



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO  
CURRICULUM PRODUZIONE E PROTEZIONE DELLE PIANTE

**RUOLO DELL'INOCULO CON FUNGHI  
ARBUSCOLO MICORRIZICI SUI PATTERN  
DI EMISSIONE DI FIORI E BACCELLI IN  
UN SET DI GENOTIPI DI PHASEOLUS  
VULGARIS ALLEVATO IN PIENO CAMPO**

TIPO TESI: sperimentale

**Studente:**  
CHIARA SANTAMARINA

**Relatore:**  
PROF. SERGIO SAIA

**Correlatore:**  
PROF. LAURA NANNI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019



# SOMMARIO

SOMMARIO .....	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE .....	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI .....	8
ABSTRACT.....	9
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI .....	11
1.1 I microrganismi promotori della crescita vegetale (PGPM) .....	11
1.2 I benefici agronomici dei PGPM .....	17
1.2.1 I batteri fissatori dell'azoto .....	17
1.2.2 Altri batteri promotori.....	19
1.2.3 Funghi non micorrizici.....	22
1.2.4 Funghi arbuscolo micorrizici (AMF).....	23
1.3 Le variazioni genotipiche nel rapporto con PGPM.....	27
1.3.1 L'interazione con <i>Phaseolus</i> e altre leguminose.....	29
1.4 Obiettivo della ricerca.....	35
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI .....	37
2.1 Area dello studio e descrizione del sito .....	37
2.2 Dispositivo sperimentale.....	40
2.2.1 Esperimento 1: <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	40
2.2.2 Esperimento 2: <i>Vigna unguiculata</i> .....	43
2.3 Rilievi effettuati .....	43
2.4 Calcoli e analisi statistica .....	44
CAPITOLO 3 RISULTATI.....	45
3.1 Esperimento 1: <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	45
3.2 Esperimento 2: <i>Vigna unguiculata</i> .....	54
CAPITOLO 4 DISCUSSIONE.....	56
CONCLUSIONI .....	59
RINGRAZIAMENTI .....	60
BIBLIOGRAFIA .....	61

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 2-1: Caratteristiche del suolo dell'appezzamento sede della prova.....	37
Tabella 2-2: Storia agronomica dell'appezzamento sede della prova.....	38
Tabella 2-3: Lista dei genotipi di <i>P. vulgaris</i> utilizzati nell'esperimento .....	41
Tabella 2-4: Composizione inoculo MycoUp (Biogard®) .....	41
Tabella 2-5: Lista dei genotipi di <i>V. unguiculata</i> utilizzati nell'esperimento .....	43
Tabella 2-6: Composizione inoculo Coveron leguminose (ItalPollina®).....	43
Tabella 3-1: Risultati dell'analisi statistica dei dati per ciascun esperimento. I fattori sono l'inoculo (IN), il gruppo di genotipi (GR) e la varietà (VAR) inserito nel GR. I valori in grassetto sono significativi per $p < 0,05$ .....	46
Tabella 3-2: Dataset completo dell'esperimento 1 – <i>Phaseolus vulgaris</i> ; in colonna ci sono le variabili rilevate nel trattamento con inoculo (AMF) e nel controllo (CONTR), in riga il codice delle varietà, inserite nel rispettivo gruppo di genotipi [élite cultivar (ELCVR), linee di introgressione rispettivamente più produttive in Italia (IT), Romania (RO), Spagna (SP)] .....	47
Tabella 3-3: Dataset completo dell'esperimento 2 – <i>Vigna unguiculata</i> ; in colonna ci sono il trattamento di controllo (CONTR), con l'inoculo semplice (AMF) e con l'inoculo complesso (MIX); in riga è riportato il codice delle varietà .....	55

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Reticolo di Hartig (da van der Heijden et al., 2015) .....	14
Figura 1-2: Ectomicorriza formata tra il fungo <i>Russula ochroleuca</i> e la radice di Faggio comune (da van der Heijden et al., 2015) .....	14
Figura 1-3: Cellule della radice di <i>Pisum sativum</i> con arbuscoli (barra, 50 $\mu$ m; da van der Heijden et al., 2015).....	16
Figura 1-4: Radice di trifoglio colorata con trypan-bleu colonizzata da <i>Glomus intraradicens</i> ( $\times$ 150; da van der Heijden et al., 2015) .....	16
Figura 2-1: Diagramma di Bagnouls Gaussen della stazione climatica di Agugliano – Borgo Ruffini, cod. ST32. I dati sono stati forniti da ASSAM – Centro operativo di agrometeorologia, Agenzia Servizi al Settore Agroalimentare delle Marche per il periodo 01 Gennaio 1960 – 31 Dicembre 2019 .....	38
Figura 2-2: Temperature medie e precipitazioni cumulate su base decennale per il periodo Maggio 2019 – Agosto 2019 e relative medie di lunga durata (linee continue nere) nella stazione climatica di Agugliano – Borgo Ruffini, cod. ST32 (circa 3 km dalla sede della prova). I dati sono stati forniti da ASSAM – Centro operativo di agrometeorologia, Agenzia Servizi al Settore Agroalimentare delle Marche per il periodo 01 Maggio 2019 – 30 Settembre 2019 .....	39
Figura 2-3: Pesatura dell'inoculo durante la preparazione del materiale da seminare .....	42
Figura 2-4: Pesatura dei semi durante la preparazione del materiale da seminare .....	42
Figura 3-1: Numero di fiori per pianta dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media $\pm$ errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per $p>0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN) .....	48
Figura 3-2: Numero di baccelli per pianta dei diversi gruppi genotipici (GR) inoculati (AMF, barre grigie) e non inoculati (CONTR, barre bianche). Le barre con lettere in comune non sono diverse per $p>0,05$ .....	49

Figura 3-3: Numero di baccelli per pianta dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN) ..... 50

Figura 3-4: Rapporto baccelli:fiori dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN) ..... 51

Figura 3-5: Produzione per pianta dei diversi gruppi genotipici (GR) inoculati (AMF, barre grigie) e non inoculati (CONTR, barre bianche). Le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$  ..... 52

Figura 3-6: Produzione per pianta dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN) ..... 52

Figura 3-7: Peso medio del baccello dei diversi gruppi genotipici (GR) inoculati (AMF, barre grigie) e non inoculati (CONTR, barre bianche). Le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$  ..... 53

Figura 3-8: Peso medio del baccello dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN) ..... 54

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

AMF	Funghi arbuscolo micorrizici, arbuscular mycorrhizal funghi;
EMF	Funghi ectomicorrizici, ecto-mycorrhizal funghi;
NFB	Batteri azotofissatori, nitrogen (or dinitrogen) fixing bacteria;
R:S	Rapporto radici-parte aerea, root to shoot ratio;
PGPM	Microorganismi promotori della crescita vegetale, plant growth promoting microbes;
ePGPR	Rizobatteri promotori della crescita vegetale extracellulari, extracellular plant growth promoting rhizo-bacteria;
iPGPR	Rizobatteri promotori della crescita vegetale intracellulari, intracellular plant growth promoting rhizo-bacteria;
ISR	Resistenza sistemica indotta, induced systemic resistance;
BNF	Fissazione biologica dell'azoto, biological nitrogen fixation;
NFB	Batteri fissatori dell'azoto, nitrogen fixing bacteria;
ERM	Micelio extraradicale, extra-radical mycelium;
RIL	Recombinant inbred lines;



## ABSTRACT

The plant growth promoting microbes (PGPM) stimulate plant growth by enhancing the nutrient uptake, producing numerous plant growth regulators, protecting plants from biotic and abiotic stress, and through various indirect mechanisms improving the soil conditions. Many plant species establish symbiosis with the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), obligate soilborn plant-symbiont are able to strongly support crop growth and increase yields. Legumes can host AMF and N<sub>2</sub>-fixing bacteria (NFB) at the same time. In the tripartite symbiosis the AMF use its extraradical mycelium (ERM) to take up elements, especially phosphorus and microelements, from the soil and deliver it to the plant. This indirectly support the biological N<sub>2</sub> fixation (BNF). At the one time, rhizobium can provide the AMF nitrogen necessary for its development, whereas the plant supplies to both microbes photosynthates to sustain their activity.

Despite the importance of both the AMF and NFB, the information on the role of the AMF inoculation in field conditions on the growth and yield of many legumes is unclear. In particular, AMF have shown to strongly support both the plant and the BNF under pot conditions and especially when stresses occur, but such result was often unseen under field conditions when varying the plant genotype used. Thus, genotypic traits can be important to support the plant-AMF symbiosis. In addition, information on the role of the AMF inoculation in the field on green bean growth, physiology and yield are dramatically scarce.

Aim of this study was thus to evaluate the effect of an AMF, *Glomus iranicum* on pod production in a set of 17 french bean genotypes, grown in low input conditions in the field. The genotypes were both elite cultivar (ELCVR) and introgression lines (INL) derived from BRESOV breeding program. The INL chosen were 3 groups of 4 lines with outstanding yields in previous tests in Italy (IT), Romania (RO) and Spain (SP). The research also aimed to compare the genotype groups (ELCVR, IT, RO, and SP) for their productivity and responsiveness to inoculation with AMF. During crop development, flowers number was counted and pods collected, counted and weighted to derive yield components (number of pods per plant and mean pod weight). The experiment was performed in Italy, in a silty-clayey soil in the experimental farm "Pasquale Rosati" (Agugliano, AN, Marche region).

Inoculation with *Glomus iranicum* positively influenced pod yield in *Phaseolus vulgaris*, both increasing the pod number per plant and pod mean weight. However, this effect appeared variable with genotypes and above all with genotypic group. Indeed, the group IT and RO appeared more responsiveness to inoculation than ELCVR and it appeared slightly

related to the production per plant (ELCVR produced on average more than the INL group). Some inoculated IT and RO lines produced 191% to 508% more than their respective controls, whereas in the inoculated ELCVR Contender and Rocquencourt the increases were only 90% and 64% compared to their uninoculated controls. In contrast, SP lines didn't show this despite being the least productive, probably due to the low adaptability to the cultivation environment. Lastly, the increase in the mean pod weight detected in ELCVR and IT after the AMF inoculation suggests the possibility of anticipating pod harvest to have more collection flows without any increase in the unit weight.

Another study was conducted to evaluate the response to inoculation with the same inoculum previously used (AMF) and with a mix of PGPM (MIX) on two genotypes of *Vigna unguiculata*, which is also cultivated for her green pod. The MIX was composed of two different AMF species (*Rhizophagus intraradices* and *Funneliformis mosseae*), *Bradhyrhizobium* spp. and *Trichoderma atroviride*.

*Vigna unguiculata* didn't respond to the inoculum, probably because of her greater rusticity and efficiency in nutrient and water uptake. Nevertheless, single pod weight increased when plants were inoculated with the MIX compared to the AMF or control, and this maybe have been due to the presence of *Bradyrhizobium*.

In conclusion, the effect of the inoculum with AMF and PGPM varied with the genotype and it was highly influenced by the group to which genotype belonged.

The present results highlight important information on the relationship between bean genotypes and arbuscular mycorrhizal fungi and may be of help to select high yielding genotypes that at the one time can positively respond to the soilborne beneficial microbes.

# Capitolo 1

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

### 1.1 I microrganismi promotori della crescita vegetale (PGPM)

I microrganismi promotori della crescita vegetale (indicati PGPM dall'acronimo dei termini inglesi '*plant growth promoting microbes*') sono microrganismi spesso localizzati nella rizosfera e in grado di promuovere la crescita e lo sviluppo delle piante attraverso diversi meccanismi, sia diretti, sia indiretti. I PGPM possono essere protozoi, batteri e funghi e sono coinvolti nella solubilizzazione dei nutrienti del suolo, producono regolatori di crescita, contrastano gli organismi fitopatogeni e riducono l'entità degli stress abiotici. Inoltre, possono avere un ruolo nel miglioramento della struttura del suolo e essere usati nel biorisanamento di suoli inquinati per la loro capacità di sequestrare metalli pesanti e degradare composti xenobiotici (Tarkka *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2019).

Nella rizosfera i PGPM interagiscono con le radici delle piante, le quali rilasciano composti carboniosi a basso peso molecolare che, a loro volta, supportano la crescita dei microrganismi (Tarkka *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2019). Tali essudati possono rappresentare fino al 20% del carbonio totale netto fissato dalle piante (Rovira, 1991) e possono aumentare di un ulteriore 10-20% in casi particolari di simbiosi con funghi micorrizici (Bonkowski, 2004; van der Heijden *et al.*, 2015). Gli essudati radicali, a loro volta, agiscono come messaggeri che stimolano le interazioni tra radici e microrganismi tellurici e formano le basi per un ambiente ricco di diversità microbiologica quale è la rizosfera (Prasad *et al.*, 2019).

Per quanto concerne la loro attività, i PGPM sono influenzati da fattori biotici, quali specie e genotipi vegetali, fase fenologica, meccanismi di difesa o comunque reazione della pianta, e abiotici, come tipo di suolo, pratiche di gestione e condizioni climatiche (Vacheron *et al.*, 2013; Agnelli *et al.*, 2014; van der Heijden *et al.*, 2015; Prasad *et al.*, 2019).

I protozoi rappresentano la classe di PGPM meno rilevante dal punto di vista applicativo e il loro effetto sulla crescita delle piante è correlato al rilascio di nutrienti dalla biomassa batterica e dalla sostanza organica del suolo. Infatti, i batteri solubilizzano i nutrienti dal suolo, sequestrandone temporaneamente una parte per aumentare la loro biomassa. I protozoi utilizzano come pabulum la stessa microfauna tellurica, in un meccanismo definito "microbial loop": il consumo di batteri da parte dei protozoi libera elementi importanti per la nutrizione vegetale che diventeranno disponibili per le piante (Bonkowski, 2004). Oltre ad avere un ruolo nella mineralizzazione dei nutrienti dalla biomassa microbica, i protozoi

stimolano la produzione di composti auxino-simili da parte dei batteri, che vanno di conseguenza a stimolare la formazione di radici laterali nelle piante, e l'attività dei batteri nitrificanti, contribuendo all'aumento localizzato della concentrazione di nitrato (Tarkka *et al.*, 2008).

I batteri sono i microorganismi più abbondanti nella rizosfera, ma solo un numero variabile, probabilmente dal 2 al 5%, sono promotori della crescita vegetale. I rizobatteri promotori della crescita vegetale (PGPR, da '*plant growth promoting rhizobacteria*') sono un gruppo di batteri in grado di colonizzare attivamente l'apparato radicale delle piante, migliorandone la crescita e le rese (Prasad *et al.*, 2019). Possono essere liberi o simbiotici. I batteri liberi generalmente si stabiliscono sul rizopiano, ossia la superficie della radice, o negli spazi tra le cellule della corteccia radicale, vengono anche definiti anche ePGPR e appartengono principalmente ai generi *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Serratia*. I batteri simbiotici invece vivono in strutture all'interno delle cellule radicali o in strutture formate dalla compartecipazione dell'attività batterica e radicale, i noduli, quindi vengono definiti iPGPR e appartengono principalmente ai generi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, i quali instaurano simbiosi con le leguminose, e *Frankia*, che instaura simbiosi con specie legnose (sia arboree, sia arbustive) appartenenti a famiglie diverse da quella delle Leguminosae (Tarkka *et al.*, 2008). La simbiosi si instaura grazie a una serie di interazioni molto specifiche tra i due simbiotici. La pianta rilascia molecole segnale di natura flavonoica, che inducono nei rizobi l'espressione dei geni di nodulazione; i rizobi, a loro volta, rilasciano lipochitooligosaccaridi che innescano divisioni mitotiche nelle cellule radicali, da cui si formano i noduli. Numerosi fattori di compatibilità tra ospite e microsimbionte influenzano la nodulazione: la presenza di molecole che mediano il segnale, le proprietà chimico-fisiche del suolo e il potenziale produttivo della coltura (Hayat *et al.*, 2010). Alcuni studi su specie non leguminose hanno dimostrato che i rizobi possono infettare le radici di altre specie agrarie come riso, frumento e mais, contribuendo all'aumento delle rese e provocando benefici comparabili ad altri PGPR (Hayat *et al.*, 2010; Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Tuttavia, nel caso di associazione tra rizobi e specie non leguminose, la simbiosi non si concretizza in un processo di azotofissazione simbiotica di grandi masse di N e consiste in pochi kg N ha<sup>-1</sup> anno<sup>-1</sup> (contro le diverse decine o centinaia di kg N ha<sup>-1</sup> anno<sup>-1</sup> fissati grazie all'azotofissazione simbiotica rizobi-leguminose). È stato ipotizzato che questo possa derivare da una co-evoluzione delle specie (Yanni *et al.*, 1997). Sono PGPR anche alcune

specie di Attinomiceti, i quali hanno mostrato potenzialità notevoli nel contrastare diversi funghi patogeni radicali e nel promuovere la crescita in presenza di alte concentrazioni di metalli pesanti (Dimkpa *et al.*, 2008; Franco-Correa *et al.*, 2010).

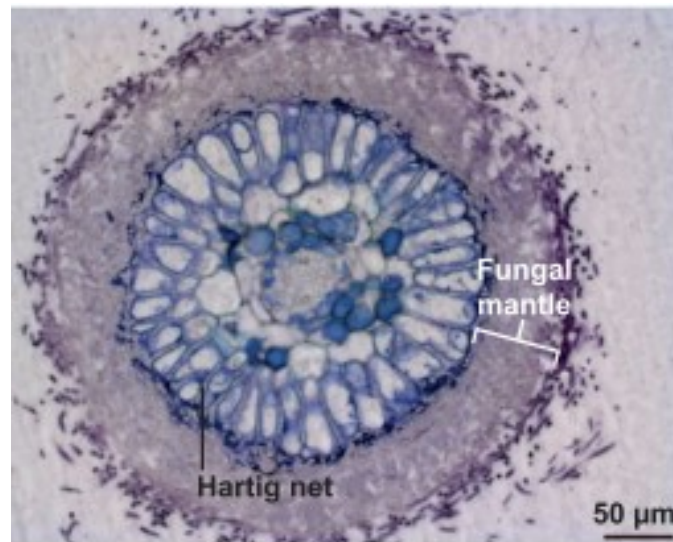
Anche nel regno dei funghi esiste una pluralità di specie benefiche per le piante. Tra i funghi che hanno mostrato effetti positivi per la crescita vegetale distinguiamo funghi micorrizici e funghi non micorrizici.

La simbiosi micorrizica è un'associazione mutualistica tra piante e funghi del suolo che si instaura a livello dell'apparato radicale, il quale viene colonizzato dalle strutture del fungo: il fungo riceve dalla pianta carboidrati derivati direttamente dalla fotosintesi in cambio di elementi minerali e acqua assorbiti dal suolo circostante attraverso il suo esteso sistema di ife (Smith & Read, 2010). Di conseguenza, la simbiosi micorrizica comporta una relazione intima tra i bionti e quindi una forte influenza sulla crescita e sulla fitness delle piante (van der Heijden *et al.*, 2015). È molto diffusa in natura e interessa tra il 70% e l'80% delle specie vegetali: si stima che esistano c. 50 000 specie di funghi micorrizici che formano associazioni simbiotiche con c. 280 000 specie di piante (van der Heijden *et al.*, 2015). Solo le *Brassicaceae*, le *Juncaceae*, le *Caryophyllaceae*, le *Cyperaceae* e le *Chenopodiaceae* non sono in grado di formare questo tipo di simbiosi. Le micorrize hanno un ruolo importante sia in ecosistemi naturali, sia negli agro-ecosistemi in quanto regolano il ciclo del carbonio e dei nutrienti, influenzano la fertilità del suolo e svolgono altre importanti funzioni ecosistemiche.

A seconda delle caratteristiche morfologiche-strutturali, fisiologiche e funzionali distinguiamo funghi ectomicorrizici (EMF), funghi arbuscolo micorrizici (AMF), micorrize ericoidi e micorrize orchidoidi; c. il 74% delle piante formano associazioni di tipo AM, solo il 2% sono EM (van der Heijden *et al.*, 2015).

