

# La Neurobiologia Vegetale: sinapsi, neurotrasmettitori e memoria nelle piante\*

## Riassunto

Nel 1880 Charles Darwin propose che gli apici radicali rappresentassero una sorta di cervello diffuso delle piante in grado di percepire segnali multipli dall'ambiente circostante e di prendere, sulla base di questi, decisioni in merito alle strategie da seguire.

A più di un secolo dall'intuizione di Darwin è ormai un dato certo che le piante superiori non solo siano capaci di ricevere segnali dall'ambiente circostante ma che posseggano anche meccanismi atti alla rapida trasmissione di questi. Inoltre le piante sono in grado di (ri)elaborare le informazioni ottenute dall'ambiente manifestando una capacità di apprendimento che implica la ricerca di uno scopo, la capacità di stimare gli errori e la presenza di meccanismi mnemonici.

Sorprendentemente, le piante a) producono numerosi neurotrasmettitori ed altre molecole neurobiologicamente attive, b) posseggono recettori per glutammato, GABA e sinaptogamine, c) sono in grado di generare potenziali d'azione con i quali comunicare a livello locale o globale ed infine, d) sviluppano vere e proprie sinapsi, specializzate per il trasferimento di informazioni sia chimiche che elettriche fra cellule adiacenti.

Le nuove conoscenze offerte dalla neurobiologia vegetale, e l'utilità di studiare le piante come prototipi di organismi "neurali" sarà discussa.

## 1. Premessa

Al nascere del nuovo millennio, la biologia vegetale è testimone di fondamentali avanzamenti nel complesso studio del comportamento delle piante superiori. Fra questi senza dubbio uno dei più straordinari risultati ottenuti dalla ricerca degli ultimi anni è stato quello di rivelare nelle piante lineamenti di un comportamento intelligente [Bibl. 6].

Sorprendentemente queste scoperte non derivano da studi di fisiologia cellulare o di genomica, bensì dall'ecologia vegetale. Grazie ai progressi sostanziali in questa disciplina è stato possibile evidenziare numerosi comportamenti "intelligenti" delle piante, soprattutto nei confronti della comprensione e risposta all'ambiente.

Le piante riconoscono altri organismi viventi come batteri, funghi, piante di altre specie, ed animali [Bibl. 95, 79, 60] ed intrattengono con essi rapporti complessi. Ad esempio, per portare a termine la riproduzione sessuale, le piante sfruttano sofisticate interazioni con insetti ed uccelli e per far questo, come già dimostrato da Charles Darwin, [Bibl. 26] modellano i loro organi sessuali in modo da favorire ed attrarre i vettori animali. Le piante inoltre "premiano" i loro impollinatori con nettare ed altri composti sia attrattivi, che necessari alla dieta di questi animali [Bibl. 24].

Sono state descritte interazioni molto complesse tra i feromoni degli insetti e i prodotti volatili prodotti dalle piante [Bibl. 65]. Un esempio interessante è offerto da molte specie appartenenti al genere *Arum*, che emettono composti volatili con un odore nauseabondo simile alla carne in putrefazione, tali prodotti volatili sono gli stessi che attraggono gli insetti verso le carcasse degli animali nei quali depositare le loro uova [Bibl. 63].

Le piante sono, quindi, maestre nell'utilizzo di strategie intelligenti finalizzate alla loro riproduzione, oltre ad essere in grado di gestire a proprio vantaggio rapporti con numerosi organismi del modo animale. È ormai certo che alcune specie vegetali riconoscono e comunicano con le formiche, le quali proteggono le piante dagli erbivori, dai patogeni e dalla

---

\* Stefano Mancuso – Dipartimento di Ortoflorofruitticoltura Università di Firenze

vegetazione circostante in competizione per il territorio [Bibl. 18, 30], ricevendone in compenso nettare [Bibl. 53] parti eduli [Bibl. 93].

Le piante riconoscono l'identità degli erbivori, e sono così in grado di difendersi da tali nemici [Bibl. 2]. Per esempio, le radici delle piante attaccate da insetti erbivori, rilasciano composti volatili che attraggono specie di nematodi predatori degli erbivori [Bibl. 84]. Rilasciando composti volatili nell'aria, i germogli colpiti dai patogeni informano le piante vicine dell'attacco in corso, cosicché quest'ultime possano aumentare le loro difese immunitarie [Bibl. 79, 85]. È affascinante osservare come le piante emettano numerosi composti volatili utilizzandoli per trasmettere segnali diversi. Così, il rilascio di composti volatili in risposta al danneggiamento dei germogli ad opera di erbivori, è diverso da quello che avviene in seguito a ferite di altra natura [Bibl. 85, 2].

Le piante rispondono, inoltre, con immediato vigore agli stimoli meccanici. Le radici mostrano un accertato tigmotropismo che permette loro di esplorare, con una curiosità simile a quella animale, l'ambiente circostante, in una continua ricerca di acqua e di nutrienti. Gli apici radicali monitorano costantemente i numerosi parametri fisici del suolo e usano tali informazioni per la ricerca di zone migliori e più favorevoli alla loro crescita e riproduzione.

Letteralmente le piante nutrono il mondo intero. Esse intercettano l'energia luminosa che arriva dal sole e trasformano i composti inorganici poveri di energia, in composti organici, ricchi di energia, che poi vengono utilizzati come cibo dagli organismi eterotrofi. Anche i combustibili come il petrolio, adoperati come dall'uomo come fonte principale d'energia hanno origine vegetale. *Le piante si trovano così al confine tra un universo apparentemente ostile e violento, e una terra fertile e ricca di vita.* Possiamo affermare che se riuscissimo a capire meglio le piante, esse sarebbero in grado di svelarci qualcosa in più del grande mistero della vita.

## **2. Alcuni appunti di storia dell'elettrofisiologia**

La comune percezione dell'uomo nei confronti delle piante è sempre stata quella di creature passive, del tutto in balia dell'ambiente in cui vivono ed assolutamente inabili ad alcun ruolo di controllo su esso. Tuttavia, questa sensazione di passività, che in generale nasce dall'idea che le piante siano incapaci di cambiare posizione o di comunicare attraverso suoni, è semplicemente una conseguenza relativa al rapporto con la scala cronologica dei movimenti e dell'esistenza umana. Le recenti scoperte nel campo dell'ecologia e della fisiologia accennate sopra, sollecitano un cambiamento di atteggiamento nei confronti di questa percezione antropocentrica delle piante superiori. Per fortuna, tutto ciò sta lentamente cambiando e interessanti ricerche di biologia vegetale iniziate negli ultimi anni hanno permesso la nascita di una nuova disciplina: la neurobiologia vegetale che sembra oggi affermarsi come un filone emergente nello studio delle piante, ma la cui storia, come sempre nella scienza, parte da lontano.

### **2.2. Da Luigi Galvani e la scuola di Bologna a Hodgkin e Huxley**

Per numerosi secoli dopo i primi studi di Aristotele e dei suoi discepoli, che si adoperarono nel tentativo filosofico di comprendere le piante nella loro complessità, l'interesse per gli organismi vegetali si limitò essenzialmente al loro utilizzo come principio medicinale (Fig. 1).

Bisognerà attendere il sedicesimo secolo, per ritrovare studiosi interessati ai principi di base delle strutture e delle funzioni delle piante. All'inizio si trattò di studi principalmente indirizzati verso la tassonomia e la morfologia delle piante. In seguito, stimolati dalle ricerche in medicina, si aggiunsero anche anatomia e citologia alla lista delle scienze botaniche studiate presso le università. In questo periodo la natura cellulare degli organismi viventi fu per la prima volta individuata studiando le piante da Hooke nel 1665 [Bibl. 55]. Sebbene, la parola "cellula" sia stata per la prima volta usata da Hooke nella sua celebre

*Micrographia* (Fig. 2), non si può dire che il microscopista inglese avesse intuito il significato della cellula, come elemento base degli organismi viventi. Pur non utilizzando la stessa parola, invece, in quegli stessi anni, Malpighi, osservando che alcune parti di piante erano costituite da minuscoli organismi elementari, li denominò *utriculi* [Bibl. 70], intuendo, la loro importanza come base elementare della vita.

Nel 1746, una notevole scoperta dell'abate Jean Nollet fu quella del primo condensatore elettrico (Fig. 3) denominato al tempo, bottiglia di Leida. L'elettricità in quel periodo diventò un fenomeno di moda, dalle applicazioni mediche [Bibl. 65], che suscitavano aspettative straordinarie, ritenendo in molti che con l'elettricità si fosse trovato finalmente il misterioso ed onnipotente fluido vitale, all'utilizzo come fenomeno da baraccone (Fig. 4).

Nel 1791, Luigi Galvani, dava alle stampe il *De viribus electricitatis in motu musculari* [Bibl. 46] (Fig. 5), un'opera di cui è stato detto che aveva provocato una tempesta nel mondo scientifico della fine del XVIII secolo pari agli sconvolgimenti che stavano attraversando l'Europa a seguito della rivoluzione francese [Bibl. 36].

Gli esperimenti al centro del trattato sono noti anche ai profani. La prima esperienza risale al 1780: *preparai una rana, scrive Galvani, e la collocai su di un tavolo, su cui era anche una macchina elettrica, dal cui conduttore era del tutto separata. Quando un mio assistente ne toccò con una punta metallica i nervi crurali, i muscoli delle zampette si contrassero violentemente. Un altro mio assistente credette di avvertire che il fenomeno accadeva proprio quando si traeva una scintilla dal conduttore della macchina. Sorpreso della novità della cosa mi avvertì subito...* (Fig. 6). Oggi noi sappiamo che la rana, percorsa da una corrente indotta istantanea, funge da rivelatore delle onde elettromagnetiche emesse dalla macchina elettrica. A quel tempo però Galvani non poteva fornire una spiegazione esatta dell'accaduto. Nel 1786, continuando le sue ricerche su questi fenomeni di elettricità animale Galvani fa un'altra scoperta fondamentale che così annota nei suoi appunti: *ai primi di settembre, all'imbrunire, preparammo delle rane al modo solito perforandone al midolla spinale con un uncino di ferro a cui gli animaletti restavano appesi. Le poggiammo un momento orizzontalmente nel parapetto del terrazzo. L'uncino di ferro toccava la lamina, di ferro anch'essa, del parapetto: osservammo che le rane erano percorse di quando in quando da vari moti* (Fig. 7) [Bibl. 46]. Galvani varia gli esperimenti in tutte i modi possibili e si accorge così di un altro fatto importantissimo: se l'arco con cui si toccano le rane è formato di solo ferro le contrazioni sono lievi, mentre se l'arco è formato da due metalli come ferro e argento, le contrazioni diventano molto più evidenti. Indicando così la strada ad Alessandro Volta per la scoperta della pila.

Galvani con la sua opera gettava le basi dell'elettrofisiologia mettendo a disposizione degli scienziati che in tutta Europa si occupavano dello studio dei fenomeni elettrici, il resoconto dettagliato di dieci anni di ricerche ed osservazioni sulla conduzione nervosa e la contrazione muscolare, figlie di un ambiente scientifico assai collaborativo in cui i rapporti costanti fra i laboratori più avanzati del tempo in diverse discipline quali fisiologia, chimica, fisica, prosperavano a Bologna sulla linea tracciata dalla grande scuola medica di Malpighi e Morgagni.

