da come il suo genotipo interagisce con quello della popolazione microbica indigena antagonista e della leguminosa ospite. Tuttavia, per la mancanza di tecniche adeguate si sa ancora poco sul comportamento dei batteri, introdotti nel suolo a seguito dell'inoculazione. Lo sviluppo della biologia molecolare negli ultimi trent'anni ha fornito nuovi strumenti d'indagine per il monitoraggio in campo dei ceppi introdotti. Questi daranno nuove informazioni su come la variabilità e diversità genetica dei rizobi si sviluppa nel suolo e la loro dinamica nel tempo. Una applicazione pratica della caratterizzazione genetica dei rizobi è la possibilità di utilizzo nel monitoraggio delle colture inoculanti allo scopo di verificare eventuali alterazioni nella composizione genetica e prevenire eventuali perdite di proprietà simbiotiche da esse derivate. La interazione tra le varie discipline coinvolte, ed il dialogo tra ricerca e attività produttive in campo dovranno essere incoraggiati e migliorati al fine di incrementare la produttività delle leguminose attraverso la pratica dell'inoculazione.

Parole chiave: genetica molecolare, inoculazione, leguminose, rizobi, simbiosi.

Summary

LEGUME - RHIZOBIUM SYMBIOSIS: CHARACTERISTICS AND PROSPECTS OF INOCULATION

Rhizobia are widespread according to the natural presence or cultivation of legumes and contribute to their productivity. It is very important evaluate where inoculation is necessary or useless. For their utilization, rhizobia are incorporated into a carrier; the system of embedding cells in a sterile peat carrier is the most common practice used today. Commercial formulations for legume inoculation are produced in many countries and in different forms (powdered, granular, liquid) in relation to the seeding techniques. The formulation and commercial production of effective and high quality inoculants requires the integration of physical, chemical and biological processes.

The fate of introduced rhizobia depend on how the strain survive in the soil environment and on how his genotype responds to the competitive indigenous rhizobia, legume host and environmental constrains. However due to methodological problems, knowledge on the behaviour of inoculant bacteria in the field soil is still scarce. In the last few decades, the development of molecular biology has enabled us to follow the fate and the performance of specific strains in the field environment. Moreover, it adds new insights into the mechanisms which strains diversity develops in soil over time. A concrete application of molecular genetic characterisation of rhizobial strains is the possibility of monitoring inoculant cultures in order to preserve their genetic composition and prevent the possible loss of some symbiotic properties. The multidisciplinary interaction between several disciplines and agronomists and producers also needs more work in order to achieve the desired improvements in the agriculture productivity of legumes through the inoculation.

Key words: inoculation, legumes, molecular genetics, rhizobia, symbiosis.

Muresu R., CNR – Centro di studio sui pascoli mediterranei c/o Dipartimento di Scienze agronomiche e Genetica vegetale agraria, via E. De Nicola – 07100 Sassari.

Sulas L., CNR – Centro di studio sui pascoli mediterranei, via E. De Nicola – 07100 Sassari.

Caredda S., Dipartimento di Scienze agronomiche e Genetica vegetale agraria, via E. De Nicola – 07100 Sassari.

Autore corrispondente: Muresu R., tel. 079 229332; fax 079-229354; e-mail: rm@igm.ss.cnr.it

Lavoro eseguito nell'ambito del programma MURST COFIN "Ruolo dell'azotofissazione delle leguminose in sistemi colturali ecocompatibili".

Coordinatore Scientifico Prof. Carlo Grignani; Responsabile Scientifico u.o. di Sassari Prof. Pietro Bullitta.

Gli Autori hanno contribuito al lavoro in parti uguali.

Introduzione

Il contributo delle leguminose al mantenimento della fertilità del suolo è un aspetto noto fin dall'antichità, tuttavia solo nel diciannovesimo secolo è stato dimostrato che leguminose sono in grado di assimilare l'azoto atmosferico nei tubercoli radicali formati dai rizobi. Col termine rizobio vengono comunemente indicati i batteri del suolo appartenenti a circa trenta specie e ai sei generi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (Garrity, 2001). L'inoculazione delle leguminose è l'introduzione in campo di ceppi di azotofissatori selezionati e moltiplicati in laboratorio (Date, 2001). Il trasferimento può avvenire apportando un apposito formulato contenente il rizobio direttamente sul suolo oppure inoculando la semente prima della semina. I primi inoculi commerciali sono stati messi a punto circa cento anni fa negli Stati Uniti e nel Regno Unito; attualmente vengono prodotti e sono disponibili in numerosi paesi.

La popolazione rizobica del terreno ha un ruolo fondamentale nella produttività delle leguminose. L'utilizzo della simbiosi con finalità agronomiche presuppone che sia condotta una mirata attività di selezione dei ceppi per l'identificazione della combinazione ottimale leguminosa di interesse – genotipo di rizobio, nelle diverse condizioni pedo-climatiche in cui si andrà ad operare. Le proprietà simbiotiche del microrganismo, intese come specificità d'ospite, capacità di colonizzazione dei noduli, efficienza nella fissazione dell'azoto sono importanti caratteristiche di cui tenere conto nella selezione di nuovi ceppi, insieme alla capacità di sopravvivere nel terreno e competere con popolazioni indigene presenti (Percuoco, 1987). L'utilizzo della biologia molecolare per la caratterizzazione dei rizobi ha evidenziato una ampia varietà di genotipi appartenenti agli stessi generi e specie (Carelli et al., 2000, Corich et al., 2001b).

In questo lavoro sono richiamati alcuni aspetti relativi a caratteristiche, modalità di preparazione e di impiego degli inoculi, con particolare riferimento alle leguminose foraggere. Inoltre, sono discusse alcune problematiche e prospettive dell'inoculazione alla luce dei recenti sviluppi delle tecniche di genetica molecolare nello studio di rizobi che possono contribuire a migliorare l'efficienza agronomica della simbiosi.

Necessità dell'inoculazione

I rizobi sono presenti nel suolo in funzione della distribuzione naturale o della coltivazione delle leguminose, tuttavia, in alcuni suoli, si può registrare l'assenza di ceppi specifici per una data leguminosa, oppure i rizobi sono presenti in numero insufficiente. Ciò si verifica con l'introduzione di una specie in un nuovo areale di coltivazione (es. leguminose foraggere in Australia, soia in Europa, etc.) od in condizioni ambientali non favorevoli per la sopravvivenza dei rizobi (es. suoli acidi o alcalini, elevate temperature, etc.). Pertanto, è fondamentale valutare, sempre, se l'inoculazione di una leguminosa in un dato sito è necessaria. L'introduzione dei rizobi è indispensabile quando sono assenti; e però auspicabile anche in suoli che ospitano popolazioni di rizobi composte da ceppi simbioticamente inefficaci con una data leguminosa, per incrementarne la carica nel tempo, oppure quando sono resi disponibili ceppi con

superiore efficienza azotofissatrice (Amarger, 2001).

Un'elevata carica batterica di un ceppo indigeno può garantire, talvolta, un'efficiente nodulazione in assenza di inoculazione, mentre un ceppo introdotto può non essere in grado di competere con quello indigeno e di sopravvivere, rendendo del tutto inutile l'inoculazione. Ad esempio, l'entità della popolazione di rizobi in pascoli australiani a base di leguminose annuali varia da 1×10^4 ad 1×10^7 cellule per g^{-1} di suolo corrispondente il primo valore $1,5 \times 10^{13}$ rizobi ha^{-1} , considerando uno strato di suolo di 10 cm. Inoculando il trifoglio sotterraneo con 1×10^4 rizobi per seme si introducono circa 6×10^{10} cellule ha^{-1} (Brockwell et al., 1995). In questo caso i rizobi introdotti, tenuto conto anche della non sempre elevata qualità degli inoculanti, non sarebbero competitivi numericamente. Tuttavia, potrebbe essere più conveniente modificare alcune condizioni agronomiche e edafiche che hanno influenza sui rizobi indigeni, oppure manipolarli geneticamente (Brockwell et al., 1995). Ciò può avvenire, ad esempio, modificando la reazione del terreno con la calcitazione, incrementando la dotazione in fosforo con la concimazione e con l'ottenimento di un ceppo mutante resistente a fungicidi etc. Infatti, ampie variazioni numeriche si verificano nelle popolazioni di rizobi in funzione di fattori multipli, sia biotici che abiotici (es. presenza continua o periodica della pianta ospite, pluviometria, tipo di suolo, etc.), che ne condizionano fortemente la persistenza. Quando i rizobi sono assenti l'inoculazione può avere successo, mentre se la popolazione indigena è elevata l'inoculazione risulterà certamente inutile; è ad un livello intermedio tra queste due situazioni, compreso tra 10 e 10^3 rizobi g^{-1} di suolo, che la competizione nella nodulazione tra ceppi indigeni ed introdotti diventa un problema concreto. Il migliore modo per favorire l'insediamento di un nuovo ceppo di rizobio è quello d'impiegare un inoculo efficace e persistente, a dose elevata, posizionandolo strategicamente vicino al punto in cui le radici della leguminosa possono accettarli per primi.

Preparazione degli inoculi e formulati

Al fine di agevolarne l'impiego, i rizobi sono usualmente incorporati in un substrato solido che svolge diverse funzioni nel periodo compreso tra la preparazione e l'utilizzazione del formulato. Il substrato è il principale costituente dell'inoculo, agevola le fasi di produzione e di impiego dei formulati e assicura il mantenimento dell'umidità indispensabile per la crescita dei batteri. Le caratteristiche ottimali di un substrato solido (Keyser et al., 1992) sono diverse: elevata capacità di ritenzione idrica, facilità di sterilizzazione, uniformità chimica e fisica, atossicità per i rizobi, biodegradabilità, pH intorno alla neutralità, maneggevolezza durante le fasi di mescolamento ed incubazione e nelle operazioni di confezionamento, idoneità per gran parte dei rizobi, elevata disponibilità e costo contenuto. La torba è stato il substrato più ricercato ed impiegato nella preparazione degli inoculanti ed è considerato il più affidabile. Diversi studi hanno mostrato che la torba, rispetto ad altri substrati, garantisce una buona protezione dei rizobi sia nel prodotto confezionato sia sul seme inoculato. Le caratteristiche fisiche e chimiche di una torba non sono però sufficienti a definirne la bontà. Secondo Corich et al. (1996), la sua affidabilità è condizionata dall'eventuale sterilizzazione e dal tempo di conservazione

del formulato. È indispensabile testare anche l'accrescimento e la sopravvivenza dei rizobi. Infatti, esiste sempre un'interazione rizobio-substrato: un dato ceppo può sopravvivere bene in un certo substrato ma non in un altro (Vincent, 1970). Quindi, è importante che il produttore di inoculi conosca le interazioni rizobio-substrato dei propri ceppi e nella valutazione dei substrati è fondamentale testare il mantenimento della vitalità della popolazione dei rizobi nel tempo. Poiché la torba non è disponibile in tutti i paesi, diversi materiali solidi sono stati valutati come substrati per inoculi. Tutti i substrati, gran parte dei quali sono prodotti naturali o sottoprodotti, possono essere raggruppati nelle seguenti tre categorie (Smith, 1992):

- 1) torba e carbone con o senza additivi; la torba è il materiale più usato negli Stati Uniti mentre la lignite in India,
- 2) materiali vegetali derivanti da sottoprodotti della lavorazione della barbabietola e canna da zucchero, residui di mais, letame ed altri materiali organici,
- 3) materiali inerti quali vermiculite, vermiculite più additivi, perlite, gel di poliacrilammide, etc.