I EMF sono Basidiomiceti o Ascomiceti che instaurano una simbiosi con piante arboree o arbustive, appartenenti alle famiglie vegetali delle *Betulaceae*, *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Salicaceae* e *Dipterocarpaceae*. Le ife si sviluppano formando un mantello fungino (detto 'micoclona') di spessore variabile attorno alle radici fini delle piante, che contribuisce ad aumentare notevolmente la superficie di substrato esplorata dalle radici. Nonostante nelle ectomicorrize il fungo non penetri mai all'interno delle cellule della pianta ospite, il mantello si estende in una certa misura anche nell'apoplasto della corteccia radicale, tra le cellule epidermiche. Qui crea una struttura molto ramificata (reticolo di Hartig) che rappresenta l'interfaccia in cui avvengono gli scambi di acqua, nutrienti e fotoassimilati tra pianta e fungo (Fig. 1-1). Generalmente la radice micorrizata da EMF risulta profondamente

trasformata: la crescita apicale è fortemente ridotta o bloccata, assume una forma coralloide e scompaiono i peli radicali (Fig. 1-2) (Tarkka *et al.*, 2008; Smith & Read, 2010; van der Heijden *et al.*, 2015).



**Figura 1-1: Reticolo di Hartig (da van der Heijden *et al.*, 2015)**



**Figura 1-2: Ectomicorriza formata tra il fungo *Russula ochroleuca* e la radice di *Faggio comune* (da van der Heijden *et al.*, 2015)**

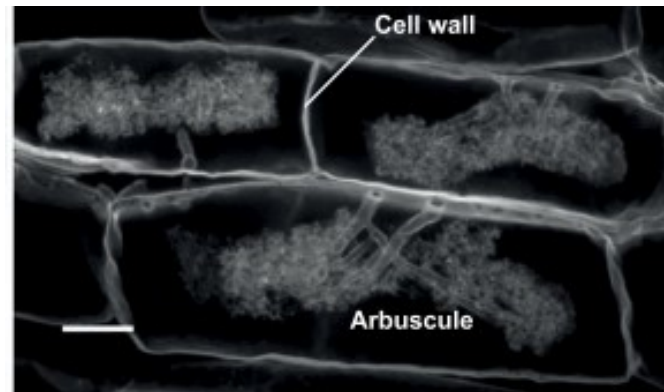
I AMF sono funghi appartenenti al subphylum *Glomeromycotina* nel phylum *Mucoromycota* (Spatafora *et al.*, 2016), precedentemente posti nel phylum *Glomeromycota*. Sono biotrofi obbligati ed entrano in simbiosi con la maggior parte delle specie vegetali, di cui un gran numero coltivate, appartenenti a diverse famiglie botaniche quali, ad esempio, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Poaceae* e *Solanaceae*. La presenza di AMF è stata rilevata in

un gran numero di ambienti, dai deserti alle foreste pluviali, in ambienti acquatici, in zone particolarmente inquinate o con alte concentrazioni di sali e sodio.

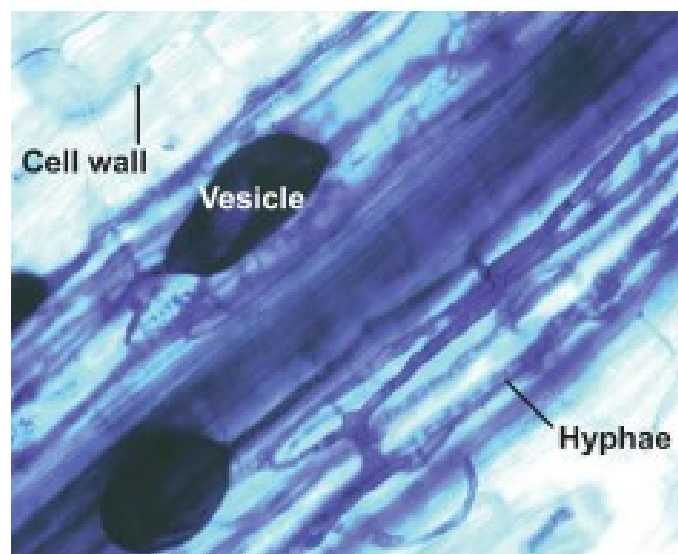
Gli AMF si distinguono dagli EMF per la formazione di micelio intraradicale: le ife possono penetrare attivamente all'interno delle radici dell'ospite, colonizzando l'apoplasto della corteccia radicale o penetrando direttamente all'interno delle cellule della corteccia, senza invadere mai il cilindro centrale e né le cellule dell'apice radicale. All'interno delle cellule corticali le ife si diramano a formare strutture ramificate, gli arbuscoli, responsabili degli scambi nutrizionali tra i due simbionti (Fig. 1-3). Tra l'arbuscolo e il citoplasma si forma una parete periarbuscolare di natura polisaccaridica in cui compaiono strutture proteiche originate da compartecipazione di materiale vegetale e fungino, soprattutto trasportatori preposti agli scambi di nutrienti e molecole segnale tra i due bionti (Bonfante, 2001; Smith & Read, 2010). Altre strutture prodotte dalle ife fungine sono le vescicole, rigonfiamenti tondeggianti inter- o intracellulari, in cui si accumulano granuli di grasso con funzione di riserva (Fig. 1-4). Non tutte le specie di funghi sono in grado di formare vescicole, al contrario tutte formano gli arbuscoli (Smith & Read, 2010). Anche se la radice colonizzata dai funghi AM non subisce variazioni morfologiche notevoli come avviene per le EM, l'apparato radicale mostra grandi quantità di ife che corrono parallele all'endoderma all'interno del cilindro centrale (Fig. 1-4). Inoltre, l'esteso micelio extraradicale (ERM) può far variare il grado di ramificazione e le dimensioni delle radici, che possono aumentare di centinaia di volte la loro superficie di assorbimento e il volume di suolo esplorabile (Smith & Read, 2010).

Altri funghi che interagiscono in diversi modi con le piante sono i funghi endofiti del genere *Trichoderma* e dell'ordine *Sebacinales*, i quali instaurano associazioni mutualistiche, migliorano la crescita, lo sviluppo e la nutrizione delle piante ospiti e conferiscono maggiore resistenza agli stress abiotici e indotti da patogeni (Varma *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Weiß *et al.*, 2016; Mohamed *et al.*, 2019; Saia *et al.*, 2019a). *Trichoderma* è un genere di funghi saprofiti, a vita libera, comuni nella rizosfera, che stabiliscono una relazione mutualistica con molte specie di piante, per cui vengono definiti simbionti avirulenti (Harman *et al.*, 2004). L'ordine *Sebacinales* (*Agaricomycetes*, *Basidiomycota*) contiene funghi endofiti radicali, saprofiti e biotrofi obbligati che formano associazioni micorriziche nelle quali non c'è formazione di un ERM. Recenti studi di ecologia molecolare hanno rivelato la diversificazione evolutiva dell'ordine in due famiglie sorelle: la prima, delle *Sebacinaceae*, comprende principalmente EM e specie saprofitiche, la seconda, delle *Serendipitaceae*, comprende funghi endofiti, EM, micorrize orchidoidi e ericoidi (Weiß *et*

al., 2016). Nonostante le capacità micorriziche delle *Sebacinales*, attualmente le ricerche si stanno concentrando sulle associazioni endofitiche, le quali interessano un ampio spettro di ospiti.



**Figura 1-3: Cellule della radice di *Pisum sativum* con arbuscoli (barra, 50  $\mu$ m; da van der Heijden et al., 2015)**



**Figura 1-4: Radice di trifoglio colorata con trypan-bleu colonizzata da *Glomus intraradicens* ( $\times 150$ ; da van der Heijden et al., 2015)**



## 1.2 I benefici agronomici dei PGPM

### 1.2.1 I batteri fissatori dell'azoto

Il contributo da parte dei batteri fissatori dell'azoto [Nitrogen fixing bacteria (NFB)] alla crescita vegetale e alla produzione agraria si esplica principalmente attraverso la fissazione biologica dell'azoto (BNF, Biological nitrogen fixation) e il mantenimento della riserva di N nei terreni. Inoltre, gli NFB, in quanto PGPR, attuano i medesimi meccanismi di supporto alla crescita vegetale (trattati in dettaglio nel paragrafo successivo) (Hayat *et al.*, 2010; Pérez-Montaña *et al.*, 2014; Prasad *et al.*, 2019).

I NFB sono in grado di convertire l'azoto atmosferico ( $N_2$ ) in composti ammoniacali, che possono essere utilizzati da altri organismi, tra cui le piante. L'azoto è il nutriente essenziale più importante per la crescita vegetale; è costituente di proteine, acidi nucleici, ormoni, clorofilla, vitamine, enzimi. Carenze provocano crescita stentata e senescenza precoce, riduzione dell'attività fotosintetica, aumento dell'assimilazione secondaria, diminuzione delle rese. Per queste ragioni, gli NFB e le specie che presentano simbiosi con NFB sono particolarmente diffusi in ambienti carenti in azoto. La BNF è, peraltro, la maggior fonte naturale di azoto per le piante: questa contribuisce a rilasciare come media globale fino  $60 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$ , per una quantità di 180 milioni di tonnellate di N fissate all'anno. Tale quantità è prevalentemente (circa l'80%) fissata dalle simbiosi mutualistiche tra leguminose e batteri della famiglia *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*), mentre il resto dalla fissazione di N avviene ad opera di batteri liberi come *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus polymyxa*, *Burkholderia vietnamiensis* e *Herbaspirillum* spp. (Prasad *et al.*, 2019). Quest'ultimi sono stati individuati come NFB e testati per le loro capacità biofertilizzanti di altre specie di piante importanti quali frumento, mais, riso, sorgo e canna da zucchero. Studi condotti con  $^{15}\text{N}$  usato come tracciante hanno evidenziato che l'entità della BNF nelle specie non leguminose è raramente più del 2-3% dell'N totale, ma in particolari condizioni può anche attestarsi attorno al 10% in piante di frumento inoculate con *Azospirillum* spp. e attorno 40% in piante di riso inoculate con *Herbaspirillum* spp. (Hayat *et al.*, 2010). Nelle leguminose invece, la BNF può rappresentare fino al 97% del totale N della pianta. Tale contributo riduce la necessità di fertilizzazioni azotate mantenendo il contenuto proteico della granella (Zobel *et al.*, 2013).

Una delle principali problematiche in campo agricolo è infatti la carenza di N e con essa la necessità da parte degli agricoltori di apportarne in quantità per ottenere rese soddisfacenti. L'associazione simbiotica leguminose-rizobi è nota per la sua efficienza nel fissare  $N_2$  atmosferico. Tale attività supporta principalmente la crescita della leguminosa ma

ha anche un notevole effetto residuo per le colture in successione e consociate. L'inoculo con NFB aumenta il peso secco della pianta e la produzione, effetto che viene attribuito a un aumento dello sviluppo delle radici, che consente in ultimo migliori tassi di assorbimento di acqua e minerali (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Diversi studi sono stati condotti per valutare la pratica dell'inoculo con *Rhizobium* spp. sui componenti della produzione delle leguminose, con effetti positivi sul numero di baccelli per pianta, il numero di semi per pianta e la resa in granella (Safapour *et al.*, 2011). Inoltre, risultati soddisfacenti in termini produttivi sono stati ottenuti anche co-inoculando *Rhizobium* spp. con altri PGPM (ad es. AMF, *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp.), che permette un aumento del numero di noduli e del loro peso e una maggiore efficienza nell'utilizzo della simbiosi rizobica (Tajini *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2019). Ciò ha permesso di evidenziare relazioni positive tra i diversi PGPM.

Anche altri NFB non simbiotici hanno mostrato effetti positivi notevoli sulle piante ospiti. Ad esempio, l'attività di *Azospirillum* spp. ha mostrato incrementi della resa fino al 30% in piante di frumento inoculate, coltivate in serra e pieno campo (Hayat *et al.*, 2010). Questi effetti sono stati attribuiti soprattutto a un migliore assorbimento e a un maggiore sviluppo e ramificazione dell'apparato radicale e in misura minore alla BNF. Nella ricerca condotta da Saubidet *et al.* (2002) su frumento tenero coltivato in vaso, *A. brasiliense* ha mostrato di aver promosso l'assorbimento di  $\text{NO}_3^-$ , senza essere negativamente influenzato da diversi livelli di concimazione azotata. In particolare, l'inoculo con *A. brasiliense* ha incrementato la biomassa e la resa delle piante trattate e l'accumulo di N nella granella, che ha mostrato contenuti proteici più elevati rispetto al controllo (Saubidet *et al.*, 2002). L'effetto dell'inoculo con *A. brasiliense* in cece e fava è stato studiato in diverse condizioni di crescita (Hamaoui *et al.*, 2001). In serra, l'inoculo ha aumentato in modo significativo la formazione di noduli da parte dei rizobi, in termini di numero di noduli e peso secco degli stessi. È stato osservato un maggiore sviluppo della parte aerea e una più importante ramificazione delle radici. Inoltre, *Azospirillum* ha ridotto l'effetto negativo causato dall'uso di acqua d'irrigazione salina. In campo, le piante di cece inoculate hanno mostrato un aumento nella crescita dei germogli e rese più elevate rispetto al controllo non trattato, attribuibili a una maggiore efficienza di assorbimento dei nutrienti.

Diversi fattori ambientali hanno un ruolo nell'influenzare l' $\text{N}_2$ -fissazione, tra cui umidità del suolo, presenza di ossigeno, pH, quantità e forma di C, N e P e presenza di oligoelementi, come Mo e Fe. Presumibilmente, questi fattori agiscono direttamente sulle comunità microbiche, che rispondono variando il tasso di fissazione dell'N. L'aumento dell'umidità del

suolo e la riduzione della pressione parziale dell'ossigeno generalmente aumentano i tassi di fissazione dell'N, che non è favorita in terreni a basso pH. Gli effetti della quantità e del rapporto C:N della sostanza organica sono invece meno coerenti: sembra che l'aumento della disponibilità di C labile generalmente stimoli la BNF, in altri casi però ha scarso o nessun effetto. Allo stesso modo, la disponibilità di N può stimolare o inibire la BNF. Limitate disponibilità di P e K possono inibire indirettamente i tassi di fissazione dell'N, limitando la crescita dei microrganismi (Hsu & Buckley, 2009). Ulteriori elementi che modificano l'entità della N<sub>2</sub>-fissazione sono la specie vegetale, la varietà, la specie e il ceppo batterico e le pratiche colturali, come le lavorazioni e la gestione dei residui. In particolare, l'apporto di residui al suolo può aumentare i tassi di fissazione dell'N (Kanungo *et al.*, 1997), ragionevolmente a seguito della scomposizione microbica della cellulosa in cellobiosio e glucosio, che i NFB utilizzano come fonte di energia. Tuttavia, Hsu e Buckley (2009) hanno osservato che, in condizioni di non lavorazione, l'interazione tra le due pratiche ha causato una riduzione significativa della BNF e un impatto sulla struttura della comunità diazotrofica, probabilmente legato al rapporto C:N della biomassa vegetale e alla sua mineralizzazione (Hsu & Buckley, 2009). Ad ogni modo, in altre esperienze l'azotofissazione simbiotica è apparsa non influenzata o favorita nei sistemi conservativi e in particolare di non lavorazione (Ruisi *et al.*, 2012; Giambalvo *et al.*, 2012).

### 1.2.2 Altri batteri promotori

I principali meccanismi per cui i PGPR promuovono la crescita vegetale sono l'aumento della disponibilità e dell'assorbimento dei nutrienti (solubilizzazione del P e del K, produzione di siderofori); la produzione di ormoni vegetali quali auxine, citochinine, gibberelline, inibitori della sintesi dell'etilene (1-aminociclopropano-1-carbossilato deaminasi, ACC deaminasi) e sostanze volatili come il butanediolo; il controllo di agenti fitopatogeni (produzione di antibiotici, sintesi di enzimi litici delle pareti cellulari dei funghi, competizione per i siti sulle radici delle piante, competizione per i nutrienti disponibili nella rizosfera); il sequestro di metalli pesanti e la degradazione di inquinanti (Lucy *et al.*, 2004; Tarkka *et al.*, 2008; Vacheron *et al.*, 2013; Pérez-Montaña *et al.*, 2014; Prasad *et al.*, 2019; Mohamed *et al.*, 2019). Dati i diversi meccanismi con cui i PGPR promuovono la crescita vegetale possono essere impiegati come biofertilizzanti, fitostimolatori, biopesticidi, bioremediators.

I PGPR possono modificare il funzionamento fisiologico e produttivo della pianta, principalmente migliorando la disponibilità e l'assorbimento dei nutrienti, soprattutto in condizioni limitanti (Saia *et al.*, 2020a).

Il fosforo è il secondo elemento per importanza nella nutrizione delle piante dopo l'azoto, ha un ruolo importante nel trasferimento di energia, nella trasduzione del segnale, nella respirazione, nella biosintesi di macromolecole e nella fotosintesi. *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. sono i batteri solubilizzatori del P più efficienti (insieme al *Rhizobium* spp.). Aumentano la disponibilità del fosforo per le piante attraverso:

- i) la secrezione di enzimi extracellulari come fosfatasi e fitasi, che contribuiscono a liberare ioni fosfato dalle forme organiche contenenti fosforo che si ritrovano nella sostanza organica (Belgaroui *et al.*, 2016; Lidbury *et al.*, 2017; Mohamed *et al.*, 2019);
- ii) attraverso l'acidificazione del mezzo esterno in seguito al rilascio di acidi organici a basso peso molecolare (come l'acido gluconico) che chelano i cationi legati al fosfato (Miller *et al.*, 2009).

Analisi trascrittomiche e metabolomiche hanno evidenziato che i PGPR interferiscono con l'espressione genica e l'accumulo di metaboliti, rafforzando le ipotesi di un effetto sistemico sulla fisiologia dell'intera pianta, influenzando i sistemi di trasporto ionico della radice (Vacheron *et al.*, 2013; Saia *et al.*, 2019b). Prove a favore di una regolazione dei trasportatori a livello trascrizionale ad opera di PGPR sono state ottenute in studi con *Bacillus subtilis* GB03 (Zhang *et al.*, 2008). Questo ceppo, attraverso l'emissione di composti volatili, ha indotto contemporaneamente sovra- e sotto-espressione di trasportatori di potassio ad alta affinità, rispettivamente nelle radici e nei germogli di *Arabidopsis*.

Ancora, i PGPR aumentano l'efficienza della BNF grazie al loro contributo nell'incrementare la disponibilità altri elementi importanti per la BNF, es. il Fe, attraverso la produzione di siderofori (Freitas *et al.*, 2015). È stato osservato che la co-inoculazione con *Pseudomonas* o *Azospirillum* di piante di fagiolo ha aumentato il numero di noduli e di conseguenza l' $N_2$ -fissazione, oltre che la biomassa radicale e aerea (Tajini *et al.*, 2012).

Inoltre, l'inoculo di PGPR può aumentare l'assorbimento delle piante di altri nutrienti come Ca, K, Fe, Cu, Mn e Zn attraverso l'acidificazione della rizosfera, in seguito alla produzione di acidi organici o per la stimolazione delle ATPasi di membrana (Pérez-Montaño *et al.*, 2014). Un altro meccanismo utilizzato è la produzione di siderofori che chelano il Fe aumentandone in modo significativo la biodisponibilità (Freitas *et al.*, 2015).

In aggiunta al loro effetto sull'apporto di nutrienti, i PGPR possono modificare l'architettura dell'apparato radicale (Saia *et al.*, 2020a) modulando l'equilibrio ormonale dell'ospite, in particolare il rapporto auxine/citochinine, e modificando le proprietà strutturali

delle pareti cellulari a livello dei tessuti radicali (Hayat *et al.*, 2010; Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

La produzione da parte di alcuni PGPR di acido-3-indolacetico (IAA) esogeno stimola direttamente la formazione di radici laterali, riduce l'allungamento delle radici primarie e aumenta la formazione di peli radicali (Vacheron *et al.*, 2013). Un altro meccanismo documentato è quello della stimolazione indiretta della via metabolica di sintesi e rilascio degli ormoni auxinici della pianta. Durante la colonizzazione di radici di pomodoro, *Azospirillum brasilense* produce emiossido di azoto (NO) conseguentemente all'attività della nitrito reductasi, che controlla la formazione di radici laterali in quanto è una molecola segnale coinvolta nella via delle auxine (Molina-Favero *et al.*, 2008). Analogamente, *Pseudomonas fluorescens* produce 2,4-diacetilfloroglucinolo (DAPG), noto composto antimicrobico che a basse concentrazioni induce resistenza sistemica (Bakker *et al.*, 2007) grazie all'interazione con vie metaboliche dipendenti dalle auxine e stimolando la produzione di essudati radicali e la ramificazione delle radici (Brazelton *et al.*, 2008).

*Azospirillum brasilense*, *Bacillus licheniformis* e *Pseudomonas fluorescens* producono anche citochinine, che stimolano la divisione cellulare, controllano la differenziazione dei meristemi radicali e inducono la proliferazione di peli radicali ma inibiscono la formazione di radici laterali e l'allungamento delle radici primarie. L'inoculo con PGPR che producono citochinine ha mostrato un aumento della crescita dei germogli e una riduzione del rapporto radici-parte aerea (Arkhipova *et al.*, 2007).

