

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Ecologia Microbica e Resistenza Indotta ad Agenti

Fitopatogeni:

Progetto n. 1 "Ecologia Microbica"

Ciclo XXI

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: AGR/16 MICROBIOLOGIA
AGRARIA

TITOLO TESI

Microrganismi probiotici per le piante:
una strategia di riduzione degli input nella coltura del
pomodoro col metodo biologico

Presentata da: Elisa Baruffa

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Paolo Bertolini

Prof. Marco Bosco

Esame finale anno 2009

1.	LA RIZOSFERA	9
2.	PPM O PROBIOTICI PER LE PIANTE	11
2.1.	GRUPPI PPM: FUNGHI MICORRIZICI, PGPR, FUNGHI ANTAGONISTI	11
2.2.	MICORRIZE	12
2.2.1.	<i>Funghi micorrizici arbuscolari (AMF)</i>	15
2.2.2.	<i>Funzioni probiotiche</i>	18
2.2.2.1.	Nutrizione dell'ospite.....	18
2.2.2.2.	Stabilizzazione aggregati del suolo.....	19
2.2.2.3.	Sopportazione stress ambientali.....	20
2.2.2.4.	Promozione biodiversità vegetale	22
2.2.2.5.	Difesa dai patogeni	23
2.3.	PGPR.....	24
2.3.1.	<i>Principali gruppi funzionali e meccanismi di azione probiotiche</i>	24
2.3.1.1.	PGPR biofertilizzanti	25
2.3.1.2.	PGPR interessati al biocontrollo	30
2.4.	FUNGHI ANTAGONISTI.....	33
2.4.1.	<i>Genere Trichoderma spp.</i>	34
2.5.	INTERAZIONI PROBIOTICHE DEI PRINCIPALI GRUPPI DI PPM.....	35
3.	COLTURA DEL POMODORO COL METODO BIOLOGICO.....	39
3.1.	ORIGINE E DIFFUSIONE	40
3.2.	PRODUZIONE.....	42
3.3.	UTILIZZO FERTILIZZANTI PROBIOTICI (PPM) NEL BIO	44
4.	METODI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLE COMUNITÀ DI PPM.....	47
4.1.	REGIONI DI DNA UTILIZZATE NELL'ANALISI DELLE COMUNITÀ MICROBICHE BATTERICHE.....	48
4.1.1.	<i>16S</i>	49
4.1.2.	<i>Spaziatore ribosomale tra i geni 16S e 23S dell'operone ribosomale</i> ..	49
4.2.	REGIONI DI DNA UTILIZZATE NELL'ANALISI DELLE COMUNITÀ FUNGINE MICORRIZICHE	50

4.2.1.	<i>18S o Small SubUnit (SSU)</i>	51
4.2.2.	<i>Spaziatori ribosomali tra i geni 18S-5.8S-28S</i>	52
4.2.3.	<i>28S o Large SubUnit (LSU)</i>	54
4.3.	TECNICHE MOLECOLARI PER L'ANALISI DELLA COMUNITÀ DI PPM.....	55
4.3.1.	<i>DGGE</i>	56
4.3.2.	<i>T-RFLP</i>	57
4.3.3.	<i>ARISA</i>	58
5.	METODI BIOINFORMATICI PER L'INTERPRETAZIONE DEI DATI	61
5.1.	TECNICHE DI ANALISI STATISTICA MULTIVARIATA.....	61
6.	SCOPO DELLA TESI E STRATEGIA SPERIMENTALE	67
7.	MATERIALI E METODI	69
7.1.	SPERIMENTAZIONI IN PIENO CAMPO.....	69
7.1.1.	<i>Locazione geografica</i>	69
7.1.2.	<i>Trapianto, materiale vegetale, introduzione fertilizzanti probiotici</i>	70
7.1.3.	<i>Prova e disegno sperimentale Prova Rio Grande</i>	73
7.1.3.1.	2006.....	73
7.1.3.2.	2007.....	73
7.1.3.3.	2008.....	74
7.1.4.	<i>Prove e disegni sperimentali Varietà</i>	76
7.1.4.1.	Gordon 2006.....	76
7.1.4.2.	3 Linee prioritarie 2007 e 2008.....	76
7.2.	CAMPIONAMENTO E PARAMETRI MISURATI (PROVE IN PIENO CAMPO).....	78
7.2.1.	<i>Campionamento produzione</i>	78
7.2.2.	<i>Disease Index (D.I.)</i>	78
7.2.3.	<i>Campionamento sviluppo della biomassa</i>	79
7.2.4.	<i>Campionamento rizosfere</i>	80
7.2.5.	<i>Campionamento per analisi di qualità</i>	81
7.3.	METODI MICROSCOPICI PER LA RILEVAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'INFEZIONE MICORRIZICA NEI CAMPIONI RADICALI.....	82
7.3.1.	<i>Preparazione dei campioni radicali</i>	83
7.3.2.	<i>Metodo McGonigle</i>	84

7.3.3.	<i>Metodo di Trouvelot</i>	85
7.4.	METODI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLE COMUNITÀ DI PPM.....	87
7.4.1.	<i>Estrazione DNA</i>	87
7.4.2.	<i>PCR verifica dell'estrazione</i>	89
7.4.3.	<i>Quantificazione del DNA estratto</i>	91
7.4.4.	<i>Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)</i>	91
7.4.4.1.	PCR (miscela di reazione)	92
7.4.4.2.	Protocollo di amplificazione	93
7.4.4.3.	Visualizzazione dei frammenti di DNA amplificati	93
7.4.4.4.	Elettroforesi capillare ARISA.....	94
7.5.	ANALISI STATISTICHE DATI PROVE SPERIMENTALI IN PIENO CAMPO.....	94
7.5.1.	<i>Dati produzione</i>	94
7.5.1.1.	Prova Rio Grande	94
7.5.1.2.	Prova varietà.....	95
7.5.2.	<i>Dati infezione micorrizica (metodi microscopici)</i>	96
7.5.2.1.	Prova Rio Grande	96
7.5.2.2.	Prova varietà.....	98
7.5.3.	<i>Dati sviluppo della biomassa</i>	100
7.5.3.1.	Prova Rio Grande	100
7.5.3.2.	Prova Gordon	101
7.5.4.	<i>Dati analisi di qualità</i>	101
7.5.4.1.	Prova Rio Grande	101
7.5.4.2.	Prova varietà: 3 linee prioritarie	102
7.6.	INTERPRETAZIONE BIOINFORMATICA RISULTATI OTTENUTI DALL'ARISA	103
7.6.1.	<i>Software utilizzati</i>	103
7.6.2.	<i>Analisi effettuate</i>	105
7.6.2.1.	Non-metric multi-dimensional scaling (MDS).....	105
7.6.2.2.	Analysis of similarity (ANOSIM)	106
7.6.2.3.	Analisi statistica dei dati UNIVARIATA	107
8.	RISULTATI E DISCUSSIONE	109
8.1.	RISULTATI PARAMETRI MISURATI PROVE IN PIENO CAMPO	109
8.1.1.	<i>Prova Rio Grande</i>	109
8.1.1.1.	Parametro Biomassa	109