Inoculanti prodotti con substrati sterili consentono di ottenere popolazioni di rizobi più longeve (Roughley e Vincent, 1967); gli svantaggi sono costituiti dai maggiori costi di produzione derivanti dall'ulteriore lavoro richiesto per la sterilizzazione, dalla necessità di procedure asettiche e dell'individuazione di eventuali partite contaminate. Pertanto, questi svantaggi possono essere accettati per piccole produzioni di inoculanti, mentre diventano un problema per i costi elevati nel caso di grandi partite. Sono stati impiegati vari metodi di sterilizzazione; l'irradiazione con raggi gamma ha dato risultati migliori rispetto all'autoclave. La fumigazione con ossido di etilene o bromo metile riduce la sopravvivenza dei rizobi rispetto all'autoclave.

Formulati

La forma fisica (in polvere, granulare, liquida) del substrato varia in funzione delle modalità di applicazione dell'inoculante, del metodo di semina e delle macchine impiegate. Gran parte degli inoculanti sono in polvere per l'applicazione sul seme prima dell'impiego; le dimensioni delle particelle dovrebbero essere tali da passare in un setaccio di 0,075 mm (50% delle particelle). La migliore adesione al seme è ottenuta con le particelle più piccole e con l'ausilio di appositi collanti. Un inoculante in forma granulare (dimensioni comprese tra 0,35 e 1,18 mm) consente l'applicazione direttamente nel solco, contestualmente alla deposizione del seme nel terreno. Gli inoculanti granulari possono essere più costosi rispetto a quelli in polvere, ma in molte condizioni, soprattutto in quelle in cui si verifica stress idrico dopo la semina, sono superiori nel promuovere la nodulazione. In arachide, un inoculo granulare a base di alginato di sodio e perlite ha dato risultati simili, in termini di nodulazione e accrescimento della coltura, a quelli ottenuti con seme confettato ed inoculato con un formulato a base di torba (Hedge e Brahmprakash, 1992). Altre applicazioni per impiego sul terreno includono colture di rizobi in fase liquida, concentrati congelati usati come sospensioni acquose o inoculanti a base di torba polverizzati in acqua e spruzzati nel solco.

Ulteriori formulati sono costituiti da sostanze sintetiche, che intrappolano i rizobi in microcapsule di gel di

polimeri (Dommergues et al., 1979; Jung e Mugner, 1982). I gel di poliacrilammide sono quelli più usati e consentono di evitare i problemi derivanti dalla qualità variabile e dalle caratteristiche non sempre omogenee della torba.

Preparazione degli inoculi

La produzione di inoculi (Smith, 1992) inizia con una coltura pura di rizobi che è usata come starter in un fermentatore. Gli inoculi vengono preparati miscelando i rizobi col substrato sia in modo continuo che discontinuo. Alcuni substrati sono acidi (es. torba) e devono essere neutralizzati previa aggiunta di carbonato di calcio per portare il pH a 6,8-7,2. Nella preparazione degli inoculi è essenziale determinare il grado ottimale di umidità per garantire la crescita e la sopravvivenza dei batteri tenendo conto della perdita di umidità durante il periodo di durata del prodotto. Alla miscelazione segue la fase di incubazione durante la quale il rizobio inizia il ciclo di crescita e di incremento della popolazione. Successivamente, l'inoculo viene fatto passare su un vaglio grossolano o su un mulino a martelli per disintegrare gli aggregati prima del confezionamento. Negli Usa, il miscuglio brodo di coltura substrato viene impaccettato in buste di polietilene dello spessore di 0,05 mm che consentono scambi gassosi minimizzando le perdite d'umidità.

Nella produzione d'inoculanti basata su substrati sterili (Sud Africa, Australia e Nuova Zelanda) il substrato viene, innanzitutto, sterilizzato con raggi gamma od in autoclave. Anche la superficie del sacchetto di polietilene viene sterilizzata prima dell'iniezione e l'introduzione del rizobio avviene in maniera asettica. L'impiego di substrati sterili consente di ottenere un numero più elevato di rizobi vitali per grammo di inoculo e tale numero viene mantenuto più facilmente durante la conservazione e sino alla data di scadenza, poiché nel substrato non c'è competizione da parte di altri microrganismi. La qualità di questi inoculanti si mantiene in condizioni accettabili per 6-12 mesi in funzione della temperatura di conservazione. La scelta delle procedure seguite dipende anche dalla scala di produzione; la torba non sterile viene preferita dalla gran parte dei produttori commerciali statunitensi, mentre in Australia tutta la torba impiegata viene irradiata con raggi gamma in confezioni di polietilene.

Metodi di applicazione degli inoculi

Inoculazione del seme

È il metodo più comune e quando correttamente applicato consente a ciascun seme di ricevere il rizobio. Tuttavia, presenta una serie di limitazioni come la scarsa quantità di rizobio che può aderire al seme, a meno che questo non venga pellettato, la possibilità di contatto diretto con pesticidi e microelementi già applicati al seme, la ridotta protezione da dessiccamento prima dell'impiego e l'esposizione a stress ambientali dopo la semina. L'uso del collante (adesivo, gomma arabica, saccarosio, altre gomme) migliora l'adesione dell'inoculante sul seme e consente la protezione da dessiccamento. Le caratteristiche più importanti di un collante sono la tenacità, per evitare il distacco e la perdita dell'inoculante durante le fasi di semina, e l'assenza di sostanze

che possano ridurre la vitalità dei rizobi. Il collante può essere disponibile in confezione a parte, separato dall'inoculo ma nella stessa confezione oppure premiscelato con l'inoculo.

Normalmente il seme viene pellettato con l'inoculo in polvere utilizzando come collante la gomma arabica; successivamente il seme viene ricoperto di carbonato di calcio finemente polverizzato. Pur essendo la pellettizzazione un eccellente metodo d'inoculazione, la sua esecuzione a livello aziendale è complicata dal fatto che si tratta di un processo a stadi multipli.

Inoculazione del terreno

L'inoculazione del seme non è la tecnica più efficace nel caso in cui il seme è già conciato con pesticidi, quando è necessario impiegare grossi quantitativi (dosi di seme elevate, vaste superfici) ed in presenza di semi fragili. Pertanto, l'inoculo, generalmente in forma granulare, viene deposto direttamente in campo, in prossimità del seme. I vantaggi, rispetto all'inoculazione del seme, sono i seguenti: maggior quantitativo di rizobio per unità di superficie, ridotta possibilità di venire a contatto con seme trattato chimicamente, eliminazione di possibili danni sul seme durante le fasi di manipolazione e rimescolamento e migliore capacità di sopportare condizioni di bassa umidità rispetto alla forma in polvere.

L'inoculo può essere introdotto nel suolo mediante l'acqua di irrigazione (Ciafardini e Barbieri, 1987); il successo di questa tecnica appare dipendere dalle caratteristiche d'infiltrazione del terreno e può consentire una migliore distribuzione dell'inoculo sull'apparato radicale (Trevors et al., 1990).

In interventi di idrosemina per scopi di rivegetazione di siti degradati (come scarpate, aperture di miniere, cave, etc.), l'inoculo viene combinato con tutti gli altri componenti (seme, acqua, fertilizzante, calce, etc.).

La modalità di inoculazione e le caratteristiche del formulato impiegato possono influenzare significativamente la distribuzione dei noduli sull'apparato radicale. Ad esempio, inoculanti per leguminose da granella applicati al seme producono più noduli vicino alla corona, mentre inoculanti granulari distribuiti sul terreno, ai lati o sotto il seme, determinano più noduli sul resto dell'apparato radicale (Walley e Johnston, 2000).

Epoca di applicazione degli inoculi

Pre-semina

Preinoculazione è la pratica di applicare l'inoculante al seme effettuata già dalla ditta sementiera (es. erba medica, miscugli di leguminose annuali) anche alcuni mesi prima della semina (Smith., 1992; Crespo, comunicazione personale). Ciò risulta molto pratico per l'agricoltore che acquista il seme già inoculato. Il seme preinoculato ha una data di scadenza sino a un anno dalla preparazione. Nel caso dell'inoculazione effettuata su richiesta, il seme è già posseduto dall'agricoltore ed il periodo intercorrente tra l'inoculo e la semina non supera dieci giorni (Smith., 1992).

Un caso particolare è quello di far insediare i rizobi nel suolo, prima della semina della leguminosa, contestualmente all'impianto di un'altra coltura in precessione, al fine di evitare condizioni che sarebbero dannose per il simbionte. Ad esempio, per evitare problemi di tossicità derivante da trattamenti fungicidi su semi di

soia e la ridotta nodulazione frequente al primo anno, il rizobio è già stato introdotto impiantando frumento o riso inoculato col simbionte specifico della soia, oppure viene abbinato alla semina di un cereale autunno-vernino per evitare le condizioni sfavorevoli per il rizobio, derivanti dalle più elevate temperature del suolo durante la semina estiva della leguminosa *Stylosantes seabrana* (Date, 2001).

