

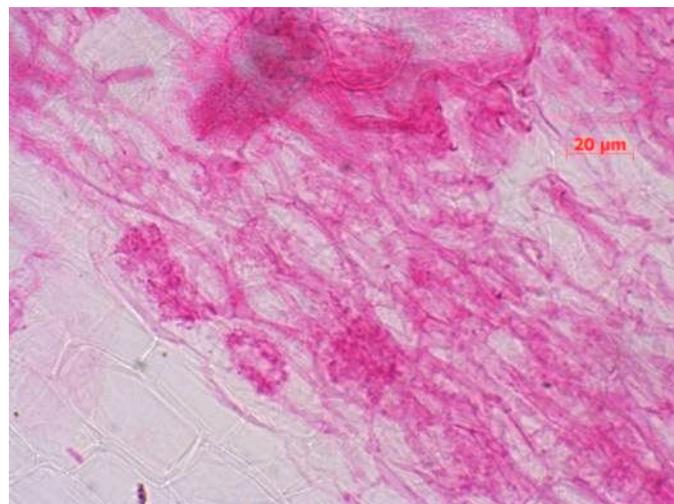


Dipartimento DEMETRA

Tesi di Dottorato in “Frutticoltura mediterranea”

XXII ciclo (SSD AGR03)

***Impiego di funghi AM in viticoltura:
valutazione dello stato di micorrizzazione e
della risposta vegetativa***



Tutor:

Prof. Livio Torta

Dottorando:

Gianvito Emilio Vinci

Co-Tutor :

Prof. Riccardo Lo Bianco

Coordinatore del dottorato:

Ch.ma Prof.ssa M.A. Germanà

1. INTRODUZIONE

1.1 Caratteri generali delle associazioni micorriziche

Le radici della maggior parte delle piante vivono in associazione simbiotica mutualistica con numerose e varie specie fungine; tale stretta associazione, definita "micorriza", origina un'entità non del tutto vegetale, né completamente fungina, costituita da cellule dell'apparato radicale e ife, intimamente connesse e organizzate.

Le prime osservazioni relative a tale simbiosi risalgono al 1847 quando Reissek descrisse la presenza di ife fungine nelle cellule radicali di diverse angiosperme, ma fu soltanto nel 1885 che A. B. Frank coniò il termine "micorriza" descrivendo il fenomeno in piante forestali, in maniera completa.

La simbiosi è di tipo mutualistico poichè la pianta mette a disposizione i fotosintetati eccedenti il proprio fabbisogno e li trasmigra all'apparato radicale dove vengono impiegati dal fungo come fonte trofica; in assenza di tali elaborati molti funghi micorrizici non potrebbero accrescersi né formare carpofori o altre strutture riproduttive. Inoltre gli essudati radicali inducono la germinazione delle spore e dei propaguli presenti nel terreno; questi, una volta raggiunto l'asse radicale, lo colonizzano producendo nuove entità micorriziche.

Il fungo sviluppa estesamente le proprie ife anche nel suolo, catturando sia elementi minerali più o meno mobili o disponibili (fosforo, rame, zinco, ecc.), che sostanze organiche direttamente dall'humus; tali nutrienti vengono traslocati sino alle porzioni di micelio a contatto con le cellule della corteccia radicale e, quindi, assorbiti dall'ospite.

L'associazione micorrizica, in particolare, consente un migliore e più abbondante assorbimento del fosforo da parte dell'ospite. Questo elemento, sottoforma di ione fosfato, costituisce infatti complessi insolubili con altri cationi presenti nel suolo (Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+}) risultando quindi scarsamente mobile nel terreno e non disponibile per la pianta.

I vegetali con un lungo ciclo vitale possono andare facilmente incontro a carenza da P, sia per la scarsa disponibilità dell'elemento nel suolo, sia a causa della continua sottrazione nella zona attorno al capillizio.

Le ife dei funghi micorrizici, circa 10 volte più sottili delle radici, si estendono assai oltre lo spazio tellurico esplorato dall'intero apparato radicale garantendo così un maggiore e costante approvvigionamento di tale nutriente (Torta, 1996; Helgason e Fitter 2005).

Il rapporto mutualistico tra pianta e fungo non è, comunque, solo di tipo trofico: una volta instaurata la simbiosi l'ospite riceve numerosi altri vantaggi.

E' noto, infatti, che l'associazione micorrizica:

1) migliora la nutrizione minerale e l'assunzione di acqua riducendo gli stress da carenza idrica (Dods e Millner. 1999; Strack *et al.* 2003; Chen *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006, Gosling *et al.*, 2006; Gaur e Varma 2007; Tawarayama *et al.* 2007; Azcón *et al.*, 2008);

2) aumenta la tolleranza ai metalli pesanti e alla salinità (Rufyikiri *et al.* 2004; Tian *et al.*, 2004; Gosling *et al.*, 2006; Janouskova *et al.*, 2006; Gaur e Varma 2007; Wang *et al.*, 2007; Colla *et al.* 2008);

3) induce una maggiore resistenza/tolleranza a fitofagi, funghi e nematodi (Torta, 2000; Strack *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005, Gosling *et al.*, 2006; Gaur e Varma 2007);

- 4) permette l'insediamento di alcuni vegetali in terreni marginali (terreni di discarica e di miniera, erosi, tufacei, ecc.; Torta, 1996) e il recupero di aree desertiche (Strack *et al.*, 2003);
- 5) migliora la resistenza agli stress da trapianto e da stanchezza del terreno (Torta, 1996);
- 6) è di ausilio nella coltivazione di piante micropropagate (Strack *et al.*, 2003);
- 7) incrementa positivamente l'attività degli azotofissatori (Picci, 1994: Johansson *et al.*, 2004: Gosling *et al.*, 2006);
- 8) stabilizza gli aggregati del suolo mediante la produzione di glomalina una glicoproteina extracellulare (Gosling *et al.*, 2006: Janos *et al.*, 2008);
- 9) migliora la fertilità agronomica del suolo.

A quest'ultimo riguardo, lo sviluppo di un estensivo micelio extraradicale favorisce la formazione di microaggregati che, insieme ad alcune sostanze organiche escrete dalle stesse micorrize (es. glicoproteine), migliorano le caratteristiche del terreno.

La maggior parte delle piante vascolari (angiosperme e gimnosperme) come pure molte pteridofite (felci) ed alcune briofite si legano in natura a funghi micorrizici; soltanto alcune famiglie (Juncaceae, Cyperaceae, Cruciferae, Chenopodiaceae e Caryophyllaceae) che vivono in ambienti aperti e ricchi di nutrienti non si avvantaggiano di tale condizione.

1. 2 Classificazione delle micorrize

In funzione della localizzazione del fungo nella radice, le micorrize vengono morfologicamente suddivise in ectomicorrize ecto-endomicorrize ed endomicorrize.

- **Ectomicorrize.** Sono caratteristiche delle piante arboree forestali. Il micelio si sviluppa come un manicotto attorno alla radice assorbente costituendo una struttura compatta e feltrosa detta micoclina, che sostituisce l'epidermide e si adagia direttamente sul tessuto corticale. All'interno della radice le ife si espandono negli spazi intercellulari della corteccia formando il reticolo di Hartig. I funghi ectomicorrizici molto numerosi, sono riferibili prevalentemente ai Basidiomycotina e agli Ascomycotina.

- **Ectoendomicorrize.** Sono caratterizzate da micoclina e reticolo di Hartig, ma con un certo grado di penetrazione intracellulare. sino alla costituzione di voluminosi gomitoli ifali all'interno del lume. Tra i funghi, partecipano all'associazione sia Basidiomycotina che Ascomycotina con alcuni rari casi di Deuteromycotina; tra i vegetali, anche in questo caso sono coinvolte solo specie arboree forestali.

- **Endomicorrize.** All'interno di questo gruppo vengono incluse le micorrize delle Ericales (ericoidi), delle orchidee (orchidoidi) e le micorrize arbuscolari (AM; Parniske, 2008). I funghi simbiotici non producono evidenti strutture esterne alla radice ma si sviluppano entro ai tessuti dell'organo a livello inter- ed intracellulare.

a) **Micorrize delle Ericales.** Le Ericales (*Rhododendron*, *Vaccinium*, *Calluna*, *Erica*, *Arbutus*), oltre a possedere radici molto sottili e filiformi vivono in terreni poveri, torbosi e acidi nei quali la maggior parte degli elementi nutritivi si presenta in forma organica; i simbiotici fungini rendono tali sostanze disponibili per le piante. Le cellule della corteccia radicale risultano invase da gomitoli e abbondanti sono le connessioni ifali tra le radici ed il terreno con numerosi punti di penetrazione radicale da parte delle ife stesse (Picci. 1994)

b) micorrize delle orchidee. Le orchidee producono semi molto piccoli, quasi polverulenti e privi di riserve: essi sono in grado di germinare solo se associati a funghi micorrizici. La penetrazione ifale nelle cellule dell'ospite avviene per mezzo di particolari ife spiralizzate e l'infezione fungina diviene densa nella regione basale del protocormo; in questo caso è il fungo, nei primissimi stadi di sviluppo della plantula, a garantirne l'accrescimento apportando alle cellule del protocormo carboidrati sostanze organiche azotate ed acqua. La colonizzazione miceliare delle radici emergenti può avvenire sia dal protocormo che direttamente dal terreno. Il tubero che si forma successivamente non risulta infetto (Picci 1994).

c) Micorrize arbuscolari (AM). Sono estremamente diffuse in natura interessando piante spontanee e coltivate di ambienti boreali, temperati e tropicali. Le strutture fungine caratterizzanti l'associazione sono i gomitoli, le vescicole (inter/intracellulari) e, soprattutto, gli arbuscoli (intracellulari). I funghi che producono questo tipo di simbiosi appartengono al phylum dei *Glomeromycota* con le famiglie più diffuse delle *Glomaceae*, *Acaulosporaceae* e *Gigasporaceae* (Shubler *et al.* 2001)

1.3 *Glomeromycota*

Il phylum *Glomeromycota* attualmente comprende circa 150 specie, distribuite in dieci generi, la maggior parte delle quali sono distinte, soprattutto, dalla morfologia delle spore.

Questi funghi sono caratterizzati da micelio multinucleato e cenocitico (Dodd *et al.*, 2000). La morfologia delle loro spore (clamidospore o azigospore) varia in funzione del genere di appartenenza: la parete può essere singola o stratificata, liscia o ornamentata; il colore può virare dallo ialino al marrone scuro-nero; la grandezza può andare da pochi (7-15), fino

anche a 300 micron; le spore, prodotte singolarmente, in gruppi o in sporocarpi, possono essere dotate o meno di sospensorio e collo miceliare (Hall, 1984).

Sono simbionti obbligati e come tali assai difficili da allevare *in vitro*, in assenza di una pianta ospite; una volta all'interno del tessuto radicale, di norma producono strutture intracellulari, note come arbuscoli, caratterizzanti questo tipo di associazione.

Per quanto concerne il ciclo biologico e la riproduzione di questi funghi è accertato, che, una volta avvenuta la germinazione di una spora libera nel suolo, il tubulo germinativo si orienta verso la superficie di una vicina radichetta (chemiotassi) e, a contatto avvenuto, al suo apice si forma un appressorio, cui segue la fase di penetrazione e colonizzazione dei tessuti corticali. Nuove spore possono essere costituite nel micelio all'interno o al di fuori della radice, mentre l'infezione micorrizica può essere avvenire anche per mezzo di ife libere nel suolo o di radichette vicine, già micorrizzate. In ogni caso, se durante le prime fasi di accrescimento, il fungo non stabilisce il rapporto trofico con l'ospite, lo sviluppo si arresta in breve tempo.