È stato osservato (Anderson, 1985; Benhamou *et al.*, 1996; Niranjana Raj *et al.*, 2012) che *Bacillus pumilus* INR-7, *Pseudomonas putida* e *P. fluorescens* 63-28R in risposta all'attivazione della resistenza sistemica, inducono una maggiore sintesi di lignina e deposito di callosio nei tessuti epidermici, rispettivamente, di piante di miglio perlato, fagiolo e pisello precedentemente inoculate, inibendo la crescita di fitopatogeni. Modifiche della composizione delle pareti cellulari delle radici possono essere innescate anche da PGPR che promuovono direttamente la crescita delle piante: in questo caso invece, è emerso che le radici di piante di mais inoculate con *Azospirillum lipoferum* CRT1 presentano un contenuto di lignina inferiore rispetto al controllo non trattato (El Zemrany *et al.*, 2007). Questo perché un contenuto minore di lignina può facilitare la distensione cellulare e quindi l'allungamento radicale complessivo.

Infine, possono essere utilizzati con successo come agenti di controllo biologico nei confronti di alcuni patogeni terricoli per la loro potenzialità di competere col patogeno,

rimuovendo alte concentrazioni di elementi nutritivi, tra cui ferro e zinco, e limitandone la loro disponibilità ai patogeni (Pérez-Montaña *et al.*, 2014; Zaidi *et al.*, 2017).

### 1.2.3 Funghi non micorrizici

Diversi ceppi di *Trichoderma* studiati promuovono la crescita vegetale attraverso la produzione di IAA e molecole auxino-simili; migliorano l'assorbimento di nutrienti essenziali come P e Fe attraverso la produzione di molecole chelanti il P, siderofori e acidi organici che riducono il pH; conferiscono resistenza a stress abiotici (calore, freddo, carenza idrica, salinità) e riducono lo stress da trapianto; sono agenti di biocontrollo in quanto stimolano i sistemi di difesa delle piante, comportano "resistenza sistemica indotta" (detta ISR), producono composti antimicrobici e, mediante iperparassitismo, limitano la crescita di funghi e nematodi fitopatogeni (Handelsman & Stabb, 1996; Rudresh *et al.*, 2005; Hoyos-Carvajal *et al.*, 2009; Shores *et al.*, 2010; López-Bucio *et al.*, 2015).

*Trichoderma* spp., in quanto fungo ubiquitario del terreno, è in grado di colonizzare le radici delle piante anche in assenza dell'operazione di inoculo pre-semina o pre-trapianto; ovviamente però, l'entità di colonizzazione, e con essa il potenziale beneficio sull'ospite, aumenta sensibilmente quando è inoculato. Diversamente dai AMF, il *Trichoderma* non è influenzato dalla disponibilità d'acqua nella colonizzazione dell'apparato radicale (Saia *et al.*, 2019a).

In prove in serra e in pieno campo (Rudresh *et al.*, 2005), tre specie di *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride* e *T. virens*) hanno comportato un aumento dell'altezza della pianta, della biomassa totale e migliorato l'assorbimento di P e N nei germogli e nelle radici in piante di cece concimato con fosfato tricalcico. Nel confronto con *Bacillus megaterium*, un efficiente PGPR solubilizzatore del P, *Trichoderma* spp. ha mostrato di rilasciare fino al 70% in più di P rispetto al *B. megaterium* e di essere in grado di incrementare la resa in granella del cece. Inoltre, è interessante notare come i plot inoculati con *Trichoderma* + *Bacillus* e concimati con fosfato di roccia (RP) mostrano rese significativamente maggiori rispetto al solo cece concimato con RP. Quindi, l'effetto biostimolante può derivare anche dall'interazione di due o più microrganismi presenti nell'inoculo. Nella valutazione in vivo di una miscela di *T. atroviride* e *Bacillus subtilis*, effettuata da Yobo *et al.* (2011), è emerso che la combinazione dei due PGPM applicati come trattamento al seme ha favorito notevolmente la crescita di piante di fagiolo allevate in serra. Infatti, è risultato che la combinazione di *Trichoderma* + *Bacillus* ha aumentato del 43% la biomassa secca rispetto al solo *Trichoderma* e al solo *B. subtilis*. Anche le osservazioni compiute con l'ausilio di un rizotrone hanno supportato questi risultati, dimostrando che la biomassa radicale e l'area

esplorata dalle radici erano aumentate. Tuttavia, i risultati ottenuti in ulteriori studi sulla resa di granella secca e sul contenuto di proteine e di lipidi non hanno mostrato correlazione con gli studi sulla piantina. Dato che gli autori escludono un'azione inibitoria tra i ceppi, i risultati irregolari ottenuti nelle prove sulla resa sollevano la questione che un aumento delle prestazioni da parte delle piante non è direttamente correlato ad un aumento della produzione, in quanto ad esempio può ritardare l'entrata in produzione delle piante, sottoponendole ad altri tipi di stress.

Quando si applicano inoculi complessi di PGPM, l'attribuzione dell'effetto biostimolante all'uno o all'altro componente può essere controverso (Colla *et al.*, 2015; Thakur *et al.*, 2019; Saia *et al.*, 2019a). In un esperimento su lattuga, Saia *et al.* (2019) hanno constatato che l'applicazione di un formulato commerciale contenente diverse specie di AMF e *Trichoderma koningii* ha stimolato la crescita in piante di lattuga. Tuttavia, la mancanza di una tesi inoculata solamente con *T. koningii* rende difficile escludere o asserire che questo fungo abbia contribuito all'azione biostimolante e in quale misura.

Piante di cece colonizzate da *Serendipita* (= *Piriformospora*) *indica* (*Sebaciales*) hanno mostrato una migliore acquisizione di nutrienti minerali, con conseguente aumento del contenuto in N, P e K, del numero di baccelli per pianta e della sostanza secca della biomassa aerea (Kumar *et al.*, 2012). Questi aumenti risultano più pronunciati quando *S. indica* viene applicata insieme a *P. fluorescens*. Il meccanismo attraverso cui *S. indica* migliora l'assorbimento di fosfato nella pianta ospite è legato alla presenza di un trasportatore ad alta affinità per il fosfato (PiPT) (Yadav *et al.*, 2010).

#### 1.2.4 Funghi arbuscolo micorrizici (AMF)

I AMF svolgono un ruolo chiave nell'ecosistema e la colonizzazione delle radici può comportare diversi benefici per le piante (Daft & Elgiahmi, 1974; Rillig, 2004; Mortimer *et al.*, 2008; Abdel-Fattah *et al.*, 2011; Saia, 2011; Hafez *et al.*, 2013; Köhl *et al.*, 2014; Saia *et al.*, 2014a, 2020b; van der Heijden *et al.*, 2015; Bender & van der Heijden, 2015). Tali benefici dipendono da una pluralità di effetti degli AMF sulla pianta e su varie componenti dell'ecosistema e dell'agroecosistema. Gli AMF hanno infatti un importante ruolo nella regolazione del ciclo del carbonio, permettono lo stoccaggio di C nella rizosfera e contribuiscono alla produttività delle piante. Inoltre, regolano il ciclo dell'azoto e del fosforo nel suolo e forniscono alle piante quantità significative di N e P, soprattutto in condizioni di ridotta disponibilità.

L'abilità degli AMF nel catturare gli elementi del suolo dipende da diversi fattori, tra i quali i più importanti sono l'elevata capacità di diffusione nel suolo dell'ERM e le sue ridotte dimensioni, che determinano una notevole capacità di esplorazione del suolo da parte degli AMF; la secrezione di esoenzimi e altre molecole efficienti nel favorire la degradazione di composti organici e la solubilizzazione dei nutrienti.

Gli AMF possono inoltre avere un ruolo nel contrastare la perdita di  $\text{NO}_3^-$  per lisciviazione e denitrificazione:

- i) perché le piante micorrizzate mostrano una maggiore efficienza di assorbimento;
- ii) perché i AMF possono sottrarre N, stoccandolo nel micelio come arginina, che negli arbuscoli può essere metabolizzata e fornita alla pianta come  $\text{NH}_4^+$  e amminoacidi;
- iii) per gli effetti dovuti alla migliore aggregazione del suolo, all'aerazione e alla variazione del pH del suolo, che portano in ultimo a influenzare le comunità batteriche, riducendo quelle denitrificanti e quindi le emissioni di  $\text{N}_2\text{O}$ .

Infine, gli AMF rilasciano glomalina, una glicoproteina la cui abbondanza è correlata con una maggiore stabilità in acqua degli aggregati del suolo, di cui ne influenzano la formazione e dimensione, quindi la stabilità della struttura del suolo, favorendo in ultima analisi le relazioni pianta-acqua-suolo.

Una pluralità di altri effetti consentono alla simbiosi tra pianta e AMF di avere risvolti positivi sia dal punto di vista agronomico, sia ambientale. Infatti, gli AMF migliorano l'efficienza d'uso dei nutrienti, incrementano la sostenibilità degli agroecosistemi, soprattutto in condizioni in cui la produttività è limitata dalla disponibilità dei nutrienti; influenzano positivamente la BNF delle leguminose in pieno campo, in particolare se coltivate in condizioni di siccità; aiutano l'insediamento dei semenzali, favorendo lo sviluppo radicale delle plantule, le quali sono meno soggette a stress idrico; forniscono resistenza a stress biotici (infezioni di patogeni e nematodi) e abiotici (siccità, salinità, sodicità e presenza di metalli pesanti); possono influenzare le comunità vegetali e modificarne le interazioni, con effetti positivi sulla ricchezza di specie.

È stato osservato che la co-inoculazione con altri PGPR, come *P. fluorescens* o *B. subtilis*, può promuovere ulteriormente la colonizzazione delle radici delle piante da parte dei AMF (Mohamed *et al.*, 2019). Quest'ultima varia anche in relazione al livello d'irrigazione e diminuisce significativamente con la riduzione della disponibilità idrica (Saia *et al.*, 2019a).

Gli studi condotti su varie specie coltivate (cereali, leguminose, orticole da pieno campo e da serra) hanno prodotto risultati preziosi sul beneficio dell'inoculo con AMF. I funghi AMF possono contribuire mediamente fino al 90% del P assorbito dalla pianta. Il contributo alla



nutrizione azotata è invece meno consistente, varia in media da 0 al 20% dell'N assorbito dalla pianta (Boddey *et al.*, 2006; Tajini *et al.*, 2012; van der Heijden *et al.*, 2015; Saia *et al.*, 2019a, 2020b).

Grazie ad una meta-analisi condotta da Pellegrino *et al.* (2015) è stato dimostrato che l'inoculo del frumento con AMF aumenta la biomassa aerea, la resa in granella, l'harvest index, la concentrazione di N e di P nella biomassa aerea, il contenuto di N e Zn nella granella. In particolare, l'aumento della biomassa aerea è positivamente correlato con l'entità della colonizzazione delle radici da parte dei AMF. Nel frumento inoculato con AMF l'harvest index aumenta del 25%, il contenuto di P nella paglia e di N nella granella del 20% e del 30%, rispettivamente. Soprattutto, l'analisi ha rivelato che l'inoculo con AMF è una pratica agronomica efficace nella produzione di frumento, in quanto in grado di aumentare la resa in granella del 20%.

L'inoculo con AMF ha aumentato la biomassa secca di piante di avena, orzo e lenticchia coltivate in condizioni di pieno campo in ambiente semiarido, effetto che è stato associato a un maggiore assorbimento di N. Tra le tre specie saggiate, la lenticchia è stata quella che ha mostrato incrementi maggiori; probabilmente, la specie ha maggiormente beneficiato della simbiosi data la minore produttività e la maggiore suscettibilità agli stress. Inoltre, nonostante la disponibilità di P non fosse limitante, l'inoculo ha contribuito ad aumentare l'assorbimento di P in modo significativo (Saia *et al.*, 2012).

In un esperimento su lattuga, Saia *et al.* (2019) hanno constatato che l'applicazione di un formulato commerciale contenente *Rhizoglyphus irregularis*, *Funneliformis mosseae* e *Trichoderma koningii* ha aumentato la produzione di lattuga coltivata in serra a diversi regimi di disponibilità idrica e ha avuto un ruolo nel mantenimento della produttività anche in condizioni di deficit idrico. Inoltre, ha modificato alcuni parametri fisiologici e qualitativi, tra cui l'attività antiossidante, il profilo degli acidi fenolici e in particolare la concentrazione di luteolina, molecola coinvolta nelle vie di stimolazione delle piante ad opera dei microorganismi.

È inoltre da sottolineare che la colonizzazione delle radici da parte delle micorrize può contrastare l'infezione di patogeni terricoli e nematodi attraverso (Graham, 2001; Hafez *et al.*, 2013):

- i) la competizione per i siti d'infezione e per i fotosintetati dell'ospite;
- ii) la compensazione dei danni alle radici, incrementando la sintesi di lignina e quindi l'aumento dello spessore della parete cellulare;

- iii) l'accensione di nuovi geni di difesa o l'induzione di geni già attivi, come ad es. quelli che codificano per chitinasi e  $\beta$ -1,3-glucanasi e per la sintesi delle fitoalessine (fenilalanina ammonio liasi, calcone sintetasi, colcone isomerasi), e la produzione di composti fenolici, sostanze antimicrobiche, enzimi idrolitici, che vengono indotti anche durante l'interazione pianta-AMF;
- iv) modifiche nella comunità microbica della micorizosfera.

Gli effetti sulla crescita delle piante e sull'assorbimento dei nutrienti sono ben noti ma spesso variabili tra studi e dipendono dal contesto, ad es. a seconda delle condizioni ambientali, della pianta ospite, delle specie fungine, della presenza di stress per le piante.

Nei suoli coltivati, la quantità e l'attività dei AMF può essere fortemente limitata dalle pratiche colturali e dalla gestione del suolo. Lo sviluppo dei AMF è negativamente influenzato dall'uso di fungicidi e insetticidi di sintesi nei trattamenti al suolo e nella concia delle sementi, i quali perturbano alcune attività fisiologiche essenziali del fungo, come la sintesi della chitina (Giovannetti *et al.*, 2006; Saia, 2011). Le lavorazioni possono distruggere l'ERM e riducono il contenuto totale di SOC, che ha un ruolo importante nel beneficio da parte delle AM. Insieme alla presenza di altri microrganismi, al clima e alle caratteristiche del suolo (tessitura, dimensione e distribuzione degli aggregati, presenza e tipo di SOM, pH, contenuto di acqua), anche la quantità e la forma dei nutrienti contribuiscono a rendere variabili gli effetti dei AMF (Köhl *et al.*, 2014; Pellegrino *et al.*, 2015; Saia *et al.*, 2020b). In particolare, le concimazioni minerali, soprattutto di N e P, riducono la necessità da parte delle piante di attivare la simbiosi micorrizica, che comunque rappresenta un costo aggiuntivo in termini di C. Al contrario, in condizioni di buone disponibilità di nutrienti i benefici ottenuti dalla simbiosi possono variare e la relazione pianta-AMF può tendere verso il parassitismo anziché verso la simbiosi (Kaeppler *et al.*, 2000; van der Heijden *et al.*, 2015). Nei sistemi biologici il beneficio osservato è generalmente più elevato perché vi è minore disponibilità di nutrienti, più SOM e residui organici e non c'è uso di principi attivi di sintesi (Saia *et al.*, 2020b).

Oltre al genotipo dell'ospite è importante anche la specie di fungo AM e soprattutto la giusta combinazione pianta-AMF. Le specie di funghi AM differiscono per l'entità della colonizzazione delle radici e dell'aumento della biomassa, per il grado di apporto di P attraverso la via micorrizica e per la capacità di ridurre l'espressione di alcuni geni nell'ospite, come ad es. quelli indotti da condizioni di carenza nutrizionale e quello che codifica per il trasportatore del P inorganico (Lehmann *et al.*, 2012).

### 1.3 Le variazioni genotipiche nel rapporto con PGPM

Il fatto che i funghi AM si rinvenivano nella maggior parte delle piante terrestri e che siano stati rinvenuti in linee di Marchantiophyta che tra le prime si sono diversificate nelle linee evolutive delle piante suggerisce che l'origine dei AMF coincide con l'origine delle piante terrestri e che tra loro possa esserci stata una co-evoluzione, in quanto si ritiene che abbiano avuto un ruolo importante nella colonizzazione degli ambienti terrestri da parte delle piante (Wang & Qiu, 2006; Ossler *et al.*, 2015).

Alcune piante forestali, le leguminose in genere e le piante C4 sono più propense a instaurare la simbiosi micorrizica. La dipendenza dai AMF da parte delle piante e con essa le risposte in termini di crescita variano in base alla specie vegetale (microterma vs macroterma), alla via fotosintetica (C3 vs C4), alla morfologia dell'apparato radicale (soprattutto lo spessore medio delle radici) e ai pattern di crescita (fascicolato vs fittonante), al profilo degli essudati radicali (Hetrick *et al.*, 1992; Vacheron *et al.*, 2013; Saia *et al.*, 2020a). Le piante macroterme C4 con apparato radicale fittonante (radici grossolane, spesse e meno numerose) dipendono molto più dai funghi AM rispetto alle piante microterme C3 con apparato radicale fascicolato (radici fini e più estese) (Hetrick *et al.*, 1992; Saia *et al.*, 2020a). La minore dipendenza di quest'ultime può anche essere dovuta al fatto che d'inverno i AMF sono metabolicamente meno attivi e che l'apparato radicale fascicolato possa essere, di per sé, una strategia alternativa per l'acquisizione di nutrienti. Ciò nonostante, i cereali mostrano benefici più stabili tra studi, mentre nei legumi in campo l'effetto dell'inoculo sulla resa in granella è più variabile (Kaschuk *et al.*, 2009; Saia *et al.*, 2020b). Risultati positivi sono stati osservati invece per la produzione di biomassa di legumi da foraggio (BODDEY *et al.*, 2006; Mortimer *et al.*, 2008; Saia *et al.*, 2014a).

Anche la fenologia della pianta può essere determinante nell'attivazione della simbiosi, ad es. i semenzali dipendono maggiormente dai AMF rispetto alle piante adulte (van der Heijden *et al.*, 2015). Inoltre, è stata osservata una certa correlazione tra produzione di biomassa totale (radicale+aerea) e colonizzazione da parte dei AMF: le piante più vigorose sono più densamente colonizzate da ife e arbuscoli AMF (Ossler *et al.*, 2015).

Il livello di colonizzazione da parte dei funghi AM è una componente genetica del genotipo vegetale, sebbene siano disponibili scarse informazioni sull'influenza del genotipo ospite (e in particolare della varietà) sullo stabilimento della simbiosi micorrizica. La variazione genotipica delle piante alla colonizzazione dei AMF e quindi ai loro benefici sono stati identificati in alcune specie coltivate. In mais, è stato trovato un QTL (Quantitative Trait Loci) associato alla risposta micorrizica in una popolazione di RIL. In seguito alla

valutazione per la risposta micorrizica in condizioni di ridotta disponibilità di P, tutti i genotipi hanno mostrato una maggiore risposta micorrizica, mentre 12 genotipi hanno mostrato una correlazione positiva tra colonizzazione micorrizica e crescita radicale ma nessuna correlazione significativa tra colonizzazione e crescita dei germogli, ad indicare che non sempre si osservano potenziali benefici agronomici in quanto la simbiosi può rappresentare un costo per la pianta, soprattutto se il genotipo riesce comunque ad accumulare biomassa in condizioni di ridotta disponibilità di nutrienti (Kaeppeler *et al.*, 2000). L'efficienza nell'assorbimento del P ha un impatto diretto sulla risposta micorrizica, poiché è stato osservato che le cultivar P-efficienti generalmente rispondono meno all'inoculo con AMF rispetto a quelle P-inefficienti (Lehmann *et al.*, 2012). In soia, sono stati individuati sei QTL associati alla colonizzazione dell'ospite da parte del fungo AM *Rhizophagus intraradicens* e sono stati identificati i geni candidati, che includono geni omologhi delle proteine noduliniche già conosciute e altri geni specifici della simbiosi (Pawlowski *et al.*, 2019). In frumento, la maggior parte dei geni identificati sono geni di difesa (De Vita *et al.*, 2018).