A più di due secoli dalla morte di Galvani, il suo fondamentale contributo alla comprensione dei fenomeni bioelettrici, alla base delle neuroscienze e più in generale dell'elettrofisiologia, rimane una splendida realizzazione di un lungimirante e fecondo periodo nella storia delle scienze, reso possibile da una rigorosa applicazione del metodo sperimentale, con il ricorso all'analisi comparata ed all'uso simultaneo delle tecniche e dei risultati di campi di ricerca anche molto diversi. Nel 1952, Hodgkin e Huxley [Bibl. 54], grazie alla dettagliata spiegazione della trasmissione elettrica dello stimolo nervoso, in qualche modo concludevano il ciclo storico delle ricerche iniziate da Galvani circa due secoli addietro [Bibl. 80]

### 2.3. *Similarità fra piante ed animali*

Alla fine del XIX secolo, con l'intensificarsi degli studi biologici, le numerose analogie fra animali e piante iniziarono ad essere evidenti. In quegli anni Fabre dava alle stampe un celebre testo di divulgazione sulla vita delle piante, che iniziava con queste parole: *La pianta è sorella dell'animale: come questo, essa vive, si nutre, si riproduce. Per comprendere la prima, spesso è molto utile consultare il secondo: come pure per comprendere il secondo, è conveniente chiedere chiarimenti alla prima.*" [Bibl. 42]. Numerose scoperte confermarono questa vicinanza fra piante ed animali. Soprattutto gli studi riguardanti alcuni processi di base, come respirazione e crescita cellulare, poterono svilupparsi grazie all'uso delle piante come materiale sperimentale.

Tutte le principali vie metaboliche sono simili, se non identiche, nelle cellule animali e vegetali, ma non solo: le piante sono somiglianti agli animali anche in ambiti inaspettati dalla riproduzione sessuale, basata sulla fusione delle cellule spermatiche e degli oociti alla risposta immunitaria, fino alle molecole e vie metaboliche utilizzate per regolare i ritmi circadiani

Negli ultimi anni le scienze vegetali, hanno accumulato una gran quantità di nuovi dati scientifici che permettono di intravedere somiglianze fra animali e piante anche in ambiti solitamente riservati alla sola biologia animale, come la neurofisiologia. Le piante sono infatti organismi intelligenti che riescono ad elaborare informazioni complesse [Bibl. 103, 104] che non solo utilizzano potenziali d'azione ma anche connessioni sinaptiche tra cellula e cellula [Bibl. 8].

Ci sono diverse sorprese se applichiamo una prospettiva "neurobiologica" allo studio dei tessuti vegetali ed alla stessa organizzazione della pianta. L'auxina sembra comportarsi come un neurotrasmettitore specifico delle piante [Bibl. 8]. Gli apici radicali sembrano possedere un'attività neural-simile [Bibl. 6]. Ed ancora, gli elementi vascolari permettendo il rapido scorrimento dei segnali idraulici e dei potenziali d'azione, rappresentano la principale via per la segnalazione a lunga distanza. Il fatto che le piante siano in grado di rilevare le condizioni ambientali e di prendere decisioni circa le loro future attività (Trewavas 2003), rendono ovvio che posseggano dei sistemi d'archiviazione ed elaborazione delle informazioni.

### 3. Cenni di neurobiologia vegetale

Charles Darwin (Fig. 8) era *...sempre felice di esaltare le piante nella scala degli esseri viventi e sentiva uno speciale piacere nel dimostrare quanti e quali ammirabilmente ben adattati movimenti l'apice della radice possedesse* [Bibl. 27]. In realtà, Darwin si spinse così avanti da ipotizzare per gli apici radicali un comportamento simile a quello di un vero e proprio cervello vegetale (*Non è una esagerazione dire che la punta delle radici, avendo il potere di dirigere i movimenti delle parti adiacenti, agisce come il cervello di un animale inferiore*) che riceve impressioni dagli organi di senso e dirige i diversi movimenti della radice [Bibl. 26]. Quello che chiaramente impressionava maggiormente Darwin era l'abilità delle radici nel percepire, spesso simultaneamente, molteplici stimoli ambientali: tocco, umidità, gravità, luce, ossigeno, nutrienti, ecc. – e quindi, essere in grado di prendere una decisione e di muoversi in funzione di questa anche se *le piante, ovviamente, non posseggono nervi o un sistema nervoso centrale* [Bibl. 25].

#### 2.1. *I potenziali d'azione*

Quantunque i vegetali non posseggano nervi, essi, tuttavia, producono potenziali d'azione che si propagano velocemente ed a grande distanza dal punto d'origine. I potenziali d'azione, ovvero la più rapida via di comunicazione neurale negli animali, sono noti nelle piante fin dal pionieristico lavoro di Burdon-Sanderson del 1873 che li misurò e descrisse in un noto studio effettuato sulla pianta carnivora *Dionea muscipula* [Bibl. 19,

20]. Potenziali d'azione furono in seguito misurati anche in piante cosiddette "sensitive" come la *Mimosa pudica* o la *Mimosa spegazinii* nelle quali la propagazione di potenziali d'azione precede la chiusura delle foglioline a seguito di stimoli meccanici [Bibl. 66, 86, 14, 16].

Questi studi risalgono, quindi, ad un periodo in cui il cervello animale era ancora largamente inesplorato e le basi cellulari dei circuiti neurali del tutto speculative e non completamente accettate dalla comunità scientifica.

I numerosi tentativi compiuti a cavallo fra l'otto ed il novecento di descrivere la comunicazione intercellulare delle piante come simil-nervosa (vedi ad esempio i numerosi ed interessanti saggi pubblicati dal fisico indiano Bose agli inizi del secolo passato) non ricevettero mai ampio riconoscimento scientifico [Bibl. 13, 15]. Al contrario molti di questi resoconti, nonostante rispondessero a tutti i requisiti richiesti da una solida scienza, furono spesso bollati come pseudo-scienza e destinati all'oblio. Le ragioni di questo rigetto sono da ricercare ancora oggi essenzialmente nella tendenza ad associare l'elettrofisiologia vegetale a suggestioni "metafisiche" o addirittura "paranormali" [Bibl. 29], così come alla perdurante considerazione che le piante essendo organismi sessili siano da considerare esseri passivi che non hanno alcun bisogno di rapidi segnali elettrici o di eccitabilità.

Indubbiamente tutto ciò è facilmente confutabile ed anzi, proprio l'impossibilità di spostarsi (non di muoversi si badi bene), richiede nelle piante sistemi di segnalazione e di risposta all'ambiente estremamente sofisticati. Questo probabilmente spiega come mai una eccezionalmente vasta porzione del genoma di *Arabidopsis* sia costituita da geni che codificano proteine recettrici (perlopiù RLK, *Receptor-Like Kinases*), le quali danno inizio a complesse reti di segnalazione [Bibl. 88].

A dispetto dell'ostilità dimostrata negli anni verso qualunque fenomeno elettrico legato alle piante, una serena analisi dei numerosi dati disponibili è sufficiente a convincere che i potenziali d'azione controllino importanti processi fisiologici quali la respirazione, la fotosintesi, il movimento laterale degli organi ecc. [Bibl. 5]. Di conseguenza oggi la presenza di potenziali d'azione nelle piante e la loro funzione nella segnalazione a breve e lunga distanza sono ampiamente accettati [Bibl. 6].

## **2.2. Le sinapsi vegetali**

Le piante sono così in grado di produrre ed elaborare segnali basati su potenziali d'azione. Non così semplice è, invece, il collegamento fra i potenziali d'azione ed una possibile attività simil-nervosa delle piante essendo quest'ultime ritenute prive di sinapsi e neuroni. Ma è davvero necessario che le piante posseggano neuroni e sinapsi simili a quelle degli animali? O per meglio dire, sono da considerarsi sinapsi soltanto le specifiche strutture animali? Fondamentalmente no. Nei successivi paragrafi dopo una rapida descrizione delle sinapsi animali cercherò di illustrare come sia possibile esportare il concetto di sinapsi anche a livello vegetale.

### **2.2.1. L'originale: le sinapsi animali**

Le strutture neuronali deputate alla trasmissione delle informazioni sono le sinapsi, illustrate sinteticamente nella [figura 9](#). Lungo il suo percorso l'assone si divide più volte formando numerosissime diramazioni, progressivamente sempre più sottili, che terminano in piccoli rigonfiamenti (del diametro di circa un micron) chiamati terminazioni nervose presinaptiche. Queste sono contrapposte ad una piccola porzione specializzata della membrana della cellula ricevente, la membrana postsinaptica; lo spazio intercellulare che si trova in mezzo alle due cellule è chiamato spazio intersinaptico o doccia sinaptica. La terminazione presinaptica contiene vescicole cariche di neurotrasmettitore che, una volta rilasciate nella doccia sinaptica, funzioneranno da messaggero chimico; sulla membrana postsinaptica sono invece concentrati i recettori per ogni specifico neurotrasmettitore,

recettori che funzionano quindi come "*detector*" per la rilevazione del segnale. Non appena le molecole di neurotrasmettitore sono rilasciate nella doccia sinaptica, si legano ai recettori specifici localizzati sulla membrana della cellula postsinaptica, innescando un meccanismo consistente nell'apertura di canali proteici che sono selettivamente permeabili ad uno o più ioni. Il passaggio attraverso la membrana cellulare di questi ioni, che per definizione sono specie cariche elettricamente, altera la differenza di potenziale elettrico normalmente esistente fra il lato interno e quello esterno della membrana cellulare. Questa variazione causa a sua volta l'apertura (o chiusura) di altri canali ionici, detti per l'appunto voltaggio-dipendenti. La presenza dei canali ionici voltaggio-dipendenti rende il neurone una cellula eccitabile, vale a dire una cellula in grado di generare e trasmettere segnali elettrici appena venga stimolata localmente. I canali voltaggio-dipendenti possono essere attivati ordinatamente, in sequenza, dando luogo a una corrente elettrica che percorre i dendriti in senso centripeto, cioè verso il corpo cellulare del neurone postsinaptico.

### 2.2.2. *Le sinapsi vegetali*

I recenti progressi nel campo dell'immunologia cellulare hanno rivelato che le interazioni di segnale tra le cellule T e gli antigeni che rappresentano le cellule bersaglio nel sistema immunitario animale, culminano nella formazione di *sinapsi immunologiche* basate sull'actina, le quali, sotto molti punti di vista, assomigliano alle sinapsi neuronali [Bibl. 39, 28, 40, 45, 56]. Per questo motivo, è stato necessario, recentemente rivedere la definizione di sinapsi [Bibl. 39]. Secondo la nuova definizione, per sinapsi si devono intendere "*domini di adesione asimmetrici basati sull'actina, specializzati nella rapida comunicazione intercellulare realizzata attraverso vesicle trafficking*". Alla luce di questa definizione allargata del significato di sinapsi i punti di contatto fra le pareti cellulari (*cross walls*), specialmente nella zona di transizione dell'apice radicale, possono essere considerati come sinapsi basate sull'actina [Bibl. 4, 7, 5, 10, 111]. È interessante notare, come oltre all'actina, queste vere e proprie *sinapsi vegetali* accumulino grandi quantità della miosina di classe VIII [Bibl. 4,5,7], molecola non convenzionale, specifica delle piante, coinvolta nella endocitosi vegetale [Bibl. 5].