1.4 Caratteri generali delle associazioni AM

Nelle associazioni AM il fungo colonizza soprattutto la zona di radice inclusa tra l'epidermide e il tessuto corticale, addentrandosi raramente nell'endoderma, nei tessuti vascolari e meristemati; ciò differenzia tale simbiosi dalle infezioni radicali di funghi patogeni che penetrano, invece, nei vasi conduttori e nei meristemi.

Il processo simbiotico si avvia con la germinazione delle spore residenti nel suolo, quando le condizioni ambientali di temperatura e umidità sono favorevoli. Dopo l'emissione del tubo o dei tubi germinativi, il micelio del fungo si accresce, attratto dagli essudati radicali, in direzione di una radichetta ospite; una volta a contatto con la superficie dell'ospite, l'apice del tubulo germinativo produce una struttura simile ad un appressorio. Tale struttura può dare origine ad un'infezione attiva se, a seguito della produzione di enzimi idrolitici e pectici, si ha la degradazione della parete cellulare; in questo caso, dall'appressorio si sviluppa un'ifa che può penetrare all'interno della cellula e, quindi, accrescersi tra e dentro le cellule limitrofe, invadendo i tessuti e l'organo intero. L'infezione può avvenire anche attraverso un pelo radicale o via spazi intercellulari presenti nell'epidermide.

All'interno della cellula colonizzata, l'ifa si accresce spingendosi nel lume cellulare, ma senza ledere la membrana dell'ospite che piuttosto si invagina; tra le due membrane a contatto, viene prodotta una zona di interfaccia ricca di ioni Ca^{++} , con funzioni di legante tra le stesse.

Successivamente, si originano gli arbuscoli intracellulari, prodotti da una spinta dicotomizzazione dell'ifa, dopo la penetrazione della parete cellulare. La membrana plasmatica della cellula vegetale aderisce alle fitte ramificazioni dell'ifa, divenendo zona d'interscambio di nutrienti. La vita degli arbuscoli è molto breve, inferiore a 15 giorni, al termine della quale essi vengono poi digeriti dall'ospite per fagocitosi.

La presenza degli arbuscoli è una condizione necessaria per identificare un'infezione AM in una radice.

Le vescicole, invece, sono corpi globosi originati da un rigonfiamento terminale di un'ifa e possono essere prodotte lungo tutto il parenchima

corticale colonizzato. Esse presentano un forte accumulo di sostanze lipidiche e, una volta completato lo sviluppo, o vanno incontro a lisi versando i metaboliti nella cellula ospite, oppure, una volta ispessita la parete, si trasformano in organi di svernamento (clamidiospore).

I gomitoli, infine, sono costituiti da grosse ife ginoculate di 5-6 μm di diametro che, entrando nelle cellule, formano avvolgimenti, spiralizzazioni o nodi.

Quando l'infezione interna ha raggiunto uno stadio avanzato (micelio intramaticale), le ife del fungo possono crescere esternamente alla radice della pianta nel suolo (micelio extramaticale) e occupare un volume di terreno normalmente inaccessibile alle radici; in questo modo la pianta aumenta considerevolmente la sua superficie d'assorbimento e di conseguenza migliora il suo stato sanitario. I funghi che formano le micorrize arbuscolari producono normalmente spore a partire dal micelio esterno, e solo in alcuni casi queste si formano all'interno della radice, a partire dalle vescicole. Le spore di resistenza possono rimanere quiescenti nel suolo per molto tempo, mentre le ife del fungo, se non trovano una radice ospite nell'arco di 2 o 4 settimane, collassano.

In genere, lo sviluppo di una micorriza vescicolo-arbuscolare è strettamente correlato alla fenologia dell'ospite e all'andamento stagionale: alla fine del periodo invernale, ad esempio, nel suolo si riscontra una numerosa presenza di spore, mentre, nel periodo estivo, tali propaguli sono presenti solo in minima quantità (Nappi *et al.*, 1980-81). Anche l'entità della micorrizzazione presenta fluttuazioni nel corso delle stagioni: infatti Sutton (1973, in Nappi *et al.*, 1980-81) ha rilevato che, per alcune piante di interesse agrario, il massimo livello di micorrizzazione si raggiunge in coincidenza dello sviluppo dell'apparato vegetativo e della fruttificazione

dell'ospite. Tuttavia tale andamento non è un fenomeno generale poiché risulta spesso correlato alla pianta ospite, all'andamento stagionale e alle tecniche di coltivazione.

1.5 Associazioni micorriziche arbuscolari in *Vitis vinifera* (L.)

Le prime osservazioni sulla presenza di ife fungine all'interno delle radici di vite risalgono ai primi del 1900 (Stahl). Successivamente, Petri (1907, in Fontana *et al.*, 1978) e Peyronel (1923-24, in Fontana *et al.*, 1978) stabilirono che si trattava di micorriza. Rives (1926-27, in Fontana *et al.*, 1978) invece fornì la prima descrizione dettagliata della simbiosi stabilendo che le radici di *V. vinifera* risultavano infettate da funghi micorrizici arbuscolari attualmente inclusi tra i *Glomeromycota*.

Le specie descritte come micorriziche della vite appartengono ai generi *Glomus* (*G. fasciculatum*, *G. occultum*, *G. monosporum*, ecc.), *Gigaspora* (*G. gigantea*, ecc.), *Acaulospora* (*A. laevis*) appartenenti tutti alla famiglia delle Endogonaceae. Il vantaggio per la vite, tanto maggiore quanto più povero è il terreno, dipende dalla maggiore disponibilità di elementi minerali per l'attività adsorbente delle ife fungine. Lo scambio di sostanze tra fungo e pianta (e viceversa) avviene attraverso il plasmalemma principalmente a livello di arbuscoli, mentre le vescicole hanno funzione di riserva.

L'associazione AM in *V. vinifera* è stata studiata in vari ambienti.

In Italia Schubert *et al.* (1980-81), valutando l'effetto della micorrizzazione in viti allevate in terreni a differente contenuto di P, hanno rilevato che la simbiosi risultava più abbondante in suoli fosforo carenti. In questi casi il fungo, garantendo un migliore assorbimento di P induceva un incremento della lunghezza del fusto, degli internodi e del peso della pianta. Sulla base

di questi risultati, è stato ipotizzato che la vite fosse una pianta micorrizadipendente.

In vigneti dell'Alto Adige (Nappi *et al.*, 1980-81) è stato riscontrato un maggior numero di spore di funghi AM nel suoli permanentemente inerbiti e pacciamati con sostanza organica (500/g suolo e 1162/g suolo, rispettivamente); il loro numero si riduceva molto (50-150/g suolo) quando veniva applicato il diserbo (sia meccanico che chimico). E' stato osservato, inoltre, che la quantità di spore variava in funzione dell'andamento stagionale: elevata in marzo, decrescente dalla primavera all'estate, minima in luglio ed in incremento nei mesi successivi. Infine è, stato rilevato che il numero di spore nei terreni pacciamati ed inerbiti diminuiva all'aumentare della profondità: il fenomeno era strettamente influenzato dalla quantità degli elementi nutritivi e della sostanza organica.

Nappi *et al.* (1985), valutando in Piemonte la distribuzione dei funghi AM sia nel suolo (spore) che nelle radici (micelio) e la distribuzione di questi nel profilo, hanno notato maggiori quantità di spore (144 spore/g, fino a 20 cm) negli strati superficiali. A profondità crescenti, il numero totale di spore tendeva a ridursi, sino a raggiungere valori nulli intorno a 60-70 cm. Anche in questo caso, nelle radici, la più alta incidenza micorrizica e il numero più elevato di arbuscoli è stato riscontrato nei suoli dove il contenuto di nutrienti e di sostanza organica era molto basso.

In Australia, Possingham e Groot Obbink (1971) hanno descritto i tipici caratteri anatomici dell'associazione dimostrando che le viti allevate in suolo sterilizzato (sia autoclavato che irradiato con raggi gamma), in assenza dei simbionti, crescevano stentate; inoltre i germogli delle giovani piantine allevate sia in suolo non sterile che in suolo sterile, ma inoculato

con funghi micorrizici avevano un contenuto in fosforo significativamente maggiore rispetto alle piantine non micorrizzate.

Altri studi sono stati condotti allo scopo di quantificare l'effetto benefico di alcune specie di funghi AM sullo stato vegetativo dell'ospite.

Ad esempio in India (Usha *et al.*, 2005) è stata valutata l'efficacia di tre differenti ceppi di *G. mossae*, *G. deserticola* e *S. calospora*, inoculati su viti della cv Perlette. I risultati hanno evidenziato che le piante inoculate con *G. deserticola* manifestavano una generale precocità nella sviluppo (apertura delle gemme emergenza delle infiorescenza fioritura, invaiatura ed allegagione), rispetto alle piante inoculate con le altre due specie fungine. Tale risposta all'inoculazione rappresentava un indubbio vantaggio sul prodotto che, raccolto anticipatamente, evitava di essere danneggiato dai monsoni.

In Spagna, Aguin *et al.* (2004) hanno valutato gli effetti dell'inoculazione sulla morfologia radicale e sulla crescita di tre portainnesti di vite. I risultati hanno indicato che l'inoculazione del fungo *G. aggregatum* nei letti di radicazione delle talee di vite induceva un cambiamento nella morfologia radicale, incrementando la ramificazione delle radici laterali di primo ordine.

Alcune talee radicate, trapiantate in vasetti contenenti un terreno normalmente dotato in P e funghi AM indigeni, dopo nove mesi mostravano anche un significativo accrescimento vegetativo. Il portainnesto 161-49 Couderc inoculato con *G. aggregatum*, da solo o in sinergia con funghi AM indigeni, mostrava il maggior grado di colonizzazione radicale ed evidenziava la migliore risposta vegetativa.

Sulla base di tali osservazioni sono stati allestiti e commercializzati inoculi fungini AM da distribuire in pieno campo o in ambiente protetto, sia in

vigneti adulti che in vivaio. Alcuni saggi effettuati in Italia (Lovato *et al.*, 1992) su piante di vite micropropagate hanno evidenziato che, sebbene nei frammenti radicali osservati la percentuale di micorrizzazione fosse piuttosto limitata (30%), le piantine inoculate mostravano un incremento di crescita dei germogli tre volte maggiore rispetto a quelle non inoculate.

1.6 Inoculi fungini AM

I funghi basidiomiceti ectomicorrizici sono stati i primi ad essere commercializzati come inoculo sporale per la micorrizzazione di piante forestali; il propagulo in forma polverulenta, poteva anche essere distribuito nell'acqua di irrigazione.

Recentemente, anche le endomicorrize sono reperibili sul mercato; tuttavia le grandi dimensioni delle spore non permettono loro di percolare nel terreno, per cui è necessario distribuire l'inoculo direttamente a contatto delle radici delle piante, miscelandole ai terricci di radicazione.

Gli inoculi di funghi micorrizici arbuscolari disponibili in commercio presentano diverse formulazioni (granulari, scaglie, polvere, pastiglie e gel) studiate per poter semplificare l'utilizzo ed adattarsi alle varie esigenze colturali; possono essere applicati con un nebulizzatore, per immersione, per iniezione, oppure mescolati alla terra d'impianto.