Alla semina

Il metodo più comune è quello di effettuare l'inoculazione poco prima della semina. Negli Stati Uniti la tecnica più popolare consiste nel versare direttamente l'inoculo nella tramoggia della seminatrice e di mescolarlo col seme. Questa modalità, pur essendo molto semplice, è la meno efficace per la ridotta adesione e ritenzione del seme e per le perdite alla base della tramoggia. Talvolta il seme viene bagnato e rimescolato per migliorare l'adesione che però viene persa col deessiccamento. In alternativa, l'inoculo viene prima sospeso in acqua (con o senza collante) e successivamente viene riversato e mescolato col seme. Altri formulati liquidi vengono applicati al seme e mescolati prima della semina, tuttavia migliorano solo l'adesione ma non preservano i rizobi da severi stress ambientali.

Dopo la semina

L'inoculo dopo la semina può essere un'operazione prevista, oppure un rimedio nel caso sia stata riscontrata una ridotta nodulazione. Diversi studi effettuati su erba medica e soia (Rogers et al., 1982) hanno messo in evidenza che l'inoculazione effettuata con applicazioni granulari sottosuperficiale o spray in post emergenza sino a 30 giorni dalla semina può garantire ancora una nodulazione soddisfacente della coltura.

Qualità degli inoculanti

La qualità dell'inoculante è basata, innanzitutto, sulla scelta del ceppo e sull'impiego di colture pure, evitando contaminazioni con altri batteri o funghi. Le caratteristiche auspiccate nei ceppi da impiegare per la produzione di inoculanti commerciali sono legate alla capacità di: nodulare la pianta ospite, competere con i rizobi già presenti nel suolo, fissare azoto in un'ampia gamma di condizioni ambientali, di genotipi ed in presenza di nitrati nel suolo, moltiplicarsi in un substrato e nel suolo, persistere nel suolo, migrare dal sito iniziale di inoculazione, colonizzare il suolo anche in assenza della leguminosa, mantenere stabilità genetica, essere compatibili con pesticidi e avere bassa mortalità sul seme inoculato (Howieson, 1999).

Il significativo effetto dell'elevato numero di rizobi per seme è stato messo in evidenza da diversi autori. Quindi, è importante che gli inoculi contengano un numero elevato di cellule batteriche e che queste, all'atto del trasferimento al seme o al terreno, rimangano vitali. Sono disponibili prodotti di qualità in vari formulati, tuttavia solo alcuni garantiscono adeguata protezione per la sopravvivenza del rizobio nel seme (Smith, 1992). In generale, la sopravvivenza del rizobio (Date, 2001), sia nell'inoculo sia nel seme inoculato varia in funzione delle condizioni di disidratazione. I più elevati tassi di mortalità si verificano subito dopo la preparazione e l'inoculazione del seme. La perdita di vitalità è legata, in particolare, all'andamento della frazione dell'acqua totale che è disponibile per il metabolismo e crescita delle cellule batteriche. Inoltre, varia, per esempio, in

funzione dei seguenti fattori: età delle cellule (es. cellule giovani nella fase esponenziale di crescita sopravvivono meglio che quelle in fase stazionaria), ceppo del rizobio, conservazione in presenza di ossigeno, velocità di reidratazione (Kosanke et al., 1991), etc. La sopravvivenza di diversi ceppi di rizobi specifici per la sulla è stata studiata (Rodriguez Navarro et al., 1991), sia in inoculanti a base di torba, sia sul seme in diverse condizioni di conservazione e con l'impiego di differenti sostanze adesive; diversi fattori come la sterilizzazione, la temperatura di conservazione e l'uso di collanti sono da prendere in considerazione per ottenere una popolazione vitale di rizobi tale da garantire l'adeguata nodulazione della coltura.

La qualità di un inoculante può essere definita come il numero di cellule vitali ed infettive di un dato ceppo di rizobio per grammo di prodotto. Tuttavia, dipende anche dall'efficienza azotofissatrice e dalle altre proprietà simbiotiche del ceppo stesso. Generalmente viene richiesto un numero di rizobi vitali di $1 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$ per inoculanti a base di substrato sterile e $1 \times 10^8 \text{ g}^{-1}$ per inoculanti a base di substrato non sterile. Nel primo caso, la vitalità è testata col metodo della conta su piastra, mentre l'infettività viene valutata direttamente sulla leguminosa in camera di crescita o in serra. Nel secondo caso, la vitalità è testata solitamente col test d'infezione sulla pianta, non esistendo terreni selettivi che permettono la crescita esclusiva dei rizobi (Casella e Lupi, 1987). Recenti studi mettono in evidenza delle limitazioni nel controllo di qualità basato esclusivamente su metodi classici (conta su piastra e test di nodulazione sulla pianta) che potrebbero sovrastimare la qualità dell'inoculante (Revellin et al., 2000). Durante la conservazione a lungo termine è possibile, inoltre, una modifica dell'attività fisiologica delle cellule batteriche (Corich et al., 1996). D'altra parte, in rizobi contenuti su inoculi a base di torba è stato messo in evidenza il verificarsi dell'ispessimento della parete cellulare come reazione di adattamento in grado di migliorarne la sopravvivenza alle limitanti condizioni nutrizionali durante la conservazione; successivamente, le cellule ispessite risultano più resistenti anche agli stress cui sono sottoposte sulla superficie del seme (Feng et al., 2002).

Per i controlli di qualità degli inoculanti possono essere usate anche tecniche immunologiche e, più recentemente, di genetica molecolare (Tas et al., 1995) che saranno ampiamente descritte di seguito. Un completo controllo della qualità dovrebbe comprendere comunque oltre a frequenti test di nodulazione tests di riduzione dell'acetilene (ARA) per determinare l'attività nitrogenasica (Casella e Lupi, 1987). Il controllo della qualità degli inoculanti, in alcuni paesi, è demandato ad autorità specifiche indipendenti, mentre in altri agli stessi produttori. I valori soglia di rizobi vitali sono compresi tra 1×10^7 e 4×10^9 rizobi vitali g^{-1} , oppure tra 1×10^3 e 10^6 rizobi per seme, in funzione della loro dimensione (peso 1.000 semi).

Secondo Smith (1992), i substrati ed i formulati degli inoculanti dovranno essere ulteriormente migliorati e presentare caratteristiche superiori per garantire, soprattutto, la vitalità del seme inoculato in relazioni alle crescenti condizioni di stress determinate sia dall'introduzione di leguminose in aree sempre più marginali che dalle mutate modalità di semina.

Lo sviluppo e la produzione commerciale di inoculi efficaci per leguminose richiede l'integrazione di processi fisici, chimici e biologici (Stephens e Rask, 2000).

Un formulato di elevata qualità dovrebbe apportare e mantenere, in modo semplice per gli operatori ed economicamente conveniente, un'elevata popolazione di rizobi efficienti in grado di sopravvivere a diverse modalità di distribuzione del seme e condizioni di semina e di competere con i rizobi indigeni eventualmente presenti nel suolo. Questo assunto si scontra, in realtà, con tutta una serie di variabili ambientali e biologiche che richiedono ancora ulteriore conoscenza e che non è sempre possibile valutare a priori ma, di cui occorre tenere conto, di volta in volta.

Problematiche dell'inoculazione

Sebbene la tecnologia degli inoculanti in quasi un secolo di sviluppo abbia conseguito incoraggianti progressi, la piena efficienza agronomica del sistema leguminosa - *Rhizobium* non può dirsi del tutto raggiunta (Thies et al., 2001). Spesso, il mancato successo riscontrato nell'introduzione in pieno campo ceppi di rizobi con spiccate attività simbiotiche ha messo in evidenza aspetti prima trascurati ma che si sono poi rivelati di estrema importanza (Casella e Lupi, 1987; Nuti e Squartini, 1987; Thies et al., 2001). I fattori più importanti da cui dipendono le difficoltà nella introduzione di nuovi ceppi sono i seguenti:

- I. Incapacità del ceppo inoculato a persistere nel terreno abbastanza a lungo per poter nodulare la pianta ospite, in particolare per le leguminose che si rigenerano annualmente.
- II. Instabilità genetica o incapacità a mantenere un genotipo funzionale stabile.
- III. Incapacità a competere nella formazione dei noduli con popolazioni di rizobi preesistenti nel terreno.
- IV. Incapacità di moltiplicazione in condizioni ambientali avverse da un punto di vista chimico-fisico.
- V. Pratiche agronomiche errate.
- VI. Scarsa qualità dell'inoculo.
- VII. Combinazione di alcuni di questi fattori.

Un'ulteriore limitazione è stata la mancanza di una collezione centrale di rizobi idonei alle colture ed alle situazioni pedoclimatiche Nazionali.

Di seguito saranno discusse alcune di queste problematiche e di come le tecniche della genetica molecolare possano contribuire ad interpretarle e risolverle.

Instabilità genetica ed inoculazione

Negli ultimi trent'anni sono stati studiati e identificati numerosi geni batterici coinvolti nella nodulazione, spettro di ospite, regolazione e espressione del processo di nodulazione e di azoto fissazione (Dénarié et al., 1996; Freiberg et al., 1997; Perret et al., 2000; Spink, 2000; Debelle et al., 2001; Barnett et al., 2001; Long, 2001; Hirsch et al., 2001; Lievens et al., 2001; Loh et al., 2002; van Brussel et al., 2002). L'intero genoma delle specie *Mesorhizobium loti* e *Sinorhizobium meliloti* è stato completamente sequenziato (Kaneko et al., 2000; Galibert et al., 2001) e un altro progetto genoma è in fase di svolgimento per sequenziare *Lotus japonicus*, la leguminosa associata a uno di questi microsimbionti (Cyranoski, 2001). Centinaia di migliaia di sequenze espresse, appartenenti a diversi geni di tre importanti specie di leguminose (soia, *Medicago truncatula* e *Lotus japonicus*) sono depositate in banche dati pubbliche