8.1.1.2.	Parametro Produzione	112
8.1.1.3.	Parametro Micorrize	120
8.1.1.4.	Parametro Qualità	131
8.1.2.	<i>Prove varietà</i>	136
8.1.2.1.	Gordon 2006	136
8.1.2.2.	3 linee Prioritarie nelle 2 location sperimentali (2007 e 2008)	141
8.2.	RISULTATI MOLECOLARI STUDIO DELLE COMUNITÀ DI PPM	150
8.2.1.	<i>PCR verifica dell'estrazione</i>	151
8.2.2.	<i>Quantificazione del DNA estratto</i>	151
8.2.3.	<i>Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)</i>	152
8.3.	ANALISI STATISTICA CON METODI BIOINFORMATICI	153
8.3.1.	<i>Analisi statistica risultati ARISA</i>	153
8.3.1.1.	Non-metric multi-dimensional scaling (MDS)	153
8.3.1.2.	Analysis of similarity (ANOSIM)	155
8.3.2.	<i>Analisi statistica dei dati UNIVARIATA</i>	157
9.	CONCLUSIONI	159
10.	PROSPETTIVE	163
11.	APPENDICE	165
11.1.	TABELLE DATI PARAMETRI MISURATI PROVE PIENO CAMPO	165
11.1.1.	<i>Prova Rio Grande</i>	165
11.1.1.1.	Produzione e colonizzazione micorrizica arbuscolare	165
11.1.1.2.	Qualità	167
11.2.	PROVE VARIETÀ	170
11.2.1.	<i>3 linee prioritarie</i>	170
11.2.1.1.	Produzione e colonizzazione micorrizica arbuscolare	170
11.2.1.2.	Qualità	172
12.	GLOSSARIO	174
	BIBLIOGRAFIA	177

**PARTE GENERALE:
RASSEGNA BIBLIOGRAFICA**

1. La rizosfera

La parola “rizosfera”, coniata dal Prof. Lorenz Hiltner nel 1904 (Hiltner, 1904), definisce la parte del terreno interessata dal sistema radicale. Più recentemente la definizione di rizosfera è stata rivisitata da Pinton *et al.*, 2001, estendendo la definizione al volume di suolo influenzato dalle radici ed ai tessuti vegetali colonizzati dai microrganismi. Essa è considerata già da tempo come un’entità dinamica, caratterizzata da una grande varietà di interazioni biologiche, chimiche e fisiche, tra le radici della pianta, il suolo, i microrganismi tellurici e le radici di piante vicine (Morgan *et al.*, 2005). In questo particolare ambiente la concentrazione microbica raggiunge valori molto più elevati che nelle altre zone del terreno; basti pensare che il suolo rizoferico contiene al minimo 10^8 cellule batteriche per grammo, appartenenti ad almeno 10^3 taxa, così come innumerevoli funghi e altri micro e macro organismi, che competono tra loro per acqua, nutrienti e spazio (van Veen, 2005).

Essa è una nicchia ecologica fondamentale per la salute e la crescita della pianta, in cui le interazioni suolo-micro e macrorganismi-radici possono innescare meccanismi e reazioni a catena che hanno, come risultato finale, la stimolazione o l’inibizione della crescita delle radici. E’ universalmente conosciuto che nella rizosfera troviamo rappresentanti di ogni importante gruppo microbico e che ognuno di essi esplica importanti funzioni nell’equilibrio dell’ecosistema (Giri *et al.*, 2005). Tuttavia, per analizzare al meglio le relazioni di cooperazione ed interazione dei diversi gruppi funzionali e microbici, è importante focalizzare l’attenzione sui batteri e funghi rizosferici (Bowen e Rovina, 1999). Tanto che oltre alla definizione di rizosfera s’introdusse quello di micorrizosfera, nel caso in cui le radici fossero colonizzate dai funghi micorrizici. Per micorrizosfera s’intende il suolo nelle vicinanze delle radici in cui si estendono le ife fungine (Linderman, 1988).

Le interazioni rizosferiche, di gran lunga più complesse di quelle epigee, sono in grande parte governate dagli essudati radicali, o rizodeposizione (Lynch e Whipps, 1990). Gli essudati radicali comprendono una grande varietà di componenti organici come zuccheri, aminoacidi, acidi organici ed enzimi (Benizri *et al.*, 1998). Gli essudati sono per la pianta una sorta di mezzo di comunicazione con cui essa si relaziona con i microrganismi del suolo, soprattutto nella prima fase di colonizzazione delle radici,

dove regolano la chemiotassi. Attraverso questi componenti, le radici della pianta riescono a controllare le popolazioni microbiche e fungine nelle immediate vicinanze, incoraggiano le relazioni simbiotiche benefiche della pianta e cambiano le caratteristiche chimico-fisiche del suolo. Inoltre, all'interno della vasta gamma di componenti degli essudati radicali, sono noti casi in cui c'è specificità sostanza-organismo. Ad esempio, gli isoflavonoidi ed i flavonoidi presenti negli essudati delle Leguminose attivano in *Rhizobium* i geni responsabili del processo di nodulazione radicale (Pal Bais *et al.*, 2004).

La composizione chimica degli essudati radicali varia secondo le proprietà chimico-fisiche del suolo, la specie e l'età delle piante. Questi cambiamenti nella natura degli essudati sono i principali fattori che controllano la microflora indigena della rizosfera. I cambiamenti indotti dagli essudati radicali sulle popolazioni microbiche, anche chiamato "effetto rizosfera", possono essere sostanzialmente di due tipi: (i) l'aumento o la diminuzione del numero relativo dei microrganismi nel suolo; (ii) la diversa distribuzione delle specie microbiche in rapporto ai differenti microhabitat (McCully, 1999).

Benché, i batteri procariotici ed i funghi eucariotici colonizzino diverse nicchie ecologiche, sono tutti regolati da diverse relazioni di tipo saprofitico o simbiotico e possono essere suddivisi complessivamente in "nocivi" e "benefici" in base agli effetti che inducono sull'ospite (Barea *et al.*, 2005). Al gruppo dei microrganismi nocivi appartengono tutti i patogeni vegetali, parassiti, ed in generale tutti i funghi e batteri nocivi che agiscono rilasciando sostanze tossiche o impoverendo il terreno dei nutrienti necessari alle radici (De Bellis e Ercolani, 2001; Barea *et al.*, 2004). Ai gruppi microbici benefici, siano essi saprofiti od endofiti, appartengono: 1) i decompositori della sostanza organica; 2) i rizobatteri che promuovono la crescita della piante, denominati da Kloepper e Schroth (1978) PGPR (dall'inglese Plant Growth Promoting Rhizobacteria); 3) i funghi e batteri antagonisti dei patogeni vegetali (Barea *et al.*, 2005).

2. PPM o PROBIOTICI per le piante

2.1. Gruppi PPM: funghi micorrizici, PGPR, funghi antagonisti

Nei sistemi agrari, in particolare in quelli di tipo sostenibili (a basso *input* e biologici), gli apporti di sostanza organica (S.O.) al suolo, principalmente come letame, compost, sovescio o residui colturali, sono considerati la migliore fonte di azoto (N) e fosforo (P) per la nutrizione vegetale. La letteratura scientifica agronomica e biochimica sostiene che la maggior parte del N e del P diviene disponibile per le piante solo dopo che la S.O. è stata mineralizzata. Invece, i microrganismi benefici del suolo, con la loro capacità di fissare l'azoto atmosferico (Kennedy *et al.*, 2004a), di solubilizzare il fosforo (Adesemoye *et al.*, 2008), di trasferire N e P organici, oligoelementi e acqua direttamente all'interno delle radici (Dobbelaere *et al.*, 2001; Cavagnaro *et al.*, 2006; Miransari *et al.*, 2009), rendono disponibili per le piante spontanee e per le piante coltivate anche i nutrienti che nel suolo non sono teoricamente disponibili (Lynch e Whipps, 1990).