Questi inoculi sono composti da una matrice organica e/o inorganica e da ceppi di più specie o uno solo.

Le micorrize sono in qualche maniera specifiche per gruppi di piante, perciò è necessario selezionare il tipo di inoculo che è più adatto alla specie in esame. La maggior parte delle ditte elenca la specie appropriata sull'etichetta dell'inoculo.

Di norma si consiglia l'applicazione di inoculi fungini alla semina o al trapianto al fine di permettere l'istaurarsi del rapporto di simbiosi già nelle prime fasi del ciclo colturale.

Nel primo caso l'inoculo può essere mescolato al substrato prima della semina in vivaio o distribuito insieme al seme nel caso si adotti la semina diretta in campo. Nel secondo caso, al trapianto, l'inoculo va collocato immediatamente sotto la piantina il più vicino possibile all'apparato radicale, in modo tale che il contatto tra l'inoculo e le nuove radici favorisca una rapida micorrizzazione. Alcuni formulati polverulenti sono commercializzati per applicazioni mediante l'impianto di fertirrigazione e quindi permettono di semplificare l'applicazione sulle colture ed effettuare anche successivi richiami in copertura. Affinché l'inoculo resti vitale è importante conservarlo in luogo fresco e aerato, al riparo dalla luce del sole e dagli sbalzi termici. La micorrizzazione artificiale in viticoltura è limitata al vivaio; in questo caso l'effetto positivo, in termini di accrescimento, è tanto maggiore quanto più povero è il terreno (Bavaresco e Fregoni, 2002). Infatti, semenzali di *V. vinifera*, ottenuti in asepsi, posti in vasi con terra sterile ed inoculati con piccoli frammenti radicali già infettati, mostrano dopo tre mesi dalla messa a dimora una crescita più rigogliosa rispetto ai testimoni (Fontana, et al. 1978).

In Tabella 1 si riporta un elenco dei formulati commerciali a base di propaguli di funghi AM commercializzati in Italia.

Tab. 1: Elenco dei principali formulati a base di spore di funghi AM in commercio in Italia

Formulato commerciale	Composizione	Caratteristiche	Ditta produttrice
Green power	50 spore di <i>Glomus</i> spp./g; Batteri della rizosfera	Maggiore sviluppo dell'apparato radicale e più rapido sviluppo vegetativo. Maggiore resistenza ai patogeni e a stress idrici.	Eleps biotecnologie
Micostart	<i>G. intraradicens</i> , <i>G. mosseae</i> , <i>Rhizopogon</i> spp., <i>sclerodermia</i> spp. Batteri della rizosfera Matrice Organica	Aumento dell'area esplorativa dell'apparato radicale, migliore capacità di trattenere acqua del suolo, migliore attecchimento di tappeti erbosi e piante al trapianto	Altea
Symbivit	6 diversi ceppi di <i>Glomus</i> spp. Matrice organica Batteri della rizosfera	Aumenta la crescita della pianta, rende più precoci i fenomeni di fioritura e maturazione dei frutti	Mybatec srl
Aegis	<i>G. intraradices</i> , <i>G. mosseae</i> (100 propaguli/cc)	Aumento della resistenza allo stress idrico e alla salinità, incremento dell'assorbimento di nutrienti minerali del suolo, maggiore resistenza ai patogeni del suolo.	Italpollina Spa

2. SCOPO DELLA TESI

Recenti indagini condotte presso la sezione di Patologia vegetale e Microbiologia agraria del Dip. Demetra di questo ateneo hanno accertato la presenza di funghi AM e delle relative associazioni endomicorriziche in vigneti siciliani.

Ulteriori studi hanno consentito di seguire sia la dinamica delle popolazioni fungine in suoli vitati che l'evoluzione dello stato di micorrizzazione nei rispettivi ospiti, accertandone variazioni strettamente correlate all'andamento stagionale e allo stato fenologico delle piante. Inoltre, prime osservazioni condotte in campo sull'impiego di inoculi micorrizici commerciali, hanno correlato all'inoculazione una maggiore produzione di legno di potatura, inducendo a ipotizzare un effetto positivo del trattamento sull'accrescimento vegetativo dell'ospite.

Con il presente lavoro si è ritenuto opportuno indagare sulle associazioni micorriziche di tipo vescicolo-arbuscolare in portainnesti di vite allevate sia in pieno campo che in fitocella impiegando un inoculo commerciale di funghi AM, a confronto di testimoni non trattati.

E' stato valutato, quindi, il grado di infezione delle radici mediante una tecnica di decolorazione dei tessuti radicali e successiva colorazione delle strutture fungine endofite, determinando la percentuale di micorrizzazione dei campioni radicali.

La stima percentuale di micorrizzazione, valutata visivamente (metodo soggettivo), è stata anche comparata a quella ottenuta su fotografie digitali delle stesse radici, tramite l'impiego di algoritmi (metodo oggettivo) in grado di distinguere le aree di radici micorrizzate (colorate) da quelle non micorrizzate (trasparenti).

Tale comparazione, oltre a evidenziare eventuali differenze di valutazione conseguenti ad errore umano ha avuto lo scopo di migliorare il livello di precisione per l'ottenimento di dati quantitativi su scala percentuale, con intervallo continuo e, quindi, con livello informativo superiore, più adatto alle procedure di analisi statistica.

Un'ulteriore indagine è stata condotta sul peso secco della biomassa prodotta al termine del primo anno di vita delle piante, inoculate e non.

Le indagini sono state condotte nei laboratori della Sezione di Patologia Vegetale e Microbiologia agraria del Dipartimento Demetra dell'Università degli Studi di Palermo, nel periodo compreso dal novembre del 2008 al dicembre 2009.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiale vegetale

Le indagini sono state condotte sui portainnesti di vite americana 140 Ruggeri e 1103 Paulsen, tra i più rappresentativi e utilizzati per la coltivazione della vite nel territorio siciliano.

- 140 Ruggeri (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). Vigoroso e rustico, resiste bene alla siccità ed al calcare attivo; si adatta ai terreni calcareo argillosi, mediamente compatti, asciutti, non molto fertili; buona affinità di innesto con molte cultivar europee da mosto e da tavola (Fregoni 2002).

-1103 Paulsen (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). Caratterizzato da elevata vigoria, buona resistenza all'umidità e alla salsedine, si adatta a suoli con alto tenore di argilla, calcarei e siccitosi (Fregoni 2002).

Per ciascun portainnesto sono state impiegate 500 barbatelle, provenienti da un vivaio di moltiplicazione; in particolare, 250 sono state allevate in fitocella presso il Dip. Demetra, mentre le rimanenti 250 in pieno campo, in un'azienda del marsalese. Per ciascun gruppo, una metà (125 marze) è stata trattata con funghi AM, l'altra metà è stata allevata in assenza dell'inoculo commerciale.

3.2. Inoculo di funghi AM

Per i saggi di micorrizzazione, sia in pieno campo che in fitocella, è stato utilizzato un inoculo artificiale prodotto dalla ditta Italpollina, commercializzato come Aegis, nella formulazione polverulenta "Argilla". Il formulato è a base di spore di *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae* miscelate con argilla (100 propaguli/cm³), con pH di 7-8 e peso specifico pari a 0,7 kg/l.

Tale prodotto è particolarmente adatto alla fase di impianto, in quanto può essere distribuito sotto forma di poltiglia adesiva alle radici delle marze prima della messa a dimora; in tal modo il formulato permane anche durante le operazioni di interramento.

L'inoculazione è stata effettuata seguendo le indicazioni riportate sulla confezione del prodotto per la vite: 1 kg per circa 100 barbatelle. Il prodotto è stato sospeso in 1 L di acqua, ottenendo una miscela collosa nella quale sono state immerse le radici della barbatelle preventivamente accorciate a circa 10 cm (**foto 1 e 2**). Le radici delle barbatelle trattate sono rimaste per circa 15 minuti a contatto con l'inoculo, prima di essere poste a dimora (**foto 3**); per quelle non inoculate si è proceduto analogamente ma con sola acqua corrente. Le barbatelle, inoculate e non, sono state poste a dimora sia in pieno campo, che in fitocelle.

3.3 Impianto in campo

Nel mese di novembre 2008 è stato allestito un campo sperimentale nel territorio di Marsala (TP) su di un fondo sito in c/da Ettore Infersa. (N 37.86770°, E 12.48899°).

Le barbatelle sono state impiantate su un appezzamento omogeneo per esposizione, pendenza e caratteristiche pedologiche, di circa 1.000 m² (**foto 4**). Esse sono state disposte secondo lo schema tradizionale, con un sesto di 2,2 x 0,8 m su quattro filari, uno per ciascuna combinazione di fattori in prova (potrinnesto e micorrizzazione), ciascuno di 125 piante.

Tutte le barbatelle sono state interrate per circa 20 cm lasciando fuori terra circa 4 cm e avendo cura di comprimere bene il terreno intorno (**foto 5**).

3.4 Trapianto in fitocelle

Il terreno utilizzato per la prova (circa 2,5 kg per fitocella) è stato prelevato dallo campo sperimentale allestito per la prova in pieno campo e opportunamente trattato termicamente (90 °C per 24 ore) allo scopo di abbattere le popolazioni fungine naturalmente presenti, in particolare quelle di glomeromiceti.

Nel mese di novembre 2008 in ciascuna fitocella (30cm × 15cm × 15cm) sono state inserite 3 barbatelle della stessa tipologia, alla profondità di 10-15 cm (3/4 della lunghezza); tutte le fitocelle sono state poste in serra con teli ombreggianti e irrigate ogni 3 giorni, ciascuna con 500 ml di acqua corrente (**foto 6**).

Le barbatelle, quindi, sono state osservate giornalmente, controllando sia l'evoluzione dello stato vegetativo, sia l'eventuale disseccamento o moria.

3.5. Prelievo di campioni radicali

Al fine di monitorare l'andamento della micorrizzazione nelle varie tesi sono stati effettuati campionamenti di radici il 16 giugno, 16 luglio, 14 settembre e 13 novembre 2009.

Il campionamento, di tipo distruttivo, è consistito nell'estirpare, in maniera casuale, 5 esemplari per ciascuna tesi, avendo cura di danneggiare il meno possibile l'apparato radicale. Le piante sono state quindi portate in laboratorio per le opportune analisi. In particolare, dopo aver accuratamente lavato le radici sotto acqua corrente, per ciascuna barbatella è stato ottenuto un campione di radichette di diametro inferiore a 2 mm dal peso di circa 5 g. Le radici sono state conservate sino all'ultimo prelievo (novembre 2009) in fissativo (F.A.A.: 300 ml etanolo 95%; 80 ml

formaldeide 40%; 20 ml acido acetico glaciale, 600 ml acqua distillata) in tubi da saggio.

3.6. Colorazione delle radici

La presenza dei funghi AM è stata accertata mediante la tecnica di Phillips e Hayman (1970) e successive modifiche (Torta et al., 2003), consistente in una decolorazione dei tessuti vegetali e successiva colorazione delle strutture fungine.

In particolare i campioni di radici, conservati nella soluzione di F.A.A., sono stati decolorati per immersione in una soluzione acquosa di KOH al 10% e mantenuti a bagnomaria (90 °C) per circa 12 ore. Successivamente sono stati sottoposti a lavaggio con la stessa soluzione e mantenuti in una soluzione alcalina di H₂O₂ (12 vol.) a temperatura ambiente sino al completo schiarimento. Conclusa la fase di decolorazione l'eccesso di H₂O₂ è stato rimosso mediante ripetuti lavaggi con acqua distillata.