Molti geni coinvolti nella simbiosi sono anche coinvolti nella difesa contro i patogeni. A questo proposito, la presenza nell'ospite di tratti di resistenza può ridurre l'infezione dei AMF e di conseguenza il beneficio sulla crescita vegetale perché portano la pianta a riconoscere il AMF come patogeno e ad attuare la difesa. A testimonianza di ciò Pawlowki *et al.* (2019) hanno identificato una regione in cui un gene candidato alla risposta micorrizica si sovrappone con un QTL associato alla resistenza SCN (Soybean cyst nematode); questo gene codifica per il citocromo P450, noto per essere coinvolto sia nei percorsi delle malattie delle piante che nella biosintesi degli strigolattoni. Gli strigolattoni si ritrovano negli essudati radicali e sono associati alla segnalazione pre-infezionale che avviene tra le spore dei funghi AM e le radici delle piante. Ancora, nella stessa regione è stato trovato un gene che codifica per una UDP-glicosiltransferasi (UGT), classe di proteine note per interagire con fitormoni e metaboliti durante le risposte di stress biotico e abiotico e che si è visto svolgere un ruolo nelle prime fasi dell'infezione micorrizica. Infine, uno dei geni candidati che codifica per una proteina nodulinica è stato ritrovato nella stessa regione di diversi geni codificanti per i fattori di risposta all'etilene (noti anche per avere un ruolo nella resistenza alle malattie dei patogeni necrotrofici) e in cui è presente un locus associato alla resistenza a *Sclerotinia sclerotiorum*.

L'entità della reattività ai funghi AM varia ampiamente tra le specie vegetali e persino tra i genotipi della stessa specie. Allo scopo di trovare un modello in questa variabilità per le

piante coltivate, diversi ricercatori hanno suggerito che l'anno di rilascio della cultivar potrebbe essere un fattore che influenza la risposta ai AMF. In seguito a una meta-analisi condotta su 39 pubblicazioni lavorando su 320 diversi genotipi di colture annuali è emerso che le nuove cultivar di cereali e legumi sono meno intensamente colonizzate dai AMF ma più sensibili e probabilmente dipendenti rispetto alle varietà meno recenti e ai genotipi ancestrali, sebbene la risposta non sia sempre coerente in tutte le condizioni. L'analisi porta quindi a escludere che i nuovi genotipi abbiano perso la capacità di rispondere alle AM a causa del breeding operato per la selezione di caratteri come l'abbassamento della taglia e spesso condotto in condizioni non limitanti per le colture vegetali, che potrebbero portare a selezionare genotipi meno efficienti nell'assorbimento dei nutrienti e meno resistenti alle condizioni di stress e scarsa disponibilità di nutrienti (Lehmann *et al.*, 2012). Inoltre, l'analisi ha rivelato che la specie fungina è più rilevante rispetto al genotipo vegetale nel determinare la risposta micorrizica (MR) in relazione all'anno di rilascio delle varietà: le nuove cultivar avevano una MR più elevata quando crescevano con *Glomus intraradices*, mentre le accessioni antiche e ancestrali crescevano di più quando colonizzate da *Glomus mosseae*.

### 1.3.1 L'interazione con *Phaseolus* e altre leguminose

Le interazioni microbiche nella rizosfera sono complesse e la comprensione dei fenomeni e dei meccanismi di regolazione è tutt'altro che completa. Nell'interazione dei AMF con le leguminose si aggiunge un ulteriore fattore di complessità perché il beneficio possa verificarsi: le leguminose instaurano una simbiosi mutualistica anche con i rizobi. Quindi, l'interazione tra una leguminosa, i AMF e i rizobi è un caso di simbiosi mutualistica tripartita. Le interazioni multiple sono frequenti in natura e possono notevolmente modificare i costi ecologici e il rapporto costi-benefici per la pianta ospite, in quanto entrambi i simbionti ricevono fotosintati e perché le reti genetiche dell'ospite che regolano la colonizzazione sono parzialmente condivise da entrambe le simbiosi. Per questo, le interazioni possono anche essere svantaggiose e rappresentare un costo che influisce negativamente sulla produttività della coltura (Ossler *et al.*, 2015). L'interazione tra leguminose, AMF e rizobi è generalmente vantaggiosa poiché i tre simbionti si complementano a livello ecofisiologico: l'ERM è molto efficiente nel ricavare P e microelementi essenziali per la BNF, la simbiosi con i rizobi fornisce al fungo AM le grandi quantità di N di cui necessita e la pianta fornisce fotosintati che sostengono i simbionti microbici (Saia *et al.*, 2020b). In generale, *Phaseolus vulgaris* è considerato un cattivo fissatore di azoto atmosferico rispetto ad altre leguminose e risponde male all'inoculazione con *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli, con differenze a seconda della varietà e del

ceppo microbico (Safapour *et al.*, 2011). La stabilità produttiva del fagiolo è una delle criticità insite nella coltivazione della specie. La resa è un tratto quantitativo complesso con bassa ereditabilità, influenzata da caratteri morfologici, i.e. habitus di crescita, altezza della pianta, harverst index, fenologia, ma soprattutto da fattori ambientali, come salinità, siccità, pH elevati, escursioni termiche in fase vegetativa, alte temperature durante la fioritura, basse temperature notturne durante la crescita del lomento, e dalla tecnica di coltivazione, come disponibilità di P, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, epoca e densità d'impianto. Per via del suo apparato radicale non molto esteso e per l'elevata richiesta di P è una specie che si presta bene alla micorrizzazione.

Seppure esistano pochi studi sul modo in cui più simbionti si influenzano a vicenda sullo stesso ospite e manchi la capacità di prevedere se gli effetti della simbiosi tripartita saranno positivi o negativi (perché molto variabili nei diversi contesti) sembra che la co-inoculazione di AMF e rizobi generi un effetto sinergico sulla fitness dell'ospite più di quanto non possano fare indipendentemente. Limitate conoscenze sono disponibili sull'impatto dei rizobi sull'attività dei AMF, mentre è noto che la colonizzazione dei funghi AM ha un effetto generalmente positivo sulla nodulazione, sull'entità della BNF e sui parametri di crescita (DAFT & ELGIAHMI, 1974; BODDEY *et al.*, 2006; Chalk *et al.*, 2006; Safapour *et al.*, 2011; Tajini *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2019). La disponibilità di N influenza la simbiosi tripartita. La ridotta disponibilità di N sembra essere un prerequisito per l'attivazione della simbiosi rizobica in quanto controlla positivamente il numero di noduli, la loro biomassa, l'attività della nitrogenasi e la durata della BNF. Al contrario, l'abbondanza di NO<sub>3</sub><sup>-</sup> inibisce lo sviluppo dei noduli ma non la colonizzazione. Invece, la colonizzazione AM dipende molto dal rapporto N:P e in particolare aumenta all'aumentare della concentrazione di NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Alte disponibilità di N aumentano le dimensioni dell'ERM e la % di lunghezza radicale colonizzata da AMF in termini di IRM, vescicole e arbuscoli. In fagiolo, è stato osservato che la giusta concentrazione di nitrato promuove sia la simbiosi rizobiale che quella micorrizica e permette l'aumento della BNF, dell'assorbimento di N e P, della biomassa e della resa (Nanjareddy *et al.*, 2014).

Gli effetti dei PGPM sui componenti della resa del fagiolo sono stati indagati soprattutto per la produzione di granella secca e granella fresca, meno per la produzione di lomento immaturo. I risultati sono molto variabili a seconda dei genotipi di fagiolo testati, con differenze legate soprattutto all'habitus di crescita, e fortemente dipendenti dalle diverse condizioni in cui sono stati ottenuti, ad es. presenza di patogeni, carenza idrica, stress salino, disponibilità di nutrienti.

Mortimer *et al.* (2008) hanno studiato i costi-benefici della simbiosi tripartita e le dinamiche del suo funzionamento in piantine nodulate di *P. vulgaris* (var. Contender) cresciute in coltura idroponica a diversi livelli di P (2 mM vs 1 mM). Hanno osservato che il fungo AM colonizza precocemente l'ospite e che il picco di colonizzazione dei AMF coincide nella pianta con un aumento dei tassi fotosintetici e respiratori, soprattutto in condizioni di basse concentrazioni di P nel mezzo di crescita, ad indicare che il fungo AM *Glomus etunicatum* è il simbionte dominante per la richiesta di C. L'elevata richiesta iniziale di fotosintati deprime la crescita nodulare del rizobio *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli, che si riprende solamente quando la crescita del fungo AM raggiunge una fase di plateau. Insieme a quest'evento è stata rilevata una maggiore fissazione dell' $N_2$  e una maggiore efficienza della nutrizione fosfatica. Ciò indica che il rapido sviluppo del fungo AM permette di fornire P che supporta la BNF (che necessita di 25-30 mol ATP/mol  $N_2$  fissata) e quindi la crescita dell'ospite grazie a un maggior contributo in termini di N. La maggiore crescita delle piante inoculate si è concretizzata in un aumento significativo della biomassa aerea rispetto al controllo non trattato in condizioni di ridotta disponibilità di P, tanto che la biomassa di piante inoculate allevate a 1 mM P risulta significativamente maggiore di quella registrata nelle piante di controllo allevate a 2 mM P (Mortimer *et al.*, 2008; Zobel *et al.*, 2013).

Tuttavia, in un esperimento antecedente, Nielsen *et al.* (1998) avevano cercato di capire se l'inoculo con il solo *Glomus intraradices* potesse realmente apportare un beneficio al fagiolo in termini di C budgets, al variare della disponibilità di P. In condizioni di scarsa disponibilità, le piante micorrizzate hanno aumentato l'assorbimento di P ma contemporaneamente, per l'aumento della respirazione radicale, hanno consumato una frazione significativamente maggiore del loro budget giornaliero totale in C (dal 29 fino al 40%) rispetto alle piante non inoculate (18-25%). L'aumento della respirazione radicale, che si è verificato insieme a un aumento nel rapporto R:S, è riconducibile all'aumento della respirazione di crescita e di mantenimento del fungo e ha causato nella pianta una riduzione nel tasso di assimilazione della biomassa epigea e nessun aumento significativo di sostanza secca. Le osservazioni sull'andamento dell'assimilazione dei germogli e dei tassi respiratori dei germogli e delle radici hanno portato gli autori a concludere che i costi in termini di C sostenuti dalla radice rappresentano il limite primario alla crescita delle piante nei terreni a bassa disponibilità di P, indipendentemente dalla presenza delle micorrize (Nielsen *et al.*, 1998). Ciò nonostante, osservando il tasso di assorbimento dell'N nell'esperimento di Nielsen e paragonandolo con quello ottenuto da Mortimer (entrambi rilevati circa 30 gg dopo la semina) sembrerebbe che il mancato effetto sull'aumento della biomassa sia dovuto

all'assenza del rizobio, che permette alle piante inoculate con AMF maggior approvvigionamento in termini di N in condizioni di scarsa disponibilità di P.

Risposte positive all'inoculo con funghi AM possono verificarsi in terreni non fertilizzati e con bassa disponibilità di P, ma è più probabile che si verifichino in terreni in cui la quantità di P disponibile è stata corretta dalla fertilizzazione, con differenze a seconda delle caratteristiche di solubilità dei fertilizzanti fosfatici utilizzati (DAFT & ELGIAHMI, 1974; Chalk *et al.*, 2006; Saia *et al.*, 2014a, 2020a). Uno studio molto interessante è stato condotto da Aguirre-Medina *et al.* (2017) su fagiolo (var. Negro Tacaná) coltivato in pieno campo in ambiente tropicale. Diversi livelli di concimazione fosfatica sono stati confrontati con il solo inoculo di AMF e con la combinazione inoculo-livelli di concimazione. Nonostante anche il controllo mostrasse un'elevata percentuale di colonizzazione delle radici, dovuta alla larga presenza nell'ambiente di ceppi naturalizzati, è stato possibile concludere che l'inoculo con *Rhizophagus intraradices* (RI) può comportare effetti analoghi a una fertilizzazione con 40 kg ha<sup>-1</sup> di P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (dose piena) per quanto riguarda la resa in granella. Considerando il numero di fiori e baccelli invece, l'effetto del RI+13 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> è paragonabile alla fertilizzazione a dose piena. In particolare, nel trattamento con RI+13 kg ha<sup>-1</sup> P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> è stato osservato un importante sviluppo delle foglie nei primi 31 giorni dalla semina, probabilmente grazie al fatto che l'ERM può assorbire più P quando esso è presente in bassa concentrazione nel suolo. Questo può aver quindi positivamente influenzato l'assimilazione e il tasso di crescita durante tutto lo sviluppo (tra cui l'emissione di fiori e baccelli), dato che l'aumento della biomassa fogliare è alla base di una buona attività fotosintetica. Infine, tutti i trattamenti inoculati con RI hanno prodotto meno biomassa radicale rispetto al trattamento a dose piena, a testimoniare la notevole efficienza assorbente dell'ERM, che permette alla pianta di destinare maggiori risorse all'apparato aereo più che all'apparato radicale.

L'inoculazione combinata AMF + *Rhizobium* spp. ha un effetto significativo sul numero di baccelli per pianta e sulla resa complessiva di granella secca, con differenze a seconda delle varietà. Le varietà a crescita indeterminata hanno elevata produttività e maggiore potenziale genetico di produzione di baccelli, il cui numero aumenta in modo significativamente maggiore in seguito all'inoculo rispetto a quelle a crescita determinata. Al contrario, il numero di semi per baccello e il peso dei 1000 semi sono sotto il controllo genetico e non vengono più di tanto influenzati dai fattori ambientali e dall'inoculo. Nonostante le varietà a portamento eretto abbiano generalmente maggiore potenzialità produttiva in termini di peso dei 1000 semi rispetto a quelle prostrate, le varietà a crescita indeterminata hanno migliori performance produttive. In particolare, Safapour *et al.* (2011)



hanno valutato in campo l'effetto dell'inoculo di *Glomus intraradicens* + *Rhizobium phaseoli* Rb133 sulle componenti della resa di diversi genotipi di fagiolo a seme rosso, registrando che nella var. Goli (c. indeterminata) il numero di baccelli per pianta è aumentato del 70% rispetto al controllo non inoculato, mentre nella var. Derakhshan (c. determinata) del 40%. Malgrado l'ambiente semi-arido (piovosità media annua: 256 mm) e la totale assenza di apporti irrigui durante il periodo di coltivazione (primavera-estate), è interessante notare che le produzioni nelle tesi inoculate hanno raggiunto valori di 2569,1 kg ha<sup>-1</sup> per la var. Goli, con un aumento del 48% rispetto al controllo non trattato, e 2307,8 kg ha<sup>-1</sup> per la var. Derakhshan, che ha registrato un aumento dell'84%. L'aumento della resa è dovuto a un maggiore assorbimento di P e N, reso possibile dall'utilizzo più efficiente della simbiosi rizobiale delle piante micorrizate (Tajini *et al.*, 2012). Inoltre, l'inoculo con AMF migliora la dipendenza della leguminosa dall'N<sub>2</sub> atmosferico (P<sub>atm</sub>), che può aumentare fino a 2,5 volte rispetto al controllo non trattato, con un conseguente aumento di N<sub>2</sub> fissato di 4,4 volte (Chalk *et al.*, 2006; Mortimer *et al.*, 2008). Pertanto, il contributo della simbiosi tripartita alla nutrizione vegetale permette un aumento del numero di fiori per pianta, che è un carattere fortemente dipendente dalla concentrazione di NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e di H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> a disposizione della pianta (Nanjareddy *et al.*, 2014; Aguirre-Medina *et al.*, 2017).

Il fagiolo è una coltura molto sensibile alla salinità, con un livello soglia di 1 dS m<sup>-1</sup>, oltre il quale si registrano cambiamenti fisiologici, fitotossicità, riduzione di crescita e di produzione fino al 20%. Per quanto esistano numerose pratiche di coltivazione, recentemente l'utilizzo di PGPM per ridurre lo stress salino sta fornendo ottimi risultati (Dodd & Perez-Alfocea, 2012). In generale la salinità inibisce la simbiosi rizobica e la colonizzazione dell'apparato radicale da parte dei AMF, tuttavia i microrganismi sono più resistenti allo stress osmotico rispetto alle piante. L'inoculo con AMF + *Rhizobium* mitiga in una certa misura lo stress salino, permette un aumento della biomassa e il contenuto di clorofilla (che correla positivamente con il contenuto di N) ma non apporta benefici in termini di produzione. Al contrario, la resa totale in baccelli freschi delle piante inoculate è significativamente minore di quelle non inoculate fino a livelli di salinità accettabili per la specie (1.0 dS m<sup>-1</sup>), mentre si stabilizza a 2 dS m<sup>-1</sup>, dove il trattamento inoculato non mostra differenze rispetto al non inoculato (Garcia *et al.*, 2019).

In seguito a ricerche sull'effetto di diversi PGPM sui componenti della resa di fagiolo da baccello fresco (cv. Bronco) coltivato in Egitto, in un suolo infestato da *Sclerotium rolfsii* e fertilizzato con diversi livelli di P, Mohamed *et al.* (2019) hanno osservato che il trattamento PGPM + 15 kg ha<sup>-1</sup> RP (mezza dose) fornisce risultati migliori rispetto al controllo non

inoculato e concimato con 65, kg ha<sup>-1</sup> CaP (dose piena). I singoli trattamenti, ovvero *B. subtilis*, *P. fluorescens* e AMF (*Glomus* spp.) hanno aumentato significativamente l'assorbimento di P e Fe, la biomassa radicale e aerea e la resa in baccelli freschi rispetto al trattamento di controllo, ma non hanno eguagliato, da soli, i risultati ottenuti nella tesi trattata con il fungicida e concimata a dose piena. I trattamenti di inoculazione combinata, ovvero *B. subtilis* + AMF e *P. fluorescens* + AMF, hanno causato ulteriori aumenti significativi dei parametri di crescita e dei componenti della resa rispetto al controllo, nonostante siano stati fertilizzati con la metà della dose di P, e sono stati più efficienti nel reprimere l'agente patogeno, ad indicare che tali PGPR si comportano sia da biofertilizzanti che da biopesticidi. Se confrontati col trattamento fungicida, invece, nessun inoculo ha fatto registrare lo stesso aumento di biomassa. Tuttavia, la resa in baccello verde ottenuta dal trattamento combinato *B. subtilis* + AMF ha superato in maniera significativa quella ottenuta dal trattamento fungicida, nonostante la diversa disponibilità di P. Questo risultato testimonia la capacità di questa specifica combinazione di microrganismi di promuovere la crescita vegetale supportando l'assorbimento di P. In conclusione, i valori di biomassa e della resa in baccelli ottenuti durante il secondo anno di prova erano significativamente maggiori rispetto a quelli ottenuti durante il primo anno, ad indicare che i PGPM hanno un'efficacia/ruolo importante nel contrastare direttamente il patogeno attraverso la competizione per lo spazio e le risorse, piuttosto che aumentando la tolleranza ai patogeni della pianta.

#### 1.4 Obiettivo della ricerca

Nei prossimi decenni l'agricoltura si troverà a dover affrontare diverse sfide, tra cui prima di tutte quella della sostenibilità ambientale ed economica. In un mondo in cui la popolazione è destinata a raggiungere i 9 miliardi di persone entro il 2050 e le produzioni agricole dovranno aumentare di almeno il 70% rispetto ad ora (FAO, 2018) è necessario fornire agli agricoltori strumenti validi che permettano loro di ottimizzare le produzioni per unità di superficie e per unità di input fornito. È da sottolineare che i paesi che vedranno aumentata la loro popolazione sono soprattutto quelli in via di sviluppo, dove c'è una minore sensibilità verso gli aspetti dello sviluppo sostenibile.

Questo discorso assume ancora più importanza quando si parla di colture orticole, in quanto richiedono elevate quantità di acqua, fertilizzanti e fitofarmaci e spesso vengono coltivate con spreco di risorse. Inoltre, il fatto che queste vengano consumate fresche e che esistano rigidi standard qualitativi per la loro commercializzazione rende queste colture più soggette a perdite, sia in campo che in post-raccolta. Si stima infatti che circa un 20% della produzione non lasci il campo, e un ulteriore 20% venga perso durante la conservazione.

Con la crescita della popolazione mondiale, l'impatto crescente dei cambiamenti climatici e le risorse ambientali che diventano sempre più scarse e, in alcuni casi, peggiorano di qualità sono necessarie misure proattive per introdurre e affermare pratiche agronomiche che rendano gli agro-ecosistemi ambienti capaci di reagire ai cambiamenti. Numerosi sono i progetti finanziati dalla Comunità Europea che vedono cooperare diversi stati membri e hanno come obiettivo unico quello di validare strategie di produzione sostenibile per ogni contesto agricolo. A tal proposito, questa sperimentazione si inserisce nel progetto Europeo BRESOV (Breeding for Resilient, Efficient and Sustainable Organic Vegetable Production), il quale mira a adattare le risorse genetiche di tre importanti colture orticole, tra cui il fagiolino, ai sistemi di produzione biologica per ottenere linee caratterizzate da maggiore adattabilità a stress ambientali (siccità, carenza di nutrienti, alte temperature) e da resistenza a patogeni e parassiti.