Da qui nasce l'idea che un'oculata gestione della sostanza organica e della flora microbica benefica possa mantenere e migliorare la fertilità del terreno nei sistemi agrari del futuro (Piazza *et al.*, 2005). Uno degli approcci più moderni è l'uso in campo di bio-inoculi, costituiti da funghi micorrizici arbuscolari (AMF) ed altri microrganismi benefici del suolo, denominati recentemente "probiotici per le piante" (PPM, dall'inglese *Plant-Probiotic Microorganisms*) (Haas e Keel, 2003), che sono stati messi a punto per mantenere la produttività vegetale, sia in condizioni di scarsa disponibilità nutritiva (Yang *et al.*, 2009), sia in prevenzione dell'attacco di patogeni (Compact *et al.*, 2005; Roesti *et al.*, 2006).

Il termine "probiotico" (Fuller, 1989) è stato preso in prestito da un altro ecosistema, il tratto gastrointestinale, dove batteri e lieviti probiotici esercitano proprietà di promozione della crescita e della salute dell'uomo e degli animali, riducendo i sintomi della diarrea e delle malattie infiammatorie (Ouweland *et al.*, 2002). I microrganismi probiotici dei vegetali, presentano alcune importanti proprietà e generalmente rispettano i tre criteri che definiscono i probiotici:

- colonizzazione effettiva e competitiva dell'ecosistema (rizosfera o intestino);

- effetti di antagonismo sui patogeni (vegetali, animali, umani);
- stimolazione della crescita e della nutrizione dell'ospite (piante, animali, uomo)

Dal punto di vista pratico-applicativo, i PPM sono attualmente proposti come un nuovo fattore della produzione vegetale sostenibile (Baruffa *et al.*, 2008), con cui tutte le piante inevitabilmente e, fortunatamente, interagiscono, tanto che i prodotti commerciali che li contengono sono stati inclusi tra i “fertilizzanti speciali” (DLgs 217, 2006). Molte ricerche in corso mirano, infatti, a capire (e sfruttare) le potenzialità dei PPM nel tamponare la tanto auspicata riduzione degli *input* di fertilizzanti, fitofarmaci, acqua ed energia nella gestione dei sistemi agricoli.

I principali gruppi di PPM, con un maggiore interesse applicativo nel campo (vivaistico) ed orto-frutticolo sono indicati in Tabella 1.

Nei prossimi paragrafi, si parlerà in dettaglio di alcuni di questi gruppi, delle loro funzioni benefiche e delle loro applicazioni nel campo agricolo.

2.2. Micorrize

I funghi giocano un ruolo fondamentale in molti processi microbiologici ed ecologici, influenzando la fertilità del suolo, decomponendo la sostanza organica, intervenendo nel ciclo degli elementi, aumentando la nutrizione e lo stato fitosanitario dell'ospite vegetale. Essendo eterotrofi, e quindi, ricavando le sostanze nutritive dall'ambiente esterno, sono costretti ad un tipo di vita dipendente dall'ospite che si può differenziare in tre modalità trofiche distinte in base al rapporto del fungo con il substrato di crescita: saprofitismo, parassitismo e mutualismo o simbiosi (Finlay, 2008). La relazione simbiotica micorrizica è la più antica (tracce di fossili risalenti a più di 550 milioni di anni fa; Thorn, 1997) e la più diffusa (più del 90% delle piante terrestri; Brundrett, 2002) forma di mutualismo con le piante. Il termine micorriza, dal greco “*mycos*” fungo e “*rhiza*” radice, coniato per la prima volta da Frank (1885) per indicare le modificazioni strutturali delle radici di alberi infettati da questi funghi, oramai indica le associazioni simbiotiche tra funghi e radici (Smith e Read, 1997).

Tabella 1. Classificazione tassonomica dei principali gruppi di “probiotici per le piante” PPM; fonte Bosco *et al*, 2007 a.

	<i>Phylum</i>	<i>Genus</i>
Ectomicorrize	<i>Zigomycota</i>	<i>Endogone</i>
	<i>Ascomycota</i>	<i>Morchella</i>
		<i>Tuber</i>
	<i>Basidiomycota</i>	<i>Amanita</i>
		<i>Boletus</i>
		<i>Hebeloma</i>
		<i>Laccaria</i>
		<i>Russula</i>
		<i>Suillus</i>
		Endomicorrize
<i>Archaeospora</i>		
<i>Entrophospora</i>		
<i>Geosiphon</i>		
<i>Gerdemannia</i>		
<i>Gigaspora</i>		
<i>Glomus</i>		
<i>Paraglomus</i>		
Altri funghi	<i>Ascomycota</i>	<i>Fusarium</i>
	<i>Oomycota</i>	<i>Trichoderma</i>
PGPR e AB	<i>Eubacteria</i>	<i>Pythium</i>
		<i>Agrobacterium</i>
		<i>Azospirillum</i>
		<i>Azotobacter</i>
		<i>Bacillus</i>
		<i>Burkholderia</i>
		<i>Enterobacter</i>
		<i>Erwinia</i>
		<i>Frankia</i>
		<i>Klebsiella</i>
<i>Pseudomonas</i>		
<i>Streptomyces</i>		

Ci sono ben sette tipologie differenti di micorrize, distinte a seconda delle loro caratteristiche morfologiche, e delle specie vegetali e fungine interessate (Finlay, 2008):

- 1) *Arbuscular mycorrhiza*; sono i funghi micorrizici arbuscolari (AMF) o endomicorrize, in grado d’instaurare una relazione simbiotica con circa 250 000 specie vegetale (più del 90% delle piante terrestri; Brundrett, 2002). Il gruppo costituito da circa 150-200 specie di AMF, è distinto al suo interno da altri sottogruppi, generi e famiglie in base alle caratteristiche morfologiche

(Fitter, 2005). Comunque in generale la simbiosi è caratterizzata da una struttura ramificata, denominata arbuscolo, che cresce nello spazio intracellulare, senza penetrare nel plasmalemma vegetale.

- 2) *Ericoid mycorrhiza*; sono funghi micorrizici, del *phylum Ascomycota*, che instaurano relazioni simbiotiche con piante appartenenti all'ordine *Ericales*. Il fungo penetra all'interno della cellula vegetale, senza entrare nel plasmalemma, dove le ife formano dei caratteristici avvolgimenti, detti coils.
- 3) *Ectomycorrhiza*; sono funghi micorrizici, prevalentemente *Basidiomycota* ed *Ascomycota* (in tutto circa 10 000 specie) che interagiscono con circa 800 specie vegetali, costituiti da alberi o arbusti tipiche delle zone temperate boreali o vegetazioni di montagna. Il fungo in questa simbiosi non penetra nelle cellule vegetali dell'ospite, ma forma un caratteristico mantello di ife (extraradicali) attorno alle radici ed una rete di ife intercellulari tra lo strato cellulare epidermico e quello corticale, detto reticolo di Hartig.
- 4) *Orchid mycorrhiza*; sono funghi che instaurano la simbiosi con piante della famiglia *Orchidaceae*, dove la maggior parte dei membri sono specie incapaci di fotosintesi clorofilliana e, quindi ottengono le fonti di carbonio dai funghi. Infatti, sebbene inizialmente si pensasse che questi funghi fossero saprofiti o parassiti, recenti studi molecolari hanno dimostrato la loro appartenenza al gruppo delle micorrize (Leake, 2004).
- 5) *Monotropoid mycorrhiza*; sono micorrize che instaurano simbiosi con le piante della famiglia delle *Monotropaceae*, la cui struttura morfologica (tipo di ramificazione, ife miceliari libere, mantello fungino, reticolo di Hartig) sono molto simili alle ectomycorrhiza.
- 6) *Arbutoid mycorrhiza*; sono associazioni simbiotiche tra funghi micorrizici, fondamentalmente ectomicorrize, con piante del genere *Arbutus* e *Arctostaphylos* e della famiglia delle *Pyrolaceae*, in questo caso però c'è una penetrazione del fungo nelle cellule vegetali.
- 7) *Ectendomycorrhiza*; sono funghi micorrizici morfologicamente simili sia alle ectomicorrize che alle endomicorrize; infatti presentano sia il reticolo di Hartig che la penetrazione nelle cellule dell'ospite. Molti funghi di questo tipo colonizzano le radici del *Pinus* e *Larix*.