Se le *cross-walls* rappresentano le sinapsi vegetali, allora esiste anche il bisogno di un qualche tipo di cellula capace di funzionare come un classico neurone. Nel cervello animale, l'immobilità dei corpi cellulari neuronali richiede la produzione di numerose appendici allungate, gli assoni, che trovano le cellule partner ed organizzano quindi le sinapsi neuronali nel cervello. Le cellule vegetali hanno sostanzialmente forma tubolare e tipicamente entrano in contatto le une con le altre attraverso i loro poli terminali, anche noti come *cross-walls* (sinapsi vegetali), per formare lunghe file di cellule che compongono le unità base dei tessuti vegetali [Bibl. 7] (Fig. 10).

Le radici mostrano cellule ordinatamente organizzate in colonne presenti in tutto l'apice radicale, caratteristica che si presenta ancora più distintamente in prossimità del meristema; ne sono un esempio il mais e l'*Arabidopsis*. Queste colonne di cellule sono caratterizzate da una precisa e stretta adesione delle cellule adiacenti, andando così a formare delle sinapsi actiniche per il trasporto auxinico. Ovviamente le cellule vegetali dotate di pareti rigide [Bibl. 111], che garantiscono loro forme tubolari allungate, non necessitano di estendere protuberanze quali gli assoni allo scopo di trovare le cellule partner. Questo caratteristico modello di interazione tra cellule all'interno dei tessuti vegetali potrebbe rappresentare il motivo per il quale le piante non posseggono nessuna delle classiche proteine microtubolari associate (MAPs) caratteristiche dei neuroni [Bibl. 68, 57, 75]. Una ulteriore somiglianza con le sinapsi neuronali e immunologiche [Bibl. 40, 39, 28,45] consiste nel fatto che le sinapsi vegetali realizzano regolati cicli di esocitosi/endocitosi guidati dalla polimerizzazione dell'actina [Bibl. 47, 48, 49]. È importante notare che, le sinapsi vegetali, così come quelle neuronali e immunologiche, sono particolarmente ricche



di actina [Bibl. 5] e un citoscheletro intatto nel suo contenuto di actina è importante per il trasporto polare dell'auxina.

### **3. Gli apici radicali come centri di comando della pianta**

Come già ricordato, Charles Darwin fu il primo a proporre che un cervello vegetale diffuso fosse localizzato all'interno degli apici radicali in corrispondenza del *polo anteriore del corpo vegetale* [Bibl. 27]. I nostri risultati preliminari sono pienamente in accordo con questa, un tempo puramente speculativa, asserzione.

#### **3.1. Perché le radici?**

Intuitivamente esistono molte buone ragioni perché nel corso dell'evoluzione le piante abbiano sviluppato i loro tessuti simil-neurali negli apici radicali sepolti nella profondità della terra. Innanzi tutto il suolo rappresenta un ambiente più stabile in confronto a quello atmosferico sia in termini di temperatura che d'umidità; è protetto dalla predazione animale, dall'ozono atmosferico così come dalla radiazione UV solare. Inoltre, il polo corrispondente al fusto del corpo vegetale (la sua estremità posteriore) porta gli organi sessuali di riproduzione, mentre l'opposto polo radicale, l'estremità anteriore è coerentemente il luogo delle attività simil-neurali.

Al contrario degli apici vegetativi, i sistemi radicali hanno un comportamento territoriale [Bibl. 21] e riescono a discriminare tra il proprio apparato radicale e quello di piante adiacenti [Bibl. 50]. Inoltre spesso le radici instaurano simbiosi con batteri e funghi, quasi a dimostrazione della loro natura sociale. Gli apici radicali, per di più, sono estremamente complessi ed in grado di monitorare molti più parametri biotici ed abiotici degli stessi germogli vegetativi, come già Darwin aveva acutamente osservato già nel 1880 [27].

Gli apici radicali sono ricoperti da una cuffia radicale che protegge l'apice e possiede molte abilità sensoriali [Bibl. 9]. Essa è una struttura unica che non si riscontra nell'apice vegetativo e che protegge un'altra regione sensoriale tipica della radice, conosciuta come zona di transizione [Bibl. 5]. Le cellule della zona di transizione mostrano una singolare (cito)architettura, con i nuclei in posizione centrale, circondati da microtubuli perinucleari che si irradiano verso le zone cellulari periferiche. Noi supponiamo che questa configurazione sia perfettamente adeguata sia per la percezione che per la trasmissione di segnali da e verso i nuclei. In più, poiché le cellule della zona di transizione non sono coinvolte in attività quali divisione mitotica, e allungamento cellulare, esse sono libere di orientare tutte le loro risorse sull'acquisizione, l'elaborazione, e l'immagazzinamento di informazioni. A sostegno di ciò, c'è un forte assorbimento di ossigeno nella parte distale della zona di transizione, che coincide spazialmente con la zona di maggior assorbimento di auxinico [Bibl. 72].

La zona di transizione è ben nota per essere una zona cruciale dal punto di vista sensorio, ricevendo e rispondendo ad una vasta gamma di segnali esterni e di sollecitazioni della crescita [Bibl. 3]. Proprio come nei tessuti cerebrali animali, nella zona di transizione si rileva il più elevato consumo d'ossigeno. Inoltre, i flussi di ossigeno, potassio e calcio misurati in questa zona presentano definite oscillazioni ritmiche nell'assorbimento [Bibl. 89]. Tale comportamento in cellule radicali anatomicamente vicine riflette il modello sincrono ed oscillatorio dei neuroni anatomicamente raggruppati che governano la rete sensi-motoria nel cervello [Bibl. 41, 51]. Se alcune di queste proprietà fisiche oscillatorie fossero accoppiate al controllo della crescita cellulare, allora esse potrebbero essere correlate ai movimenti nutazionali delle radici. È importante notare che studi preliminari da noi condotti rivelano come le oscillazioni ritmiche dell'assorbimento di ossigeno nella zona di transizione di apici radicali di mais rispondono con estrema rapidità (entro pochi secondi) alla gravistimolazione (Fig. 11) [Bibl. 71, 73] così come alle ferite ed ad altri

stress applicati in modo selettivo agli apici vegetativi delle giovani piante di mais (S. MANCUSO et al., dati non pubblicati). Misure effettuate a livello di singole cellule radicali mostrano come un incremento dell'assorbimento d'ossigeno si verifichi quasi subito, con un tempo di induzione di 2-3 secondi, dopo l'arrivo di un potenziale d'azione prodotto dalla stimolazione locale dell'apice vegetativo. Questa situazione è quasi identica a quella registrata per i singoli neuroni nel cervello animale [Bibl. 101]. Comunque sia, quali processi cellulari regolino questa rapida trasmissione di segnali tra gli apici vegetativi (dei germogli) e quelli radicali, responsabile della risposta quasi immediata da parte delle cellule della zona di transizione degli apici radicali e se le piante posseggano tessuti nervosi deputati a ciò, sono domande cruciali ancora prive di risposta.

Ed infine, la zona di transizione è anche molto vicina ai punti di arrivo del floema, per cui le sue cellule sono ben rifornite di saccarosio [Bibl. 94] che permette loro di rifornire processi metabolici ad alto dispendio di ATP, come l'attività delle pompe ioniche, il riciclaggio di vescicole, e il continuo riarrangiamento del citoscheletro.

A sostegno di una attività simil-neurale delle cellule della zona di transizione, esistono, inoltre, numerose evidenze legate alla sensibilità che questa zona della radice dimostra nei confronti dell'alluminio, il quale è, un noto e potente neurotossico, che colpisce preferenzialmente le cellule neurali [Bibl. 90].

Gli effetti iniziali della tossicità dell'alluminio sulle piante si manifestano con l'inibizione dell'allungamento delle radici; un effetto molto rapido che si manifesta entro pochi minuti dall'applicazione. Eccetto negli apici radicali, non si riscontrano forti effetti di tossicità in altri organi della pianta. La ragione per la quale l'alluminio colpisce soltanto gli apici, non è ancora conosciuta. Peraltro anche all'interno dell'apice radicale, le diverse zone anatomiche mostrano diversi gradi di sensibilità con la parte distale della zona di transizione (DTZ) che rappresenta la porzione più sensibile di tutta la pianta [Bibl. 91].

Così, un potente neurotossico agisce preferenzialmente nella pianta sulle cellule della zona di transizione dell'apice radicale, ed è curioso notare come sia ormai accertato che la sensibilità all'alluminio delle cellule della DTZ sia conseguenza di un'alterazione nei recettori del glutammato [Bibl. 92], uno fra i più importanti neurotrasmettitori animali (vedi paragrafo successivo sui neurotrasmettitori vegetali).

#### **4. Neurotrasmettitori e molecole neuroattive**

Gli impulsi nervosi che passano attraverso le sinapsi sono trasmessi attraverso il rilascio di composti chimici chiamati neurotrasmettitori. Appena un impulso nervoso (un potenziale d'azione) raggiunge la fine della terminazione presinaptica, le molecole del neurotrasmettitore sono rilasciate nella doccia sinaptica (vedi Fig. 8). I neurotrasmettitori sono responsabili della trasmissione nervosa tramite interazione con degli specifici recettori. Per essere definiti tali i neurotrasmettitori devono rispondere a determinati requisiti:

1. Biosintesi: esistenza nel neurone degli enzimi che portano alla sintesi del neurotrasmettitore, dei cofattori e dei prodotti intermedi della catena sintetica
2. Accumulo: esistenza dei meccanismi che determinano il deposito del neurotrasmettitore
3. Liberazione: rilascio del neurotrasmettitore dai siti di accumulo del neurone negli spazi extracellulari a seguito di stimolazione presinaptica
4. Interazione con recettori specifici: L'applicazione del neurotrasmettitore a livello postsinaptico deve provocare sulla membrana effetti simili a quelli della stimolazione presinaptica del neurone.
5. Meccanismo di interruzione dell'azione: blocco degli effetti del neurotrasmettitore, a seguito di demolizione enzimatica e/o di riassorbimento del neurone.



Se le cellule vegetali sono interconnesse mediante contatti sinaptici specializzati nel trasferimento di segnali elettrici, allora necessitano anche di appropriati neurotrasmettitori. Sorprendentemente le piante possiedono numerosi neurotrasmettitori [Bibl. 87] il cui ruolo nella comunicazione intercellulare delle piante rimane in gran parte da esplorare. Nonostante ciò, grazie alle ricerche degli ultimi anni si sta iniziando a delineare un quadro in cui i neurotrasmettitori vegetali sembrano giocare un ruolo di primo piano nella catena segnalatoria.

#### **4.1. Neurotrasmettitori nelle piante**

I neurotrasmettitori sono un gruppo di composti chimici che variano dalle semplici ammine come la dopamina, agli amminoacidi come il GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico) o la glicina (Fig. 12). Le piante possiedono un elevato numero di neurotrasmettitori in comune con gli animali quali: l'acetilcolina, la serotonina, la melatonina, le sinaptogamine, l'ATP, l'acido glutammico, il GABA, la glicina, il monossido d'azoto (NO) ecc., mentre per alcuni composti, primo fra tutti l'auxina, sembra emergere per le piante un ruolo di neurotrasmettitore vegetale specifico.