(Stougaard, 2001; Colebatch et al., 2002). Le informazioni sulla genetica strutturale e funzionale della simbiosi, oltre ad aprire la strada a nuove prospettive di manipolazione genetica, forniranno un quadro completo e dettagliato del riconoscimento, interazione selettiva e dialogo molecolare tra pianta e batterio. Con questa chiave di lettura potranno essere spiegati alcuni fenomeni ancora non del tutto chiari, di grande importanza agronomica. Uno di questi è la ben documentata instabilità delle caratteristiche simbiotiche di certi ceppi nel tempo o dopo la loro permanenza nei noduli (Brockwell et al., 1995). Un ceppo inoculato e introdotto *ex novo* in un terreno, in genere persiste nei noduli al massimo della sua attività, per un periodo di tempo limitato, quasi sempre, all'anno che segue l'inoculazione, ma la sua capacità di colonizzare i noduli declina negli anni successivi. La presenza di popolazioni di rizobi residenti, con una minore efficienza nella fissazione di azoto, ma più competitive per l'occupazione dei noduli, potrebbero spiegare il fenomeno (Dowling e Broughton, 1986). Potrebbe trattarsi anche di instabilità dei geni coinvolti nella azoto fissazione, che si manifesta lungo la progenie, dopo parecchi anni nel terreno. In molti studi eseguiti *in vitro* è stata dimostrata la diminuzione della capacità di nodulazione, la variabile efficienza di azoto fissazione e anche invasività in colonie singole isolate da colture parentali collezionate in laboratorio (Jansen van Rensberg e Strijdom, 1985). Recentemente, sono stati rilevate alterazioni delle caratteristiche fisiologiche e prestazioni in campo di inoculanti di rizobi preparati su torba dopo conservazione a lungo termine (Revellin et al., 2000). Anche il passaggio del rizobio attraverso la pianta può modificare i geni plasmidici che determinano la specificità di ospite e questo spiegherebbe il perché rizobi reisolati da noduli di leguminose in campo, sono meno efficienti; si verifica, infatti, una diminuzione della capacità di nodulazione di quella specie ospite (Wang et al., 1986). La perdita di plasmidi introdotti in *Rhizobium leguminosarum* associata al processo di nodulazione è stata osservata recentemente (Corich et al., 2001a). Inoltre, esistono evidenze sperimentali di scambi genetici di rizobi in campo in tempi relativamente brevi attraverso il trasferimento laterale e ricombinazione di DNA tra le popolazioni batteriche del suolo (Sullivan et al., 1995). Circa il 50% della quantità totale di DNA dei rizobi, infatti, è contenuto in plasmidi di grosse dimensioni dove, nella maggior parte dei casi, sono localizzati i geni implicati nella simbiosi. Questi includono i geni *nod*, essenziali per la nodulazione dell'ospite, ed i geni *nif* e *fix* richiesti per la fissazione dell'azoto ed altre funzioni del batteroide (Sobral et al., 1991; Barnett et al., 2001; Long, 2001). Questi "megaplasmidi" simbiotici (*pSym*) possono essere appunto trasferiti per coniugazione alle stesse o ad altre specie e generi batterici, dove sono capaci di replicarsi. Studi genetici di frequenze di ricombinazione trovate in alcune popolazioni, dimostrano che anche la ricombinazione cromosomica avviene abbastanza frequentemente (Eardly et al., 1990). Inoltre, nei rizobi esistono elementi genetici mobili, o trasposoni o sequenze di inserzione, che sono alla base del trasferimento dei geni tra i batteri e, all'interno di essi, tra DNA cromosomico e plasmidico (Laberge et al., 1995; Meneghetti et al., 1996). Isole simbiotiche mobili di DNA, ora interamente sequenziate, unitamente ai geni contenuti *nif*, *nod* ed molti altri geni essenziali per il metabolismo del batteroide (Sullivan e Ronson, 1998), possono integrarsi nel genoma di diverse popolazioni e

ceppi di rizobi in campo, modificandone le proprietà simbiotiche (Sullivan et al., 1995). L'acquisizione di geni simbiotici, infatti, consente loro di sintetizzare e secernere lipo-chitooligosaccharidi ceppo-specifici, indispensabili per la nodulazione e invasione intracellulare (Dénarié et al., 1996; Spaink, 2000). La presenza di questi elementi e il loro movimento ha un ruolo importante nella generazione di nuovi genotipi all'interno di popolazioni naturali e deve aver avuto una grande importanza nell'evoluzione del genoma di questi batteri (Wang e Martínez-Romero, 2000).

L'enorme biodiversità osservata nei rizobi può essere correlata a vari fattori inclusi tipo di terreno, cultivar di leguminosa, tempo trascorso dall'inoculazione, etc., che influenzano il proprio adattamento e sopravvivenza in diverse condizioni ambientali (Carelli et al., 2000).

Alla luce di questa ampia variabilità, diventa fondamentale il monitoraggio della coltura dei microrganismi in fase di sperimentazione in campo allo scopo di controllare la composizione genetica e prevenire eventuali modifiche delle proprietà simbiotiche da essa derivate. Altrettanto importante è il monitoraggio delle colture madri dei ceppi usati negli inoculanti per assicurare, nel tempo, la stabilità del ceppo distribuito. In molti paesi esiste un organismo di controllo della qualità che oltre a fornire i ceppi selezionati alle ditte produttrici, ciascun anno, testa i singoli ceppi per le loro proprietà simbiotiche e caratteristiche culturali, biochimiche e biologiche. La caratterizzazione molecolare e l'identificazione di "marcatori" specifici di tutte le colture madri con il *fingerprinting* del DNA potrebbe dare la risposta definitiva in termini di identità genetica e stabilità nel tempo (Thies et al., 2001).

Competizione e inoculazione

In passato, si considerava più competitivo lo stipite saggiato in prove di serra che veniva quindi selezionato per gli inoculi. Gli stessi ceppi saggiati poi in pieno campo, all'interno di una comunità microbica complessa, fornivano, spesso, valori di produttività inferiori a quelli relativi ai controlli non inoculati (Percuoco, 1987; Sulas et al., dati non pubblicati). Il fenomeno può essere spiegato considerando che nel terreno esistono popolazioni residenti che, pur non avendo proprietà simbiotiche rilevanti, possono essere in grado di competere, nell'occupazione dei noduli, più del ceppo introdotto. In mancanza di tecniche per identificare il ceppo introdotto era difficile comprendere poi le motivazioni del fallimento, non attribuibili al ceppo in esame ma ad un ceppo indigeno già presente nel terreno. La caratterizzazione e quantificazione *in situ* della popolazione naturale dei rizobi nel suolo prima dell'inoculazione è perciò di estrema importanza. Ora è risaputo che la competizione di rizobi naturalizzati, dipende da fattori diversi, inclusi la dimensione della popolazione, la sua distribuzione nel suolo e le caratteristiche fisico chimiche e biologiche del terreno (Nutti, 1985; Brockwell et al., 1995). Inoltre, un ruolo importante è esercitato dalla pianta con la sua individualità varietale e le sue preferenze per uno o più ceppi che possono anche contemporaneamente e in proporzioni diverse occupare i suoi noduli. (Corich et al., 2001b). Lo scambio e la ricombinazione dei geni simbiotici tra il ceppo inoculato e la popolazione indigena persistente, può generare, in campo, nuove popolazioni di rizobi simbiotici più competitive, che potreb-

bero rappresentare un ostacolo anche a successive inoculazioni con ceppi più efficienti (Amarger et al., 2001). Queste importanti implicazioni richiedono ulteriore conoscenza sulla genetica ed ecologia dei rizobi; è fondamentale, pertanto, la disponibilità di strumenti d'indagine adeguati al monitoraggio dei rizobi introdotti nel terreno, nel tempo e rispetto alla flora batterica indigena, e controllarne la variabilità genetica, naturale o modificata come conseguenza dell'inoculazione. Specialmente in prove sperimentali sarebbe opportuna la identificazione di "markers" ceppo-specifici di DNA che in campo possano consentire di seguire il microrganismo introdotto nella pianta e nel terreno e attribuirgli con sicurezza il risultato ottenuto.

MMPN Plant Infection Technique

Il *plant infection test* basato sulla capacità dei rizobi di nodulare una specifica leguminosa ospite, consente di ottenere precise informazioni sulla entità della microflora indigena capace di nodulare una specifica *cultivar*. Applicato alla valutazione del MPN, *most probable number*, (Somasegaran and Hoben, 1994) i valori ottenuti possono risultare fortemente influenzati dalla recettività della varietà impiegata (Nutti, 1985). La tecnica, sebbene laboriosa e lunga nella sua esecuzione (da 3 a 4 settimane) è comunque affidabile e fornisce la stima migliore della dimensione della popolazione microbica capace di nodulare una data leguminosa.

Tecniche di genetica molecolare per il monitoraggio dei rizobi in campo

La maggior parte degli studi eseguiti su singoli ceppi o popolazioni di rizobi si basa sull'isolamento dei batteri dai tubercoli o, talvolta, dal terreno e dal loro mantenimento in coltura per lo studio e caratterizzazione. In realtà, la quasi totalità dei dati deriva proprio da rizobi isolati da noduli che sono il risultato del processo di selezione esercitato dalla pianta. Pertanto, questi non sono rappresentativi di tutta la popolazione rizobica del terreno che può influenzare, comunque, la riuscita della batterizzazione.

Prima dello sviluppo della biologia molecolare, le tecniche utilizzate in ecologia microbica fornivano poche informazioni su tutti i componenti di una data comunità, in quanto consentono di seguire uno o al massimo pochi ceppi in campo e necessitano dell'utilizzo delle tecniche colturali classiche di arricchimento e isolamento (Somasegaran e Hoben, 1994). Con dell'introduzione delle tecniche molecolari, basate sull'analisi degli acidi nucleici, è stato possibile identificare i batteri indipendentemente dalla loro capacità di riprodursi in coltura e ottenere informazioni su tutti i componenti di una comunità microbica. Sebbene i rizobi crescano bene *in vitro*, è anche documentata l'instabilità delle proprietà simbiotiche dei ceppi in coltura (Jansen van Rensburg e Strijdom, 1985), che risulta tanto più probabile quanto maggiore è il numero di passaggi delle cellule *in vitro*. Inoltre, i metodi colturali convenzionali non sempre consentono di individuare la presenza dei batteri nel suolo, soprattutto quando il loro numero è basso rispetto a tutta la popolazione microbica indigena (Picard et al., 1992; Pillai et al., 1992).

I rizobi a crescita rapida contengono un numero variabile di plasmidi di grande dimensioni ed uno o più "megaplasmidi" in alcuni dei quali sono, nella maggior parte dei casi, localizzati i geni simbiotici (*pSym*). L'estrazione e il profilo del DNA plasmidico dei rizobi

si è rivelato un metodo rapido e pratico per caratterizzare e tipizzare contemporaneamente molti isolati di rizobi a livello di ceppo (Corich et al., 2001b). Plasmidi ricombinanti, contenenti geni marcatori (*gus A* o *lacZ*) possono essere trasferiti all'interno dei batteri (*Gus technology*) consentendo di seguire il loro percorso e destino nel terreno e direttamente nei noduli della pianta (Wilson, 1995; Wilson et al., 1999). Possono anche essere esaminati profili di DNA dell'intero genoma o tratti specifici di esso partendo dal DNA cromosomico.