I campioni, dapprima trattati con una soluzione acquosa di HCl al 10%, sono stati posti in una soluzione di lattofenolo (acqua distillata, glicerolo, acido lattico e cristalli di fenolo in parti uguali per volume e peso) contenente 0,1% del colorante fucsina acida e portati ad ebollizione per 5 minuti. Al termine del trattamento, l'eccesso di colorante è stato allontanato attraverso ripetuti lavaggi con lattofenolo chiaro.

Piccoli frammenti di tessuto radicale colorato sono stati sezionati longitudinalmente e trasversalmente, montati su vetrini in una goccia di lattofenolo e sottoposte ad esame microscopico per individuare le tipiche strutture micorriziche (arbuscoli, vescicole e gomitoli).

3.7. Stima dell'entità della micorrizzazione

L'entità di micorrizzazione è stata rilevata valutando la percentuale di tessuto radicale colorato (micorrizzato) sull'unità di lunghezza totale del campione. Tale valore è stato quantificato sia ad occhio nudo (stima a vista), che mediante analisi di foto digitali degli stessi campioni.

3.7.1. Stima a vista

La stima a vista della percentuale di tessuto micorrizzato rispetto al totale di apparato radicale in esame (indice di micorrizzazione) può presentare un ampio grado di approssimazione e, soprattutto, può essere differentemente valutata da diversi operatori. Valori quanto più corrispondenti al reale livello di colonizzazione sono forniti, in genere, da personale ben addestrato a questo tipo di misurazioni. I valori percentuali ottenuti dalla stima a vista hanno fornito dati su una scala di valori discontinui (10%, 20%, 30%, ecc.).

3.7.2. Analisi delle immagini digitali

Nell'intento di poter ottenere valori percentuali di micorrizzazione più accurati e su una scala continua si è ritenuto opportuno utilizzare immagini fotografiche digitali del campione radicale colorato acquisite al computer, da sottoporre ad analisi con un algoritmo in grado di calcolare le variazioni cromatiche nei toni del rosso (fuxina acida) presenti nel campione di radice in esame.

Allo scopo, i frammenti radicali utilizzati per la stima a vista sono stati posti dentro piastre Petri su una base retro illuminata e fotografati con una macchina digitale (Canon eos d50). Le immagini ottenute sono state, quindi, ritagliate ed analizzate con un algoritmo che converte le immagini

dal formato RGB a quello CIE L*a*b*, così da quantificare e indicizzare le caratteristiche colorimetriche.

Il metodo sviluppato utilizza un'immagine campione scelta in maniera interattiva della radice con la colorazione ottimale per calcolare un indice di colorazione per ciascuna radice del set di immagini. In base ad una prima analisi cromatica la radice viene automaticamente estratta dall'immagine e ne viene quantificato il numero di pixel totali. A questa prima analisi colorimetrica segue un secondo algoritmo che consente di distinguere due aree all'interno della radice mediante la scelta di una soglia di separazione cromatica tra verde e rosso. Questa funzione permette di quantificare in maniera esatta il numero di pixel di radice attribuibile ad una colorazione tendente al rosso (considerata micorrizzata, poichè riferibile alla tonalità di rosso della fucsina) dalla restante parte di colore pressoché neutro e quindi più lontana dal rosso o più prossima al verde (non micorrizzata).

La percentuale di radice micorrizzata per ciascuna immagine è stata infine calcolata dividendo il numero pixel nella categoria del rosso per il numero di pixel totali della radice e poi moltiplicando per 100.

3.8. Prelievo di campioni di biomassa

Al fine di indagare sull'eventuale risposta vegetativa delle piante inoculate rispetto a quelle allevate in assenza d'inoculo commerciale, si è ritenuto opportuno rilevare il peso della biomassa prodotta al termine del primo anno di crescita delle barbatelle.

Il campionamento, effettuato nel mese di gennaio 2010, ha riguardato l'asportazione totale del legno dell'anno prodotto nel 2009 da 50 piante, scelte in maniera casuale.

Al fine di determinare le differenze di accumulo di sostanza secca, è stato determinato il peso secco di un sottocampione in stufa a 60° C.

I tralci sono stati pesati prima del trattamento in stufa e a intervalli regolari fino al raggiungimento di un peso costante.

Le pesate sono state effettuate con una bilancia con risoluzione 0,01 g.

3.9. Analisi statistica dei dati

L'associazione tra stima a vista e determinazione computerizzata del livello di micorrizzazione è stata valutata mediante una analisi di regressione.

I dati di micorrizzazione sono stati poi messi a confronto mediante analisi della varianza (ANOVA). Nel modello dell'ANOVA sono stati inseriti quattro fattori principali, epoca del rilievo, substrato (fitocella e pieno campo), portainnesto e micorrizzazione (+ o -), e tutte le interazioni derivanti. Anche i dati di biomassa prodotta sono stati analizzati mediante ANOVA, ma con un modello a tre fattori principali, substrato, portainnesto e micorrizzazione, e rispettive interazioni. In questo caso è stata utilizzata una trasformazione logaritmica dei dati al fine di assolvere alle assunzioni generali di normalità e omogeneità della varianza. L'analisi dei dati è stata condotta mediante procedure del software SYSTAT (Systat Software Inc., Richmond, CA, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel corso delle indagini, sia in campo che in fitocella, le piante hanno vegetato in sanità, mostrando un attecchimento del 100%. Inoltre, le analisi di laboratorio sullo stato di micorrizzazione, hanno consentito di confermare la presenza dell'associazione endomicorrizica di tipo vescicolo arbuscolare in tutti i campioni di radice di vite oggetto di indagine (**Foto 7**).

4.1 Correlazione tra stima a vista e analisi fotografica computerizzata

Dall'analisi di regressione è emerso un elevato grado di associazione ($R^2 = 0.981$) tra i valori percentuali di micorrizzazione ottenuti dalla stima a vista e quelli ottenuti dall'analisi delle immagini digitali (**Fig. 1**). La relazione è di tipo diretto e l'equazione della retta ottenuta mette in evidenza incrementi prossimi al valore unitario tra le due variabili, come si evince dal valore medio del coefficiente angolare (1,04).

La stessa equazione della retta ha però riportato un valore di intercetta negativo, ad indicare una certa sovrastima del metodo visivo o sottostima di quello digitalizzato. Ciò potrebbe in parte essere imputabile alla scelta della soglia di separazione tra rosso e verde nell'algoritmo di analisi delle immagini, nonché al grado di precisione nella separazione tra sfondo e radice, specialmente nei tratti di radice non colorati di rosso. L'utilizzo di campioni di radici meno fitti e condizioni standardizzabili di acquisizione delle immagini (microscopio dotato di fotocamera e fonte di luce regolabile) dovrebbero consentire di minimizzare questo tipo di scostamento tra i due metodi e garantire la massima riproducibilità del dato anche tra campionamenti ottenuti in momenti diversi o in laboratori diversi.

Nonostante i valori ottenuti sinteticamente a vista non si discostano da quelli stimati con l'algoritmo informatico, confermando quindi la validità della metodica visiva (**Foto 8, 9**), si tratta pur sempre di dati categorizzati che esprimono un singolo valore per un certo range. Con il metodo digitalizzato, invece, si riesce ad esprimere quel grado di informazione accurata e su scala continua, messo in luce dalla variabilità espressa anche all'interno della singola categoria stimata a vista (**Fig. 1**). Accertato pertanto che l'utilizzo del metodo digitalizzato aumenta la precisione della quantificazione del livello di micorrizzazione senza distorcere minimamente l'informazione fornita dal metodo visivo, per l'elaborazione statistica dei dati di questo lavoro sono state prese in considerazione solo le percentuali di micorrizzazione ottenute con la stima per immagini.

4.2 Confronto del livello di micorrizzazione

Il risultato ottenuto dalla ANOVA è riportato in **Tab. 2**

L'analisi ha evidenziato un effetto significativo ($P \leq 0,05$) del portainnesto, della presenza di inoculo, dell'epoca e delle due interazioni portainnesto-epoca e inoculo-epoca. Sono invece risultati non significativi gli effetti del substrato e tutte le interazioni ad esso collegate. Ciò sembrerebbe evidenziare che il trattamento termico al substrato (lo stesso in pieno campo e in fitocella) non abbia limitato lo sviluppo di spore fungine AM occasionalmente trasportate da vari vettori, né la loro capacità micorrizogena.

In **Fig. 2** sono riportati i valori medi di micorrizzazione nelle varie epoche di prelievo che evidenziano un generale incremento nel tempo ma con andamenti di tipo diverso. In **Fig. 3**, invece, sono evidenziati i valori medi di micorrizzazione in assenza o presenza di inoculo: è possibile notare che

esistono effetti significativi dell'inoculo solo in alcuni momenti della stagione vegetativa. In particolare, tra giugno e luglio il processo infettivo risulta più intenso per le piante inoculate (maggiori percentuali di micorrizzazione), per poi raggiungere valori pressochè uguali per tutte le tesi nelle fasi finali.

Tale andamento mostra un graduale incremento della colonizzazione endomicorrizica, più evidente nelle piante trattate, in presenza di un'elevata biomassa del fungo simbiote; tuttavia, al termine del primo anno d'impianto, tutte le barbatelle risultano quasi completamente colonizzate, probabilmente a causa del regolare accrescimento dei funghi nel tessuto radicale, a prescindere dallo stadio di inoculazione iniziale.

Per quanto concerne il livello medio di micorrizzazione dei due portainnesti, possiamo affermare che esso aumenta nel tempo ma con andamenti diversi a secondo del portainnesto (**Fig. 4**). In particolare dal grafico si può notare come, partendo da livelli iniziali molto simili di micorrizzazione, il 1103 P presenta nei mesi tra giugno e luglio un aumento repentino per poi attestarsi nei mesi successivi su incrementi quasi simili con quelli del 140 R terminando, nel mese di novembre, con una quantità di tessuto micorrizzato inferiore, seppur di poco, rispetto al 140 R. Per quanto riguarda invece il 140 R possiamo affermare che, nel complesso, l'andamento della micorrizzazione aumenta in maniera lineare durante tutto l'arco di tempo monitorato.

Tale comportamento sembra evidenziare una possibile differente affinità dei due portainnesti verso i funghi endomicorrizici, alloctoni, impiegati nella prova. Ulteriori studi di inoculazione con altri ceppi fungini, anche autoctoni, potranno consentire di acquisire dati utili per una più approfondita comprensione del fenomeno.

4.3 Confronto della biomassa secca.

Il risultato ottenuto dalla ANOVA è riportato in **Tab. 3**.

L'analisi ha evidenziato un effetto significativo ($P \leq 0,05$) del portainnesto, del substrato e della presenza di inoculo e della interazione tra portainnesto e substrato e tra substrato e micorrizzazione escludendo dalla significatività invece tutele le altre interazioni.

La **Fig. 5** riporta le differenze su scala logaritmica della biomassa prodotta (media dei due portainnesti) in risposta alla inoculazione nei due diversi substrati. In questo caso su tutte le piante inoculate si è notato un aumento della produzione di biomassa sia per le piante allevate in pieno campo che per quelle in fitocelle.