Come descritto, i PGPM apportano notevoli benefici alle piante coltivate. Le loro funzioni a supporto della crescita vegetale li rendono tra i migliori candidati per ridurre l'impatto negativo dei fertilizzanti e degli agrofarmaci sull'ambiente, ottimizzare la richiesta di acqua e, contemporaneamente, migliorare la fertilità dei suoli e la resa delle colture. Per questo, molti ricercatori stanno largamente studiando la loro applicazione alle condizioni di campo e per molte colture sono già disponibili informazioni solide riguardo agli effetti sulla resa, tanto che l'utilizzo dei PGPM è una pratica ormai assodata. Tuttavia, non è stato ancora

del tutto chiarito come questi possano influenzare il comportamento produttivo del fagiolino al variare del genotipo vegetale, in termini di finestra di maturazione, flussi di raccolta e componenti della produzione. Inoltre, mancano informazioni su come alcuni caratteri genotipici, ad es. fenologia, altezza della pianta e del primo fiore, habitus di crescita, influenzino i flussi di produzione e se essi siano correlabili con incrementi nella resa in seguito all'azione dei PGPM.

L'intento di questa ricerca è confrontare diversi genotipi di fagiolo da baccello verde (cultivar e linee di introgressione) per la risposta all'inoculo con il fungo AM *Glomus iranicum* e valutare il suo effetto sulla resa in condizioni di basso input. Attraverso il confronto delle linee di introgressione vogliamo poi valutare l'efficacia dei programmi di breeding da cui derivano le linee di introgressione saggiate e la loro adattabilità all'ambiente. L'obiettivo ultimo è quello di contribuire ad aumentare le conoscenze riguardo l'interazione tra il fungo AM *Glomus iranicum* e *Phaseolus vulgaris* per quanto riguarda le diverse componenti della produzione del fagiolino al variare della struttura genetica dei genotipi.

## Capitolo 2

### MATERIALI E METODI

#### 2.1 Area dello studio e descrizione del sito

La prova è stata condotta nell'azienda agraria didattico-sperimentale "Pasquale Rosati" di Agugliano (AN). Il dispositivo sperimentale misurava circa 1500 m<sup>2</sup> (Latitudine 43.545 N, Longitudine 13.363 E, Altitudine 80 m s.l.m.), aveva esposizione Sud-SudEst e inclinazione del 5-6%. Le caratteristiche del suolo sono riportate in Tabella 2-1.

**Tabella 2-1: Caratteristiche del suolo dell'appezzamento sede della prova**

<b>Scheletro</b>	< 1 %
<b>Tessitura</b>	Limosa-argillosa
<b>pH</b>	8.1
<b>C organico totale</b>	14,4 g kg <sup>-1</sup>
<b>N totale</b>	0.95 g kg <sup>-1</sup>
<b>P assimilabile</b>	11,7 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Mg scambiabile</b>	267 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Na scambiabile</b>	33 mg kg <sup>-1</sup>
<b>K scambiabile</b>	145 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Ca scambiabile</b>	4672 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Fe assimilabile</b>	6,8 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Cu assimilabile</b>	1,2 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Zn assimilabile</b>	0,26 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Mn assimilabile</b>	4,5 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Bo solubile</b>	0,2 mg kg <sup>-1</sup>

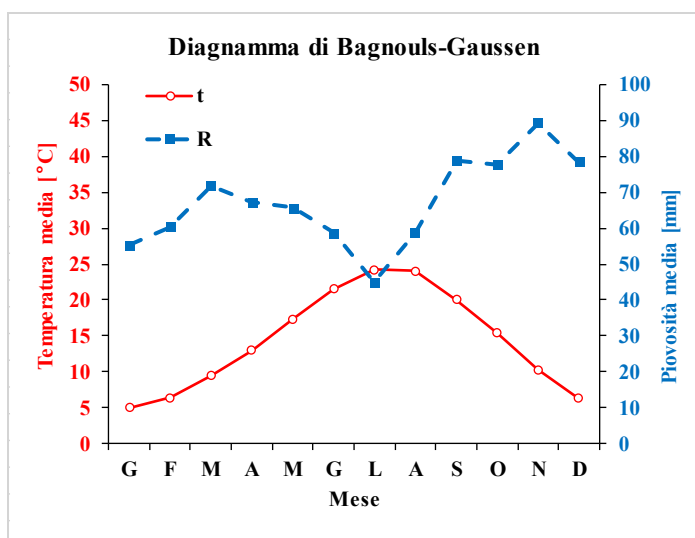
L'area è caratterizzata da un clima mesomediterraneo subumido (dati climatici dalla stazione climatica di Agugliano – Borgo Ruffini, cod. ST32; forniti da ASSAM - Centro operativo di agrometeorologia, Agenzia Servizi al Settore Agroalimentare delle Marche per il periodo 01 Gennaio 1960 – 31 Dicembre 2019). La stazione climatica è a circa 3 km in linea d'aria dal sito della prova, in una località circa 40-60 m s.l.m più alta della sede della prova). Il sito è in un'area di fondovalle, ha una piovosità media annua di 807 mm, ben distribuita, con medie di piovosità durante i mesi estivi tra 20 e 30 mm/mese (Fig. 2-1). La temperatura media annua dell'aria è di 14,4 °C; Gennaio è il mese più freddo dell'anno e Luglio e Agosto i più caldi (Fig. 2-1). La storia agronomica dell'appezzamento sede della prova è riassunta nella Tabella 2-2.

L'annata di prova (Maggio 2019 – Settembre 2019) si è rivelata alquanto anomala dal punto di vista meteorologico rispetto alla media poliennale del periodo (Fig. 2-2). L'ipotesi iniziale

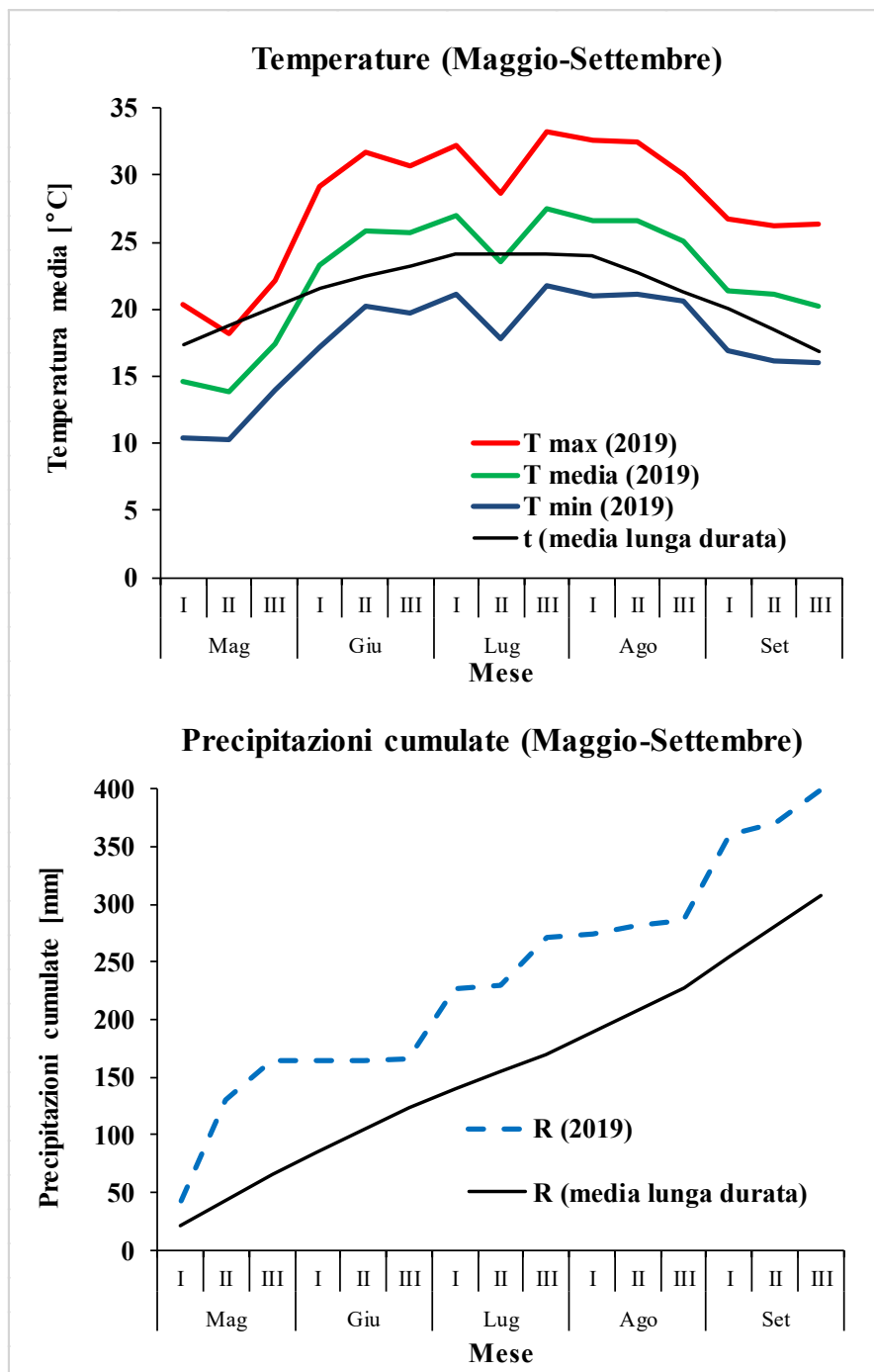
era eseguire l'impianto dell'esperimento la prima settimana di Maggio 2019, ma a causa delle temperature estremamente basse e delle piogge estremamente abbondanti durante questo mese nel sito della prova è stato avviato con un mese di ritardo (il 3 Giugno 2019). La temperatura media del mese di Maggio è stata minore rispetto alla media del lungo periodo e tale da impedire la semina e compromettere l'ottimale sviluppo vegetativo del fagiolo in fase iniziale, se consideriamo inoltre che l'appezzamento era localizzato nel fondovalle. Nel solo mese di Maggio sono caduti 122 mm di pioggia, e solo durante il periodo della prova 355 mm, tuttavia mal distribuiti. Il mese di Giugno totalmente privo di precipitazioni e il ritardo per motivi tecnici nel posizionamento dell'impianto d'irrigazione hanno contribuito a rendere stentata la germinazione dei semi. Al contrario, Luglio è stato un mese molto piovoso rispetto alla media e caratterizzato da un repentino calo termico di oltre 5°C.

**Tabella 2-2: Storia agronomica dell'appezzamento sede della prova**

	Specie coltivata	Note
2014	Fragola	Dispositivo sperimentale
2015	Pomodoro	Pieno campo, resa non disponibile
2016	Mais	Dispositivo sperimentale
2017	Pomodoro	Pacciamato
2018	Frumento tenero	cv. Bologna, pieno campo, resa non disponibile
2019	Fagiolo mangiatutto	Annualità della prova, vedi risultati



**Figura 2-1: Diagramma di Bagnouls Gausson della stazione climatica di Agugliano – Borgo Ruffini, cod. ST32. I dati sono stati forniti da ASSAM – Centro operativo di agrometeorologia, Agenzia Servizi al Settore Agroalimentare delle Marche per il periodo 01 Gennaio 1960 – 31 Dicembre 2019**



**Figura 2-2: Temperature medie e precipitazioni cumulate su base decadale per il periodo Maggio 2019 – Agosto 2019 e relative medie di lunga durata (linee continue nere) nella stazione climatica di Agugliano – Borgo Ruffini, cod. ST32 (circa 3 km dalla sede della prova). I dati sono stati forniti da ASSAM – Centro operativo di agrometeorologia, Agenzia Servizi al Settore Agroalimentare delle Marche per il periodo 01 Maggio 2019 – 30 Settembre 2019**

## 2.2 Dispositivo sperimentale

La prova è stata seminata a mano il 3 Giugno 2019, su terreno precedentemente erpicato e affinato. Le piante non sono state mai fertilizzate né trattate con fungicidi e insetticidi. Il controllo delle infestanti è stato manuale per tutto il periodo della prova, soltanto a 30 giorni dalla semina è stata effettuata una sarchiatura. L'esperimento è stato irrigato con 20 mm di acqua tre volte a settimana, con un sistema di irrigazione a goccia a bassa pressione (<1 atm). L'irrigazione è stata evitata a causa degli eventi piovosi nei giorni: 9 luglio (28 mm), 10 luglio (38 mm), il 28 luglio (36 mm), 2-3 settembre (14 e 44 mm). La raccolta è stata eseguita manualmente.

L'unità sperimentale era composta da una fila binata, in cui la distanza tra le file era di 20 cm e la distanza delle piante sulla fila di 10 cm, per un totale di 12 piante per parcella. Le parcelle sulla stessa bina erano distanti 50 cm. Le file binate erano tra loro distanti 140 cm. La linea irrigua è stata posizionata al centro di ciascuna bina. La lunghezza di un'ala piovana è stata di circa 50 metri con allaccio nella parte alta del campo. In considerazione di ciò, non si sono verificate perdite di carico nella distribuzione dell'acqua. In ogni caso, le repliche del dispositivo sperimentale hanno seguito il gradiente di fertilità e pendenza del terreno.

L'esperimento principale è stato condotto con l'obiettivo di valutare il ruolo dell'inoculo in campo con un fungo arbuscolo micorrizico sulla resa di un set di genotipi di *Phaseolus vulgaris* (di seguito "Esperimento 1"), a cui è stata aggiunta una sub-prova per valutare la risposta all'inoculo con 2 diversi PGPM su un'altra specie anch'essa coltivata per il consumo di lomento immaturo, la *Vigna unguiculata* ("Esperimento 2").

### 2.2.1 Esperimento 1: *Phaseolus vulgaris*

Il dispositivo sperimentale utilizzato è stato un blocco randomizzato con tre trattamenti, di cui uno annidato in un altro. I trattamenti allo studio sono stati il genotipo (5 cultivar e 12 linee di introgressione, Tab. 2-3) e l'inoculo con AMF (prodotto commerciale "MycoUp", la cui composizione è descritta in Tabella 2-4). Il genotipo è stato annidato all'interno del gruppo di breeding (riportato in Tab. 2-3). In totale, erano presenti 4 gruppi: nel gruppo delle cultivar rientrano 5 cultivar élite, la cui strategia di breeding è sconosciuta, mentre nel gruppo delle linee di introgressione rientrano 12 genotipi provenienti da un'unica strategia di breeding. A loro volta, queste sono state divise in tre gruppi (Italia, Romania e Spagna) di 4 genotipi per ciascun gruppo. Il gruppo indica i migliori genotipi già testati in ciascuna nazione (Nanni e Papa, comunicazione personale), quindi presumibilmente con caratteristiche favorevoli per ciascuno degli ambienti summenzionati.



Ogni genotipo è stato inoculato con il fungo AM (di seguito AMF) o lasciato non inoculato (di seguito CONTR). Il dispositivo sperimentale aveva 4 repliche posizionali e due sub-repliche per replica biologica, per un totale di 16 repliche biologiche. Prima di essere seminati, 16 semi di ogni genotipo sono stati pesati e inoculati con 2,5 g di inoculo per parcella (Fig. 2-3, 2-4).

**Tabella 2-3: Lista dei genotipi di *P. vulgaris* utilizzati nell'esperimento**

Gruppo genotipico	Genotipo	Codice	Note	
Élite Cultivar (ELCVR)	Contender	CT	Nano, b. verde	
	Messi	ME	Nano, b. verde scuro	
	Purple king	PK	Nano, b. viola	
	Rocquencourt	RC	Nano, b. giallo	
	Supernano giallo	SG	Nano, b. giallo	
Linee di introgressione (INL)	IT_2259	INL risultate più performanti in precedenti prove in Italia	Nano, b. giallo	
	Italia (IT)			IT_309
	IT_835			
	IT_962			
	Romania (RO)	RO_1561		INL risultate più performanti in precedenti prove in Romania
		RO_1603		
		RO_1870		
		RO_1878		
	Spagna (SP)	SP_1816		INL risultate più performanti in precedenti prove in Spagna
		SP_1988		
		SP_2164		
		SP_967		

**Tabella 2-4: Composizione inoculo MycoUp (Biogard®)**

MYCOUP (AMF)	
Contenuto in micorrize	1 %
<i>Glomus iranicum</i> var. tenuihypharum (120 spore/g)	
Contenuto in batteri della rizosfera	10 <sup>3</sup> UFC/g



*Figura 2-3: Pesatura dell'inoculo durante la preparazione del materiale da seminare*



*Figura 2-4: Pesatura dei semi durante la preparazione del materiale da seminare*

### 2.2.2 Esperimento 2: *Vigna unguiculata*

Il dispositivo sperimentale utilizzato è stato un blocco randomizzato con due trattamenti. I trattamenti allo studio sono stati il genotipo (2 cultivar di *Vigna unguiculata*, Tab. 2-5) e l'inoculo con PGPM. Per ogni genotipo erano presenti tre livelli: l'inoculo con una singola specie di AMF ("MycoUp", la cui composizione è descritta in Tabella 2-4, di seguito AMF), l'inoculo con un mix di PGPM (prodotto commerciale "Coveron leguminose", Tab. 2-6, di seguito MIX) e il controllo non inoculato (di seguito CONTR). Il dispositivo sperimentale era adiacente al precedente e strutturato e gestito nella medesima maniera.

**Tabella 2-5: Lista dei genotipi di *V. unguiculata* utilizzati nell'esperimento**

Genotipo	Codice	Note
Metro o Stringa	MS	Rampicante, b. verde scuro e lungo
Dall'occhio veneto o dolico	DO	Nano, b. verde scuro e lungo

**Tabella 2-6: Composizione inoculo Coveron leguminose (ItalPollina®)**

COVERON LEGUMINOSE (MIX)	
Matrice organica	100 % vegetale
Contenuto in micorrize totali (20 spore/g)	1,9 %
<i>Rhizophagus intraradices</i> (basionym: <i>Glomus intraradices</i> ) (10 spore/g)	1 %
<i>Funneliformis mosseae</i> (basionym: <i>Glomus mosseae</i> ) (10 spore/g)	0,9 %
<i>Trichoderma atroviride</i>	4 x 10 <sup>8</sup> UFC/g
Batteri della rizosfera ( <i>Bradhyrhizobium</i> spp.)	1 x 10 <sup>9</sup> UFC/g

### 2.3 Rilievi effettuati

All'inizio della fioritura, per ogni parcella, è stata misurata l'altezza stirata di 6 piante.

Durante tutto lo sviluppo della coltura è stato rilevato il numero di fiori, al fine di ricostruire il flusso di produzione caratteristico di ogni genotipo. I baccelli immaturi sono stati raccolti quando la loro lunghezza era compresa tra i 9 e gli 11 cm, contati e pesati per ricavare le componenti della resa del fagiolo mangiatutto.

## 2.4 Calcoli e analisi statistica

I dati raccolti sono stati utilizzati per calcolare i valori di numero di fiori per pianta, numero di baccelli per pianta, produzione per pianta, altezza stirata delle piante, rapporto baccelli:fiori e peso medio del singolo baccello.

L'analisi dei dati è stata effettuata con un modello lineare generalizzato misto (GLMM) attraverso la procedura Glimmix in ambiente SAS/STAT 9.2. Un modello simile è presentato nei materiali supplementari in Saia et al. (2019a). In particolare, il genotipo è stato annidato nel gruppo genotipico. La sproporzionatura numerica di genotipi tra i gruppi e la divisione dei gruppi in varietà elite e linee di introgressione sono state tenute in conto attraverso una correzione dei gradi di libertà con il metodo di Kenward-Roger e l'imposizione di un fattore random. Nei fattori random sono state inserite anche le repliche.

Quando l'effetto dell'inoculo è stato significativo, le medie tra i trattamenti sono state separate tramite un test conservativo di Tukey Kramer applicato alle 'pdifferences' delle medie dei minimi quadrati (LSMEANS).

## Capitolo 3

### RISULTATI

#### 3.1 Esperimento 1: *Phaseolus vulgaris*

I risultati dell'analisi statistica e il dataset completo dell'esperimento 1 sono riportati, rispettivamente, in Tabella 3-1 e 3-2.