Restriction Fragment Length Polymorphism analysis (RFLP, analisi dei polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione)

Esistono nel genoma dei rizobi sequenze di DNA che tendono a variare da una specie o da un ceppo all'altro, pur rimanendo stabili per ciascuno di loro. Questa variabilità può essere determinata quando il DNA purificato viene frammentato in corrispondenza di sequenze nucleotidiche specifiche con enzimi di restrizione. Variazioni nella sequenza infatti generano piccoli frammenti di DNA con lunghezze diverse, che possono essere separati per elettroforesi su gel di agarosio e visualizzati dopo colorazione con bromuro di etidio e illuminazione UV (Kaijalainen et al., 1989; Demezas et al., 1991; Somasegaran e Hoben, 1994). Il confronto tra i profili che si ottengono è un po' complesso per l'elevato numero di bande. Perciò la metodica non è, in genere, usata da sola ma insieme con *Southern blotting hybridization* (Sambroock et al., 1989). I profili di RFLP che si ottengono dopo ibridazione forniscono informazioni su definite regioni di DNA. A seconda del livello di conservazione delle sequenze analizzate varia il livello tassonomico di risoluzione della metodica. In generale, sequenze non codificanti del DNA evolvono più velocemente delle regioni trascritte, essendo la frequenza di mutazioni del DNA trascritto, per selezione naturale, molto ridotta rispetto a quello non attivo dal punto di vista trascrizionale. Le regioni spaziatriche intergeniche, variano quindi più rapidamente, seguono i geni codificanti proteine e ultimi, essendo i più conservati, sono i geni per l'rRNA ribosomico (rDNA). L'ibridazione del DNA genomico digerito con sonde di rDNA genera dei profili che sono gli stessi delle specie di appartenenza (*ribotype*), avendo ciascuna differenze nella struttura o posizione cromosomica dei geni per gli rRNA (Sivakumaran et al. 1997; Amarger et al., 2001). Specifiche sequenze di DNA sono state utilizzate come sonde per identificare in ibridazione polimorfismi di restrizione e quindi diversità di sequenza in geni cromosomici e plasmidici a livello di ceppo, geni *lac*, *nif*, *nod*, sequenze delle regioni dei geni LPS e sequenze IS, (Demezas et al., 1991; Paffetti et al., 1995; Meneghetti et al., 1996; Amarger et al., 2001). Poiché diversi patterns di ibridazione di geni simbiotici sono stati identificati per uno stesso tipo cromosomico, per una più precisa caratterizzazione di ceppi di rizobi, dovrebbero essere utilizzati marcatori sia plasmidici che cromosomici. Sebbene questo sia un metodo ad alta risoluzione nel determinare divergenze di sequenza del DNA, il suo uso va diminuendo per far strada ad altri metodi più rapidi.

Polymerase Chain Reaction (PCR, reazione a catena della polimerasi)

La introduzione della tecnica di amplificazione del DNA è stata determinante nello studio dei microrganismi *in situ*. Il DNA estratto da campioni ambientali,

come terreno o acqua, può essere amplificato *in vitro* in tempi relativamente brevi in maniera selettiva e sensibile, consentendo di identificare un ampio spettro di microrganismi anche quando non sono coltivabili o sono presenti in basso numero (Picard e al., 1992; Pillai et al., 1992). Per ottenere l'amplificazione selettiva è necessario avere a priori alcune informazioni sulla sequenza del DNA bersaglio, che rendano possibile la costruzione di due sequenze oligonucleotidiche (lunghe 15-30 nucleotidi) da utilizzare come inneschi (*primers*). In poche ore con una ventina di cicli, in un apparecchio termostato che svolge automaticamente il processo, si ottengono circa un milione di copie della sequenza bersaglio specifica. Il principale svantaggio di questa tecnica è la possibilità che DNA estranei contaminanti possono essere replicati assieme a quelli ricercati. Sia il suolo che la rizosfera sono ambienti molto complessi in termini di composizione di flora microbica e il numero delle specie presenti in un grammo di suolo può essere di decine di migliaia. Tuttavia, il 99% di questi microrganismi rimane sconosciuto per l'impossibilità di isolarli e coltivarli in laboratorio (Amann et al., 1995). Sebbene i rizobi crescano bene *in vitro* la possibilità di avere informazioni sul DNA senza dover coltivare i batteri consente di poter identificare non solo i ceppi che hanno colonizzato i noduli ma anche quelli presenti nel terreno quando sono presenti in piccolo numero e tra due colture successive (Hebb et al., 1998).

Sequenziamento degli acidi nucleici

Il sequenziamento del gene che codifica per la subunità ribosomica 16S (rDNA 16S), è un metodo ampiamente utilizzato per identificare ceppi di rizobi appartenenti a diverse specie (Willems e Collins, 1993; Yanagi e Yamasato, 1993). L'uso generalizzato del sequenziamento dei geni rDNA 16S negli ultimi 10 anni, insieme all'analisi del fenotipo e dei tratti fisiologici, ha portato alla descrizione di più di 20 nuove specie di rizobi e 4 addizionali generi, una lista dei quali, con nome del ceppo e sequenza del 16S rDNA è resa disponibile al sito internet del U.S. Department of Agriculture, o al National Center for Biotechnology Information (NCBI). Recentemente, la tassonomia della famiglia delle rizobiaceae è stata rielaborata con l'analisi comparativa degli rDNA 16S (Young et al., 2001) ed è stata proposta nella seconda edizione del manuale di sistematica batterica del Bergey (URL <http://www.cme.msu.edu/bergeys/>; Garrity, 2001).

Analisi dei polimorfismi di restrizione in sequenze amplificate con la PCR (PCR-RFLP)

L'analisi dei polimorfismi di restrizione dei geni 16S amplificati con la PCR (PCR-RFLP) è stata ampiamente utilizzata per stabilire le relazioni genetiche e caratterizzare i ceppi di rizobi a livello di specie (Willems and Collins 1993; Laguerre et al., 1996; Vinuesa et al., 1998; Lafay e Burdon, 2001; Squartini et al., 2002). La distinzione di ceppi molto vicini fra di loro con questi metodi, richiede l'utilizzo di parecchie sonde e/o enzimi di restrizione e non sempre si riesce a ottenere dei risultati positivi. I geni per gli RNA 23S di alcune specie batteriche contengono all'estremità 5' una regione altamente variabile la cui analisi di sequenza e comparazione è stata utilizzata per stabilire relazioni filogenetiche tra specie (Therefework et al., 1998; Pulawska et al., 2001).

Maggiore variabilità genetica all'interno della specie può essere evidenziata dalla analisi di sequenze di DNA spaziatore intergenico tra i geni 16S e 23S, (*16S and 23 S rDNA intergenic spacer sequences* o IGS; Barry et al., 1991; Paffetti et al., 1996). La combinazione della tecnica della PCR con la RFLP delle sequenze IGS 16S-23S ha permesso di discriminare ulteriormente tra ceppi all'interno di diverse specie di rizobi (Laguerre et al., 1996; Selenska-Pobell et al., 1996; Vinuesa et al., 1998; de Oliveira et al., 1999; Tan et al., 2001). La PCR-RFLP consente la caratterizzazione dei rizobi anche in base a polimorfismi di restrizione di geni simbiotici e altri geni plasmidici (Laguerre et al., 1996; Rigottier-Gois et al., 1998).

Rep-PCR, RAPD, NPC-PCR e DNA fingerprinting

Ulteriore discriminazione a livello di ceppo può essere ottenuta con il *genomic fingerprinting* per amplificazione con la PCR di un numero multiplo di frammenti di DNA di lunghezza variabile, distribuiti su tutto il genoma (Laguerre et al., 1996; Perret e Broughton, 1998; Corich et al., 2001b). Questi possono essere ottenuti con la *random amplification of polymorphic DNA fragments* (RAPD; Paffetti et al., 1996; Carelli et al., 2000) o con la rep-PCR che amplifica sequenze ripetitive del genoma (de Bruijn, 1992; Niemann et al., 1999). RAPD e rep-PCR-fingerprinting sono comparabili come livello di risoluzione tassonomica e sono stati usati ampiamente per tipizzare ceppi di rizobi (Laguerre et al., 1996) e per monitorare in campo la stabilizzazione e persistenza di rizobi inoculanti (Hebb et al., 1998). L'analisi RAPD è stata utilizzata per descrivere la struttura genetica di popolazioni naturali di rizobi e la loro dinamica in relazione a diversi fattori ambientali e genetici, terreno, genotipo della pianta ospite, etc., (Carelli et al., 2000).

Un'altro metodo di *fingerprinting* è quello chiamato *nif promoter consensus-PCR* (NPC-PCR; Richardson et al., 1995) che fornisce un profilo specifico per i diversi ceppi di rizobi utilizzando un unico *primer* mirato che amplifica le varie copie del promotore *nif*.

Una limitazione del DNA fingerprinting in particolare con il RAPD è la variabilità dei profili ottenuti con piccole modificazioni delle condizioni della PCR (Thies et al., 2001). Perciò la standardizzazione delle condizioni di PCR è essenziale per poter comparare i dati nel tempo e tra diversi laboratori. Un'altra limitazione delle tecniche *fingerprinting* è che esse necessitano l'isolamento dei batteri: profili derivati direttamente da noduli contenenti ceppi multipli tendono a sovrapporsi come in un unico ceppo.

Directed primers

Oligonucleotidi specifici per il DNA di una data specie possono essere disegnati e utilizzati come *primers* per identificare con la PCR il rizobio che appartiene a quella specie anche in colture miste, come nella maggior parte dei campioni ambientali. Perciò, la PCR diretta con *primers* per specifici frammenti di DNA dovrebbe essere il metodo di scelta per studi ecologici. Questi oligonucleotidi possono derivare da rDNA 16S (Rome et al., 1997), da IGS 16S-23S (de Oliveira et al., 1999), da rDNA 23S (Tsfaye et al., 1998) o da geni plasmidici *nif* e *nod* (Meneghetti et al., 1996; Widmer et al., 1999; Zeze et al., 2001). Gli oligonucleotidi, specie, genere o ceppo specifici, possono essere ottenuti dalla analisi

comparativa delle sequenze dei geni analizzati (Tesfaye et al., 1997) o da strategie differenti come la *Subtractive hybridization* (Tas et al., 1994; Cooper et al., 1998). Sequenze bersaglio di acidi nucleici possono essere anche ricavate dalla analisi comparativa di polimorfismi di restrizione di DNA genomico o di profili ottenuti con RAPD o rep-PCR e con l'isolamento dei frammenti di DNA direttamente da un gel di agarosio della corsa elettroforetica (Niemann et al., 1999; Roberts e Crawford, 2000).