Si nota in particolare come l'effetto della micorrizzazione sia più marcato nelle piante in pieno campo rispetto a quelle in fitocella, probabilmente per un effetto competitivo tra le piante presenti nello stesso contenitore.

In **Fig. 6** sono riportate le differenze su scala logaritmica della biomassa prodotta (media di inoculato e non) in risposta ai due portainnesti nei due diversi substrati. Si nota, in particolare, che l'incremento di biomassa prodotta in pieno campo rispetto alla fitocella sia maggiore per il 140 R rispetto al 1103 P. Ciò dovrebbe principalmente essere dovuto ad una differenza genetica che si estrinseca nel maggior vigore per il 140 come riportato in letteratura (Fregoni 2002).

Dalla **Tab. 4**, in cui vengono riportati i valori medi di biomassa secca prodotta nelle varie tesi, si evince comunque che, nonostante le interazioni esaminate sopra, le piante inoculate in tutti i casi presentano una maggiore quantità di sostanza secca prodotta rispetto a quelle non inoculate. Tale comportamento confermerebbe il benefico effetto della micorrizzazione

sull'accrescimento delle piante, più evidente in presenza di elevata biomassa d'inoculo e correlato alla maggiore entità di micorrizzazione.

4.4. Considerazioni conclusive.

Lo studio condotto ha consentito di accertare la costante presenza di associazioni micorriziche nelle piante di vite indagate. In particolare è stata confermata l'associazione endomicorrizica di tipo arbusolare tra i due portainnesti tipici degli ambienti siciliani (140 R e 1103 P) e funghi glomeromiceti (*G. intraradices* e *G. mosseae*).

Nei due anni di rilievi, è stato evidenziato un andamento crescente della quantità di micorrizzazione e delle popolazioni di funghi AM, probabilmente in funzione dell'andamento stagionale e dello stato fenologico dell'ospite.

Da notare che il processo di micorrizzazione è stato osservato anche nelle radici delle piante cresciute su terreno trattato termicamente e non inoculato, sia pure in maniera più limitata (almeno durante le prime fasi di accrescimento) e rallentata. Ciò dimostra che la diffusione dei funghi AM può avvenire facilmente, su brevi distanze, attraverso vari vettori occasionali (schizzi di acqua, animali, vento, ecc.).

Va rilevato, comunque, che in ambedue i portainnesti la micorrizzazione con inoculo commerciale ha raggiunto valori superiori rispetto alle piante non inoculate e micorrizzate naturalmente. La maggiore biomassa prodotta dalle piante inoculate con il formulato commerciale, rispetto a quelle non trattate è indice di una migliore attività vegetativa come conseguenza ad una più alta micorrizzazione.

L'inoculo alloctono utilizzato, quindi, ha dato buoni risultati, come dimostrano la più rapida e maggiore micorrizzazione, assieme alla più abbondante biomassa, delle piante trattate.

Tali vantaggi sono stati rilevati soprattutto nelle prime fasi di crescita delle piante, quando, dopo l'espianto dal vivaio e l'impianto in pieno campo le condizioni di stress e le ferite che inevitabilmente si arrecano alle barbatelle, le rendono più soggette a deperimento e attacchi da parte di patogeni tellurici.

In tal caso, particolarmente utile può risultare, quindi, un arricchimento delle popolazioni di funghi AM nel suolo e a diretto contatto con le radici, così da garantire una buona risposta al trapianto, già al risveglio vegetativo. Tuttavia va considerato che l'impiego di funghi non endemici può non garantire i risultati attesi. Infatti, in taluni casi, gli stessi propaguli possono trovare condizioni edafiche e climatiche non del tutto idonee al loro attecchimento, senza escludere eventuali fenomeni di antagonismo con popolazioni della microflora-fauna endemica.

Altro possibile rischio che può manifestarsi a seguito dell'impiego di inoculi esotici è la possibile "preponderanza" di questi sulle popolazioni autoctone, i quali finirebbero per affermarsi in modo assoluto. Esempi di questi fenomeni sono assai noti e diffusi in tutte le componenti ecologiche viventi.

Infine, situazione forse ancora più temibile, non va escluso il rischio di possibili ibridazioni tra popolazioni di funghi AM esotici ed endemici, con conseguente perdita di biodiversità e deriva genetica.

Una soluzione per ovviare questi effetti, a volte indesiderati, potrebbe essere la selezione e l'impiego inoculi autoctoni, particolarmente adatti alle condizioni ecologiche e affini alle piante coltivate.

Questi inoculi, opportunamente somministrati alle colture agrarie, possono trovare largo utilizzo sia in ambito vivaistico che nelle fasi di impianto, contribuendo a garantire il sano e pieno sviluppo delle piante trattate.

5. Foto



Foto 1. barbatelle di vite americana fornite dal vivaio di moltiplicazione



Foto 2. Barbatella con l'intero apparato radicale sviluppato in vivaio, e barbatella prima dell'impianto dopo la rimozione delle radici.



Foto 3. Barbatelle trattate con l'inoculo micorrizico prima di essere poste a dimora



Foto 4. Campo sperimentale sito nel territorio di Marsala (TP)



Foto 5. Messa a dimora della barbatella con apposita forcella



Foto 6. Barbatelle impiantate in fitocelle.

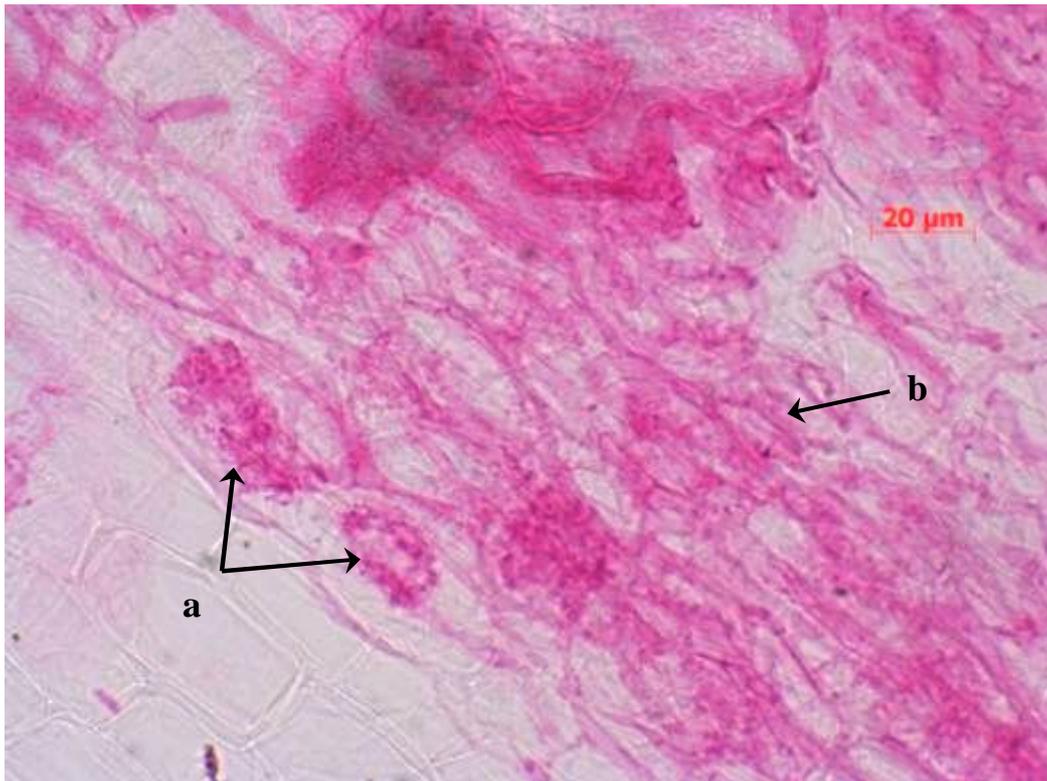


Foto 7. Frammenti di tessuto radicale sezionato longitudinalmente e trasversalmente, montati su vetrini e sottoposti ad esame microscopico per individuare le tipiche strutture micorriziche; a) arbuscoli intracellulari; b) micelio intramatriciale.

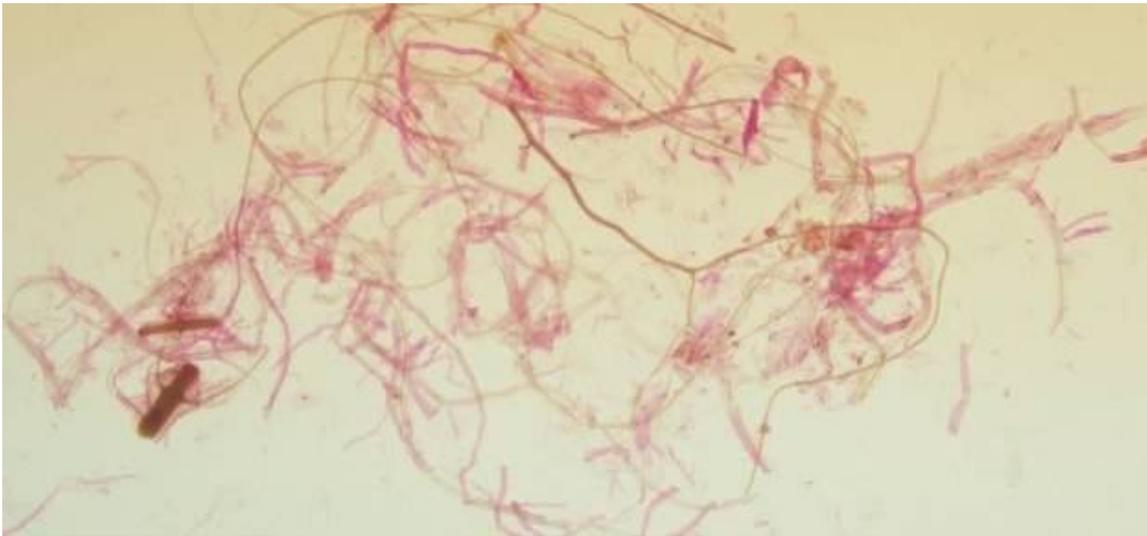


Foto 8. Radice di 140 Ruggeri allevato in pieno campo con inoculo micorrizico: percentuale di micorrizzazione a vista, 80% , per immagini, 80,83%