E' chiaramente risaputo che tutte le micorrize, soprattutto le forme arbuscolari e le ectomicorrize aumentano l'assorbimento degli elementi minerali del suolo, grazie al micelio extraradicale che può essere considerato come un'estensione dell'apparato radicale (Finlay, 2008). Poiché nei sistemi semi-naturali ed agrari, i funghi micorrizici arbuscolari rappresentano uno tra i più importanti gruppi microbici del suolo (Smith e Read, 1997), svolgendo svariate funzioni benefiche fondamentali nei sistemi agricoli di tipo sostenibili (Johansson *et al.*, 2004); nel prossimo paragrafo la rassegna bibliografica, sarà focalizzata sui AMF.

2.2.1. Funghi micorrizici arbuscolari (AMF)

E' ormai risaputo che la simbiosi pianta–funghi micorrizici arbuscolari, risale a più di 400 milioni di anni fa (Remy *et al.*, 1994) (circa 300-400 milioni di anni prima della simbiosi tra le leguminose ed i batteri fissatori di azoto). Lo studio di reperti di paleobotanica e sequenze risalenti a quel periodo, hanno dimostrato la simbiosi tra le prime piante terrestri e funghi *Glomeromycota* (Redecker *et al.*, 2000). Durante l'evoluzione, le piante ed i funghi micorrizici arbuscolari si sono adattati insieme e vicendevolmente alla colonizzazione dei diversi habitat terrestri che mutavano col passare del tempo (Simon *et al.*, 1993) ed è per questo, che, oggi, gli AMF infettano le radici della gran parte delle piante vascolari (circa il 90%, Brundrett 2002), soprattutto erbacee.

L'associazione simbiotica induce importanti cambiamenti fisiologici in entrambi i partner che portano alla riorganizzazione cellulare del fungo e della pianta ospite, dovuti a cambiamenti specifici nell'espressione genica in ogni livello e fase della simbiosi (Balestrini e Lanfranco, 2006). Dopo la germinazione delle spore nel suolo, l'instaurarsi della simbiosi consiste nella ramificazione delle ife, nella formazione dell'appressorio (dopo il contatto con le radici), nella colonizzazione della corteccia radicale, nella formazione degli arbuscoli negli spazi intracellulari ed in concomitanza nella formazione del micelio extraradicale da cui poi si formeranno altre spore (Smith e Read, 1997). Tutti questi passaggi possono essere raggruppati in tre fasi: 1) la fase asimbiotica; 2) la fase iniziale della colonizzazione; 3) la fase simbiotica (Balestrini e Lanfranco, 2006). La fase asimbiotica comprende la germinazione delle spore e la produzione e l'estensione del micelio necessario per raggiungere l'ospite. Nelle prime fasi della colonizzazione, invece, accadono molti eventi di natura morfologica e fisiologica sia nel fungo che nella pianta, spesso concatenati e/o sincronizzati tra loro

(Harrison, 2005). L'evento principale di questa fase è la formazione dell'appressorio, la struttura che permette il contatto e la penetrazione del fungo nell'ospite. La pianta ospite, dopo il contatto con il fungo, riorganizza il citoplasma in prossimità del contatto, costruendo un nuovo compartimento apoplastico per facilitare la penetrazione del fungo, detto "pre-penetration apparatus" (PPA) (Genre *et al.*, 2005). D'altro canto i funghi, anche se non per contatto diretto, ma grazie ai composti essudati dalle ife, stimolano la formazione di radici laterali (Olah *et al.*, 2005) e l'espressione di geni da parte dell'ospite che regolano la riparazione di tessuti, la protezione per i patogeni e la resistenza a stress. La fase simbiotica consiste nell'istaurarsi e nello sviluppo del mutualismo sia all'interno del tessuto vegetale che nel suolo circostante le radici infettate (Schnepf *et al.*, 2008). All'interno del tessuto vegetale, il fungo forma le strutture intraradicali: ife intercellulari, coils intracellulari, arbuscoli e vescicole (vedasi Figura 1). Gli arbuscoli, struttura peculiare dei AMF, devono il nome alla loro somiglianza con dei piccoli alberi, e non sono altro che ramificazioni dicotomiche di ife all'interno della corteccia cellulare. Le ife man mano che si ramificano restringono il loro diametro da 5- 10µm a meno di 1µm. Sono considerati come la principale sede degli scambi nutrizionali: gli AMF partecipano alla relazione simbiotica assorbendo e rendendo disponibili per la pianta nutrienti inorganici ed altri ioni, come ad esempio il fosfato; la pianta, invece, cede al fungo i carboidrati di cui necessita (Dodd, 2000). All'esterno del tessuto vegetale l'infezione micorrizica si espande, con la formazione di ife extraradicali e con la formazione di nuove spore. Attualmente (Finlay, 2004, 2008; Schnepf *et al.*, 2008) sta acquistando sempre più importanza e ci si sta focalizzando sul ruolo del micelio extraradicale nell'assorbimento di acqua e nutrienti, come se fosse una vera e propria estensione dell'apparato radicale che può espandersi da valori di inferiori a centimetri fino ad una superficie di alcuni chilometri (Davidson, 2007).

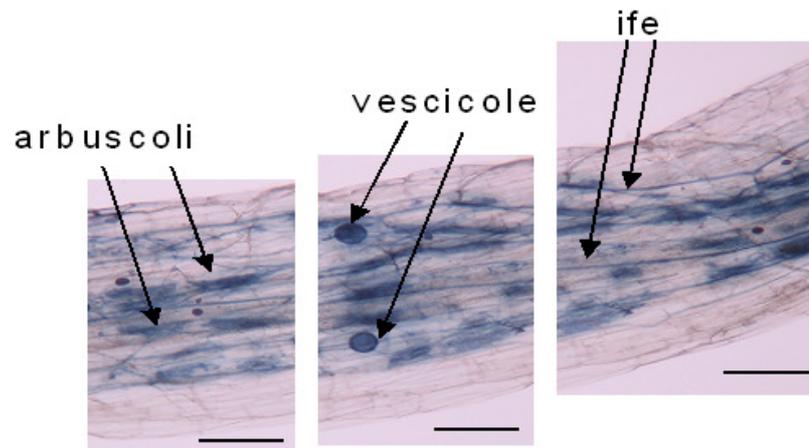


Figura 1. Strutture intraradicali caratteristiche dei funghi micorrizici arbuscolari, radice di pomodoro al microscopio ottico (ingrandimento 10 x) scala (barra nera) 0.1 mm

Oltre al ruolo di fornire nutrienti, sono stati osservati altri aspetti benefici per la pianta ospite e, quindi, favorevoli per l'utilizzo degli AMF in agricoltura. Infatti, i funghi micorrizici arbuscolari rivestono una funzione importante nella stabilizzazione degli aggregati del suolo (Miller e Jastrow, 1990) nella promozione della biodiversità delle piante (van der Heijden *et al.*, 1998), nella difesa da parte dell'attacco dei funghi patogeni e dei nematodi (Barea *et al.*, 1998; Pozo *et al.*, 1999), nella sopportazione degli stress abiotici, ad esempio idrico (Riuz-Lozano *et al.*, 2006) e presenza di metalli pesanti, quindi nel risanamento delle zone "inquinata" (Rufyikiri *et al.*, 2003; Khan, 2006) e nella fissazione dell'azoto nell'associazione simbiotica a tre leguminose-AMF-*Rhizobium* (Barea *et al.*, 1992).