Il gruppo genotipico e la varietà (tenendo conto dell'appartenenza al gruppo genotipico) hanno mostrato un effetto marcato su tutte le variabili rilevate. Spesso, l'effetto dell'inoculo non è stato costante al variare del gruppo genotipico o dei singoli genotipi. L'inoculo con AMF ha influenzato i componenti della produzione (numero di baccelli per pianta, produzione per pianta, peso del singolo baccello), in quanto caratteri sotto forte controllo ambientale e della tecnica agronomica, ma anche l'altezza stirata delle piante.

L'interazione tra inoculo e gruppo genotipo è stata significativa per quanto riguarda il numero di baccelli per pianta, la produzione per pianta, il peso del singolo baccello e l'altezza stirata delle piante. L'interazione tra inoculo e varietà invece, seppur significativa per molte delle variabili rilevate (numero di fiori e baccelli per pianta, produzione per pianta e peso medio del baccello) è risultata essere meno importante della precedente.

*Tabella 3-1: Risultati dell'analisi statistica dei dati per ciascun esperimento. I fattori sono l'inoculo (IN), il gruppo di genotipi (GR) e la varietà (VAR) inserito nel GR. I valori in grassetto sono significativi per  $p < 0,05$*

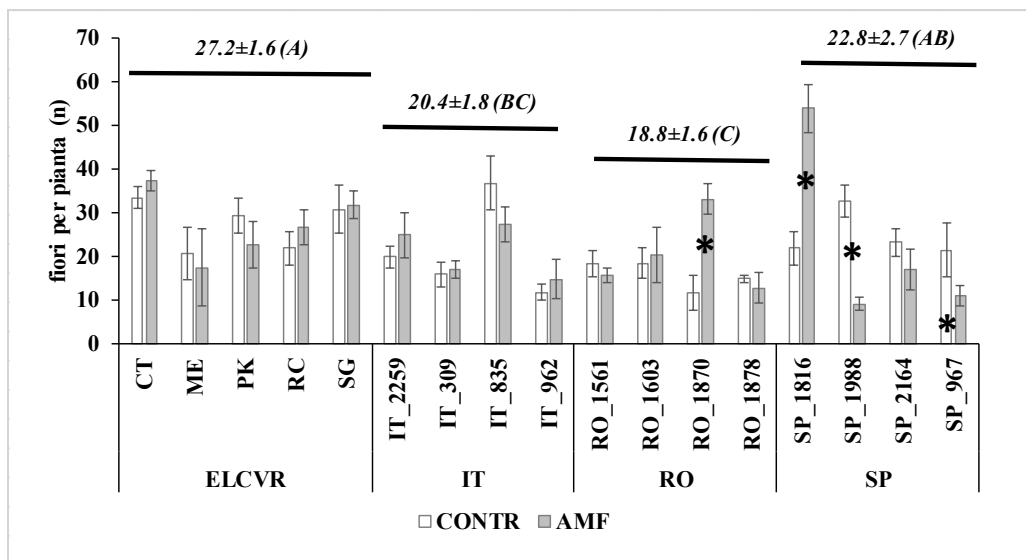
		Fiori per pianta (n)		Baccelli per pianta (n)		Produzione per pianta (g PF)		Altezza stirata delle piante (cm)		Rapporto baccelli: fiori (n/n)		Peso medio del baccello (g PF)	
		<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
		<hr/>											
<b>Phaseolus experiment</b>	<b>IN</b>	0,25	0,6149	<b>25,79</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>52,47</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>14,97</b>	<b>0,0002</b>	0,07	0,7892	<b>21,35</b>	<b>&lt;.0001</b>
	<b>GR</b>	<b>7,64</b>	<b>0,0001</b>	<b>49,27</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>89,42</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>27,33</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>7,74</b>	<b>0,0001</b>	<b>42,55</b>	<b>&lt;.0001</b>
	<b>IN×GR</b>	1,04	0,3765	<b>8,41</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>10,07</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>3,36</b>	<b>0,0220</b>	0,67	0,5755	<b>3,33</b>	<b>0,0227</b>
	<b>VAR(GR)</b>	<b>7,00</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>14,16</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>26,75</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>6,01</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>5,76</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>10,05</b>	<b>&lt;.0001</b>
	<b>IN×VAR(GR)</b>	<b>5,33</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>4,55</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>7,48</b>	<b>&lt;.0001</b>	1,48	0,1376	1,12	0,3524	<b>2,17</b>	<b>0,0162</b>
<hr/>													
<b>Vigna experiment</b>	<b>IN</b>	0,30	0,7462	0,38	0,6907	1,15	0,3337	0,58	0,5655	0,17	0,8426	<b>8,21</b>	<b>0,0019</b>
	<b>VAR</b>	<b>23,40</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>31,31</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>29,24</b>	<b>&lt;.0001</b>	<b>96,15</b>	<b>&lt;.0001</b>	2,75	0,1103	<b>494,98</b>	<b>&lt;.0001</b>
	<b>IN×VAR</b>	2,20	0,1313	0,48	0,6252	0,42	0,6596	0,70	0,5046	0,93	0,4088	2,25	0,1259

**Tabella 3-2: Dataset completo dell'esperimento 1 – Phaseolus vulgaris; in colonna ci sono le variabili rilevate nel trattamento con inoculo (AMF) e nel controllo (CONTR), in riga il codice delle varietà, inserite nel rispettivo gruppo di genotipi [élite cultivar (ELCVR), linee di introgressione rispettivamente più produttive in Italia (IT), Romania (RO), Spagna (SP)]**

	Fiori per pianta		Baccelli per pianta		Produzione per pianta		Altezza stirata delle piante		Rapporto baccelli:fiore		Peso medio del baccello		
	(n)		(n)		(g PF)		(cm)		(n/n)		(g PF)		
	CONTR	AMF	CONTR	AMF	CONTR	AMF	CONTR	AMF	CONTR	AMF	CONTR	AMF	
<b>ELCVR</b>	CT	33.4 ± 2.5	37.4 ± 2.3	15.2 ± 0.8	23.8 ± 1.7	59.8 ± 3.2	113.6 ± 8.5	15.8 ± 1.3	22.7 ± 3.5	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.8 ± 0.2
	ME	20.5 ± 6.1	17.4 ± 8.9	7.0 ± 1.5	6.8 ± 1.0	22.8 ± 5.0	28.8 ± 4.5	6.9 ± 1.4	6.7 ± 1.0	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1	3.3 ± 0.2	4.2 ± 0.1
	PK	29.3 ± 4.1	22.5 ± 5.3	7.5 ± 0.7	5.7 ± 0.3	27.0 ± 1.8	22.7 ± 1.4	26.0 ± 2.5	23.3 ± 2.5	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	3.6 ± 0.1	4.0 ± 0.1
	RC	21.8 ± 3.9	26.6 ± 3.9	7.9 ± 2.2	11.6 ± 1.6	31.9 ± 7.4	52.4 ± 6.5	19.7 ± 1.4	19.8 ± 1.3	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.6 ± 0.2
	SG	30.7 ± 5.4	31.7 ± 3.1	8.7 ± 2.1	7.1 ± 1.7	27.1 ± 6.3	22.8 ± 4.0	17.5 ± 2.0	17.9 ± 1.7	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	3.1 ± 0.1	3.3 ± 0.1
<b>IT</b>	IT 2259	19.8 ± 2.5	24.8 ± 5.2	5.8 ± 1.0	15.2 ± 2.1	19.2 ± 2.7	55.7 ± 5.4	16.2 ± 2.9	18.3 ± 0.5	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.7 ± 0.2
	IT 309	15.8 ± 2.9	16.8 ± 2.0	7.7 ± 0.9	8.7 ± 1.5	28.1 ± 3.6	35.9 ± 8.0	18.6 ± 1.2	21.3 ± 3.4	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.1	3.6 ± 0.1	4.1 ± 0.2
	IT 835	36.8 ± 6.3	27.2 ± 4.0	3.7 ± 1.8	11.3 ± 1.0	5.8 ± 0.9	35.5 ± 3.9	20.3 ± 4.4	23.8 ± 1.7	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.0	2.2 ± 0.6	3.2 ± 0.2
	IT 962	11.7 ± 1.8	14.7 ± 4.6	4.8 ± 0.9	5.6 ± 1.3	18.4 ± 4.1	22.6 ± 5.5	20.6 ± 0.5	19.3 ± 3.8	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.1	3.8 ± 0.1	4.1 ± 0.2
<b>RO</b>	RO 1561	18.1 ± 3.1	15.6 ± 1.6	3.7 ± 0.4	5.3 ± 0.1	10.5 ± 0.7	16.2 ± 0.5	20.6 ± 1.1	18.3 ± 3.3	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.1
	RO 1603	18.3 ± 3.6	20.2 ± 6.4	8.5 ± 2.6	11.7 ± 2.7	27.5 ± 6.1	41.2 ± 8.4	19.2 ± 2.6	19.4 ± 0.9	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	3.4 ± 0.3	3.6 ± 0.1
	RO 1870	11.5 ± 3.9	33.0 ± 3.5	3.9 ± 0.8	13.9 ± 2.1	13.8 ± 3.4	42.2 ± 4.5	15.3 ± 0.6	20.1 ± 2.5	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	3.5 ± 0.1	3.2 ± 0.4
	RO 1878	14.9 ± 0.8	12.7 ± 3.4	1.8 ± 0.4	3.4 ± 0.1	5.1 ± 0.9	11.0 ± 0.6	18.1 ± 2.5	13.6 ± 1.7	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.3 ± 0.2
<b>SP</b>	ES 1816	21.8 ± 3.7	53.8 ± 5.6	3.1 ± 0.5	2.3 ± 0.8	8.0 ± 0.4	4.6 ± 1.7	13.0 ± 2.9	16.7 ± 6.7	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.7 ± 0.3	2.0 ± 0.1
	ES 1988	32.6 ± 3.6	9.0 ± 1.4	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.0	3.8 ± 0.1	3.2 ± 0.3	13.5 ± 1.6	13.1 ± 3.3	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	3.2 ± 0.1	3.2 ± 0.3
	ES 2164	23.1 ± 3.2	16.8 ± 4.7	5.0 ± 0.9	1.8 ± 0.1	14.8 ± 2.4	6.0 ± 0.5	14.8 ± 2.4	11.2 ± 3.3	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	3.0 ± 0.2	3.3 ± 0.1
	ES 967	21.3 ± 6.1	10.8 ± 2.4	3.3 ± 0.6	2.0 ± 0.3	8.2 ± 1.5	6.3 ± 1.0	18.8 ± 4.6	13.1 ± 1.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	2.5 ± 0.1	3.2 ± 0.1

I gruppi genotipici hanno mostrato differenze notevoli per la maggior parte dei parametri rilevati, anche se con entità diverse a seconda della variabile.

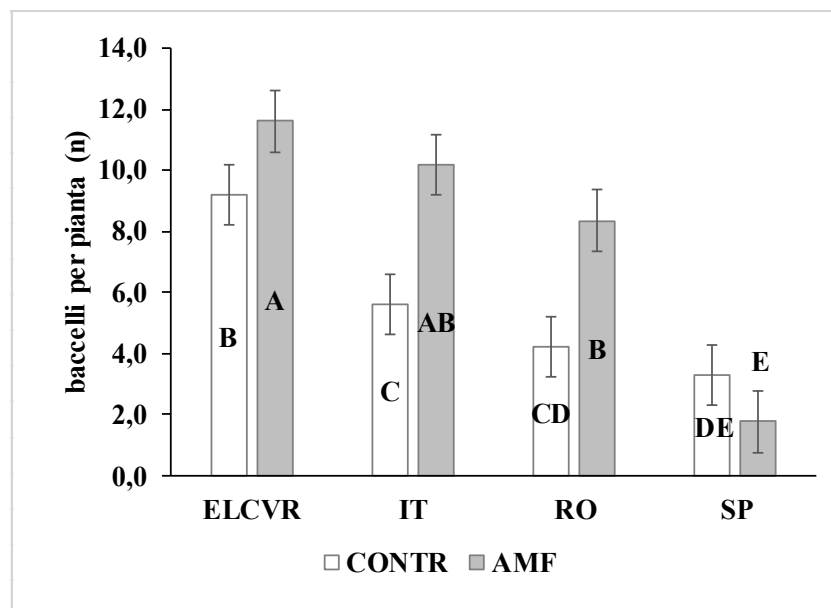
Le ELCVR hanno prodotto una quantità di fiori per pianta non dissimile dalle linee SP (rispettivamente 27,2 e 22,8) (Fig. 3-1). Le ELCVR hanno prodotto il 33% di fiori in più rispetto al gruppo IT e il 45% in più rispetto al gruppo RO. Inoltre, l'inoculo ha mostrato effetti evidenti in particolare nei genotipi RO\_1870 e in 3 genotipi su 4 del gruppo SP. Va sottolineato che il genotipo RO\_1870 e il genotipo SP\_1816 hanno avuto un beneficio in termini di numero di fiori prodotti dovuto alla presenza dell'inoculo, mentre i genotipi SP\_1988 e SP\_967 hanno mostrato nel trattamento inoculato rispettivamente il 72% e il 49% di fiori in meno rispetto al trattamento di controllo.



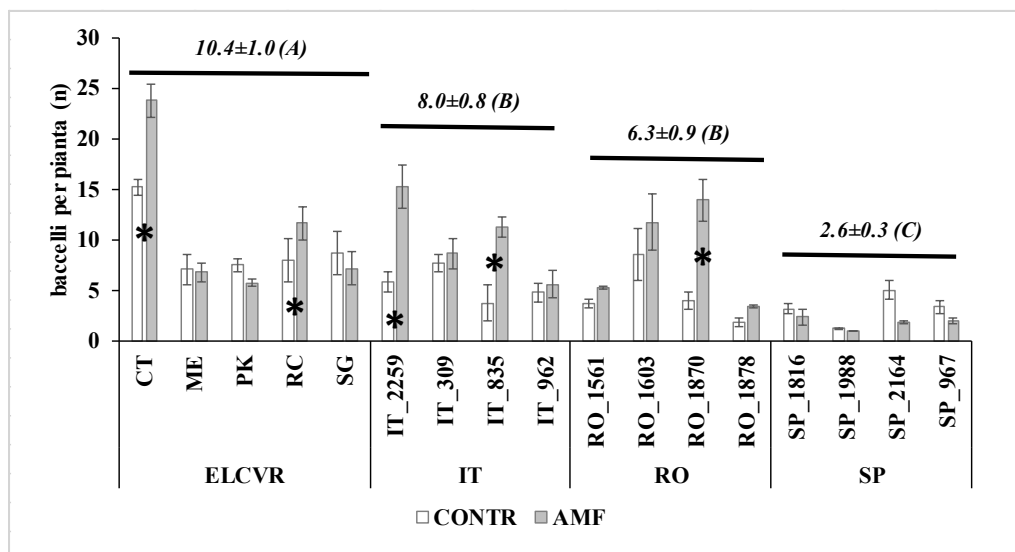
**Figura 3-1: Numero di fiori per pianta dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p>0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN)**



Il gruppo delle ELCVR ha prodotto sensibilmente più baccelli per pianta degli altri gruppi (Fig. 3-2 e 3-3). Va inoltre notato che il gruppo SP ha avuto una produzione di baccelli per pianta decisamente bassa e costante tra i genotipi al suo interno. Le IT e le RO non risultano significativamente diverse tra loro, ma a loro volta producono circa la metà di baccelli delle ELCVR e 3,5 volte più baccelli delle spagnole (Fig. 3-2 e 3-3). L'inoculo con micorrizza ha avuto un evidente effetto di incremento dei baccelli, il quale non si è però manifestato nel gruppo SP (Fig. 3-2). Tale effetto è stato tanto più marcato quanto minore è stata la produzione media del gruppo, consistendo in un aumento del 26,2% in ELCVR e in aumenti del 81,2% e 98,2% in IT e RO. In particolare, i genotipi CT, RC, IT\_2259, IT\_835 e RO\_1870, quando inoculati, hanno prodotto dal 46% al 256,4% di baccelli in più rispetto ai rispettivi controlli non inoculati. Nel gruppo SP l'inoculo ha comportato una riduzione del numero di baccelli pari al 45,9%, tuttavia tali differenze non sono apparse apprezzabili all'analisi statistica (la cui "P > |t|" del confronto di coppia tra inoculato e non inoculato nell'ambito delle SP è stata 0.15, altri dati di confronti a coppie non mostrati).

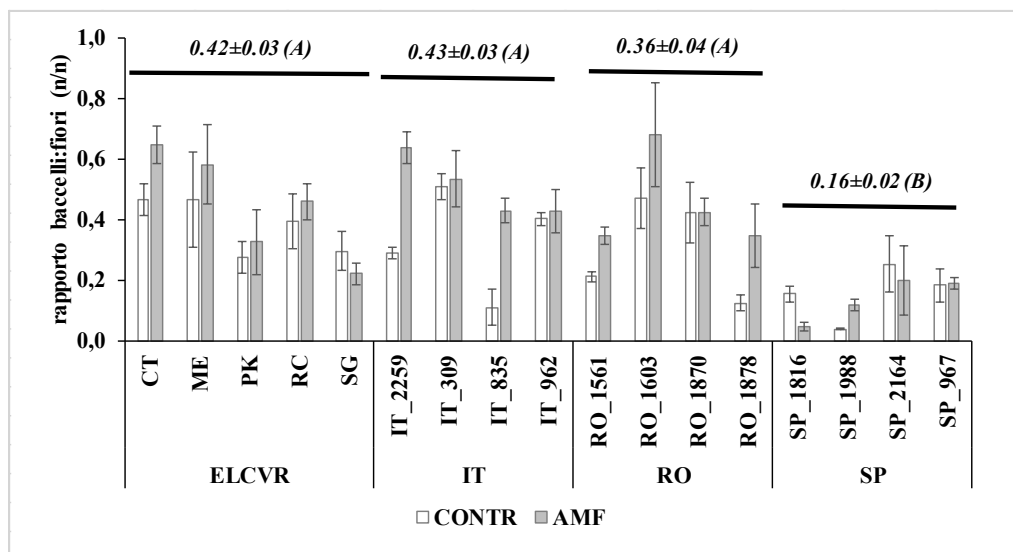


**Figura 3-2: Numero di baccelli per pianta dei diversi gruppi genotipici (GR) inoculati (AMF, barre grigie) e non inoculati (CONTR, barre bianche). Le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$**



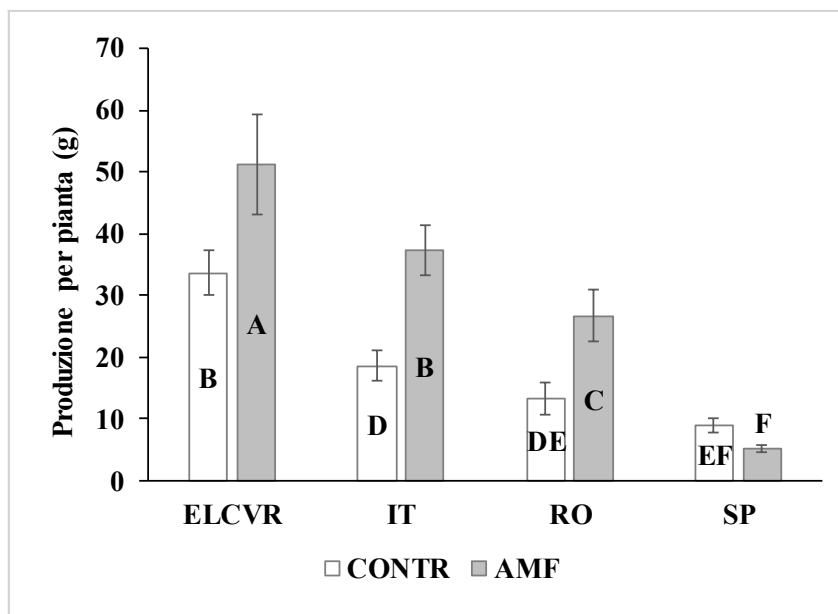
**Figura 3-3: Numero di baccelli per pianta dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN)**

Con i dati a disposizione è stato anche calcolato il rapporto tra baccelli e fiori prodotti complessivamente. Tale rapporto è relazionato alla percentuale grezza di allegazione, ma non tiene conto dei flussi di emissione dei fiori. Le linee IT, le RO e le ELCVR non hanno mostrato differenze per il rapporto baccelli:fiori, attestandosi su valori medi di allegazione del 36%-43%. Il gruppo delle SP invece ha avuto un'allegazione estremamente bassa (16%) (Fig. 3-4). Inoltre, l'inoculo non ha mostrato un effetto di rilievo sulla percentuale di allegazione né a scala di singolo genotipo, né di gruppo o di dataset completo.