Ibridazione degli acidi nucleici

Le sequenze così ottenute possono essere clonate in vettori plasmidici, sequenziate e utilizzate come sonde in esperimenti di ibridazione degli acidi nucleici. Diverse sonde di DNA cromosomico o plasmidico sono state costruite e usate in studi sui rizobi (Laguerre et al., 1993; Niemann et al., 1999; Rome et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Thies et al., 2001). Per lo più il DNA sonda viene marcato con un radioisotopo o un fluorocromo e la sequenza bersaglio è legata a una membrana di nylon o di nitrocellulosa (*Southern blotting hybridization*), ma anche le colonie batteriche possono essere trasferite dalla piastra di agar alla membrana di un filtro di nitrocellulosa e il loro acido nucleico esposto, dopo la lisi cellulare, a ibridazione con sonde di DNA o RNA (Laguerre et al., 1993; Theron e Cloete, 2000).

Sebbene le tecniche come la PCR e successiva ibridazione o il sequenziamento del DNA abbiano rivoluzionato tutti i campi della microbiologia, dalla diagnostica clinica alla ecologia microbica, queste tecniche sono indirette e non forniscono informazioni sulla morfologia e distribuzione spaziale nell'ambiente naturale dove il microrganismo vive e si riproduce (Amann et al., 2001). Per fare questo è indispensabile utilizzare tecniche microscopiche. Le tecniche di immunofluorescenza con anticorpi monoclonali avrebbero potuto essere molto utili se non presentassero i problemi spesso riportati di cross-reattività e variabilità antigenica fenotipica. Inoltre il microrganismo deve essere coltivato prima dell'identificazione di un suo specifico anticorpo. Il microscopio elettronico a scansione e a trasmissione sono stati usati per lo studio dell'interazione radice-batterio e la analisi di microrganismi nella rizosfera (Dazzo e Petersen, 1989; Frommel et al., 1991; Yanni et al., 1997) ma richiedono molta esperienza tecnica nell'allestimento dei preparati: i trattamenti a cui è sottoposto il campione possono modificare il suo stato originario e introdurre degli artefatti (Crang e Klomparens, 1988). Una tecnica microscopica che consente di identificare in maniera specifica le sequenze di acido nucleico all'interno della cellula senza alterare la morfologia e l'integrità dei vari componenti è l'Ibridazione In Situ o *In Situ Hybridization* (ISH) (Muresu et al., 1994; Amann et al., 2001). Questa è completamente indipendente dalla coltura cellulare, combina la precisione della genetica molecolare con la informazione visuale del microrganismo e consente la rapida e specifica identificazione delle singole cellule microbiche nel loro habitat naturale. In microbiologia la molecola bersaglio più comunemente usata per la *Fluorescence in Situ Hybridization* (FISH) è l'rRNA 16S per la sua stabilità genetica, il contenuto in regioni altamente conservate e variabili, e il notevole numero di copie nella cellula (Amann et al., 1995). Più di 16.000 sequenze di rRNA 16S sono disponibili in banche dati pubbliche e possono essere utilizzati per disegnare sonde di oligonucleotidi marcati con fluoro-

cromi. Esistono inoltre software specifici per lo sviluppo razionale di sonde. Altri target utilizzati sono gli rRNA 23S, 18S, mRNA (Amann et al., 2001) e recentemente i tmRNA (Schonhuber et al., 2001). La FISH con sonde di rRNA in combinazione con la microscopia confocale si è rivelata importante strumento di identificazione di microrganismi associati alle piante (Pirttila et al., 2000). Sonde per RNA 16S che ibridizzano con la maggior parte dei membri del gruppo *rhizobia* e con alcuni sottogruppi sono state descritte e utilizzate con la FISH (Ludwig et al., 1998). Lo sviluppo di questa metodica per la identificazione dei rizobi, sarà di grande importanza per lo studio dell'interazione rizobio - terreno - pianta *in situ* nelle varie fasi del processo di colonizzazione del microrganismo nel suolo, nella pianta e nelle diverse nicchie ecologiche. Genotipi molto rappresentati nella popolazione batterica del suolo sono quelli con migliore proprietà competitiva come saprofiti ben adattati alle condizioni di quel sito. Questi ceppi preadattati, quando selezionati per efficienza nella azoto fissazione e stabilità genetica diventeranno ottimi inoculanti (Thies et al., 2001). Dovrebbero essere perciò sviluppati e ottimizzati adeguati metodi per l'isolamento diretto dal terreno, la localizzazione *in situ*, e la identificazione dei microrganismi introdotti e residenti. Nell'utilizzo di approcci basati sull'identificazione dei microrganismi attraverso l'analisi delle sequenze dei geni rRNA, determinata direttamente dal suolo senza coltivazione, l'ibridazione *in situ* chiude il ciclo consentendo di assegnare le sequenze ottenute a un preciso tipo morfologico, nell'*habitat* naturale d'origine (Ludwig et al., 1998). Inoltre l'utilizzo di sonde per gli rRNA in combinazione con sonde specifiche per i geni coinvolti nell'espressione dell'azoto fissazione potrebbe correlare la caratterizzazione filogenetica con le proprietà fisiologiche dei microrganismo e perciò fornire informazioni sui tratti fenotipici del genotipo identificato. L'ibridazione *in situ*, infatti, può essere utilizzata per lo studio dell'espressione dei geni nel batterio e nella pianta. L'analisi trascrizionale quantitativa di specifici geni a livello di tessuto sarà di grande aiuto nella comprensione delle basi genetiche della fisiologia della simbiosi come di recente è stato dimostrato attraverso una strategia di ricerca interdisciplinare allo scopo di migliorare la fissazione dell'azoto e la produzione di *Phaseolus vulgaris* in aree saline del Mediterraneo (Drevon et al., 2001).

Prospettive ed applicazioni future

Nonostante un secolo di esperienza, gran parte degli inoculanti prodotti nel mondo sono ancora di bassa qualità e molto spesso agricoltori e talvolta anche ricercatori, sia nei paesi sviluppati che in via di sviluppo, sottovalutano l'importanza ed il valore dell'inoculazione (Brockwell et al., 1995).

I recenti progressi nella tecnologia degli inoculanti riguardano il miglioramento della qualità, della durata (tra preparazione e data di scadenza) e la creazione di nuovi formulati per condizioni meno favorevoli, quali esposizioni ad elevate temperature in seminatrici pneumatiche, rapido disseccamento quando l'inoculo viene riversato nella coclea del seme oppure quando la semente inoculata convenzionalmente viene seminata in condizioni caldo asciutte. Molto recentemente, sono stati messi a punto negli Stati Uniti anche rizobi geneticamente modificati per erba medica con lo scopo di migliorare la capacità di azotofissazione e di conferire resistenza ad antibiotici. In generale, l'impiego degli

inoculanti deve essere compatibile con le esigenze richieste dalle attuali pratiche agricole.

È opportuno ricordare che tutti i miglioramenti negli inoculanti e nel loro impiego saranno sostanziali solo in un corretto contesto agronomico della coltura: se la leguminosa ha un ridotto potenziale produttivo a causa di avversità, carenze nutritive, infestazione, attacchi d'insetti etc., l'impiego di inoculanti, anche di elevata qualità, o la manipolazione dei rizobi sarà di poco aiuto. Inoltre, in molti ambienti italiani e mediterranei in genere sarebbe molto utile poter disporre sia di inoculanti in fase solida ed in generale di più agevole impiego per gli agricoltori sia di ceppi più efficienti per leguminose foraggere di rinnovato interesse come la sulla (Sulas et al., 1998).

Altri aspetti interessanti sono l'impiego di inoculanti multiceppo, talvolta con caratteristiche superiori rispetto a quelli con singolo ceppo (Somasegaran e Bohloul, 1990), la co-inoculazione dei rizobi con l'impiego contestuale di micorrize utili nella rizosfera. Per il futuro è molto importante anche la selezione di ceppi resistenti a pH più acidi (Howieson et al., 2000) per ampliare l'areale di coltivazione di molte leguminose foraggere anche di nuova introduzione. D'altra parte, poiché accessioni di una stessa leguminosa differiscono per la capacità azotofissatrice (Ballard et al., 2000) anche la selezione entro specie vegetale può essere presa in considerazione come una valida strategia per migliorare l'efficienza della simbiosi.

È fondamentale individuare gli ambienti sia dove l'inoculazione è necessaria sia dove è conveniente ripeterla nel tempo per incrementare la carica di microrganismi nel terreno; ciò richiede la messa a punto di tecniche nuove e più rapide. Infatti, la possibilità di scambio di informazioni genetiche tra ceppi presenti nel suolo e l'elevata diversità esistente anche nei rizobi estratti dai noduli di una sola pianta richiedono ulteriore conoscenza al fine di valorizzare tale diversità. Variazioni della popolazione del suolo, pratiche agronomiche errate e fattori ambientali avversi, possono aver contribuito agli insuccessi spesso riportati dell'inoculazione in campo. Per ottenere un effettivo miglioramento di produttività delle leguminose attraverso la pratica della inoculazione è necessario indirizzare lo sviluppo tecnologico nella direzione che consenta lo studio e il monitoraggio di questi microrganismi singolarmente, a livello di ceppo, e nelle popolazioni, rispetto alla pianta, alla flora microbica del terreno, nonché ai diversi fattori ambientali che nel tempo possono variare e condizionare la riuscita della batterizzazione. Le tecniche molecolari consentiranno lo studio della biodiversità naturale e indotta dei microrganismi del suolo e l'ottimizzazione/manipolazione delle interazioni batterio-pianta, requisito iniziale, indispensabile per lo sviluppo di inoculanti microbici più efficienti. Lo studio delle sequenze di DNA e della loro espressione nei simbionti fornirà inoltre informazioni indispensabili per la comprensione dettagliata dei meccanismi molecolari che consentono alla pianta e al batterio di riconoscersi l'un l'altro e permetterà l'identificazione dei geni coinvolti nella nodulazione.