Tuttavia, a causa dell'antica origine, è ancora difficile avere un quadro chiaro dell'evoluzione filogenetica degli AMF. La classificazione, usata fino a poco tempo fa, basata sull'analisi delle caratteristiche morfologiche delle spore, raggruppava la maggior parte degli AMF nell'ordine delle *Glomales* (Morton e Redecker, 2001). Solo recentemente, con l'analisi molecolare del gene SSU rRNA, si è potuto constatare che gli AMF derivano da un gruppo monofiletico ben separato dagli altri funghi (O'Donnel *et al.*, 2001). Infatti, basandosi sulla distanza filogenetica calcolata dalla sequenza dello stesso gene, è stata proposta una nuova struttura tassonomica in cui, quello che prima era considerato l'ordine *Glomales* è diventato un nuovo *phylum*, *Glomeromycota* (Schuëbler *et al.*, 2001). Questo nuovo *taxa* è stato inoltre suddiviso al suo interno in 4 ordini; gli *Glomerales*, gli *Archeosporales*, i *Diversisporales* e gli *Paraglomerales*.

Attualmente, è in corso uno studio approfondito sul genoma micorrizico, soprattutto sul polimorfismo delle regioni codificanti 18S rDNA (Simon *et al.*, 1992; Helgason *et*

al., 1998, 1999, 2002), 5.8S rDNA e 28S rDNA (Alkan *et al.*, 2004, 2006) e delle regioni non codificanti ITS (Redecker, 2000; Isayenkov *et al.*, 2004), allo scopo di creare sonde molecolari specifiche, in grado di discriminare almeno al livello dell'ordine le diverse AMF. Infatti, riuscire a distinguere tra loro i diversi ordini di funghi micorrizici arbuscolari è necessario, sia per scopi puramente tassonomici, sia, soprattutto per studi applicativi (Renker *et al.*, 2005). È infatti noto che il contributo benefico delle micorrize alla pianta ospite è influenzato non solo dalla quantità dell'infezione, ma anche dalla sua diversità. A questo riguardo, si stanno compiendo molti studi sull'ecologia delle comunità micorizzosferiche (autoctone e/o inoculate), cioè quanto e come varia la loro composizione in base ai fattori biotici e abiotici del terreno (Alkan *et al.*, 2004), alle condizioni climatiche (Wirsel, 2004) ed alle specie vegetali (Helgason *et al.*, 2002).

2.2.2. Funzioni probiotiche

2.2.2.1. Nutrizione dell'ospite

Nella simbiosi funghi micorrizici arbuscolari-piante, dove entrambi i partner partecipano e collaborano per aumentare la reciproca convivenza, lo scambio di nutrienti è uno dei principali benefici (Selosse *et al.*, 2004). Inoltre, nell'ottica di un'agricoltura sostenibile, dove di solito gli input nutritivi sono bassi, rispetto al metodo convenzionale, la simbiosi diventa fondamentale per un maggiore vigore vegetale per la produttività delle piante (Johansson *et al.*, 2004). E' oramai risaputo, infatti, che i funghi micorrizici arbuscolari aumentano l'assimilazione dei nutrienti nel suolo, presenti in forma ionica con una bassa mobilità o presenti in piccole concentrazioni, grazie al loro micelio extraradicale (Smith e Read, 1997; Hodge *et al.*, 2001; Barea *et al.*, 2005; Finlay *et al.*, 2004, 2008). L'esteso network di ife extraradicali di piccolissimo diametro è in grado di aumentare l'assorbimento dei nutrienti in maniera diretta (Harrier, 2001) od in maniera indiretta, come ad esempio migliorando la struttura del suolo (Riling e Mummey, 2006). Infatti in un esperimento recente Miransari *et al.* (2009) hanno dimostrato che le micorrize aumentano l'assorbimento di fosforo (P), azoto (N) e ferro (Fe) nel mais anche in condizioni sfavorevoli costituite da un suolo troppo compatto. Le micorrize sono efficienti in questo compito 1) grazie al micelio che aumenta l'assorbimento; 2) l'aumentato assorbimento di P fa crescere maggiormente l'apparato radicale rispetto alla parte aerea del mais e, quindi, anche

le piante stesse diventano più efficienti nell'assorbimento (Miransari *et al.*, 2007, 2009). Inoltre i funghi, alterando la produzione di ormoni vegetali in condizioni di stress (Suresh e Bagyarai, 2002), modificano indirettamente la struttura dell'apparato radicale in modo che sia più adatto ad un suolo compatto (Zhu *et al.*, 2005).

Ciò che recentemente è oggetto di studi è il fatto che le micorrize arbuscolari, da sole od in associazione con altri batteri del suolo, siano in grado loro stesse di ricavare sostanze minerali dalle rocce (Puente *et al.*, 2004; Finlay, 2008).

Sebbene le micorrize rivestano un ruolo fondamentale nell'assimilazione del fosforo (Ezawa *et al.*, 2002), risultano molto importanti anche l'assorbimento dell'azoto, sottoforma di ammonio e nitrati (Johansen *et al.*, 1993) di zinco (Zn), rame (Cu) e potassio (K) (Marschner e Dell, 1994). Svariati studi hanno dimostrato quanto e come l'aumento di assorbimento di P da parte degli AMF (anche in associazione con altri rizobatteri benefici) influisca positivamente sulla biomassa, sulla produttività e sul bilancio nutrizionale minerale di diverse colture nel caso di Lekberg e Koide (2005), del pomodoro nel caso di Gamalero *et al.*, (2004), del grano nel caso di Li *et al.*, 2006 e Tarafdar e Marschner (1995). Cavagnaro *et al.* (2006) in un esperimento in pieno campo, su un suolo biologico, servendosi di un ceppo di pomodoro mutante in cui la mutazione genetica inibisce la colonizzazione da parte dei AMF ha dimostrato che la concentrazione di elementi minerali sia nei frutti che nelle foglie era migliore nelle piante colonizzate. In particolare, la concentrazione del P era superiore del 40%, la concentrazione di Zn (lo zinco è un elemento fondamentale e difficile da acquisire per l'uomo) era superiore di circa il 25%, la concentrazione di N era superiore del 12.3%, inoltre nel suolo delle piante micorrizzate c'erano meno nitrati, indicando così un maggiore sfruttamento delle fonti di azoto disponibili nel suolo.

2.2.2.2. Stabilizzazione aggregati del suolo

Da quanto detto sopra si evince chiaramente che le funzioni benefiche di assorbimento di nutrienti e di miglioramento della tessitura del suolo (così come la sopportazione di stress) sono strettamente collegate tra loro. Infatti sia nel lavoro di Cavagnaro *et al.* (2006) che in quello di Miransari *et al.* (2009), la colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari ha un effetto benefico sulla crescita rispettivamente del pomodoro e del mais, dapprima migliorando la stabilità del suolo e poi aumentando l'assorbimento dei nutrienti. In particolare nel lavoro di Cavagnaro la colonizzazione delle micorrize ha un effetto benefico sulla stabilità degli aggregati del suolo:

l'espansione delle ife è il principale agente di miglioramento della stabilità del suolo. A dimostrazione di ciò, esperimenti precedenti (Poulsen *et al.*, 2005) in serra avevano dimostrato la maggiore proliferazione delle ife delle micorrize che colonizzavano le piante "normali" rispetto alla variante mutata, in cui era inibita la colonizzazione dei funghi. L'aumento della stabilità e la geometria degli aggregati e della struttura del suolo sono direttamente correlati all'espansione del micelio extraradicale (Miller e Jastrow, 1990) che esplica la sua azione sia in maniera meccanica o grazie alla secrezione di componenti stabilizzanti. I AMF producono, infatti, una glicoproteina detta glomalina, in grado di legare le particelle di suolo e di formare aggregati stabili (Wright e Upadhyaya, 1996; Riling, 2004).