##### **4.1.1. Acetilcolina**

L'acetilcolina è una semplice molecola sintetizzata a partire dalla colina e dall'acetil coenzima A grazie all'azione della colina acetiltransferasi. I neuroni che sintetizzano l'acetilcolina sono chiamati neuroni colinergici. Allorchè un potenziale d'azione raggiunge un neurone presinaptico, un canale calcio voltaggio-dipendente si apre ed l'influsso di  $Ca^{2+}$  stimola la esocitosi di vescicole presinaptiche contenenti l'acetilcolina, che sono rilasciate nella doccia sinaptica. Una volta rilasciata, l'acetilcolina deve essere rapidamente rimossa attraverso l'enzima acetilcolinesterasi. Due principali classi di recettori dell'acetilcolina sono stati identificati. Sulla base della loro risposta agli alcaloidi muscarina e nicotina essi vengono indicati come recettori muscarinici (recettori m) e recettori nicotinici (recettori n). Entrambi i recettori sono abbondanti nel cervello umano. Nelle piante la presenza di acetilcolina e degli enzimi acetilcolina-transferasi, acetilcolina-esterasi è nota ormai da anni [Bibl. 102, 52]. In più, è ormai accerato che la presenza di questo neurotrasmettitore sia particolarmente alta negli apici radicali, rispetto ad altre porzioni della pianta.

Vaga è, finora, la conoscenza dell'attività dell'acetilcolina nelle piante, sebbene sempre più evidenze si stiano accumulando per una importante funzione dell'acetilcolina nella trasmissione dei segnali dalla radice alla chioma delle piante e nella funzionalità stomatica. È stato, infatti, dimostrato che in piante senza radici, è possibile ripristinare una normale funzionalità degli stomi, somministrando acetilcolina. Inoltre, la produzione di acetilcolina nelle radici è intimamente correlata con l'apertura degli stomi [Bibl. 112, 69, 109]. Recentemente, entrambi i recettori di tipo m ed n, sono stati localizzati sia nella radice, che nella zona periferica delle cellule di guardia. L'applicazione di agonisti die due recettori ha aumentato l'attività dell'acetilcolina sugli stomi, mentre degli antagonisti l'hanno inibita (Lou Cheng-Hou, comunicazione personale).

##### **4.1.2. Acido glutammico**

Il glutammato è il più comune neurotrasmettitore presente nel cervello. Ha sempre funzione eccitatoria, grazie ai recettori ionotropici glutammato (iGLur) che aumentano il flusso cationico a livello delle giunzioni sinaptiche con l'apertura di canali ionici non-selettivi che funzionano prevalentemente attraverso l'influsso di  $Ca^{2+}$  e  $Na^{+}$ . Si ipotizza che l'acido glutammico sia coinvolto nel cervello in funzioni cognitive quali l'apprendimento e la memoria, benché in quantità eccessive possa causare danni neuronali tipici di sclerosi progressive e del morbo di Alzheimer.

Esistono in *Arabidopsis* venti membri della famiglia dei cosiddetti *Arabidopsis glutamate-*

*like receptors* (AtGLR) i quali sono stati chiamati in questa maniera a causa della loro significativa similarità con gli iGLur animali [Bibl. 67]. Nonostante il fatto che studi recenti abbiano suggerito un ruolo per questi recettori glutammato in vari aspetti della fotomorfogenesi, calcio omeostasi e tossicità da alluminio, la loro funzione fisiologica nelle piante rimane elusiva. Recentemente, il recettore AtGLR3.4 che è espresso in *Arabidopsis* nelle radici, nei fasci vascolari e nelle cellule del mesofillo e di guardia, si è dimostrato fondamentale nella rapida trasmissione di segnali basata sul  $Ca^{2+}$  in seguito a stress ambientali [Bibl. Becker 77].

#### 4.1.3. GABA

Diversi amminoacidi hanno una precisa azione eccitatoria o inibitoria sul sistema nervoso. L'acido  $\gamma$ -amminobutirrico è un ben noto inibitore della trasmissione presinaptica. La produzione di GABA avviene attraverso la decarbossilazione del glutammato, grazie ad una reazione catalizzata dall'enzima glutammato-carbossilasi. Esistono 2 tipi di recettori per il GABA entrambi con effetti inibitori: il GABA A, attivo a livello post-sinaptico, che determina ingresso del cloro all'interno della cellula iperpolarizzandola, ed il GABA B attivo pre- e post-sinapticamente tramite chiusura dei canali del calcio nella terminazione pre-sinaptica (diminuzione della liberazione del neurotrasmettitore a livello pre-sinaptico) e tramite apertura del canale del cloro annesso al recettore (come il GABA A).

Il GABA è un messaggero ubiquitario e l'attivazione o l'antagonismo a livello dei suoi recettori è il meccanismo d'azione di un gran numero di sedativi, miorilassanti, ipnotici, antiepilettici etc.

Nelle piante il GABA è stato dimostrato aumentare rapidamente dopo esposizione ad un numero elevato di stimoli ambientali quali ipossia, basse temperature o ferite [Bibl., 62]. Recentemente, inoltre, è stata dimostrata un'importante funzione del GABA nella crescita e guida del tubetto pollinico [Bibl. 78]. Benché il ruolo del GABA come molecola segnalatrice, sembri ormai piuttosto evidente [Bibl. 17], pochissimo è, ancora, conosciuto sul ruolo fisiologico del GABA nelle piante o di come l'alterazione del rapporto glutammato/GABA alteri la loro crescita e sviluppo.

#### 4.1.4. ATP

Concentrazioni molto basse di purine extracellulari (ATP, ADP e AMP) funzionano anche come neurotrasmettitori nelle cellule animali [Bibl. 61]. Sulla superficie delle cellule esse interagiscono con recettori specifici (purinorecettori) i quali formano canali transmembrana catione-selettivi (recettori P2X) o attivano delle proteine G (recettori P2Y). È stato dimostrato che basse concentrazioni di ATP extracellulare (eATP), possono alterare la distribuzione dell'auxina, l'espressione genica e la risposta gravitropica in radici di *Arabidopsis* [Bibl. 97]. Poiché questi effetti non solo legati alla fosforilazione è stato ipotizzato un possibile ruolo come neurotrasmettitore anche nelle piante. Concentrazioni di eATP di 300 nM inducono un'aumento transiente della concentrazione di  $Ca^{2+}$  citoplasmatico; lo stesso transiente di calcio è inibito utilizzando classici bloccanti dei purinocettori [Bibl. 58, 31]. Infine, recentemente, è stato provato che ATP, ADP ed una forma non idrolizzabile di ATP (meATP) inducono in cellule radicali un transiente influsso di  $Ca^{2+}$  ed un efflusso di  $K^+$  che assomiglia molto da vicino al meccanismo di funzionamento dei purinorecettori ionotropici negli animali [Bibl. 32]

#### 4.2. L'auxina, un neurotrasmettitore vegetale

Oltre ai neurotrasmettitori classici, nelle cellule vegetali è presente l'ormone vegetale auxina, che ad essi assomiglia sotto molti aspetti [Bibl. 7] (BALUŠKA et al., 2003a). Ad esempio l'auxina extracellulare è responsabile di una vasta gamma di risposte elettriche nelle piante [Bibl. 22, 11, 107, 81, 114]. Oltre a ciò l'auxina modula l'attività di diversi

canali ionici [Bibl. 114, 100, 12] essenziali per la propagazione dei segnali elettrici e nella conservazione delle altre proprietà della membrana plasmatica [Bibl. 113]. Numerosi esempi confermano la bontà del modello simil-neurotrasmettitore per l'auxina ed il suo sistema di trasporto [Bibl. 7, 10]. Così l'auxina oltre alle sue proprietà di simil-ormone e simil-morfogene [Bibl. 59, 44], esibisce anche un comportamento da simil-neurotrasmettitore con comportamenti del tutto simili a quelli del neurotrasmettitore glutammato nelle sinapsi neuronali.

Un importante elemento a sostegno del fatto che l'auxina si comporta come un neurotrasmettitore deriva dagli studi sperimentali sul trasporto polare nel cambio [Bibl. 110]. Questi autori hanno mostrato come l'applicazione esterna dell'auxina sulle parti apicali dei segmenti del cambio induca un efflusso "ad onda" (ondulatorio) di auxina dalla parte basale di questi segmenti. Stranamente la velocità di propagazione di questo segnale indotto dall'auxina è molte più veloce dello stesso trasporto di auxina e può essere propagato anche contro la direzione principale del trasporto polare dell'auxina. L'importanza vitale dell'auxina per l'esistenza stessa delle piante, correlata alla sua natura simil-neurale oltre alle sue proprietà di ormone e morfogene è evidenziata anche dai dati che rivelano la natura molto antica di questa, piccola ma estremamente potente, molecola di segnalazione. Particolarmente interessante è la similarità fra la struttura dell'IAA e alcuni importanti neurotrasmettitori animali come la serotonina o la melatonina con cui l'acido indolacetico condivide gran parte del ciclo biosintetico.

Recentemente la messa a punto di un nuovo microelettrodo sensibile nei confronti dell'IAA ha permesso di costruire delle mappe "topografiche" dei flussi di IAA nell'apice radicale [Bibl. 72]. La zona di transizione della radice che, sembra svolgere le principali funzioni simil-neurali nella pianta (vedi paragrafo 3.1), è apparsa anche come la regione più interessata dai flussi auxinici con influssi di IAA fino a 7-8 volte superiori rispetto alle regioni limitrofe.

## **5. La memoria**

Dal momento che le piante sono in grado di rispondere a stimoli esterni, in alcuni casi aumentando l'efficienza della loro risposta in seguito a ripetute esposizioni, ne consegue la necessità che le piante siano in grado di archiviare delle informazioni e di richiamarle quando se ne presenti l'occasione, anche a distanza di tempo. La questione apparentemente paradossale dell'esistenza di attività mnemoniche nella pianta, ha interessato, in realtà, un discreto numero di ricercatori negli ultimi trent'anni, grazie soprattutto all'interesse suscitato alla fine degli anni '70 dai numerosi studi effettuati sulle abilità mnemoniche di insetti e di altri animali inferiori [Bibl. 83, 37, 38, 76]. La capacità degli insetti nell'imparare è stata studiata particolarmente da vicino nelle api, considerate sistemi modello per la comprensione della memoria negli insetti. Le api possiedono dei sofisticati meccanismi di apprendimento che gli permettono di ricordare una fonte di cibo e di comunicare la localizzazione al resto dello sciame. Studi sulla *Drosophila*, hanno, inoltre, fornito numerose conoscenze a proposito dei geni coinvolti nel processo mnemonico tanto che è stato possibile creare dei mutanti nei fenomeni di memorizzazione.

### **5.2. Il concetto di memoria**

Il concetto di memoria umana è un concetto familiare a tutti noi e facilmente estendibile alle capacità degli animali superiori. Negli anni '70, a seguito degli studi citati nel precedente paragrafo, anche gli animali inferiori entrarono a far parte della grande famiglia degli organismi dotati di memoria. Il tipo di risposta scelto per determinare le abilità mnemoniche di questi animali era sempre strettamente legato alla capacità di apprendimento ed al possesso di cellule nervose specializzate. In quest'accezione, il concetto di memoria non sarebbe applicabile alle piante, che, ovviamente, non sono dotate

di cellule nervose. Tuttavia, la memoria può anche essere definita come “l’abilità di immagazzinare informazioni riguardanti eventi passati e richiamarle dopo un periodo di tempo” [Bibl. 1]. In questo senso il concetto di memoria diventa applicabile sia ad esseri viventi come le piante, sia ad oggetti come, per esempio, un computer. In questi altri casi si rende necessario ricorrere a test diversi specifici per rendere evidenti dei processi di memorizzazione [Bibl. 98].

### **5.3. La memoria nelle piante**

Numerosi esempi di immagazzinamento (memorizzazione) di segnali ambientali, sono stati esplicitamente od implicitamente provati in piante e microrganismi, in alcuni casi anche a livello molecolare.