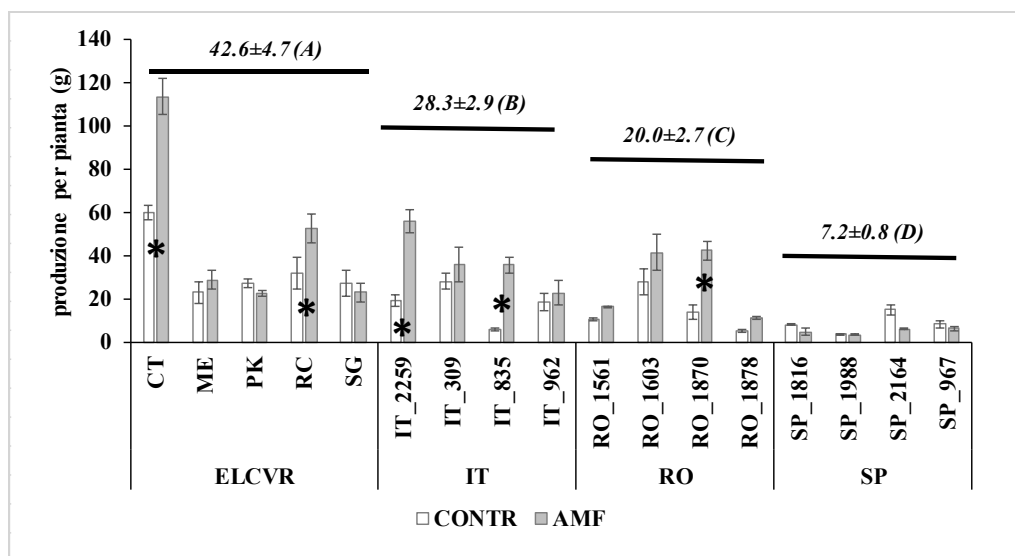


**Figura 3-4: Rapporto baccelli:fiori dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN)**

Per quanto riguarda il parametro della produzione per pianta tutti i gruppi sono risultati diversi tra loro (Fig. 3-5 e 3-6) con differenze dovute all'inoculo analoghe a quanto già osservato per il numero di baccelli per pianta, ma di maggiore entità, in particolare nelle ELCVR. Nel complesso, le ELCVR hanno mostrato le migliori performance in termini produttivi (42,6 g per pianta), mostrando rese del 50,5%, 113% e 491,7% maggiori rispetto ai gruppi IT, RO e SP. Tra i gruppi testati, è emersa ampia variabilità nella resa nell'ambito delle ELCVR e bassa variabilità nell'ambito delle INL. Al contrario, l'effetto dell'inoculo è stato più marcato in alcune linee IT e RO, che grazie alla micorriza hanno prodotto dal 191% al 508% in più rispetto al controllo, che non nelle ELCVR CT e RC, nei confronti delle quali le tesi AMF hanno mostrato rese maggiori del 90% e 64% rispetto ai controlli non inoculati.



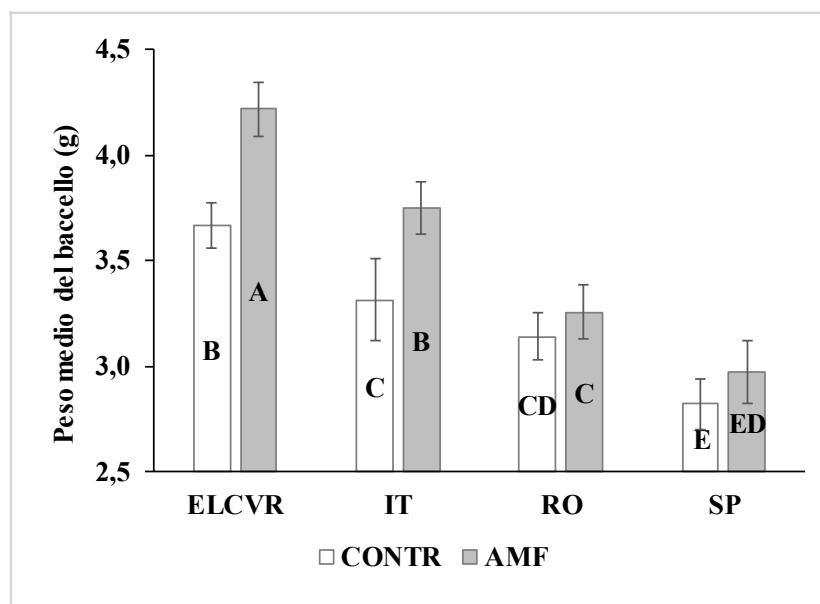
**Figura 3-5: Produzione per pianta dei diversi gruppi genotipici (GR) inoculati (AMF, barre grigie) e non inoculati (CONTR, barre bianche). Le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$**



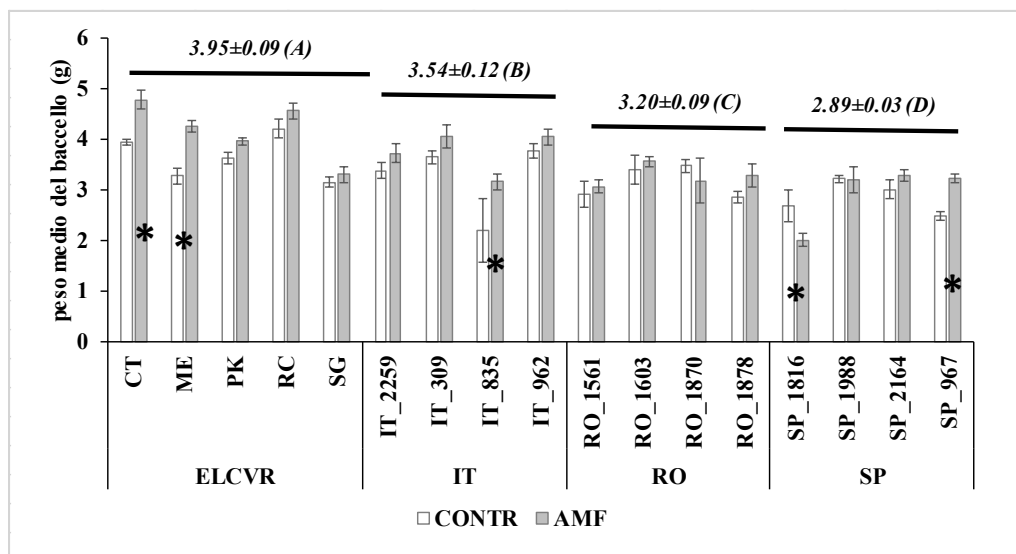
**Figura 3-6: Produzione per pianta dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde. I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre**

*con lettere in comune non sono diverse per  $p>0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN)*

L'effetto dell'inoculo sulla resa è dipeso sia dall'effetto sul numero di baccelli (come anche mostrato in Fig. 3-2) sia dall'effetto sul peso medio del baccello (Fig. 3-7 e 3-8). In particolare, le ELCVR hanno prodotto baccelli più pesanti rispetto a tutti gli altri gruppi confrontati. I baccelli prodotti dalle linee SP hanno invece mostrato un peso unitario, rispettivamente, del 10% e 22% in meno delle linee RO e delle IT. L'effetto dell'inoculo sul peso del baccello nei vari gruppi è però apparso evidente solamente nelle ELCVR e nel gruppo IT, che sono risultati il 15% e il 13,1% in più rispetto alle tesi di controllo, mentre le variazioni dovute all'effetto dell'inoculo sulle varietà del gruppo RO e SP non sono stati apprezzabili, seppur positive (3,6% e 5,4% in più rispetto al controllo). In seguito all'inoculo, CT, ME e IT\_835 hanno prodotto baccelli con peso medio unitario maggiore del 23%, 27% e del 45,5%. Nel genotipo SP\_1816 l'inoculo ha invece determinato un calo del 35% del peso fresco.



**Figura 3-7: Peso medio del baccello dei diversi gruppi genotipici (GR) inoculati (AMF, barre grigie) e non inoculati (CONTR, barre bianche). Le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p>0,05$**



**Figura 3-8: Peso medio del baccello dei diversi genotipi di fagiolino da baccello verde I fattori all'interno del gruppo genotipico (GR) sono la varietà (Contender: CT; Messi: ME; Purple king: PK; Rocquencourt: RC; Supernano giallo: SG; le linee di introgressione dei gruppi italiani, rumeni e spagnoli sono indicate rispettivamente con IT, RO e SP seguite da un codice interno) e l'inoculo (CONTR, barre bianche: non inoculato; AMF, barre grigie: inoculato con funghi arbuscolo micorrizici). I dati sono media  $\pm$  errore standard. Le barre orizzontali nere sopra i singoli genotipi indicano l'effetto medio del GR; le barre con lettere in comune non sono diverse per  $p > 0,05$ . Gli asterischi indicano differenze significative per il fattore inoculo (IN)**

### 3.2 Esperimento 2: Vigna unguiculata

L'esperimento riguardante la *Vigna unguiculata* comprende due soli genotipi e tre trattamenti di inoculo (vedi Tab. 3-1 per l'analisi statistica e Tab. 3-3 per il dataset completo). A differenza di quanto già osservato per il *Phaseolus*, in *V. unguiculata* l'inoculo microbico ha avuto un effetto alquanto modesto sulle variabili in studio misurate. In particolare, l'interazione tra inoculo e varietà non è mai apparsa evidente e l'inoculo ha influenzato solamente il peso medio del singolo baccello. Tale peso è risultato maggiore nel MIX rispetto alla media di AMF e controllo, che nel complesso non sono stati dissimili tra loro.

Le due varietà in studio di *V. unguiculata* hanno comunque mostrato differenze per tutti i caratteri ad eccezione del rapporto tra baccelli e fiori. In media i genotipi di Vigna hanno mostrato un'allegagione del 57%.

La varietà Dolico (indicata come “DO” in Tab. 3-3) ha mostrato il 62,1% di fiori in più e il 94,2% di fiori in più rispetto alla varietà Metro o Stringa (indicata come “MS” in Tab. 3-3), tuttavia, il DO ha presentato un peso medio del baccello del 75,2% inferiore a MS e ciò si è concretizzato in una resa complessiva per pianta del 51,9% inferiore in DO rispetto a MS. Inoltre, la varietà MS ha anche mostrato una lunghezza stirata di 4,5 volte superiore al DO.

**Tabella 3-3: Dataset completo dell'esperimento 2 – Vigna unguiculata; in colonna ci sono il trattamento di controllo (CONTR), con l'inoculo semplice (AMF) e con l'inoculo complesso (MIX); in riga è riportato il codice delle varietà**

	CONTR	AMF	MIX
<b>Fiori per pianta (n)</b>			
DO	11,1 ± 2,5	9,2 ± 0,9	10,8 ± 0,3
MS	6,5 ± 0,6	7,5 ± 0,7	5,2 ± 0,5
<b>Baccelli per pianta (n)</b>			
DO	6,8 ± 1,7	5,6 ± 0,7	6,5 ± 0,3
MS	3,5 ± 0,6	3,3 ± 0,3	3,0 ± 0,4
<b>Produzione per pianta (g PF)</b>			
DO	18,9 ± 3,7	17,2 ± 1,9	25,4 ± 0,9
MS	39,3 ± 7,7	42,1 ± 3,7	46,3 ± 6,2
<b>Altezza stirata delle piante (cm)</b>			
DO	15,1 ± 6,5	9,6 ± 0,8	10,6 ± 2,4
MS	50,5 ± 2,6	58,4 ± 5,8	50,5 ± 6,0
<b>Rapporto baccelli:fiori (n/n)</b>			
DO	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0
MS	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
<b>Peso medio del baccello (g PF)</b>			
DO	2,9 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,9 ± 0,2
MS	11,2 ± 0,9	13,1 ± 0,6	15,7 ± 0,8

## Capitolo 4

### DISCUSSIONE

Le cultivar élite (ELCVR) hanno mostrato produzioni in media maggiori rispetto al gruppo delle linee di introgressione (INL). All'interno delle INL, le linee del gruppo IT sono state le più produttive e, rispetto alle RO, hanno prodotto baccelli più pesanti.

Ciò può essere dipeso da una maggiore adattabilità delle linee IT all'ambiente di prova. In effetti, le linee di ogni gruppo erano già state scelte per essere risultate le più produttive nel rispettivo ambiente. Nonostante le SP abbiano mostrato una buona potenzialità a produrre fiori, hanno tuttavia prodotto pochi baccelli per pianta e questi sono apparsi più leggeri rispetto a quelli prodotti dalle linee degli altri gruppi, raggiungendo di conseguenza una produzione per pianta estremamente bassa. Le linee spagnole hanno avuto una scarsissima allegazione e sono quelle che in assoluto hanno sofferto maggiormente nel nostro ambiente e nelle nostre condizioni di coltivazione.

L'inoculo con *Glomus iranicum* ha influenzato positivamente la resa in baccelli freschi del *Phaseolus vulgaris*. Come altri autori hanno precedentemente osservato (Safapour *et al.*, 2011; Petropoulos *et al.*, 2019; Mohamed *et al.*, 2019), tale effetto si verifica sia attraverso l'aumento del numero di baccelli per pianta e sia del peso medio del baccello ed è legato a un migliore stato nutrizionale della pianta.

Nella prova in atto, tale beneficio è apparso tuttavia variabile al variare dei genotipi e soprattutto funzionale al gruppo genotipico. Tendenzialmente, le INL hanno risposto meglio all'inoculo rispetto alle ELCVR, ma in modo non uniforme tra i genotipi (Fig. 3-2, 3-3, 3-5 e 3-6). Tale risposta è presumibilmente direttamente relazionata alla produttività complessiva. In particolare, la possibilità di trasferire zuccheri alla radice dipende dalla fotosintesi (Janos, 2007). Ciò è confermato dal fatto che il gruppo delle ELCVR, in media, ha mostrato una potenzialità produttiva maggiore rispetto al gruppo delle INL (Fig. 3-6). Ciononostante, nel gruppo IT e RO alcuni genotipi mostrano produttività analoghe alla gran parte dei genotipi del gruppo ELCVR, il quale è fortemente influenzato da un genotipo molto produttivo. Sebbene le INL IT\_2259, IT\_835 e RO\_1870 abbiano risposto moltissimo alla pratica dell'inoculo, quando non inoculate, hanno produzioni estremamente basse e non commercialmente interessanti. Da questa dinamica si può ipotizzare che la risposta all'inoculo di alcune INL sia inversamente proporzionale alla produzione media per pianta. Infatti, i genotipi poco produttivi rispondono molto all'inoculo, raggiungendo produzioni



estremamente interessanti, mentre i genotipi che hanno di per sé una produttività accettabile risultano poco influenzati dall'inoculo con funghi AM. Tuttavia, questo non si è verificato nelle linee SP, che indipendentemente da tutto hanno trovato nelle nostre condizioni di coltivazione un ambiente sfavorevole.

L'adattabilità di un genotipo a un contesto e alla relazione con determinati simbionti radicali è un concetto acclarato. Altri lavori hanno mostrato che tale adattabilità dipende dalla configurazione genica del genotipo e in particolare dalla presenza di determinati alleli (Meixner *et al.*, 2007; Cesaro *et al.*, 2008; De Vita *et al.*, 2018). Inoltre, la relazione tra leguminose e AMF è spesso controllata da geni che controllano anche la relazione tra pianta e batteri azotofissatori (Levy *et al.*, 2004; Gherbi *et al.*, 2008; Svistoonoff *et al.*, 2010; Rasmussen *et al.*, 2012; Ossler *et al.*, 2015), il che può contribuire a magnificare gli effetti di stimolo dal parte del simbionte fungino.

Le conoscenze sull'effetto che i funghi AM esercitano sulla fioritura sono ancora insufficienti e risultano poco chiare anche in seguito a questo studio. Con tutta probabilità, il numero di fiori per pianta e il rapporto baccelli:fiori hanno risentito in maniera decisamente scarsa dell'effetto dell'inoculo per il fatto che il fagiolino è una specie con elevata predisposizione alla colatura dei fiori. In altre specie, è stato dimostrato che l'inoculo con AMF ha un effetto importante sul numero di fiori, che arrivano a essere addirittura dimezzati nelle tesi inoculate (Lazzara *et al.*, 2017). In altri casi, tuttavia, è stato anche mostrato un aumento e anticipo della fioritura in leguminose e solanacee inoculate rispetto alle tesi non inoculate, ma tale effetto è stato evidente solo in condizioni di elevata disponibilità di fosforo (Saia *et al.*, 2014b, 2020a). Pertanto, l'assenza di effetto osservato su fagiolo è può essere dipeso dalla carenza di P del terreno e al contempo dalla presenza di elevate temperature, che favoriscono la cascola dei fiori (Gross & Kigel, 1994; Silva *et al.*, 2020).

L'altezza stirata, per approssimazione, può darci un'idea della biomassa aerea prodotta dalle piante. In letteratura, è noto l'effetto delle AMF sull'aumento della biomassa aerea nelle leguminose da foraggio e nel frumento (BODDEY *et al.*, 2006; Mortimer *et al.*, 2008; Saia *et al.*, 2012, 2014a). Nonostante l'effetto dell'inoculo su questo parametro risulti apprezzabile all'analisi statistica, di fatto non da nessuna informazione in quanto le tesi trattate con AMF sono sempre uguali al loro controllo. È possibile che l'aumento della biomassa aerea subisca un incremento per l'aumento della biomassa fogliare piuttosto che per l'aumento dell'altezza delle piante, e che esso possa essere correlato a una maggiore assimilazione delle piante inoculate, con risultati positivi sulla resa.

L'aumento del peso del singolo baccello non è opportunamente un carattere vantaggioso per il fagiolino mangiatutto, in quanto correlato all'aumento della dimensione e del numero dei semi, all'indurimento dei tessuti e alla riduzione della dolcezza. Tuttavia, l'aumento del peso del singolo baccello in seguito all'inoculo (Fig. 3-8), può comportare la possibilità di anticipare il ciclo di raccolta per avere più flussi senza alcun aumento del peso unitario.

La *Vigna unguiculata* testata in questa tesi non ha risentito dell'effetto dell'inoculo, probabilmente perché il genere *Vigna* comprende specie più rustiche e quindi meno tendenti a rispondere all'inoculo rispetto a *Phaseolus* (Abd-Alla *et al.*, 2000). A seguito di queste caratteristiche, che possono essere legate a una maggiore ottimizzazione dell'assorbimento e uso dell'acqua e dei nutrienti assorbiti e a una più elevata efficienza nell'assimilazione, alcuni genotipi possono non trovare beneficio nella simbiosi con i funghi AM (Kaepler *et al.*, 2000). Rispetto al *Phaseolus*, la *Vigna* potrebbe essere stata limitata da una scarsa affinità con i ceppi nativi dei rizobi simbiotici nel suolo e dalla capacità delle radici di intercettarli ed entrarvi in simbiosi. Tuttavia, in *V. unguiculata*, il peso del singolo baccello è stato maggiore quando le piante sono state inoculate con l'inoculo complesso (che comprende sia AMF, sia il rizobio specifico, sia *Trichoderma*). Tale aumento può essere attribuito più alla presenza nel MIX di *Bradhyrhizobium* spp., che di *Trichoderma artroviride*. In altri studi, è stato dimostrato che l'inoculo con rizobi è in grado di aumentare la resa in baccelli (Nielsen *et al.*, 1998; Rudresh *et al.*, 2005; Mortimer *et al.*, 2008; Saia *et al.*, 2019a), mentre Saia *et al.* (2019a) hanno ipotizzato che l'effetto del MIX non sia tanto legato alla presenza del *Trichoderma artroviride*, il quale è di beneficio prevalentemente in presenza di stress da attacchi di funghi patogeni, condizioni che non si sono verificate nel presente studio. In effetti, per via delle alte temperature, non è stato evidenziato alcun sintomo di attacco da patogeni fungini alle foglie o ai baccelli nonostante la presenza di irrigazione.

## CONCLUSIONI

In conclusione, è stato possibile osservare un effetto dell'inoculo al variare del genotipo, ma tale effetto è stato molto influenzato dal gruppo a cui il genotipo apparteneva, con effetti più evidenti in alcuni gruppi di genotipi presumibilmente più adattati alle condizioni di sperimentazione.

Nelle INL, la componente selezionata dall'interazione genotipo  $\times$  ambiente è notevole e tale da influenzare fortemente la risposta di un genotipo a condizioni di coltivazione diverse da quelle in cui è stato selezionato. Nonostante non si possa escludere del tutto che queste componenti esistano anche nelle ELCVR possiamo opportunamente convenire che queste siano state selezionate per un'ampia adattabilità ai diversi ambienti di coltivazione e che la stessa struttura genetica influisca nel determinare questa risposta.