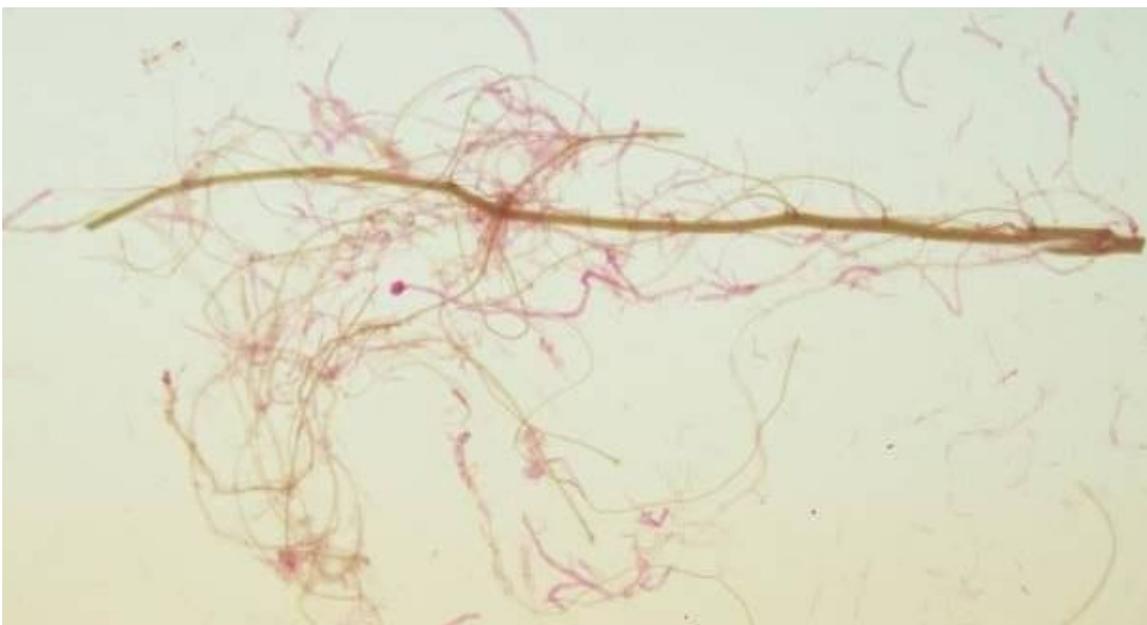


Foto 9. Radice di 140 Ruggeri allevato in pieno campo in assenza di inoculo micorrizico: percentuale di micorrizzazione a vista, 40%, per immagini, 39,11%

6. TABELLE

Tabella 2. Analisi della varianza (ANOVA) sulle percentuali di micorrizzazione ottenute dall'analisi delle immagini digitali di radici di barbatelle di due **portainnesti** di vite durante la stagione di crescita del 2009 (**epoca**) allevate in pieno campo ed in fitocella (**substrato**) in presenza o assenza di inoculo micorrizico esogeno (**micorrizzazione**)

Fonti di variabilità	SS tipo III	gdl	MSE	F-ratio	P
Substrato	2,75	1	2,75	0,04	0,82
Portainnesto	806,9	1	806,9	13,9	<0,001
Micorrizzazione	3603,2	1	3603,2	62,4	<0,001
Epoca	72071	1	72071	1248	<0,001
substrato × portainnesto	107,2	1	107,2	1,85	0,17
substrato × micorrizzazione	33,1	1	33,1	0,57	0,45
substrato × epoca	105,9	1	105,9	1,83	0,17
portainnesto × micorrizzazione	146,2	1	146,2	2,53	0,11
portainnesto × epoca	575,1	1	575,1	9,96	0,002
Micorrizzazione × epoca	982,5	1	982,5	17,02	<0,001
Substrato × portainnesto × Micorrizzazione	35,7	1	35,7	0,61	0,43
Substrato × portainnesto × epoca	113,6	1	113,6	1,96	0,16
substrato × micorrizzazione × epoca	26,4	1	26,4	0,45	0,50
portainnesto × micorrizzazione × epoca	178,8	1	178,79	3,09	0,08
substrato × portain. × micorrizzaz. × epoca	19,9	1	19,92	0,34	0,55
Errore	6464	112	57,7		

Tabella 3. Analisi della varianza (ANOVA) su un campione di biomassa secca prodotta da barbatelle di due **portainnesti** di vite alla fine della stagione di crescita del 2009 allevate in pieno campo ed in fitocella (**substrato**) in presenza o assenza di inoculo micorrizico esogeno (**micorrizzazione**)

Fonti di variabilità	SS tipo III	gdl	MSE	F-ratio	P
Portainnesto	1,7	1	1,7	27,7	<0,001
Substrato	72,13	1	72,13	1174	<0,001
Micorrizzazione	3,9	1	3,9	63,6	<0,001
portainnesto × substrato	0,29	1	0,29	4,7	0,030
portainnesto × micorrizzazione	0,10	1	0,101	1,6	0,201
Substrato × micorrizzazione	0,46	1	0,466	7,5	0,006
portainnesto × substrato × micorrizzazione	0,17	1	0,174	2,8	0,093
Error	24,02	391	0,06		

Tab 4. Valore medio del peso secco espresso in grammi dei campioni di biomassa prodotta da barbatelle di due portainnesti (**140 Ruggeri e 1103 Paulsen**) di vite alla fine della stagione di crescita del 2009 allevate in pieno campo ed in fitocella in presenza o assenza di inoculo micorrizico esogeno (**M+ e M-**)

	140 Ruggeri		1103 Paulsen	
	Pieno campo	fitocelle	Pieno campo	Fitocelle
M+	3,43	0,86	3,27	0,77
M-	2,95	0,58	2,96	0,71

7. FIGURE

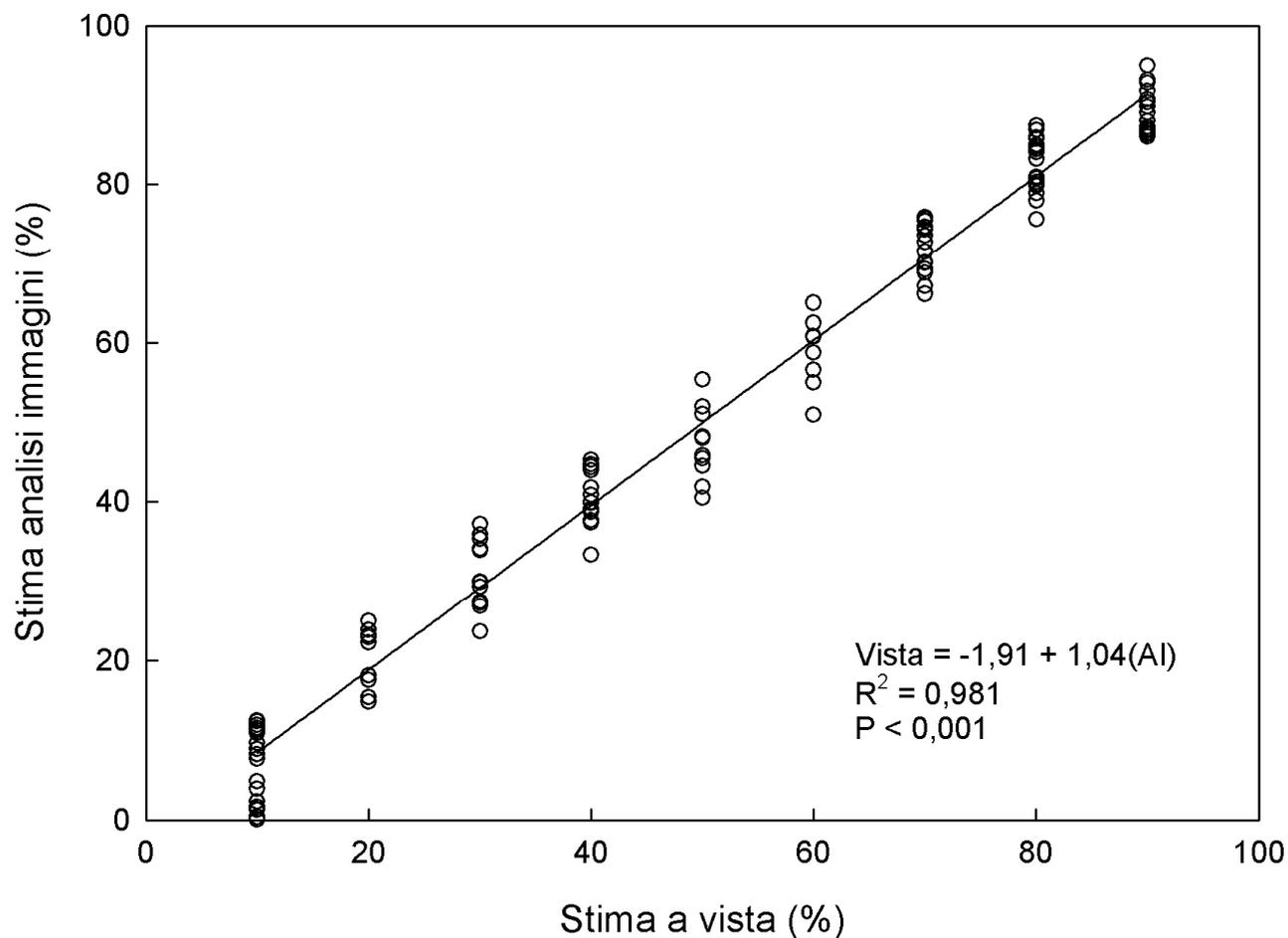


Fig 1. Associazione tra i valori percentuali di micorrizzazione ottenuti dalla stima a vista (VISTA) e da quella per immagini digitali (AI). In grafico sono riportati l'equazione della retta, i valori di R^2 e significatività derivanti dall'analisi di regressione.

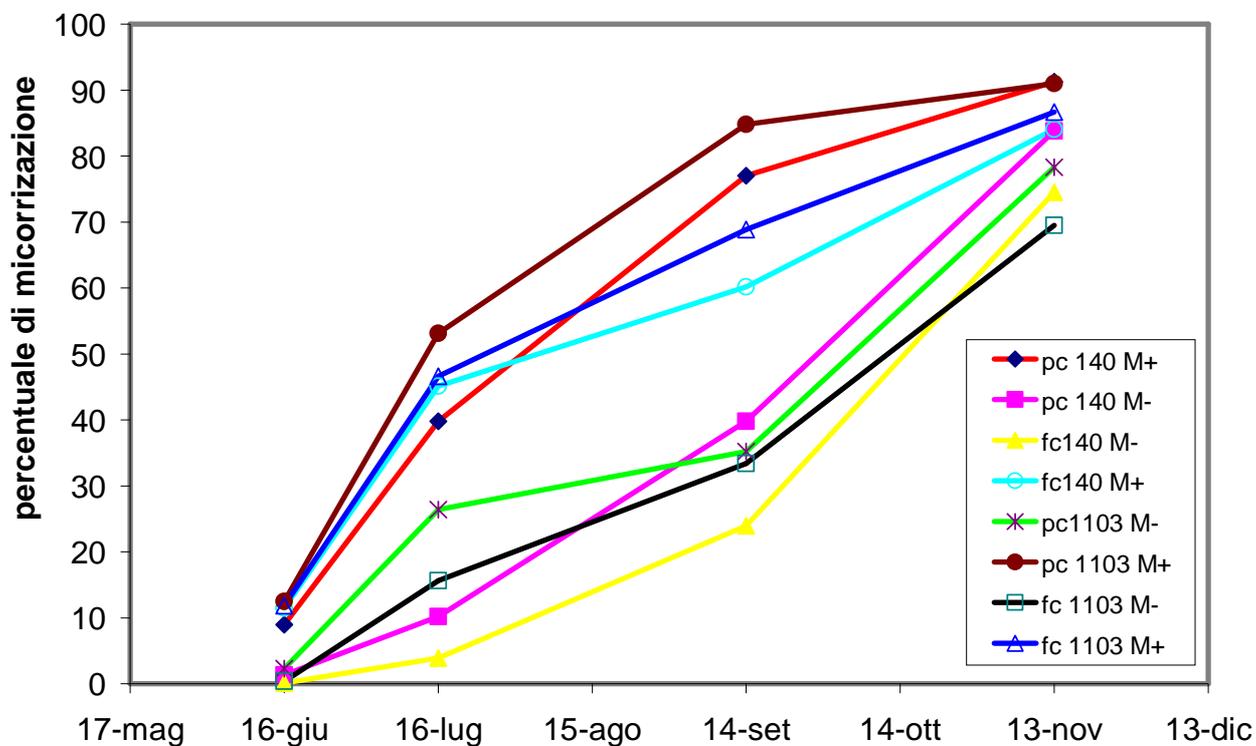


Fig. 2 Andamento della percentuale di micorrizzazione rilevata attraverso l'analisi delle immagini digitali su radici di barbatelle di vite americana delle cv. 140 Ruggeri e 1103 Paulsen (**140** e **1103**) durante la stagione di crescita del 2009 coltivate in pieno campo ed in fitocelle (**pc** e **fc**) in presenza o assenza di inoculo micorrizico esogeno (**M+** e **M-**)