Le piante nel loro ambiente naturale sono soggette ad una enorme varietà di stimoli boricci ad abiotici, ai quali rispondono quasi sempre modificando il loro tasso di crescita o il loro sviluppo vegetativo. Uno dei più comuni esempi di memoria nelle piante è legata al fenomeno della vernalizzazione, e cioè il fenomeno per cui numerose piante sono in grado di fiorire in primavera, soltanto se hanno passato un periodo di freddo durante l’inverno. È questo un importante meccanismo evolutivo molto importante, che previene la fioritura precoce delle piante, e del quale soltanto recentemente si stanno identificando le basi genetiche [Bibl. 74].

La quasi totalità degli studi realizzati sulla catena di traduzione degli stimoli, assume che una volta recepito lo stimolo iniziale, la catena di segnalazione sia praticamente ininterrotta fino all’effetto finale sullo sviluppo della pianta. Tuttavia, le piante sono soggette ad una moltitudine di stimoli contemporanei, e non ad uno stimolo per volta. Poiché questi stimoli, inoltre, avvengono in tempi diversi, una risposta integrata della pianta richiederebbe, di 1) discriminare, 2) memorizzare, 3) richiamare e 4) processare i segnali indotti dai differenti stimoli. Esempi esaurientemente descritti di registrazione di stimoli dannosi e non, riportano periodi di memorizzazione da 2 giorni a 2 mesi nel caso dell’inibizione della crescita dell’ipocotile in semenzali di *Bidens pilosa* [Bibl. 34, 35]. Altri esempi di memorizzazione riguardano l’inibizione della crescita dell’ipocotile [Bibl. 34], la crescita delle gemme cotiledonari [Bibl. 35], la germinazione dei semi [Bibl. 23], la risposta a fluttuazioni nella concentrazione di fosforo in cianobatteri [Bibl. 108, 43, 82], la risposta a shock osmotici [Bibl. 96], i segnali calcio indotti da siccità [Bibl. 64], e numerosi altri [Bibl. 99].

Per indurre un cambiamento di crescita, le piante spesso richiedono due stimoli complementari. Così, fornendo alla pianta un solo segnale senza l’altro, è possibile determinare la durata del tempo in cui la memoria di questo segnale è conservata [Bibl. 34, 35, 105, 106]. Questo sistema è stato, ad esempio, utilizzato nello studio dei fenomeni di avvolgimento dei viticci. Questi per iniziare il movimento hanno necessità di uno stimolo meccanico e di luce blu. Separando l’applicazione dei due stimoli nel tempo è possibile determinare la durata della memoria. Nel caso dei viticci, lo stimolo meccanico è ricordato per diverse ore [Bibl. 104]. La durata della memoria nelle piante può andare dai pochi secondi ai mesi e dipende dal segnale e dalla risposta esaminata.

## **6. Conclusioni**

L’esplorazione e lo studio dell’affascinante complessità della vita vegetale sollevano sempre nell’osservatore attento questioni urgenti. In particolare: se le piante sono “senza cervello”, dove e come le piante immagazzinano ed elaborano le informazioni che ottengono circa gli ambienti abiotici e biotici che le circondano e come esse utilizzano queste informazioni per ottimizzare il loro comportamento futuro? Ed ancora, se con intelligenza si intende la facoltà che “permette l’acquisizione di capacità, l’adattamento e la risposta agli

stimoli esterni e la comunicazione con i propri simili” o “l’abilità a interagire con situazioni nuove” [Bibl. 1], allora perché le piante non possono definirsi intelligenti?

La nostra mancanza di conoscenza non dovrebbe giustificare la comune nozione che le piante non possiedono queste abilità, quando la complessità e razionalità del loro comportamento suggerirebbero perfettamente il contrario. Ritengo che dovremmo essere più sensibili ed incominciare una seria indagine su questi argomenti utilizzando menti educate al metodo scientifico, ma non spaventate dall’apparente eccentricità del problema. In fine, sarà un caso che la parola *νευρον* si riferisca a fibre vegetali? Questa felice coincidenza rende la dizione di *neurobiologia vegetale* pienamente giustificata!

Infine, la neurobiologia vegetale inizia il suo cammino come una scienza coerente. Per la prima volta, un ramo della biologia vegetale abbraccia lo studio della pianta dal comportamento molecolare allo sviluppo di comunità ecologiche. Ciò è stato peraltro reso possibile grazie al contributo generoso dell’Ente Cassa di Risparmio di Firenze che ha patrocinato il primo simposio di Neurobiologia Vegetale tenutosi a Firenze nel mese di maggio 2005 (<http://izmb.de/volkmann/plantneuro.php>). Il secondo simposio si terrà a Pechino, nel maggio 2006. Oltre agli organizzatori locali, questo simposio sarà coorganizzato dalla società di neurobiologia vegetale (<http://www.plantneurobiology.org/>). Infine, una nuova rivista *Plant Signaling and Behavior* è stata fondata in collaborazione con l’editore Landes Bioscience (<http://www.landesbioscience.com/journals/psb/>) e sarà focalizzata sui diversi modi con cui le piante comunicano e sui vari aspetti neurali della vita della pianta .

## 6. Bibliografia

- [1] Agnes, M.E., *Webster's NewWorld Compact Desk Dictionary and Style Guide*. New York : Hungry Minds, 2002.
- [2] Arimura G-I., Kost C., Boland W., *Carnivorous plants: phylogeny and structural evolution*. *Science*, 257: 1491-1495, 2005.
- [3] Baluška F., Barlow P.W., Kubica Š., *Importance of the post-mitotic 'isodiametric' growth (PIG) region for growth and development of roots*. *Plant and Soil*, 167: 31-42. 1994.
- [4] Baluška F., Barlow P.W., Volkmann D., *Actin and myosin VIII in developing root cells*. In: *Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions*, Staiger CJ, Baluška F, Volkmann D, Barlow PW (eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 457-476, 2000.
- [5] Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., Barlow P.W., *Root apices as plant command centres: the unique 'brain-like' status of the root apex transition zone*. *Biologia*, 59: 7-19, 2004.
- [6] Baluška F., Mancuso S., Volkmann D., *Plant communications. Neural aspects of plant life*. Berlino, Springer, 2005.
- [7] Baluška F., Šamaj J., Menzel D., *Polar transport of auxin: carrier-mediated flux across the plasma membrane or neurotransmitter-like secretion?* *Trends Cell Biol.*, 13: 282-285, 2003.
- [8] Baluška F., Volkmann D., Menzel D., *Plant synapses: actin-based adhesion domains for cell-to-cell communication*. *Trends Plant Sci* 10:106-111, 2005.
- [9] Barlow P.W., *The root cap: cell dynamics, cell differentiation and cap function*. *J Plant Growth Regul*, 21: 261-286, 2003.
- [10] Barlow P.W., Volkmann D., Baluška F., *Polarity in roots: tubulin-based cell bodies and actin-based plant synapses direct polar auxin transport and polarised development*. In: Lindsey K (ed), *Polarity in Plants*, Blackwell, Oxford, UK, 2004.



- [11] Bates G.W., Goldsmith M.H.M., *Rapid response of the plasma membrane potential in oat coleoptiles to auxin and other weak acids*. *Planta*, 159: 231-237, 1983.
- [12] Becker D., Hedrich R., *Channelling auxin action: modulation of ion transport by indole-3-acetic acid*. *Plant Molec. Biol.*, 49: 349-356, 2002.
- [13] Bose J.C., *Physiological and anatomical investigations on Mimosa pudica*. *Proc. Royal Soc Ser. B*, 98: 280-299, 1925.
- [14] Bose J.C., *Plant response as a means of physiological investigation*. Longman, Green & Co, London, New York, 1907.
- [15] Bose J.C., *Researches on the irritability of plants*. Longman, Green & Co, London, 1913.
- [16] Bose J.C., *The nervous mechanism of plants*. Longman, Green & Co, London, New York, 1926.
- [17] Bouché N., Fait A., Bouchez D., Moller S.G., Fromm H., *Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the  $\gamma$ -aminobutyrate shunt is required to restrict level of reactive oxygen intermediate in plants*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 6843-6848, 2003.
- [18] Brouat C., Garcia N., Andarry C., McKey D., *Plant lock and ant key: pairwise coevolution of an exclusion filter in an ant-plant mutualism*. *Proc R Soc Lond B*, 268:2131-2141, 2001.
- [19] Burdon-Sanderson J., *Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of Dionea muscipula in the excited and unexcited states*. *Proceedings of the Royal Society London*, 21: 491-496, 1873.
- [20] Burdon-Sanderson J., *On the relation of motion in animals and plants to the electrical phenomena which are associated with it*. *Proceedings of the Royal Society London*, 65: 37-64, 1899.
- [21] Callaway R.M., *The detection of neighbors by plants*. *Trends Ecol Evol* 17: 104-105, 2002.
- [22] Cleland R.E., Prins H.B.A., Harper J.R., Higinbotham N., *Rapid hormone-induced hyperpolarization of the oat coleoptile transmembrane potential*. *Plant Physiology*, 59: 395-397, 1977.
- [23] Corbineau F., *Le contrôle de la germination des semences par l'environnement gazeux*. *La Vie des Sciences* 12: 223-237, 1995.
- [24] Cozzolino S., Widmer A., *Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?* *Trends Ecol Evol*, In stampa.
- [25] Darwin C., *Autobiography*. In G de Beer ed., *Charles Darwin autobiography*. Oxford University Press, Oxford, 1876/1983.
- [26] Darwin C., *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects*. Murray, London, 1862.
- [27] Darwin C., *The power of movements in plants*. John Murray, London, 1880.
- [28] Das V., Nal B., Roumier A., Meas-Yedid V., Zimmer C., Olivo-Marin J-C., Roux P., Dautry-Varsat A., Alcover A., *Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation*. *Immunol. Rev.* 189: 123-135, 2002.
- [29] Davies E., *New functions for electrical signals in plants*. *New physiologist*, 161: 607-610, 2004
- [30] Dejean A., Solano P.J., Ayroles J., Corbara B., Orivel J., *Arboreal ants build traps to capture prey*. *Nature* 434:973, 2005.
- [31] Demidchik V., Nichols C., Oliynyk M., Dark A., Glover B.J., Davies J.M., *Is ATP a signaling agent in plants?* *Plant Physiology*, 133: 456-461, 2003.