Sebbene, la pratica della inoculazione abbia conseguito notevoli miglioramenti grazie alle nuove conoscenze di fisiologia, ecologia, biochimica e genetica dei rizobi, in questi ultimi anni, non ci sono stati ancora sostanziali progressi nel campo della applicazione agronomica della simbiosi. Anche in Italia sarebbe auspicabile istituire una collezione centrale di rizobi e un servi-

zio di controllo di qualità che salvaguardi la bontà degli inoculi agli operatori agricoli. La caratterizzazione genetica dei rizobi con le tecniche molecolari, sarà indispensabile, oltre che ad assicurare la qualità del ceppo distribuito, nella pre-selezione di isolati "unici" prima che vengano testati e incorporati in una collezione, evitando l'inserimento di copie multiple degli stessi ceppi, con notevole risparmio di tempo e di risorse. Inoltre in letteratura emergono solo pochi tentativi, sebbene ben riusciti, di strategie di ricerca interdisciplinare, seppure da tempo ci sia nella comunità scientifica la consapevolezza della necessità e validità di una cooperazione interattiva tra queste discipline con l'attività dei tecnici e produttori agricoli. La realizzazione in Italia di un pubblico database genetico dei *fingerprinting* di questa collezione, con le informazioni sulle proprietà simbiotiche, culturali, biochimiche, sierologiche su cui le colture madri degli inoculanti, di anno in anno, vengano confrontate e con i quali possano venire comparati nuovi isolati, sarebbe un grande passo in avanti in questa direzione.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Prof. Andrea Squartini del Dipartimento di Biotecnologie agrarie dell'Università di Padova per le preziose indicazioni ed i commenti forniti.

Bibliografia

- Amann R., Fuchs B.M., Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12:231-236.
- Amann R., Ludwig W., Schleifer K. 1995. Phylogenetic and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59:143-169.
- Amarger N., 2001. *Rhizobia* in the field. *Adv. Agron.*, 73:109-168.
- Ballard R.A., Charman N., Craig A.D., Hughes S.J. 2000. Symbiotic performance of pasture legume with naturalised soil rhizobia. *Cahiers Options méditerranéennes*, vol. 45, 315-320.
- Barnett M.J., Fisher R.F., Jones T., Komp C., Abola A.P., Barloy-Hubler F., Bowser L., Capela D., Galibert F., Gouzy J., Gurjal M., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Palm C., Peck M.C., Surzycki R., Wells D.H., Yeh K.C., Davis R.W., Federspiel N.A., Long SR. 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 14:98(17):9883-8.
- Barry T., Colleran G., Glennon M., Dunican L.K., Gannon F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Applic.*, 1:51-56.
- Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E. 1995. Manipulation of *rhizobia* microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil*, 174:143-180.
- Carelli M., Gnocchi S., Fancelli S., Mengoni A., Paffetti D., Scotti C., Bazzicalupo M. 2000. Genetic Diversity and Dynamics of *Sinorhizobium meliloti* Populations

- Nodulating Different Alfalfa Cultivars in Italian Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11):4785-4789.
- Casella S., Lupi F. 1987. Inoculi per la batterizzazione dei semi: controllo della qualità e standards produttivi. *Agr. Med.*, 117:409-414.
- Ciafardini G., Barbieri C. 1987. Effects of cover inoculation of soybean on nodulation, nitrogen fixation and yield. *Agron. J.*, 79:645-648.
- Colebatch G., Trevaskis B., Udvardi M. 2002. Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics era. 2002. *New Phytol.*, 153:37-42.
- Cooper J.E., Bjourson A.J., Streit W., Werner D. 1998. Isolation of unique nucleic acid sequences from *rhizobia* by genomic subtraction: Applications in microbial ecology and symbiotic gene analysis. *Plant Soil*, 204:47-55.
- Corich V., Bosco F., Giacomini A., Basaglia M., Squartini A., Nuti M.P. 1996. Fate of genetically modified *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* during long-term storage of commercial inoculants. *J. Appl. Bacteriol.*, 81(3):319-28.
- Corich V., Giacomini A., Carlot M., Simon R., Tichy H.V., Squartini A., Nuti M.P., 2001b. Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* natural populations. *Can. J. Microbiol.*, 47(6):580-4.
- Crang R.F., K. Klomparens L. ed. 1988. Artifacts in Biological Electron Microscopy. 254 p.
- Cyranoski D. 2001. Japanese legume project may help to fix nitrogen problem. *Nature*, 409 (6818):272.
- Date R.A. 2001. Advances in inoculant technology: a brief review. *Austral. J. Exp. Agric.*, 41:321-325.
- Dazzo F.B. and M. Petersen M. 1989. Application of computer-assisted image analysis for microscopic studies of the *rhizobium*-legume symbiosis. *Symbiosis*, 7193-210.
- De Bruijn F. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2180-2187.
- De Oliveira V.M., Coutinho H.L., Sobral B.W., Guimaraes C.T., van Elsas J.D., Manfio G.P. 1999. Discrimination of *Rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Lett. Appl. Microbiol.*, 28(2):137-41.
- Debelle F., Moulin L., Mangin B., Denarie J., Boivin. C. 2001. Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochim.*, 48(2):359-65.
- Demezas D.H., Reardon T.B., Mwatson J., Gibson A.H. 1991. Genetic Diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* Strains Revealed by Allozyme and restriction Fragment Length Polymorphism Analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(12):3489-3495.
- Dénarié, J., Debelle, F., Promé, J.C. 1996. *Rhizobium* lipochitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- Dommergues Y.R., Diem H.G., Divies C. 1979. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:779-781.
- Dowling D.N. and Broughton W.J. 1986. Competition for nodulation of Legumes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40:131-157.
- Drevon J.J., Abdely C., Amarger N., Aouani E.A., Aurag J., Gherbi H., Jebara M., Lluch C., Payre H., Schump O., Soussi M., Sifi B., Trabelsi M. 2001. An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. *J. Biotechnol.*, 4:91(2-3):257-68.
- Eardly B.D., Materon L.A., Smith N.H., Johnson D.A., Rumbaugh M.D., Selander R.K. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(1): 187-94.
- Feng L., Roughley R.J., Copeland L. 2002. Morphological changes of *rhizobia* in peat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(3):1064-70.
- Freiberg C., Fellay R., Bairoch A., Broughton W.J., Rosenthal A., Perret X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 387(6631):394-401.
- Frommel M.I., Novak J., Lazarovits G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* sp.) as affected by a non fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.*, 96:928-936.
- Galibert F., Finan T.M., Long S.R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M.J., Becker A., Boistard P., Bothe G., Boutry M., Bowser L., Buhrmester J., Cadieu E., Capela D., Chain P., Cowie A., Davis R.W., Dreano S., Federspiel N.A., Fisher R.F., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Golding B., Gouzy J., Gurjal M., Hernandez-Lucas I., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Jones T., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Kiss E., Komp C., Lelaure V., Masuy D., Palm C., Peck M.C., Pohl T.M., Portetelle D., Purnelle B., Ramsperger U., Surzycki R., Thebault P., Vandendol M., Vorholter F.J., Weidner S., Wells D.H., Wong K., Yeh K.C., Batut J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 27;293(5530):668-72.
- Garrity G.M. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., New York: Springer-Verlag.
- Hebb D.M., Richardson A.E., Ried R., Brockwell J. 1998. PCR as an ecological tool to determine the establishment and persistence of *Rhizobium* strains introduced into the field as seed inoculant. *J. Agric. Res.*, 49:923-34.
- Hedge S.V., Brahma Prakash G.P. 1992. A dry granular inoculant of *Rhizobium* for soil application. *Plant Soil*, 144:309-311.
- Hirsch A.M., Lum M.R., Downie J.A. 2001. What makes the *rhizobia*-legume symbiosis so special? *Plant Physiol.*, 127(4):1484-92.
- Howieson J.G. 1999. The host-*rhizobia* relationship. In: Bennett S.J., Cocks P.S. eds. *Genetic Resources of Mediterranean Pastures and Forage Legumes*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 96-106.
- Howieson J.G., O'Hara G.W., Loi A. 2000. The legume-*rhizobia* relationship in the Mediterranean Basin. *Cahiers Options méditerranéennes*, vol. 45, 305-314.
- Jansen van Rensberg H., Strijdom B.W. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:127-131.
- Jung G., Mugner J. 1982. Polymer-entrapped *rhizobium* as an inoculant for legumes. *Plant Soil*, 65:219-231.
- Kaijalainen S., Lindstrom K. 1989. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Rhizobium galegae* strains. *J. Bacteriol.*, 171(10):5561-6.
- Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Asamizu E., Kato T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Mochizuki Y., Nakayama S., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takeuchi C., Yamada M., Tabata S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.*, 7:331-338, 381-406.