Nelle condizioni di esecuzione della prova, l'inoculo con funghi AMF ha apportato benefici sulla resa del fagiolo da baccello verde nonostante le condizioni siano indubbiamente state molto stressanti per la pianta (sia in termini di carenza di elementi, sia di eccessi termici).

In particolare, l'aumento di resa è stato registrato raccogliendo i baccelli nelle tesi inoculate e in quelle non inoculate nello stesso momento. Quindi, il maggior peso unitario del baccello nelle tesi inoculate suggerisce chiaramente che l'inoculo potrebbe permettere un anticipo del momento di raccolta. In tal caso, rimuovendo il principale sink per la pianta (appunto i baccelli in accrescimento), si ridurrebbe la competizione tra AMF, fiori e baccelli già allegati a cui la pianta risponderebbe attraverso l'emissione di nuovi fiori o una più rapida crescita dei baccelli che non hanno ancora raggiunto la dimensione desiderata per la raccolta.

Infine, è emerso che *Vigna unguiculata* ha beneficiato in misura esigua dell'inoculo con PGPM.

Per concludere, l'inoculo con AMF può essere una pratica positiva per l'ottimizzazione delle risorse ambientali e per la produzione in aree a scarsa fertilità, anche se il beneficio è strettamente legato a caratteristiche del genotipo vegetale che non sempre sono determinabili a priori.

## RINGRAZIAMENTI

Ci tengo a ringraziare il professor Sergio Saia per la passione e per la dedizione che mette nel suo lavoro, fatto che è di grande ispirazione per me; per la sua disponibilità e per la competenza messa a mia disposizione durante la stesura della tesi; per aver creduto in me e per avermi portato a credere in me stessa. Soprattutto lo ringrazio, per avermi dato spunti di riflessione e per avermi portato a pormi sempre più domande piuttosto che a darmi delle risposte.

Ringrazio me stessa e insieme la sensibilità e l'attenzione di mia madre, la precisione e l'onestà di mio padre, la giovinezza e la determinazione di mia sorella.

Ringrazio Ale per supportarmi e sopportarmi, e per le altre mille cose che mi insegna e che contribuiscono a rendermi una persona migliore.

## BIBLIOGRAFIA

**Abd-Alla MH, Omar SA, Karanxha S. 2000.** The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology* **14**: 191–200.

**Abdel-Fattah GM, El-Haddad SA, Hafez EE, Rashad YM. 2011.** Induction of defense responses in common bean plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbiological Research* **166**: 268–281.

**Agnelli A, Bol R, Trumbore SE, Dixon L, Cocco S, Corti G. 2014.** Carbon and nitrogen in soil and vine roots in harrowed and grass-covered vineyards. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **193**: 70–82.

**Aguirre-Medina JF, Aguirre-Cadena JF, Cadena-Iñiguez J, Arevalo-Galarza MDL, Rosas-Quijano R, Galvez-Lopez D. 2017.** Influence of rhizophagus intraradices and phosphorus fertilization on growth, yield and N P content in grain of *Phaseolus vulgaris*. *Legume Research* **40**: 735–740.

**Anderson AJ. 1985.** Responses of Bean to Root Colonization With *Pseudomonas putida* in a Hydroponic System. *Phytopathology* **75**: 992.

**Arkipova TN, Prinsen E, Veselov SU, Martinenko E V., Melentiev AI, Kudoyarova GR. 2007.** Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil* **292**: 305–315.

**Bakker PAHM, Pieterse CMJ, Van Loon LC. 2007.** Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* **97**: 239–243.

**Belgaroui N, Berthomieu P, Rouached H, Hanin M. 2016.** The secretion of the bacterial phytase PHY-US417 by *Arabidopsis* roots reveals its potential for increasing phosphate acquisition and biomass production during co-growth. *Plant Biotechnology Journal* **14**: 1914–1924.

**Bender SF, van der Heijden MGA. 2015.** Soil biota enhance agricultural sustainability by improving crop yield, nutrient uptake and reducing nitrogen leaching losses (I Kaplan, Ed.). *Journal of Applied Ecology* **52**: 228–239.

**Benhamou N, Bélanger RR, Paulitz TC. 1996.** Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* Trow: An ultrastructural and cytochemical study. *Planta* **199**: 105–117.

**BODDEY RM, ALVES BJR, URQUIAGA S, ISMAILI M, IBIJBIJEN J. 2006.** Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytologist* **134**: 353–360.

**Bonfante P. 2001.** At the Interface Between Mycorrhizal Fungi and Plants: the Structural Organization of Cell Wall, Plasma Membrane and Cytoskeleton. In: Hock B, ed. *Fungal Associations*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 45–61.

**Bonkowski M. 2004.** Protozoa and plant growth: The microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* **162**: 617–631.

**Brazelton JN, Pfeufer EE, Sweat TA, McSpadden Gardener BB, Coenen C. 2008.** 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1349–1358.

**Cesaro P, van Tuinen D, Copetta A, Chatagnier O, Berta G, Gianinazzi S, Lingua G. 2008.** Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato farming area. *Applied and environmental microbiology* **74**: 5776–83.

**Chalk P, Souza R, Urquiaga S, Alves B, Boddey R. 2006.** The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2944–2951.

**Colla G, Rouphael Y, Di Mattia E, El-Nakhel C, Cardarelli M. 2015.** Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**: 1706–1715.

**DAFT MJ, ELGIAHMI AA. 1974.** EFFECT OF ENDOGONE MYCORRHIZA ON PLANT GROWTH VII. INFLUENCE OF INFECTION ON THE GROWTH AND NODULATION IN FRENCH BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*). *New Phytologist* **73**: 1139–1147.

**Dimkpa C, Svatoš A, Merten D, Büchel G, Kothe E. 2008.** Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Canadian Journal of Microbiology* **54**: 163–172.

**Dodd IC, Perez-Alfocea F. 2012.** Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3415–3428.

**FAO. 2018.** *The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050.*

**Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodríguez MX, Barea JM. 2010.** Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* **45**: 209–217.

**Freitas MA, Medeiros FHV, Carvalho SP, Guilherme LRG, Teixeira WD, Zhang H, Pará PW. 2015.** Augmenting iron accumulation in cassava by the beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GBO3). *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–7.

**Garcia CL, Dattamudi S, Chanda S, Jayachandran K. 2019.** Effect of Salinity Stress and Microbial Inoculations on Glomalin Production and Plant Growth Parameters of Snap Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomy* **9**.

**Gherbi H, Markmann K, Svistoonoff S, Estevan J, Autran D, Giczey G, Auguy F, Peret B, Laplaze L, Franche C, et al. 2008.** SymRK defines a common genetic basis for plant root endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia, and Frankiabacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 4928–4932.

**Giambalvo D, Ruisi P, Saia S, Di Miceli G, Frenda AS, Amato G. 2012.** Faba bean grain yield, N<sub>2</sub> fixation, and weed infestation in a long-term tillage experiment under rainfed Mediterranean conditions. *Plant and Soil* **360**: 215–227.

**Giovannetti M, Turrini A, Sbrana C, Avio L, Pietrangeli B. 2006.** Funghi micorrizici in studi ecotossicologici : impatto sul suolo di fungicidi , insetticidi ed erbicidi. **2**: 49–63.

**Graham JH. 2001.** What Do Root Pathogens See in Mycorrhizas? *The New Phytologist* **149**: 357–359.

**Gross Y, Kigel J. 1994.** Differential sensitivity to high temperature of stages in the reproductive development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* **36**: 201–212.

**Hafez EE, Abdel-Fattah GM, El-Haddad SA, Rashad YM. 2013.** Molecular defense response of mycorrhizal bean plants infected with *Rhizoctonia solani*. *Annals of Microbiology* **63**: 1195–1203.

**Hamaoui B, Abbadi JM, Burdman S, Rashid A, Sarig S, Okon Y. 2001.** Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* **21**: 553–560.

**Handelsman J, Stabb E V. 1996.** Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* **8**:

1855–1869.

**Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004.** Trichoderma species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 43–56.

**Hayat R, Ali S, Amara U, Khalid R, Ahmed I. 2010.** Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* **60**: 579–598.

**van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA, Sanders IR. 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.

**Hetrick BAD, Wilson GWT, Todd TC. 1992.** Relationships of mycorrhizal symbiosis, rooting strategy, and phenology among tallgrass prairie forbs. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1521–1528.

**Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J. 2009.** Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Trichoderma. *Biological Control* **51**: 409–416.

**Hsu SF, Buckley DH. 2009.** Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME Journal* **3**: 124–136.

**Janos DP. 2007.** Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. *Mycorrhiza* **17**: 75–91.

**Kaepler SM, Parke JL, Mueller SM, Senior L, Stuber C, Tracy WF. 2000.** Variation among Maize Inbred Lines and Detection of Quantitative Trait Loci for Growth at Low Phosphorus and Responsiveness to Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Crop Science* **40**: 358–364.

**Kanungo PK, Panda D, Adhya TK, Ramakrishnan B, Rao VR. 1997.** Nitrogenase Activity and Nitrogen-Fixing Bacteria Associated with Rhizosphere of Rice Cultivars with Varying N Absorption Efficiency. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **73**: 485–488.

**Kaschuk G, Kuyper TW, Leffelaar PA, Hungria M, Giller KE. 2009.** Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1233–1244.

**Köhl L, Oehl F, Van Der Heijden MGA. 2014.** Agricultural practices indirectly influence plant productivity and ecosystem services through effects on soil biota. *Ecological Applications* **24**: 1842–1853.



**Kumar V, Sarma MVRK, Saharan K, Srivastava R, Kumar L, Sahai V, Bisaria VS, Sharma AK. 2012.** Effect of formulated root endophytic fungus *Piriformospora indica* and plant growth promoting rhizobacteria fluorescent pseudomonads R62 and R81 on *Vigna mungo*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**: 595–603.

**Lazzara S, Militello M, Carrubba A, Napoli E, Saia S. 2017.** Arbuscular mycorrhizal fungi altered the hypericin, pseudohypericin, and hyperforin content in flowers of *Hypericum perforatum* grown under contrasting P availability in a highly organic substrate. *Mycorrhiza* **27**: 345–354.

**Lehmann A, Barto EK, Powell JR, Rillig MC. 2012.** Mycorrhizal responsiveness trends in annual crop plants and their wild relatives—a meta-analysis on studies from 1981 to 2010. *Plant and Soil* **355**: 231–250.

**Levy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet E-PP, Ane JM, Lauber E, Bisseling T, et al. 2004.** A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* **303**: 1361–4.

**Lidbury IDEA, Murphy ARJ, Fraser TD, Bending GD, Jones AME, Moore JD, Goodall A, Tibbett M, Hammond JP, Scanlan DJ, et al. 2017.** Identification of extracellular glycerophosphodiesterases in *Pseudomonas* and their role in soil organic phosphorus remineralisation. *Scientific Reports* **7**: 1–11.

**López-Bucio J, Pelagio-Flores R, Herrera-Estrella A. 2015.** Trichoderma as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* **196**: 109–123.

**Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004.** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **86**: 1–25.

**Meixner C, Vegvari G, Ludwig-Müller J, Gagnon H, Steinkellner S, Staehelin C, Gresshoff P, Vierheilig H. 2007.** Two defined alleles of the LRR receptor kinase GmNARK in supernodulating soybean govern differing autoregulation of mycorrhization. *Physiologia Plantarum* **130**: 261–270.

**Miller SH, Browne P, Prigent-Combaret C, Combes-Meynet E, Morrissey JP, O’Gara F. 2009.** Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 403–411.

**Mohamed I, Eid KE, Abbas MHH, Salem AA, Ahmed N, Ali M, Shah GM, Fang C.**

**2019.** Use of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae to improve the growth and nutrient utilization of common bean in a soil infected with white rot fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **171**: 539–548.

**Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. 2008.** Aerobic Nitric Oxide Production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and Its Influence on Root Architecture in Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1001–1009.

**Mortimer PE, Pérez-Fernández M a., Valentine AJ. 2008.** The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1019–1027.

**Nanjareddy K, Blanco L, Arthikala M-K, Affantrange XA, Sánchez F, Lara M. 2014.** Nitrate regulates rhizobial and mycorrhizal symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Integrative Plant Biology* **56**: 281–298.

**Nielsen KL, Bouma TJ, Lynch JP, Eissenstat DM. 1998.** Effects of phosphorus availability and vesicular-arbuscular mycorrhizas on the carbon budget of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytologist* **139**: 647–656.

**Niranjan Raj S, Lavanya SN, Amruthesh KN, Niranjana SR, Reddy MS, Shetty HS. 2012.** Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biological Control* **60**: 90–102.

**Ossler JN, Zielinski CA, Heath KD. 2015.** Tripartite mutualism: Facilitation or trade-offs between rhizobial and mycorrhizal symbionts of legume hosts. *American Journal of Botany* **102**: 1332–1341.

**Pawlowski ML, Vuong TD, Valliyodan B, Nguyen HT, Hartman GL. 2019.** Whole-genome resequencing identifies quantitative trait loci associated with mycorrhizal colonization of soybean. *Theoretical and Applied Genetics*.

**Pellegrino E, Öpik M, Bonari E, Ercoli L. 2015.** Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of field studies from 1975 to 2013. *Soil Biology and Biochemistry* **84**: 210–217.

**Pérez-Montaña F, Alías-Villegas C, Bellogín RA, Del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Cubo T. 2014.** Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research* **169**: 325–336.

**Petropoulos SA, Taofiq O, Fernandes Â, Tzortzakis N, Ciric A, Sokovic M, Barros L, Ferreira ICFR. 2019.** Bioactive properties of greenhouse-cultivated green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under biostimulants and water-stress effect. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**: 6049–6059.

**Prasad M, Srinivasan R, Chaudhary M, Choudhary M, Jat LK. 2019.** *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture*. Elsevier Inc.

**Rasmussen S, Parsons AJ, Jones CS. 2012.** Metabolomics of forage plants: A review. *Annals of Botany* **110**: 1281–1290.

**Rillig MC. 2004.** Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* **84**: 355–363.

**Rovira AD. 1991.** Rhizosphere research - 85 years of progress and frustration. In: Keister DL, Cregan PB, eds. *The Rhizosphere and Plant Growth: Papers presented at a Symposium held May 8--11, 1989, at the Beltsville Agricultural Research Center (BARC), Beltsville, Maryland*. Dordrecht: Springer Netherlands, 3–13.

**Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD. 2005.** Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 217–222.

**Ruisi P, Giambalvo D, Di Miceli G, Frenda AS, Saia S, Amato G. 2012.** Tillage Effects on Yield and Nitrogen Fixation of Legumes in Mediterranean Conditions. *Agronomy Journal* **104**: 1459.

**Safapour M, Ardakani M, K S, Rejali F, Kaveh Z, Mahdi C, Teimuri M. 2011.** Response of Yield and Yield Components of Three Red Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes to Co-Inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium phaseoli*. *American Eurasian Journal Agric. and Envi. Science* **11**: 398–405.

**Saia S. 2011.** Focus micorrize: una preziosa simbiosi. *Agriscilia*: 9: 30-33.

**Saia S, Aissa E, Luziatelli F, Ruzzi M, Colla G, Ficca AG, Cardarelli M, Roupael Y. 2020a.** Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. *Mycorrhiza*.

**Saia S, Amato G, Frenda AS, Giambalvo D, Ruisi P. 2014a.** Influence of Arbuscular Mycorrhizae on Biomass Production and Nitrogen Fixation of Berseem Clover Plants Subjected to Water Stress (L-SP Tran, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e90738.

**Saia S, Amato G, Frenda AS, Giambalvo D, Ruisi P. 2014b.** Influence of Arbuscular Mycorrhizae on Biomass Production and Nitrogen Fixation of Berseem Clover Plants Subjected to Water Stress (L-SP Tran, Ed.). *PLoS ONE* **9**: e90738.

**Saia S, Colla G, Raimondi G, Di Stasio E, Cardarelli M, Bonini P, Vitaglione P, De Pascale S, Rouphael Y. 2019a.** An endophytic fungi-based biostimulant modulated lettuce yield, physiological and functional quality responses to both moderate and severe water limitation. *Scientia Horticulturae* **256**: 108595.

**Saia S, Fragasso M, De Vita P, Beleggia R. 2019b.** Metabolomics Provides Valuable Insight for the Study of Durum Wheat: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**: 3069–3085.

**Saia S, Ruisi P, Amato G, Di Miceli G, Frenda AS, Giambalvo D, P R, G A, G DM, AS F, et al. 2012.** Effects of soil inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and nutrient uptake of some Mediterranean species grown under rainfed field conditions. In: 17th International Nitrogen Workshop. Wexford: Richards, K; Fenton, O; Watson, CJ, 90–91.

**Saia S, Tamayo E, Schillaci C, De Vita P. 2020b.** Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Nutrient Cycling in Cropping Systems. In: Datta R, Pathan SI, Ceccherini MT, Meena RS, eds. Carbon and Nitrogen Cycling in Soil. Singapore: Springer Singapore, 87–115.

**Saubidet MI, Fatta N, Barneix AJ. 2002.** The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil* **245**: 215–222.

**Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010.** Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 21–43.

**Silva DA da, Pinto-Maglio CAF, Oliveira ÉC de, Reis RL de M dos, Carbonell SAM, Chiorato AF. 2020.** Influence of high temperature on the reproductive biology of dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Agricola* **77**.

**Smith SE, Read DJ. 2010.** *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

**Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, Lazarus K, Smith ME, Berbee ML, Bonito G, Corradi N, Grigoriev I, Gryganskyi A, et al. 2016.** A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **108**: 1028–1046.

**Svistoonoff S, Sy M-O, Diagne N, Barker DG, Bogusz D, Franche C. 2010.** Infection-specific activation of the *Medicago truncatula* Enod11 early nodulin gene promoter during

actinorhizal root nodulation. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* **23**: 740–7.

**Tajini F, Trabelsi M, Drevon JJ. 2012.** Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* **19**: 157–163.

**Tarkka M, Scherey S, Hampp R. 2008.** *Chapter 1: Plant associated soil microorganisms.*

**Thakur MP, Quast V, van Dam NM, Eisenhauer N, Roscher C, Biere A, Martinez-Medina A. 2019.** Interactions between functionally diverse fungal mutualists inconsistently affect plant performance and competition. *Oikos*: 1136–1146.

**Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moënne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C. 2013.** Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–19.

**Varma A, Sherameti I, Tripathi S, Prasad R, Das A, Sharma M, Bakshi M, Johnson JM, Bhardwaj S, Arora M, et al. 2012.** The symbiotic fungus *Piriformospora indica*: Review. *Fungal Associations, 2nd Edition* **9**: 231–254.

**De Vita P, Avio L, Sbrana C, Laidò G, Marone D, Mastrangelo AM, Cattivelli L, Giovannetti M. 2018.** Genetic markers associated to arbuscular mycorrhizal colonization in durum wheat. *Scientific Reports*.

**Wang B, Qiu Y-L. 2006.** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**: 299–363.

**Weiß M, Waller F, Zuccaro A, Selosse MA. 2016.** Sebaciales - one thousand and one interactions with land plants. *New Phytologist* **211**: 20–40.

**Yadav V, Kumar M, Deep DK, Kumar H, Sharma R, Tripathi T, Tuteja N, Saxena AK, Johri AK. 2010.** A Phosphate Transporter from the Root Endophytic Fungus *Piriformospora indica* Plays a Role in Phosphate Transport to the Host Plant. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 26532–26544.

**Yanni YG, Rizk RY, Corich V, Squartini A, Ninke K, Philip-Hollingsworth S, Orgambide G, de Bruijn F, Stoltzfus J, Buckley D, et al. 1997.** Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. In: *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in*

Rice and Other Non-Legumes. Dordrecht: Springer Netherlands, 99–114.

**Zaidi A, Khan MS, Rizvi A, Saif S, Ahmad B, Shahid M. 2017.** Role of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Legume Improvement. In: Zaidi A, Khan MS, Musarrat J, eds. *Microbes for Legume Improvement*. Cham: Springer International Publishing, 175–197.

**El Zembrany H, Czarnes S, Hallett PD, Alamercery S, Bally R, Jocteur Monrozier L. 2007.** Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Plant and Soil* **291**: 109–118.

**Zhang H, Kim M-S, Sun Y, Dowd SE, Shi H, Paré PW. 2008.** Soil Bacteria Confer Plant Salt Tolerance by Tissue-Specific Regulation of the Sodium Transporter HKT1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 737–744.

**Zobel RW, Wright SF, Antunes PM, Goss MJ. 2013.** Communication in the Tripartite Symbiosis Formed by Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Rhizobia and Legume Plants: A Review.