- [32] Demidchik V., Shabala S., Nichols C., Dark A., Davies J.M., *Is ATP a signalling agent in plants*. Atti del First Symposium on Plant neurobiology, Firenze, 2005.
- [33] Desbiez M.O., Gaspar T., Crouzillat D., Frachisse J.M., Thellier M., *Effect of cotyledonary prickings on growth, ethylene metabolism and peroxidase activity in Bidens pilosa*. Plant Physiology and Biochemistry, 25: 137-143, 1987.
- [34] Desbiez M.O., Kergosien Y., Champagnat P., Thellier M., *Memorization and delayed expression of regulatory messages in plants*. Planta, 160: 392-399, 1984.
- [35] Desbiez M.O., Tort M., Thellier M. *Control of a symmetry-breaking process in the course of the morphogenesis of plantlets of Bidens pilosa L*. Planta, 184: 397-402, 1991.
- [36] Du Bois-Reymond E., *Untersuchungen über thierische Elektrizität*. Reimer, Berlino, 1848
- [37] Dudaï Y., *L'intelligence de la mouche*. La Recherche, 118: 58-71, 1981.
- [38] Dudaï Y., *Properties of learning and memory in Drosophila melanogaster*, J Comp Physiol, 114: 69-89, 1977.
- [39] Dustin M.L., Colman D.R., *Neural and immunological synaptic relations*. Science, 298: 785-789, 2002.
- [40] Dustin M.L., Cooper J.A., *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*. Nat. Immunol., 1: 23-29, 2000.
- [41] Engel A.K., Fries P., Singer W., *Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing*. Nat. Rev. Neurosci., 2: 704-716, 2001.
- [42] Fabre J.H., *La plante*. Paris, 1874
- [43] Falkner R., Falkner G., *Distinct adaptivity of the phosphate uptake system of the cyanobacterium Anabaena variabilis reflects information processing about preceding phosphate supply*. J. Trace Microprobe Techn., 21: 363-375, 2003.
- [44] Friml J., *Auxin transport – shaping the plant*. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 7-12, 2003.
- [45] Fuller C.L., Braciale V.L., Samelson L.E., *All roads lead to actin: the intimate relationship between TCR signaling and the cytoskeleton*. Immunol. Rev., 191: 220-236, 2003.
- [46] Galvani L., *De viribus electricitatis in motu muusculari*. Commentarius Bon. Sci. Art. Inst. Acad. Comm. 7: 363-418, 1791.
- [47] Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A., Jürgens G., *The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth*. Cell 112: 219-230, 2003.
- [48] Geldner N., Friml J., Stierhof Y.D., Jürgens G., Palme K., *Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking*. Nature, 413: 425-428, 2001.
- [49] Grebe M., Xu J., Möbius W., Ueda T., Nakano A., Geuze H.J., Rook M.B., Scheres B., *Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes*. Curr. Biol. 13: 1378-1387, 2003.
- [50] Gruntman M., Novoplansky A., *Physiologically mediated self/non-self discrimination in roots*. Proc Natl Acad Sci USA 101: 3863-3867, 2004.
- [51] Harris K.D., Csicsvari J., Hirase H., Dragoi G., Buszáki G., *Organization of cell assemblies in the hippocampus*. Nature 424: 552-556, 2003.
- [52] Hartmann E., Gupta R., *Acetylcholine as a Signaling System in Plants*. In Second Messengers in Plant Growth and Development, Boss, W. E. and Morre, J. D., eds., Liss AR, New York, 257-287, 1989.

- [53] Heil M., Rattke J., Boland W., *Postsecretory hydrolysis of nectar sucrose and specialization in ant/plant mutualism*. Science, 308: 560-563, 2005.
- [54] Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B., *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo*. Journal of Physiology (Lond.), 116: 424-448, 1952.
- [55] Hooke R. *Micrographia*. Martin and Allestry. Londra, 1665.
- [56] Huppa J.B., Gleimer M., Sumen C., Davis M.M., *Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full receptor activation*. Nat. Immunol., 4: 749-755, 2003.
- [57] Hussey P.J., Hawkins T.J., Igarashi H., Kaloriti D., Smertenko A., *The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the Xenopus MAP215-like protein, MOR1*. Plant Molec. Biol. 50: 915-924, 2002.
- [58] Jeter C.R., Tang W., Henaff E., Butterfield T., Roux S.J., *Evidence of a Novel Cell Signaling Role for Extracellular Adenosine Triphosphates and Diphosphates in Arabidopsis*. The Plant Cell 16: 2652-2664, 2004.
- [59] Jones A.M., *Auxin transport: down and out and up again*. Science, 282: 2201-2202, 1998.
- [60] Kessler A., Baldwin I.T., *Defensive function of herbivory-induced plant volatile emissions in nature*. Science, 291: 2141-2144, 2001.
- [61] Khakh B.S., *Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses*. Nature Reviews Neuroscience 2: 165-174, 2001.
- [62] Kinnersley A.M., Turano F.J., *Aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress*. Crit Rev Plant Sci, 19: 479-509, 2000.
- [63] Kite G.C., Hettterscheid W.L.A., Lewis M.J., Boyce P.C., Ollerton J., Cocklin E., Simmonds M.S.J., *Inflorescence odours and pollinators of Arum and Amorphophallus (Araceae)*. In: SJ Owens and PJ Rudall (eds) Reproductive biology. pp 295-315. Royal Botanic Gardens, Kew, 1998.
- [64] Knight H., Brandt S., Knight M.R., *A history of stress alters drought calcium signaling pathways in Arabidopsis*. Plant Journal, 16: 681-687, 1998.
- [65] Kratzenstein C., *Trattato dell'utilità dell'elettricità nella scienza medica*. San Pietroburgo, 1745.
- [66] Kunkel K.A.J., *Über elektromotorische Wirkungen an unverletzten lebenden Pflanzenteilen*. Arbeiten Botan Institut Würzburg 2:1-17, 1878.
- [67] Lam H.M., Chiu J., Hsieh M.H., Meisel L., Oliveira I.C., Shin M., Corazzi G., *Glutamate-receptors in plants*. Nature, 396: 125-126, 1998.
- [68] Lloyd C.W., Hussey P.J., *Microtubule-associated proteins in plants – why we need a MAP*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 40-47, 2001.
- [69] Madahavan S., Sarath G., Lee B.H., Pegden R.S., *Guard Cell Protoplast Contain Acetylcholinesterase Activity*. Plant Science, 109: 119-127, 1995.
- [70] Malpighi M., *Anatomes plantarum idea*. Londra, 1671
- [71] Mancuso S., Marras A.M., *Theory and practice of self-referencing microsensors in root physiology*. In “Plant Electrophysiology – Theory and methods” Ed. Alexander Volkov. Springer. 2005
- [72] Mancuso S., Marras A.M., Volker M., Baluška F., *Non-invasive and continuous recordings of auxin fluxes in intact root apex with a carbon-nanotube-modified and self-referencing microelectrode*. Anal Biochem 341: 344-351, 2005.
- [73] Mancuso S., Mugnai S., Azzarello E., Schick A., Baluska F., Volkmann D., *Gravity-regulated oxygen uptake in root apices*. International Botanical Congress, Vienna, July 13 to July 20, 2005
- [74] Marx J., *Remembrance of winter past*. Science, 303: 1607, 2004

- [75] Meagher R.B., Fechheimer M., *The Arabidopsis cytoskeletal genome*. In *The Arabidopsis Book*, Meyerowitz, E. M. & Somerville, C. R. (eds.), American Society of Plant Biologists (<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>), 2003.
- [76] Menne D., Spatz H.C., *Colour vision in Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol* 114: 301-312, 1977.
- [77] Meyerhoff O., Müller K., Rob M. Roelfsema G., Latz A., Lacombe B., Hedrich R., Dietrich P., Becker D., *Keeping in touch with plant glutamate receptors*. *Atti del First Symposium on Plant neurobiology*, Firenze, 2005.
- [78] Palanivelu R., Brass L., Edlund A.F., Preuss D., *Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels*. *Cell*, 114: 47-59, 2003.
- [79] Paré P.W., Tumlinson J.H., *Plant volatiles as a defense against insect herbivores*. *Plant Physiology*, 121: 325-331, 1999.
- [80] Piccolino M., *Animal electricity and the birth of electrophysiology: the legacy of Luigi Galvani*. *Brain Research Bulletin*, 46: 381-407, 1998.
- [81] Pickard B.G., *Voltage transients elicited by sudden step-up of auxin*. *Plant Cell Environm.* 7: 171-178, 1984.
- [82] Plaetzer K., Thomas S.R., Falkner R., Falkner G., *The microbial experience of environmental phosphate fluctuations. An essay on the possibility of putting intentions into cell biochemistry*. *J Theor Biol (in stampa)*, 2005
- [83] Quinn W.G., Harris W.A., Benzer S., *Conditioned behaviour in Drosophila melanogaster*. *Proc Nat Acad Sci USA*, 71: 708-712, 1974.
- [84] Rasmann S., Kollner T.G., Degenhardt J., Hiltpold I., Toepfer S., Kuhlmann U., Gershenzon J., Turlings T.C., *Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots*. *Nature*, 434: 732-737, 2005.
- [85] Reddy G.V.P., Guerrero A., *Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals*. *Trends Plant Sci*, 9: 253-261, 2004.
- [86] Ricca U., *Soluzione d'un problema di fisiologia. La propagazione di stimolo nella "Mimosa"*. *Giornale Botanico Italiano* 23, 51-170, 1916.
- [87] Roshchina V.V., *Neurotransmitters in Plant Life*. Einfield, New Hampshire, New Delhi: Science Publishers and Oxford Publishing, 2001.
- [88] Schultz J.C., Appel H.M., Raina R., *Receptor-like kinases: how plants sense their environment and can tell us what they see*. *Proceedings of the First Symposium on Plant Neurobiology*, Firenze, 2005.
- [89] Shabala S., Shabala L., Gradmann D., Chen Z., Newman I, Mancuso S., *Oscillations in plant membrane-transport activity: model predictions, experimental validation, and physiological implications*. *Journal of Experimental Botany*. In stampa
- [90] Singer S.M., Chambers C.B., Newfry G.A., Norlund M.A., Muma N.A., *Tau in aluminum-induced neurofibrillary tangles*. *Neurotoxicology*, 18: 63-76, 1997.
- [91] Sivaguru M., Baluška F., Volkman D., Felle H.H., Horst W.J., *Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone*. *Plant Physiology* 119: 1073-1082, 1999.
- [92] Sivaguru M., Pike S., Gassmann W., Baskin T.I., *Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: Evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor*. *Plant Cell Physiology* 44: 667-675, 2003.
- [93] Solano P-J., Belin-Depoux M., Dejean A., *Formation and structure of food bodies in Cordia nodosa (Boraginaceae)*. *C R Biol*, 328:642-647, 2005.
- [94] Stadler R., Wright K.M., Lauterbach C., Amon G., Gahrtz M., Feuerstein A., Oparka K.J., Sauer N., *Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells*

- reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in root.* Plant J 41: 319-331, 2005.
- [95] Takabayashi J., Dicke M., *Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants.* Trends Plant Sci, 1:109-113, 1996.
- [96] Takahashi K., Isobe M., Knight M.R., Trewavas A.J., Muto S., *Hypoosmotic shock induces increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> in tobacco suspension-culture cells.* Plant Physiology, 113: 587-594, 1997.
- [97] Tang W.Q. Brad S.R., Sun Y., Muday G.K., Roux S.J., *Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport.* Plant Physiology 131: 147–154, 2003.
- [98] Thellier M., Desbiez M.O., Champagnat P., Kergosien Y., *Do memory processes also occur in plants?* Physiologia Plantarum 56: 281-284, 1982.
- [99] Thellier M., Verdus M-C., Ripoli C., *Memory effects in the response of plants to environmental signals.* Atti del First Symposium on Plant neurobiology, Firenze, 2005.
- [100] Thomine S., Lelievre F., Boufflet M., Guern J., Barbier-Brygoo H. *Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown Arabidopsis hypocotyls.* Plant Physiology, 115: 533-542, 1997.
- [101] Thompson J.K., Peterson M.R., Freeman R.D., *Single-neuron activity and tissue oxygenation in the cerebral cortex.* Science, 299: 1070-1072, 2003.
- [102] Tretyn A., Kendrick R.E., *Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action.* Plant Science, 57; 33-73, 1991.
- [103] Trewavas A., *Aspects of plant intelligence.* Annals of Botany, 92: 1-20, 2003.
- [104] Trewavas A., *Green plants as intelligent organisms.* Trends in Plant Science, 10: 413-419, 2005
- [105] Trewavas A., *Le calcium c'est la vie.* Plant Physiology, 120: 1-6, 1999
- [106] Verdus M.C., Thellier M., Ripoll C., *Storage of environmental signals in flax : their morphogenetic effect as enabled by a transient depletion of calcium.* Plant Journal, 12: 1399 -1410, 1997.
- [107] Vorobiev L.N., Manusadzinas L., *Bioelectrical reactions of Nitellopsis obtusa induced by indole-3-acetic acid.* Physiol. Plant. 59: 651-658, 1983.
- [108] Wagner F., Falkner R., Falkner G., *Information about previous phosphate fluctuations is stored via an adaptative response of the high-affinity uptake system of the cyanobacterium Anacystis nidulans.* Planta 197: 147-155, 1995.
- [109] Wang X.C., Ren H.Y., Lou C.H., *Root to Shoot Communication in the Responses to Drought.* Plant Physiology Communications, 28: 397-402, 1992.
- [110] Wodzicki T.J., Wodzicki A.B., *Modulation of the oscillatory system involved in polar transport of auxin by other phytohormones.* Physiol. Plant., 53: 176-180, 1981.
- [111] Wojtaszek P., Volkmann D., Baluška F., *Polarity and cell walls.* In: Lindsey K (ed), Polarity in Plants, Blackwell, Oxford, UK, 2004.
- [112] Xu X.D., Lou C.H., *Presence of Roots – A Prerequisite for Normal Function of Stomata on Sweet Potato Leaves.* Journal of Peking Agricultural University, 1: 37-45, 1980.
- [113] Zbell B., Walter-Back C., *Signal transduction of auxin on isolated plant cell membranes: indications for a rapid polyphosphoinositide response stimulated by indoleacetic acid.* J. Plant Physiol., 133: 353-360, 1988.
- [114] Zimmermann S., Thomine S., Guern J., Barbier-Brygoo H. *An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin.* Plant J. 6: 707-716, 1994.