- Keyser H.H., Somasegaran P., Bohlool B.B. 1992. Rhizobial ecology and technology. In: F.B. Metting ed. Soil Microb. Ecol., 205-226.
- Kosanke J.W., Osburn R.M., Shuppe G.I., Smith R.S. 1991. Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial populations. Can. J. Microbiol., 38:520-525.
- Laberge S., Middleton A.T., Wheatcroft R. 1995. Characterization, nucleotide sequence, and conserved genomic locations of insertion sequence ISRM5 in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 177(11):3133-42.
- Lafay B., Burdon J. 2001. Small-Subunit rRNA Genotyping of *Rhizobia* Nodulating Australian *Acacia* spp. Appl. Environ. Microbiol., 67:396-402.
- Laguette G., Bardin M., Amarger N. 1993. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic by DNA hybridization. Can. J. Microbiol. 39:1142-1149.
- Laguette G., Mavingui P., Allard M.R., Charnay M.P., Louvrier P., Mazurier S.I., Rigottier-Gois L., Amarger N. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. Appl. Environ. Microbiol., 62(6):2029-36.
- Lievens S., Goormachtig S., Holsters M. 2001. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. Nucleic Acids Res., 1:29.
- Loh J., Lohar D.P., Andersen B., Stacey G. 2002. A two-component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. J. Bacteriol. 184(6):1759-66.
- Long S.R. 2001. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbioses. Plant Physiol., 125:69-72.
- Ludwig W., Amann R., Martinez-Romero E., Schonhuber W., Bauer S., Neef A., Schleifer K.H. 1998. rRNA based identification and detection systems for *rhizobia* and other bacteria. Plant Soil, 204:1-19.
- Meneghetti F., Alberghini S., Tola E., Giacomini A., Ollero F.J., Squartini A., Nuti M.P. 1996. Presence of repeated insertion sequences in nodulation genes of *Rhizobium hedysari*. Plant Soil, 186:113-120.
- Muresu R., Rubino S., Rizzu P., Baldini A., Colombo M., Cappuccinelli P. 1994. A new method for identification of *Trichomonas vaginalis* by fluorescent DNA in situ hybridization. J. Clin. Microbiol., 32(4):1018-22.
- Niemann S., Damman T., Nagel A., Puhler A., Selbitschka W. 1999. Genetic basis of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *Sinorhizobium meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment. Archiv. Microbiol., 172:22-30.
- Nuti M.P. ed. 1985. Impiego degli azotofissatori in agricoltura-limitazioni e prospettive. Monografia n. 7 Prog. Fin. IPRA-CNR, CNR Roma.
- Nuti M.P., Squartini A. 1987. La batterizzazione delle leguminose in Italia. Agr. Med., 117:383-389.
- Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S., Bazzicalupo M. 1995. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* Population from Different *Medicago sativa* Varieties. Appl. Environ. Microb., 62(7):2279-2285.
- Paffetti D., Scotti C., Gnocchi S., Fancelli S., Bazzicalupo M. 1996. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. Appl. Environ. Microbiol., 62:2279-2285.
- Percuoco G. 1987. Metodi di Batterizzazione di leguminose da foraggio e da granella. Agr. Med., 117:397-407.
- Perret X., Broughton W.J. 1998. Rapid identifications of *Rhizobium* strains by targeted PCR fingerprinting. Plant Soil 204:21-34.
- Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 64(1):180-201.
- Picard C., Ponsoonnet C., Paget E., Nesme X., Simonet P. 1992. Detection and Enumeration of bacteria in Soil by Direct DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. Appl. Env. Microb., 58(9):2717-2722.
- Pillai S.D., Josephson Karen L., Bailey Rachel L. and Pepper I.L. 1992. Specific detection of *rhizobia* in root nodules and soil using the polymerase chain reaction. Soil Biol. Biochem., 24(9):885-891.
- Pirttila A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllyla R., Hohtola A. 2000. Detection of Intracellular Bacteria in the Buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by In Situ Hybridization. Appl. Environ. Microbiol., 66(7):3073-3077.
- Pulaska J., Maes M., Willems A., Sobczewski P. 2001. Phylogenetic analysis of 23S rRNA gene sequences of *Agrobacterium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* strains. Syst. Appl. Microbiol., 23(2):238-44.
- Revellin C., Meunier G, Giraud J., Sommer J., Wadoux P., Catroux G. 2000. Changes in the physiological and agricultural characteristics of peat-based *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after long-term storage. Appl. Microbiol. Biotechn., 154:206-211.
- Richardson A.E., Viccars L.A., Watson J.M., Gibson A.H. 1995. Differentiation of *rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers. Soil Biol. Biochem., 27:515-524.
- Rigottier-Gois L., Turner S.L., Young J.P.W., Amarger N. 1998. Distribution of repC plasmid-replication sequences among plasmids and isolates of *rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* from field populations. Microbiol., 144:771-780.
- Roberts M.A., Crawford D.L. 2000. Use of randomly amplified polymorphic DNA as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. Appl. Environ. Microbiol., 66(6):2555-64.
- Rodriguez-Navarro D.N., Temprano F., Orive R. 1991. Survival of *Rhizobium* sp. (*Hedysarum coronarium* L.) on peat-based inoculants and inoculated seeds. Soil Biol. Biochem., 4:375-379.
- Rogers D.D., Warren R.D., Chamblee D.S. 1982. Remediation postemergence legume inoculation with *Rhizobium*. Agron. J., 74:613-619.
- Rome S., Cleyet-Marel J.C., Materon L.A., Normand P., Brunel B. 1997. Rapid identification of *Medicago* nodulating strains by using two oligonucleotide probes complementary to 16S rDNA sequences. Can. J. Microbiol., 43(9):854-61.
- Roughley R.J., Vincent J.M. 1967. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. J. Appl. Bacteriol., 30:362-376.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.A. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schonhuber W., Le Bourhis G., Tremblay J., Amann R. and Kulakauskas S. 2001. Utilization of tmRNA sequences for bacterial identification. BMC. Microbiol., 1:20.
- Selenska-Pobell S., Evgueniev-Hackenberg E., Radeva G., Squartini A. 1996. Characterization of *Rhizobium* 'hedysari' by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. J. Appl. Bacteriol., 80(5):517-28.
- Sivakumar S., Lockhard P.J., Jarvis B.D.V. 1997. Identification of soil bacteria expressing a symbiotic plasmid from *rhizobium leguminosarum* bv *trifoli* Can. J. Microbiol., 43:164-167.
- Smith R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application. Can. J. Microbiol., 38:485-492.

- Sobral B.W.S., Honeycutt R.J., Atherly A.G. 1991. The genomes of the family *Rhizobiaceae*: Size, stability, and rarely cutting restriction endonucleases. *J. Bacteriol.*, 173:704-709.
- Somasegaran P. 1995. Inoculant production with diluted liquid cultures of *Rhizobium* spp. and autoclaved peat: evaluation of diluents, *rhizobium* spp., peats, sterility requirements, storage and plant effectiveness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:398-405.
- Somasegaran P., Bohlool B.B. 1990. Single-strain versus multi-strain inoculation: effect of soil mineral N availability on rhizobial strain effectiveness and competition for nodulation on chick-pea, soybean and dry bean. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:3298-3303.
- Somasegaran P., Hoben J.H. 1994. *Handbook for rhizobia*. Springer-Verlag, New York.
- Spaink H.P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54:257-88.
- Squartini A., Struffi P., Döring H., Selenska-Pobell S., Tola E., Giacomini A., Vendramin E., Velázquez E., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Dazzo F.B., Casella S., Nuti M.P. 2002. *Rhizobium sullae* sp. nov. (formerly *Rhizobium "hedysari"*): the microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, (in corso di stampa).
- Stephens J.H.G., Rask H.M. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.*, 65:249-258.
- Stougaard J. 2001. Genetics and genomics of root symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:328-335.
- Sulas L., Re G.A., Loi A., Howieson J.G. 1998. The selection of optimal root-nodule bacteria inoculants increases the forage yield of *Hedysarum coronarium* (sulla). *Proc. 17th General Meeting of the European Grassland Federation Debrecen, Hungary, 18-21 May 1998*. 899-904.
- Sullivan J.T., Patrick H.N., Lowther W.L., Scott D.B., Ronson C.W. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 12:92(19): 8985-9.
- Sullivan J.T., Ronson C.W. 1998. Evolution of *rhizobia* by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a pre-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:5145-5149.
- Tan Z., Hurek T., Vinuesa P., Muller P., Ladha J.K., Reinhold-Hurek B. 2001. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8):3655-64.
- Tas E., Kaijalainen S., Saano A., Lindstrom K. 1994. Isolation of a *rhizobium galegae* strain-specific DNA probe. *Microb. Rel.*, 2:231-237.
- Tas E., Saano A., Leinonen P., Lindstrom K. 1995. Identification of *Rhizobium* spp. in peat based inoculants by DNA hybridization and PCR and its application in inoculants quality control. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1822-1827.
- Therefework Z., Nick G., Suomalainen S., Paulin L., Lindstrom K. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *Internat. J. of Syst. Bacteriol.* 48:349-356.
- Tesfaye M., Holl F.B. 1998. Group-specific differentiation of *Rhizobium* from clover species by PCR amplification of 23S rDNA sequences. *Can. J. Microbiol.*, 44(11):1102-5.
- Tesfaye M., Peterson D.J., Holl F.B. 1997. Comparison of partial 23S rDNA sequences from *Rhizobium* species. *Can. J. Microbiol.*, 43(6):526-33.
- Theron J., Cloete T.E. 2000. Molecular Techniques for Determining Microbial Diversity and Community Structure in Natural Environments. *Crit. Rev. Microbiol.*, 26(1):37-57.
- Thies J.E., Holmes E.M., Vachot A. 2001. Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review. *Austr. J. Exp. Agric.*, 41:299-319.
- Trevors I., Van Elsas J.D., Van Overbeek L.S., Starodub M. 1990. Transport of a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.*, 16:401-408.
- van Brussel A.A., Tak T., Boot K.J., Kijne J.W. 2002. Autoregulation of root nodule formation: signals of both symbiotic partners studied in a split-root system of *Vicia sativa* subsp. nigra. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 15(4):341-9.
- Vincent J.M. 1970. *A manual for practical study of the root nodule bacteria*. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications.
- Vinuesa P., Rademaker J.L. W., de Bruijn F.J., Werner D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:2096-2104.
- Walley F., Johnston A. 2000. Fertility management of peas. *Farm. Tech. 2000 Conference, Alberta, Canada*. 1-8.
- Wang E.T. e Martínez-Romero E. 2000. Phylogeny of Root- and Stem-Nodule Bacteria Associated with Legumes. In: Nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. (A compilation of 44 chapters written by experts from around the world.). *Norfolk (UK): Horizon Scientific Press*, 1-800.
- Wang C.L., Beringer J.E., Hirsch P.R. 1986. Host plant effects on hybrids of *rhizobium leguminosarum* biovars *viciae* and *trifolii*. *J. Gen. Microbiol.*, 132:2063-2070.
- Widmer F., Shaffer B.T., Porteous L.A., Seidler R.J. 1999. Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:374-380.
- Willems A., Collins M.D. 1993. Phylogenetic analysis of *Rhizobia* and *Agrobacteria* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 43:305-313.
- Wilson K.J. 1995. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. *Soil Biol. Biochem.*, 27:501-514.
- Wilson K.J., Parra A., Botero L. 1999. Application of the GUS marker gene technique to high-throughput screening of rhizobial competition. *Can. J. Microbiol.*, 45:678-685.
- Yanagi M. e Yamasato K. 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.*, 107:115-120.
- Yanni Y.G., Rizk R., Chorich V., Squartini A., Ninke K., Philip-hollingsworth G., Orgambide G., de Bruijn F., Stoltzfus J., Buckley D., Schmidt T., Mateos P., Ladha J.K. Dazzo F.B. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil*. 194:99-114.
- Zeze A., Mutch La., Young J.P. 2001. Direct amplification of Nod D from Community Dna reveals the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* in soil. *Environ. Microbiol.*, 3(6):363-70.