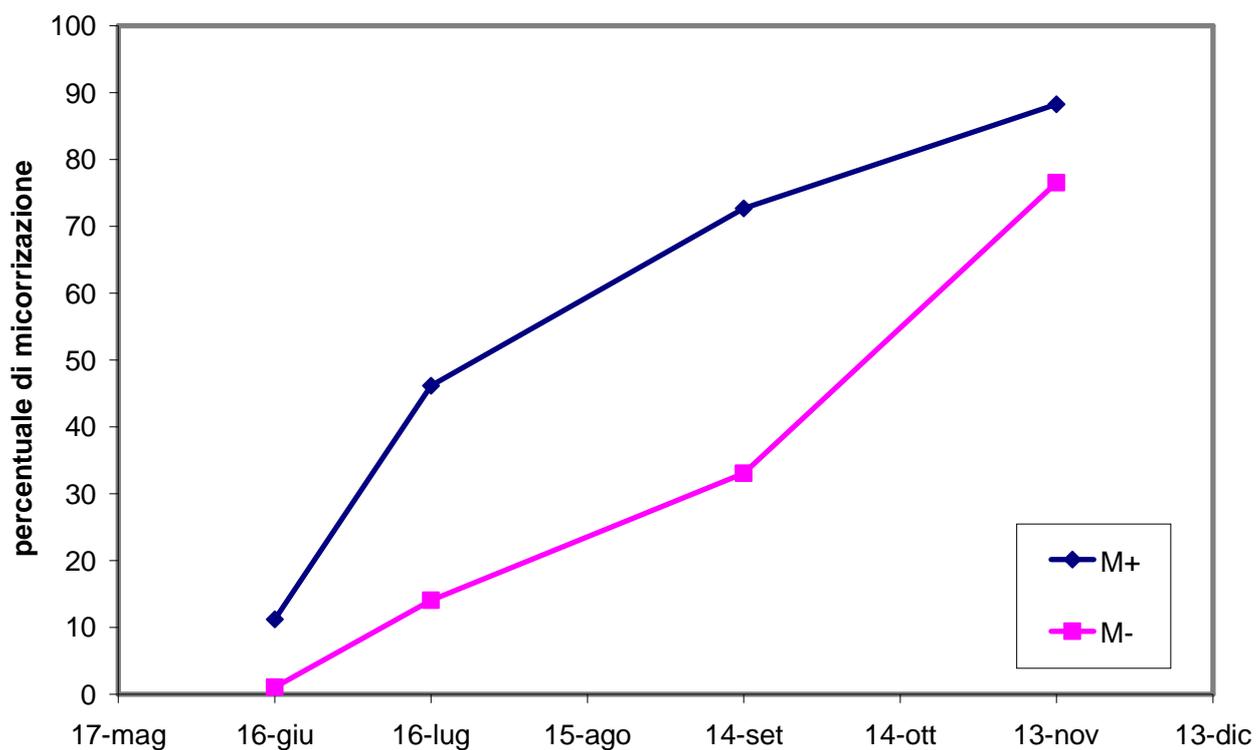


Fig 3. Andamento della percentuale di micorrizzazione rilevata attraverso l'analisi delle immagini digitali su radici di barbatelle di vite americana durante la stagione di crescita del 2009 in presenza o assenza di inoculo micorrizico esogeno (**M+** e **M-**)

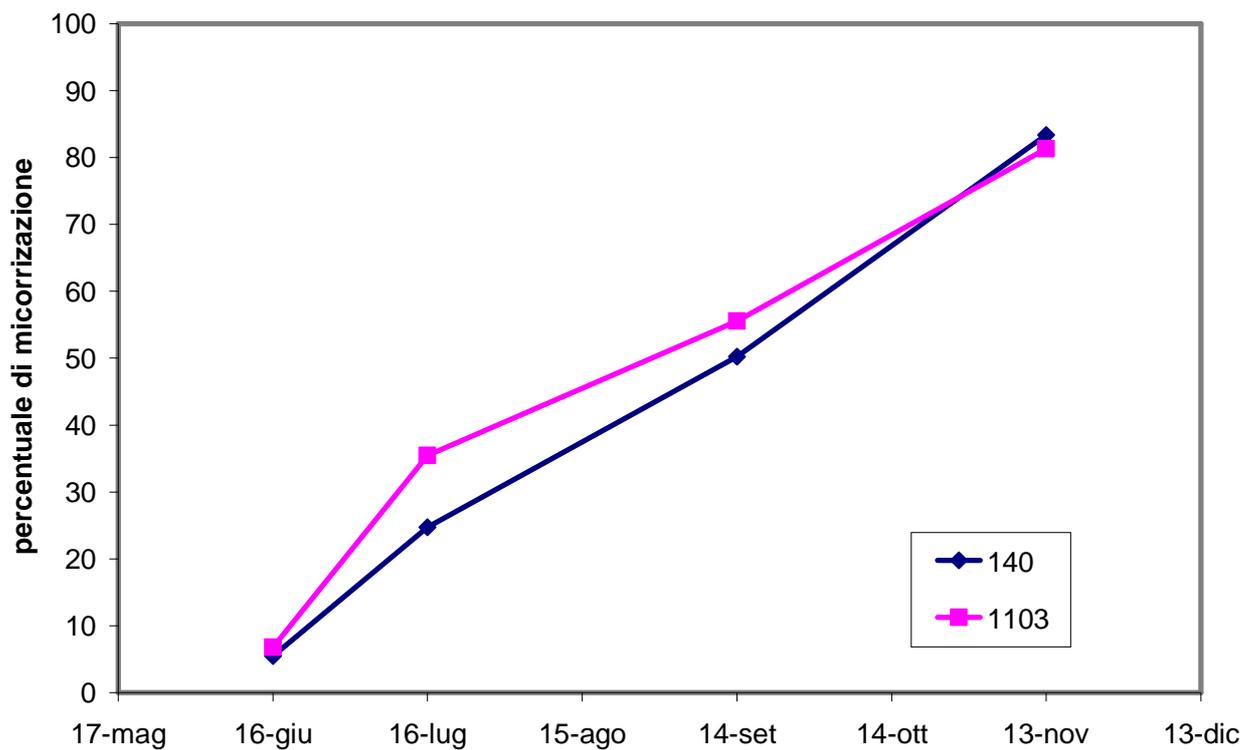


Fig 4. Andamento della percentuale di micorrizzazione rilevata attraverso l'analisi delle immagini digitali su radici di barbatelle di vite americana della cv. 140 Ruggeri e 1103 Paulsen (**140** e **1103**) durante la stagione di crescita del 2009

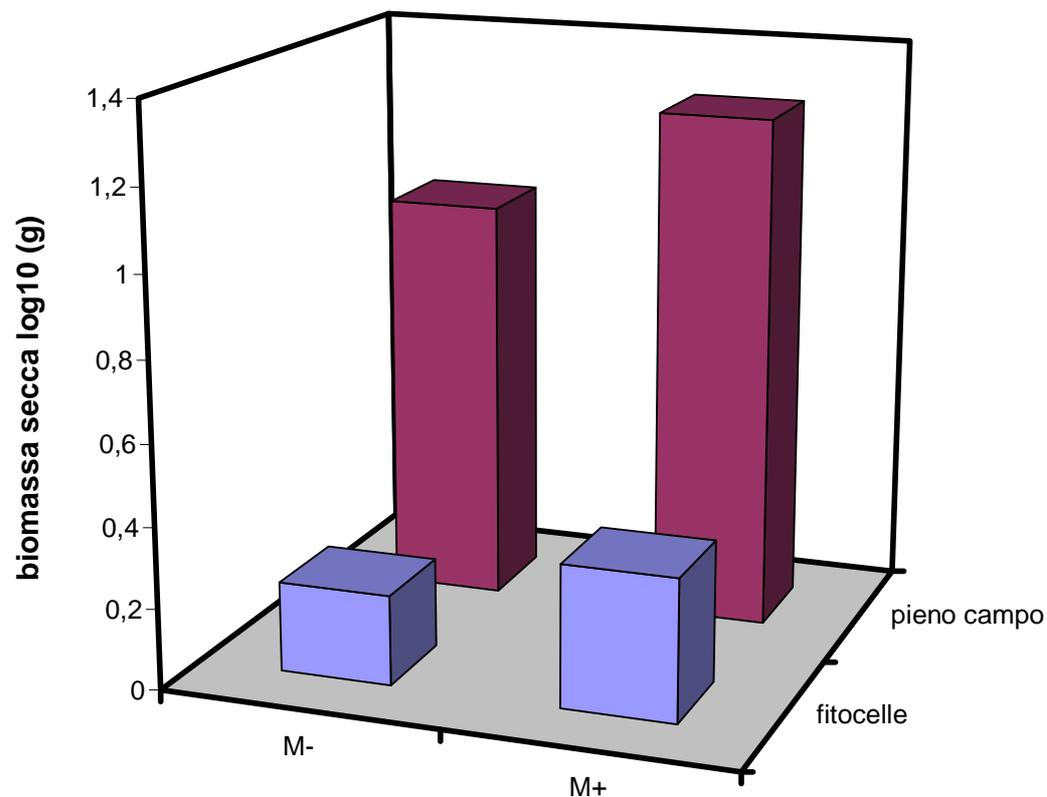


Fig 5. Peso della biomassa secca media (variabile trasformata mediante Log_{10}) prodotta da barbatelle di vite americana delle cv. 140 Ruggeri e 1103 Paulsen alla fine della stagione di crescita del 2009 allevate in pieno campo ed in fitocella in presenza o assenza di inoculo micorrizico esogeno (M+ e M-)