## Legenda delle figure

1.



Fig. 1



SW  
**MICROGRAPHIA:**

*Thomas Wentworth of St.  
John's College  
Cambridge 1709* OR SOME  
*Physiological Descriptions*

OF  
**MINUTE BODIES**

MADE BY  
**MAGNIFYING GLASSES.**

WITH  
**OBSERVATIONS and INQUIRIES** thereupon.

By **R. HOOKE**, Fellow of the **ROYAL SOCIETY.**

*Non possis oculo quantum contendere Linceus,  
Nontamen idcirco contemnas Eippus inungi. Horat. Ep. lib. 1.*



**LONDON**, Printed by *Jo. Martyn*, and *Ja. Allestry*, Printers to the  
**ROYAL SOCIETY**, and are to be sold at their Shop at the *Bell* in  
*S. Paul's Church-yard.* **M DC LX V.**

Fig. 2





Fig. 3

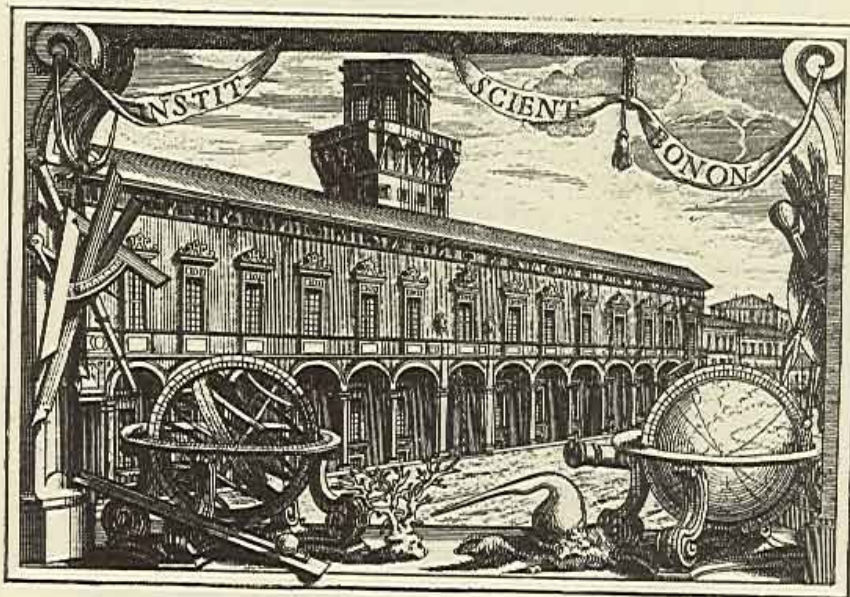




Fig. 4



DE BONONIENSI  
SCIENTIARUM  
ET  
ARTIUM  
INSTITUTO ATQUE ACADEMIA  
COMMENTARII.  
TOMUS SEPTIMUS.



BONONIÆ

Ex Typographia Instituti Scientiarum. MDCCXCL.  
CUM APPROBATIONE.

Fig. 5

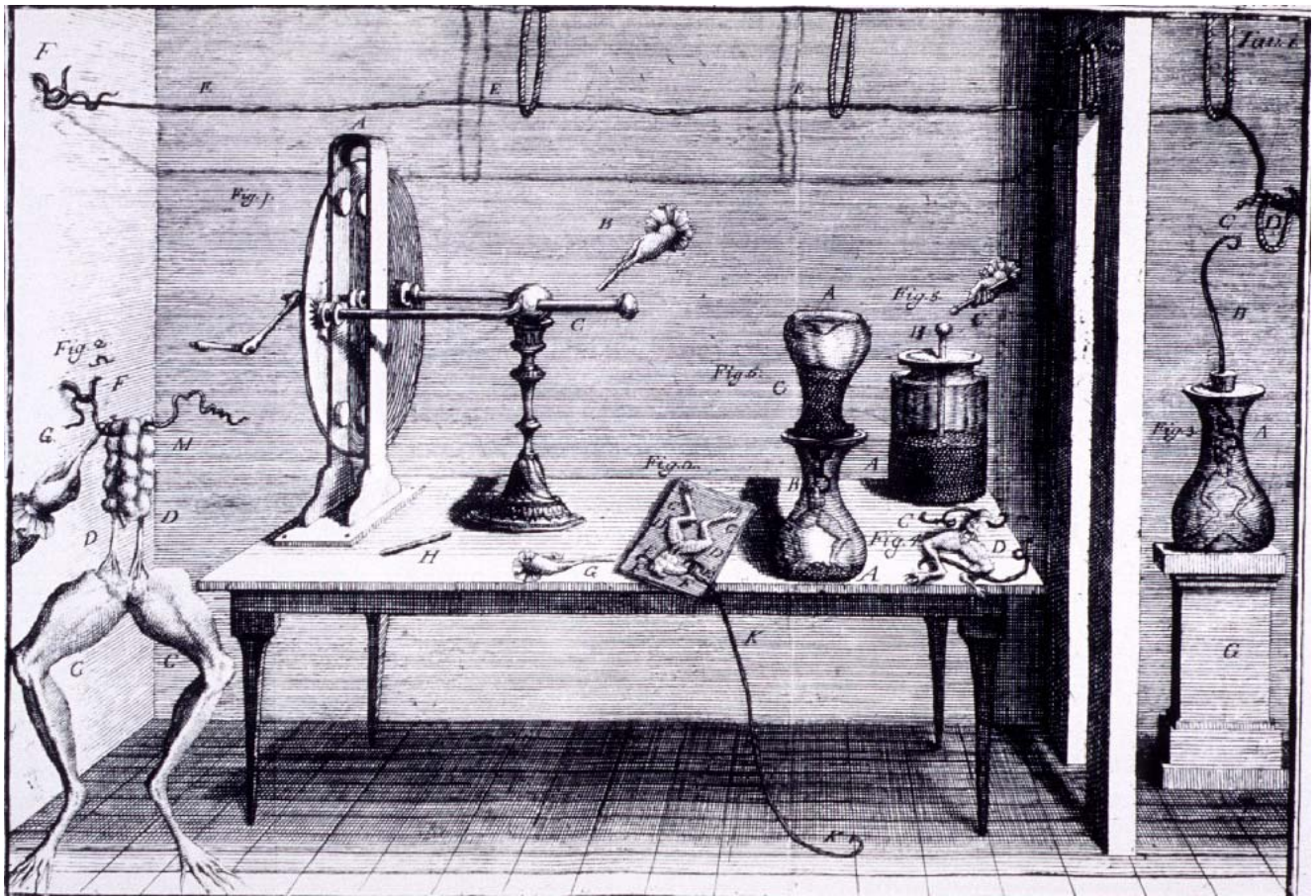


Fig. 6





Fig. 7

THE  
POWER OF MOVEMENT  
IN  
PLANTS.

By CHARLES DARWIN, LL.D., F.R.S.

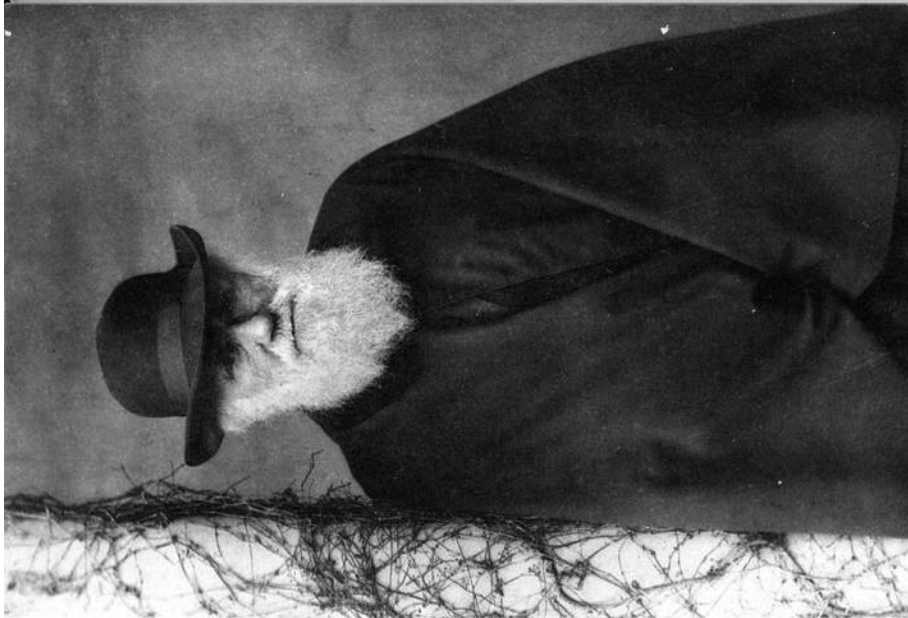
ASSISTED BY  
FRANCIS DARWIN.

WITH ILLUSTRATIONS.



LONDON:  
JOHN MURRAY, ALBEMARLE STREET.  
1880.