2.2.2.3. Sopportazione stress ambientali

Anche la funzione benefica di sopportazione degli stress ambientali, soprattutto nel caso di stress idrico, poiché dipendente dallo sviluppo delle ife extraradicali, è strettamente collegata anche alla stabilizzazione degli aggregati del suolo. Thomas *et al.* (1986) in un lavoro condotto su suolo argilloso dimostra che la colonizzazione micorrizica, migliorando la porosità e la struttura del suolo, migliora anche la permeabilità e l'assorbimento dell'acqua, con in conseguenza un aumento della massa radicale della pianta. Mentre per Finlay 2004 e 2008, il fatto di alleviare lo stress idrico non può essere scisso dalla funzione benefica del miglioramento dei nutrienti dal suolo, poiché in situazioni di suolo povero di acqua, l'assorbimento dei nutrienti diviene di seconda importanza. Ciò dimostra la molteplicità benefica funzionale delle micorrize (Dodd, 2000). In un esperimento in pieno campo su piante di cocomero sottoposte a stress idrico, Kaya *et al.*, 2003 dimostra che la presenza dei funghi riesce a mitigare l'effetto negativo dovuto allo stress, riportando la concentrazione di micro e macro elementi nelle foglie paragonabile a quella delle foglie appartenenti alle piante non sotto stress. La colonizzazione delle radici da parte di AMF in condizioni di stress idrico induce l'espressione di geni della pianta "specifici per la siccità" (Ruiz-Lozano *et al.*, 2006). Altri geni codificanti acquaporine plasma membrana sono responsabili dell'aumento della tolleranza di stress idrico e di stress salino in piante colonizzate (Porcel *et al.*, 2006).

Un'altra situazione sfavorevole alle ottimali condizioni di crescita colturali, spesso si aggiunge ad aggravare una condizione di stress idrico: infatti, specialmente nelle regioni del bacino Mediterraneo, oltre ad una situazione di aridità o semi-aridità e

salinità del suolo, è pratica comune irrigare con acqua salata (Villa-Astoria *et al.*, 2003; Al-Karaki, 2006). In questo caso, in diversi studi è stato provato quanto gli effetti negativi sulla crescita della biomassa, sulla produzione delle colture e sul contenuto di minerali nelle foglie siano mitigati dall'introduzione nel suolo di bioinoculi costituiti da funghi micorrizici arbuscolari (Al-karaki, 2004, 2006; Daei *et al.*, 2008). Inoltre, l'effetto positivo dell'inoculo risulta significativamente maggiore se l'inoculo è effettuato nel vivaio, subito la fase di germinazione delle piantine. In questo modo, al momento del trapianto in campo i funghi inoculati sono avvantaggiati, avendo già infettato le radici, rispetto a quelli naturalmente presenti nel suolo (Al-Karaki, 2006).

L'inquinamento della biosfera a causa dei metalli pesanti si è accelerato drammaticamente negli ultimi 20 anni a causa dell'estrazione, dello smaltimento, delle industrie e dei trattamenti agricoli con sostanze di sintesi. Nel suolo, metalli pesanti come piombo (Pb), cromo (Cr), arsenico (As), rame (Cu), cadmio (Cd) e mercurio (Hg) introdotti dall'industrie, dai reflui dell'agricoltura e domestici, rimangono nel suolo e possono essere assorbiti in particelle o filtrati nelle acque sotterranee (He *et al.*, 2005). Ciò può causare gravi problemi all'ambiente ed alla salute dell'uomo (Khan, 2006). L'uso di microrganismi e AMF, per il risanamento dei suoli contaminati da metalli pesanti (detto "bioremediation", Kumar *et al.*, 1995 o "mycorrhizoremediation", Khan, 2006) è una strategia valida per risolvere il problema, anche se per ottimizzare l'efficacia del trattamento c'è ancora molto da comprendere a riguardo delle interazioni nella rizosfera/micorrizosfera (Smith, 2002).

Le pareti cellulari dei funghi del suolo, e quindi anche dei AMF, riescono a catturare i metalli pesanti presenti nel suolo (Kapoor e Viraraghan, 1995; Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004). Il micelio extraradicale sembra essere la principale sede di accumulo di questi elementi (Turnau, 1998); lì può avvenire l'esclusione selettiva di elementi tossici, attraverso l'assorbimento all'interno della parete cellulare di chitina (Zhou, 1999), o all'esterno attraverso le glicoproteine (glomalina) (Wright e Upadhyaya, 1996) o con una precipitazione intracellulare. Attraverso questi meccanismi i AMF svolgono la loro funzione benefica di "mycorrhizoremediation", cioè riducendo l'esposizione alle sostanze tossiche o potenzialmente tossiche delle piante (Khan, 2006). Tra questi meccanismi, il più promettente probabilmente è il ruolo della glomalina nell'assorbimento e nel sequestro degli elementi tossici (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2004). Questa glicoproteina sembra avere un ruolo cruciale

nell'immobilizzazione e nel filtraggio dei metalli pesanti nell'interfaccia suolo-ifa, prima di entrare nel sistema congiunto fungo-pianta (Khan, 2006).

Spesso nel risanamento di suoli contaminati i funghi AMF giocano il ruolo di fitostabilizzatori, mentre le piante iperaccumulatrici hanno il ruolo principale. Infatti, anche se i funghi micorrizici non svolgono direttamente la funzione di fitoestrazione, il fatto di stimolare la crescita della biomassa della pianta, aumentando l'assorbimento di acqua e nutrienti, e di "bloccare" gli elementi tossici, li rendono importanti nella bioremediation (Turnau, 2005). Infatti, si è dimostrato che piante iperaccumulatrici, come *Berkheya coddii*, che riesce a instaurare una simbiosi con micorrize, produce una biomassa molto superiore rispetto ad altre piante iperaccumulatrici non micorrizzate (Turnau, 2005). In altri esperimenti, condotti allo scopo di identificare la sopravvivenza, la crescita vegetale e l'accumulo di metalli come zinco (Zn), cadmio (Cd), piombo (Pb) e nichel (Ni), in piante iperaccumulatrici, si è visto che *Glomus mossae*, il fungo inoculato, era presente in tutti suoli inquinati, svolgendo la funzione di fitostabilizzatore (Vivas *et al.*, 2003, 2005).