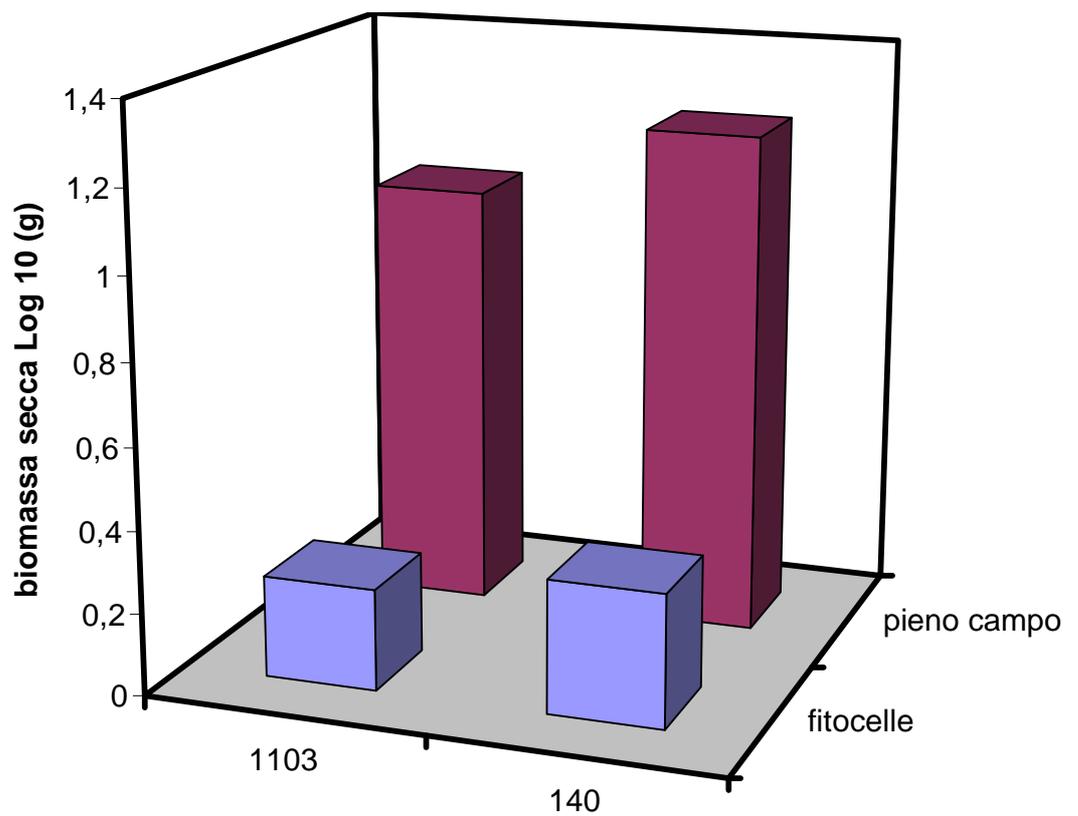


Fig 6. Peso della biomassa secca media (variabile trasformata mediante Log_{10}) prodotta da barbatelle di vite americana della cv. 140 Ruggeri e 1103 Paulsen (**1103** e **140**) alla fine della stagione di crescita del 2009 allevate in pieno campo ed in fitocella.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abott L. K., Robinson A.D., 1986: "The effect of VA mycorrhizae on plant growth" in VA Mycorrhiza, C.L. Powell & D.J. Bagayaraj Eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 113-130.
- Aguin O., Mansilla J.P., Villarino A., Sainz M.J., 2004. Effects of mycorrhizal inoculation on root morphology and nursery production of three grapevine rootstocks. *American Journal of Enology and Viticulture* 55,1, 108-111.
- Azcon R., Rodriguez R., Amora-Lazcano E., Ambrosiano E., 2008. Uptake and metabolism of nitrate in mycorrhizal plants as affected by water availability and N concentration in soil. *European Journal of Soil Science* 59, 131-138.
- Bavaresco L., Fregoni M., 2002. "le micorriza nella moderna viticoltura", *Phytomagazine*, 7.
- Bonfante-Fasolo P., 1984. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell C.L.; Bagayaraj D.J. (Eds), VA mycorrhiza, CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, 6-33.
- Bonfante P., Giovannetti M. (1982). *Quaderni di biologia. Le Micorriza*. Ed Piccin, Padova, pp 1-143.
- Bonfante P., Perotto S., 1992. La cooperazione tra piante e funghi simbiotici. *Le scienze* n. 284, 34-44.
- Chen X., Tang J., Zhi G., Hu S., 2005. Arbuscular Mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology* 28, 259-269.
- Cho K., Toler H., Lee J., Ownley B., Stutz J.C., Moore J.L., Augè R.M., 2006. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *Journal of Plant Physiology* 163, 517-528.
- Colla G., Roupheal Y., Cardarelli M., Tullio M., Rivera C.M., Rea E., 2008. alleviation of salt stress by arbuscular mycorrhizal in zucchini plants grown at low and high phosphorus concentration. *Biology and fertility of Soils* 44, 501-509.
- Deacon J.W., 1997. Funghi Parassiti di vegetali. In: Deacon J.W., *Micologia Moderna*, Calderin Ed agricole, 305-348.
- Deal D.R., Boothroyd C.W., Mai W.F., 1972. Replanting of vineyard and its relationship to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Phytopathology* 62, 172-175.

- Dodd J. C., Boddington C.L., Rodriguez A., Gonzalez- Chavez C., Mansur I., 2000. Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant and Soil* 226: 131-151.
- Dods D.D. Jr., Millner P.D., 1999. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74, 77-93.
- Eason W.R., Scullion J., Scott E.P., 1999. Soil parameters and plant responses associated with arbuscular mycorrhizas from contrasting grassland management regimes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 73, 245-255.
- Fontana A., Bonfante-Fasolo P., Schubert A., 1978. Caratterizzazione morfologica della micorriza vescicolo arbuscolare della vite. *Quaderni di Scienze Viticole ed Enologiche*. Università di Torino, 2, 137-144.
- Fregoni M. 2005: "Viticoltura di qualità" 37-40, 383-385.
- Gaur A., Varma A., 2007. Research Methods in Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In: Varma A., Oelmüller R. (Eds.), *Advanced Techniques in Soil Microbiology, Soil Biology* Vol.11, Springer- Verlag Berlin Heidelberg, 377-396.
- Giovanetti M., 1990: "Le micorrize come agenti di lotta biologica contro i patogeni delle piante agrarie", *informatore fitopatologico*, 10:17-20.
- Gosling P., Hodge A., Goodlass G., Bending G.D., 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113, 17-35.
- Hall I.R., 1984. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi. N: Powell C.Ll., Bagayaraj D.J. (Eds), *VA mycorrhiza*, CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, 57-94.
- Hart M.M., Reader R.J., 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 153, 335-344.
- Hart M.M., Reader R.J., 2005. The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiologia* 49, 269-279.
- Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P.W., 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394-431.
- Helgason T., Fitter A., 2005. The ecology and evolution of the arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologist* 19, 96-101.
- Janos D.P., Gáramszegi S., Beltrán B., 2008. Glomalin extraction and measurement. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 3, 728-739.

Janouskova M., Pavlikova D., Vasatka M., 2006. Potential contribution of arbuscular mycorrhiza to cadmium immobilisation in soil. *Chemosphere* 65, 1957-1965.

Johansson J.F., Paul L.R., Finlay R.D., 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS microbiology Ecology* 48, 1-13.

Lovato P., Guillemin J.P., Gianinazzi S., 1992. Application of commercial arbuscular endomycorrhizal fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. *Agronomie* 12, 10, 873-880.

Meyer A.H., Valentine A.J., Botha A., Archer E., Louw P.J.E., 2004. Young grapevine response and root colonisation following inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. 25, 1, 26-32.

Nappi P., Jodice R., Krofler A., 1980-81. Micorriza vescicolo-arbuscolari in vigneti dell'Alto Adige sottoposti a differenti tecniche di lavorazione del suolo. *Allionia*, 24, 27-42.

Nappi P., Jodice R., Luzzati A., Corino L., 1985. Grapevine root system and VA mycorrhizae in some soils of Piedmont. *Plant and Soil* 85, 205-210.

Parniske M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature* 6, 763-775.

Phillips J.M., Hayman D.S., 1970. improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions british Mycological Society* 55, 1, 158-160.

Picci G., 1994. Simbiosi. In: Picci G., *Microrganismi, Ambiente e produttività agrarian. Ed agricole*, 55-75.

Possingham J.V., Groot obbink J., 1971. Endotrophic micorrhiza and the nutrition of grape vine. *Vitis* 10, 120-130.

Romani M., Bonin I., Banciotto V., Lumini E., Beltarre G., Bonfante P., 2005: “Micorriza, un'utile simbiosi”, *AZ Bio, Lug-Ago*: 27-32.

Rufyikiri G., Huysmans L., Wannijn J., Van Heese M., Leyval C., Jakobsen I., 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean lover grown at high levels of uranium in soil. *environmental Pollution* 130, 427-436.

Schubert A., Bonfante-Fasolo P., Fontana A., 1908-81. Interazioni tra micorriza vescicolo arbuscolare e apporti di fosforo nella vite. *Allionia*, 24, 19-25.

Schwarzott D., Walzer C., Schubler A., 2001. Glomus, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21, 2, 190-197.

Shubler A., Schwarzott D., Walker C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105, 12, 1413-1421.

Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W., Walter M.H., 2003. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. *Journal of chemical Ecology* 29, 9, 1955-1979.

Tawaraya K., TurJaman m., Ekamawanti H.A., 2007. Effect of arbuscular mycorrhizal colonization on nitrogen and Phosphorus uptake and growth of Aloe vera L. *hortscience*, 42, 7, 1737-1739.

Tian C.Y., Feong G., Li X.L., Zhang F.S. 2004. Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. *Applied Soil Ecology* 26, 143-148.

Torta L., 1990: Ruolo delle micorriza nelle colture agrarie e prospettive d'impiego. *Sviluppo Agricolo*, 14 (11), 11-14.

Torta L., 1996. Micorrize e funghi micorrizogeni come bioindicatori del bosco. *Atti 4 giornate Confederaz. Europ. Micol. Mediter. (a.e.)*. Poggibonsi, Novembre 1996, 79-87.

Torta L. 2000. Preliminary observations on the interactions between mycorrhizae and Phytophthora species in Citrus seedlings. *Proceedings of the 5 Congress of European Foundation of Plant Pathology: " Biodiversity in Plant Pathology"*, Taormina – Giardini Naxos, Italy, 18-22/09/2000, 577-580.

Torta L., Mondello V., Burruano S., 2003. Valutazione delle caratteristiche morfo-anatomiche di alcune simbiosi micorriziche mediante tecniche colorimetriche usuali ed innovative. *Micologia Italiana* anno XXXII, 2, 53-59.

Usha K., Mathew R., Singh B., 2005. Effect of arbuscular mycorrhiza on bud sprout and ripening in grapevine (vitis vinifera L.) cv Perlette. *Biological Agriculture and Horticulture* 23, 1, 73,83.

Vhen X., Tang J., Zhi G., Hu S., 2005. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species. *Applied Soil Ecology* 28, 259-269.

Wang F.Y., Lin X.G., Yin R., 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus Acaulospora mellea decrease Cu phytoextraction by maize from Cu.contaminated soil. *Pedobiologia* 51, 99-109.

INDICE

1. Introduzione
 - 1.1 Caratteri generali delle associazioni micorriziche
 - 1.2 Classificazione delle micorriza
 - 1.3 Glomeromycota
 - 1.4 Caratteri generali delle associazioni AM
 - 1.5 Associazioni micorriziche arbuscolari in Vitis Vinifera (L.)
 - 1.6 Inoculi Fungini AM
2. Scopo della tesi
3. Materiali e metodi
 - 3.1 Materiale vegetale
 - 3.2 Inoculo di funghi AM
 - 3.3 Trapianto in pieno campo
 - 3.4 Trapianto in fitocelle
 - 3.5 Prelevamento di campioni radicali
 - 3.6 Colorazione delle radici
 - 3.7 Stima dell'indice di micorrizzazione
 - 3.7.1 Stima a vista
 - 3.7.2 Analisi delle immagini digitali
 - 3.8 Prelievo di campioni di biomassa
 - 3.9 Analisi statistica dei dati
4. Risultati e discussioni
 - 4.1 Correalazione tra stima a vista e analisi per immagini
 - 4.2 Confronto del livello di micorrizzazione
 - 4.3 Confronto della biomassa secca
 - 4.4 Considerazioni conclusive
5. foto
6. Tabelle
7. Figure
8. Bibliografia