*The right of Translation is reserved.*



*Ch. Darwin*



Fig.8

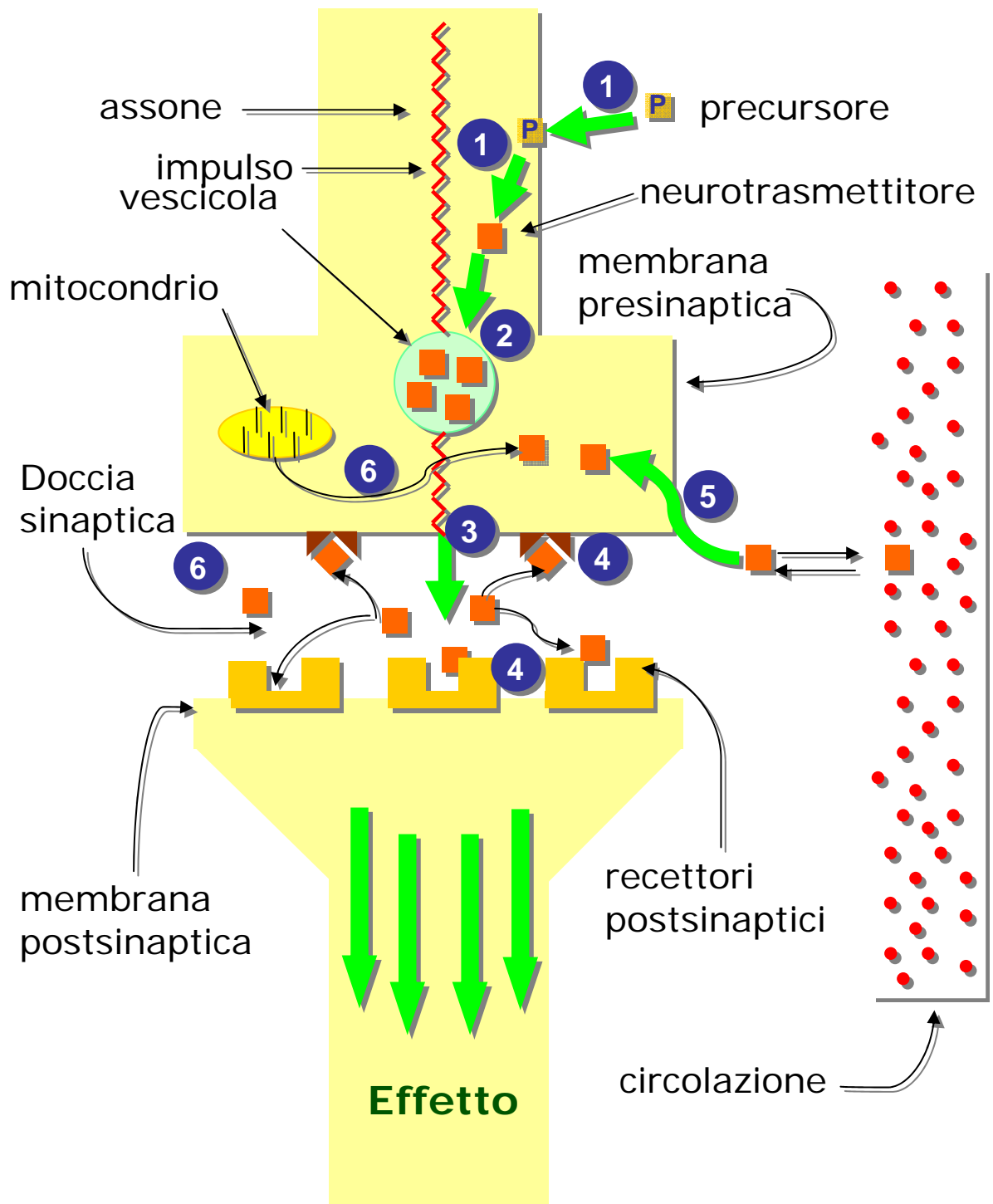


Fig. 9

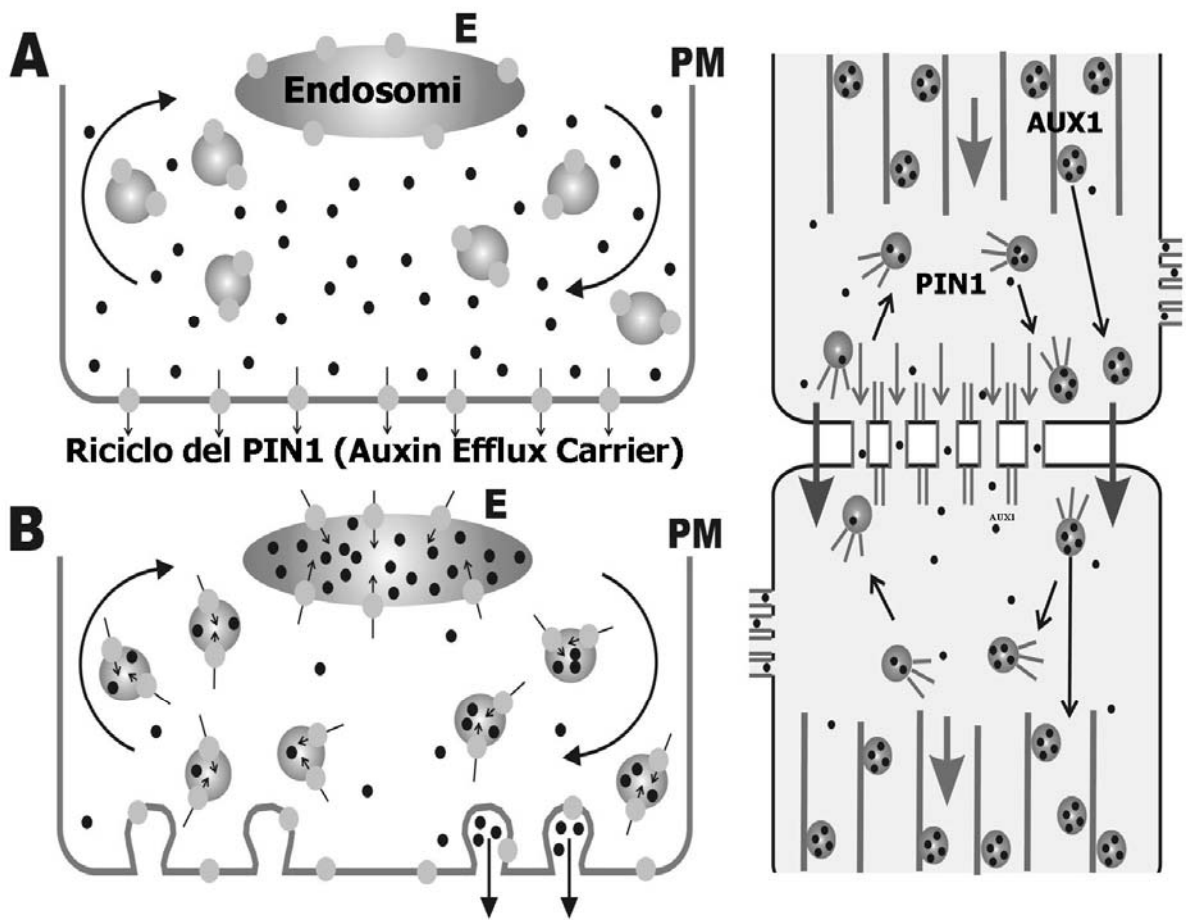


Fig. 10

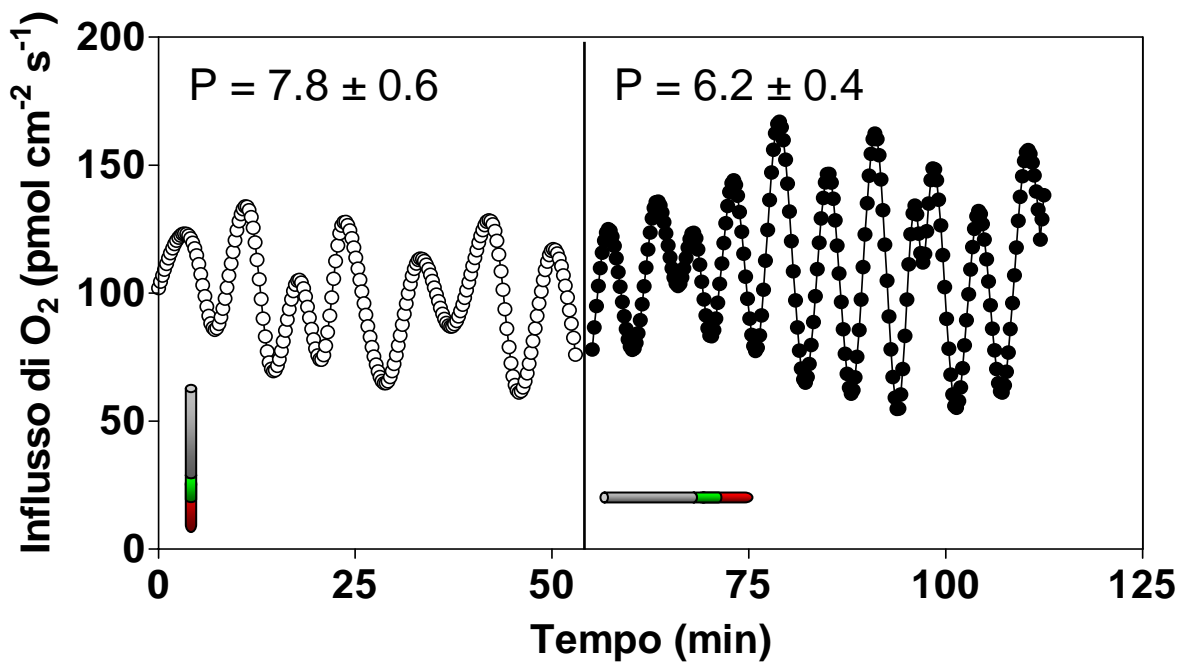
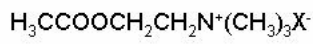
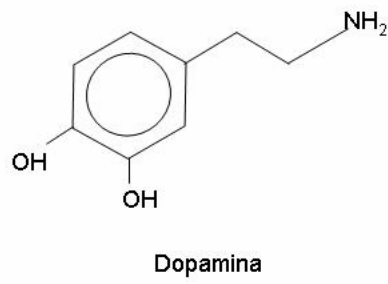
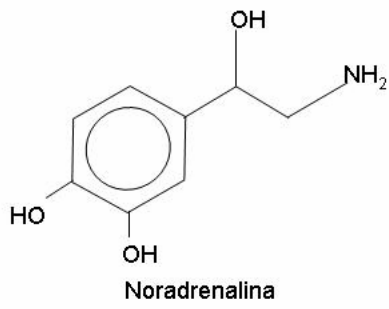


Fig. 11





Acetilcolina

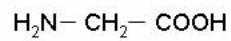
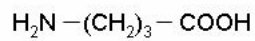
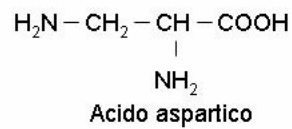
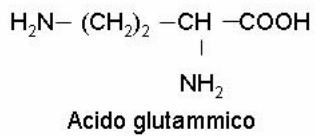
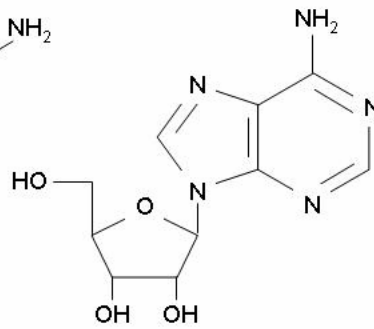
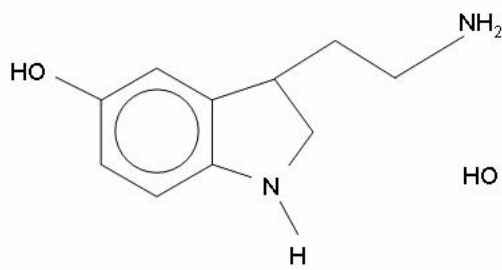
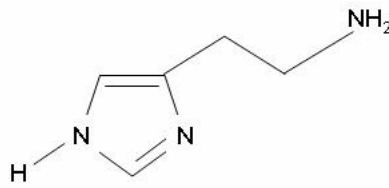


Fig. 12