2.2.2.4. Promozione biodiversità vegetale

Solo recentemente, anche se se ne parla da circa un centinaio di anni, si è presa consapevolezza della possibile perdita della biodiversità globale, causata da pressioni ambientali in grado realmente di eliminare alcune specie (Thomas *et al.*, 2004). Dal punto di vista della flora, la ricchezza delle specie, cioè la diversità dell'ecosistema è diventato un argomento di attuale importanza. Infatti, le pressioni commerciali a trovare, sostenere e diffondere le varietà vegetali maggiormente produttive hanno modificato la biodiversità naturale degli ecosistemi (Tilman *et al.*, 2001). La diversità e la produttività dipende dalla ricchezza e dalla struttura delle comunità micorriziche del suolo (van der Heijden *et al.*, 1998). In questo lavoro si è osservato che l'aumento della diversità fungina portava ad un aumento della diversità e della produttività vegetale, suggerendo che un cambiamento nel sottosuolo guidasse un cambiamento anche "agli strati superiori". La possibile spiegazione è nei differenti effetti specifici dovuti alla singola combinazione pianta-fungo nella biodiversità generale. Questi effetti variano a seconda delle condizioni ambientali e secondo Vogelsang *et al.*, 2006 la diversità e la produttività vegetale varia maggiormente in risposta a molteplici colonizzazioni di AMF rispetto ad una colonizzazione di una specifica micorrizza. In accordo con questi risultati anche Jansa

et al., 2008 hanno dimostrato che esiste una complementarità funzionale all'interno della comunità micorrizica della rizosfera. Infatti, piante di aglio co-inoculate da *Glomus claroideum* e *Glomus intraradices* sono più efficienti nell'assimilazione del fosforo di quanto lo siano in risposta ad un singolo inoculo.

2.2.2.5. Difesa dai patogeni

L'uso dei bio inoculi, costituiti da AMF, o comunque l'efficacia delle popolazioni micorriziche presenti nel terreno contro i patogeni è risaputo già da tempo ed è una valida alternativa ai pesticidi, soprattutto nei sistemi agricoli di tipo sostenibili (Gianinazzi e Schuepp, 1994). Infatti, i primi studi del ruolo di biocontrollo delle micorrize risalgono agli anni '70 (Azcon-Aguilar e Barea, 1996). Le strategie di controllo sui patogeni attuate dalle micorrize sono: 1) la competizione delle risorse; 2) induzione di cambiamenti nel metabolismo e nella fisiologia della pianta, mentre 3) la produzione diretta di sostanze antibiotiche non è stata ancora chiaramente validata (Selosse *et al.*, 2004). Nella strategia difensiva della competizione, le micorrize agiscono esaurendo nella rizosfera i nutrienti ed i tessuti vegetali per la colonizzazione, limitando così l'infezione dei patogeni (Larsen e Bodker, 2001).

L'induzione della variazione del metabolismo consiste principalmente nel cambiamento dell'essudazione radicale durante la simbiosi pianta-fungo, che influisce a sua volta sulle popolazioni microbiche rizosferiche (Vierheilig, 2004). Ad esempio Lioussanne *et al.* (2003) hanno dimostrato che gli essudati radicali di piante non micorrizzate avevano una maggiore attrazione per le zoospore di *Phytophthora parasitica* rispetto a quelli essudati da piante infettate da AMF. Tra questi composti essudati ricoprono un ruolo importante nel biocontrollo i flavonoidi, sostanze che sembrano avere influenze allelopatiche sulle altre piante e sui microrganismi (Newman e Rovina, 1975), proprietà antifunginee e proprietà stimolanti la crescita in vitro delle micorrize (Siqueira *et al.*, 1991). Inoltre, in uno studio recente (Carlsen *et al.*, 2008) è stato confermato che la produzione di flavonoidi in *Trifolium repens* L. nelle piante micorrizzate da 2 tipologie di micorrize (*Glomus mossae* e *Glomus claroideum*) ha avuto un effetto protettivo nei confronti di *Phytophthora ultimum*, ma le 2 specie di micorrize hanno un diverso potenziale antifungino. Infatti, le piante colonizzate da *Glomus mossae* hanno un livello di efficacia sul patogeno inferiore alle piante colonizzate da *Glomus claroideum*, anche se la percentuale di colonizzazione è superiore in quest'ultime. Quindi, la specie vegetale e la specie

micorrizica sembra essere un fattore più importante del grado di colonizzazione (Carlsen *et al.*, 2008). A dimostrazione del fatto che l'effetto dell'inoculo di AMF introdotto nel suolo, sia per stimolare la crescita e la produttività vegetale, sia per il biocontrollo, è il risultato di una serie d'interazioni complesse e che bisogna valutare la competenza, la persistenza e l'efficacia dell'inoculo nelle specifiche condizioni (Farmer *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda il cambiamento della fisiologia della pianta ospite dopo la simbiosi sono stati fatti studi sull'induzione di espressione di geni codificanti enzimi idrolitici come chitinosi e β -1, 3-glucanase (Azcon-Aguilar *et al.*, 1996; Pozo *et al.*, 1999). Questi enzimi degradano le pareti cellulari funginee e si è dimostrato il loro effetto nel contrastare l'infezione dei patogeni appartenenti al genere *Phytophthora*. Ad esempio nell'esperimento di Pozo *et al.*, 1999 le piante attaccate da *P. parasitica*, le cui radici erano colonizzate dalle micorrize, mostravano sintomi, come le lesioni alle radici, meno importanti e ed un sviluppo vegetativo maggiore delle piante non colonizzate.

2.3. PGPR

Da quando Kloepper coniò il termine PGPR (dall'inglese Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper e Schroth, 1978), le ricerche sull'argomento sono aumentate esponenzialmente perché questi rizobatteri sono risultati essere di grande interesse per l'agricoltura moderna, specialmente nel campo dell'agricoltura sostenibile, sia essa a basso input, biologica o biodinamica (QLIF, 2003). Infatti, numerosi studi hanno dimostrato che la presenza di PGPR nella rizosfera di una pianta permette generalmente di stimolare la sua crescita e migliorare la sua salute (Compact *et al.*, 2005).

2.3.1. Principali gruppi funzionali e meccanismi di azione probiotiche

In generale i PGPR sono divisi in 2 gruppi: 1) quelli interessati alla stimolazione della crescita e nutrizione dell'ospite, detti anche biofertilizzanti (Kennedy *et al.*, 2004a); 2) quelli interessati al biocontrollo dei patogeni (Bashan e Holguin, 1998).

2.3.1.1. PGPR biofertilizzanti

Come abbiamo già detto i PGPR sono fondamentali nell'ottica di un'agricoltura di tipo sostenibile perché aumentano l'assorbimento degli elementi nutritivi per le piante, evitando gli effetti negativi dell'accumulo di fertilizzanti chimici nel suolo e nelle acque. Ad esempio, l'accumulo e l'eliminazione di fonti di N e P nel fiume Mississippi ha ridotto notevolmente la popolazione di molluschi e pesci nel Golfo del Messico (Malakoff, 1999).

Questi rizobatteri possono essere suddivisi in biofertilizzanti esterni o endofitici a seconda di come colonizzano le radici della pianta. I biofertilizzanti possono essere anche suddivisi in base alle sostanze benefiche che forniscono alla pianta ospite (Vessey, 2003): azoto fissato assimilabile, fitormoni, fosfati e metalli solubili.

Azoto fissatori

I batteri che fissano l'azoto molecolare, rendendolo assimilabile per la comunità biotica della rizosfera, possono essere sia simbiotici che liberi.

Alcune piante, soprattutto le Leguminose e le piante attinoriziche, hanno la possibilità di stabilire rapporti di simbiosi con alcuni rizobatteri per ricavarne, attraverso il processo di azoto-fissazione batterico, l'azoto necessario per il proprio sviluppo. Quando c'è simbiosi, le radici delle Leguminose presentano dei rigonfiamenti, detti noduli radicali, che si formano in seguito all'infezione da parte dei rizobatteri (Sprent *et al.*, 2002). Questi batteri, una volta insediatisi nel nodulo, sono in grado di fissare l'azoto atmosferico, cosa che sono incapaci di fare allo stato libero nel terreno. I batteri probiotici azoto-fissatori delle Leguminose appartengono ai generi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* (Casella, 2003), e sono da sempre i più studiati, basti pensare che di essi già intorno al 1890 si commerciavano i primi inoculanti (Vessey, 2003).

Oltre alle Leguminose, altre piante come l'ontano e l'olivello spinoso hanno la possibilità di formare simbiosi con batteri azoto fissatori, risultando nella formazione di noduli radicali e nella fissazione dell'azoto. Suddette simbiosi vengono stabilite dai batteri del genere *Frankia*, che appartengono al gruppo degli attinomiceti (Bosco e Lumini, 2003; Vessey *et al.*, 2004).

Il tema dei fissatori liberi, microrganismi in grado di fissare l'azoto atmosferico anche in assenza di una simbiosi con le piante, è di grande interesse poiché grazie al loro intervento si potrebbe ridurre l'impiego dei fertilizzanti azotati industriali per tutte le

colture. *Azospirillum* è stato il primo genere di rizobatterio azoto fissatore di cui si sono riconosciuti gli effetti benefici sulle piante non Leguminose, cioè prevalentemente su Graminaceae (Dobbelaere *et al.*, 2001). Ad esempio, l'inoculazione di *Azospirillum brasilense* ha portato ad un aumento della produzione in campo del 30% nel grano (Okon e Labandera-Gonzalez, 1994) e del mais dal 50 al 95% a seconda delle condizioni del suolo (Dobbelaere *et al.*, 2001), ma sempre in basse concentrazioni di N. I ceppi di *Azospirillum* partecipano a tutte le fasi del ciclo dell'azoto eccettuato la nitrificazione. Fissano N₂ e sono capaci di effettuare la riduzione assimilativa e la respirazione del nitrato. Oltre al guadagno in azoto fissato, peraltro ridotto, l'inoculazione di *Azospirillum* su Graminaceae ha determinato effetti favorevoli sulla crescita delle piante riferibili ad altri meccanismi innescati dal batterio, come la produzione di fitormoni e i cambiamenti morfologici delle radici (Vessey, 2003).

Dopo la scoperta di *Azospirillum* come azoto fissatore, numerose altre associazioni azotofissatrici sono state descritte, facendo intervenire diversi generi batterici, come *Azotobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, *Bacillus* e *Enterobacter* (Kennedy *et al.*, 2004a; Okon, 2005).

Produttori di auxine e di altri fitormoni

Tra i probiotici che colonizzano la rizosfera, più dell'80% riescono a sintetizzare l'acido indol-acetico (AIA) (Barazani e Friedman, 1999), struttura assegnata all'auxina, ormone vegetale conosciuto per gli effetti che ha in numerosi processi di sviluppo, come il differenziamento del tessuto vascolare, la proliferazione radicale e la dominanza apicale. Tali rizobatteri sono, per la grande parte, assegnati ai generi *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (Kampert *et al.*, 1975; Muller *et al.*, 1989; Arshad e Frankenberger, 1991). I rizobatteri produttori di auxine sono da considerare come promotori della crescita delle piante perché stimolano il differenziamento e l'allungamento delle radici primarie e anche la proliferazione delle radici secondarie e di quelle avventizie. Il fatto di avere radici primarie più lunghe e secondarie più numerose, per la pianta è una caratteristica vantaggiosa perché esse permettono un più efficace ancoraggio al terreno e un migliore assorbimento di acqua e nutrienti (Patten e Glick, 2002). Studi condotti *in planta* sulla produzione di auxina da parte di *Pseudomonas putida* hanno dimostrato un aumento di tutta la superficie radicale, soprattutto della sua parte

deputata all'assorbimento, tale da avvantaggiare la pianta nel prelievo di acqua e nutrienti. D'altro canto, l'espansione dell'apparato radicale è favorevole agli stessi rizobatteri che guadagnano superficie da colonizzare (Patten e Glick, 2002).

Tra gli innumerevoli batteri produttori di auxine, non tutti hanno effetti benefici. Infatti, ce ne sono anche di fitopatogeni, come *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae*, che producendo grandi quantità di auxine, provocano la formazione di galle e tumori (Costacurta e Vanderleyden, 1995).

L'approccio genetico allo studio della biosintesi dell'auxina batterica ha dato risultati molto interessanti. Si è scoperto che l'auxina prodotta dai batteri fitopatogeni segue la via di sintesi dell'acido indolacetamidico e secernono livelli di auxina molto maggiori di 70 μM , mentre i batteri fitostimolatori, come *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Bacillus* e altri, usano una via triptofano dipendente, producendo bassi livelli di AIA, generalmente inferiori a 20 μM . Inoltre, si è visto che l'auxina secreta dai batteri rispetto a quella endogena influisce maggiormente nella crescita delle radici, perché stimola direttamente l'allungamento e la divisione cellulare (Barazani e Friedman, 1999).

L'auxina batterica influenza l'attività dell'enzima derivato dall'acido aminociclopropan carbossilico (ACC deaminasi), il precursore dell'etilene prodotto nei tessuti della pianta, impedendo di raggiungere la produzione di alti livelli dell'ormone tali da inibire la crescita della pianta. Ne deriva che l'auxina e l'ACC deaminasi cooperano per stimolare l'accrescimento radicale (Patten e Glick, 2002).

Le citochinine, una classe di fitormoni che stimolano la divisione e l'espansione cellulare, possono essere sintetizzate da *Bacillus megatherium* e *Rhizobium leguminosarum* (Florenzano, 1983). Le gibberelline, ormoni associati alle modificazioni fisiologiche e morfologiche della pianta, come la germinazione e l'allungamento dei cauli, sono stati isolati da colture di *Fusarium moniliforme*, ma diversi autori hanno riscontrato che dette sostanze possono essere sintetizzate anche da altri funghi, batteri e attinomiceti (Florenzano, 1983).

I rizobatteri produttori di etilene, fitormone volatile conosciuto per il suo coinvolgimento in numerose manifestazioni fisiologiche, come indurre la senescenza dei tessuti o l'allungamento e la crescita delle radici, sono stati studiati per il precursore dell'ACC e per la relazione che lo lega all'auxina (Vessey, 2003).

Fosfato solubilizzatori

Il fosforo P, dopo l'azoto N, è il secondo elemento fondamentale per la sopravvivenza e la crescita delle piante. Sebbene sia abbondante nel suolo, sia in forma organica che non, molti terreni risultano essere limitanti ed non ottimali alla crescita colturale per la scarsa concentrazione di questo elemento nella forma solubile ed assimilabile dalla vegetazione. Preliminari studi hanno dimostrato che nel suolo la crescita delle radici, o per effetto dell'essudazione radicale o modificando il pH, hanno già di per sé un effetto positivo sull'assimilazione del P per le piante (Riley e Barber, 1971). Tuttavia, la maggior parte dell'assimilazione del P per le piante è dovuto ai microrganismi del suolo, nel caso dei PGPR, ai cosiddetti fosfato solubilizzatori, dall'inglese "*phosphate solubilizing bacteria*" (PSB) (Rodriguez e Fraga, 1999). Sebbene questi rizobatteri siano ubiquitari nel suolo e molti studi in laboratorio abbiano già dimostrato la loro efficace assimilazione del P, gli studi condotti in pieno campo hanno dato risultati incerti, probabilmente dovuti al fatto che non si conoscono ancora bene i meccanismi biochimici e molecolari in cui sono implicati per sfruttare al meglio le loro capacità (Barea *et al.*, 2002; Gyaneshwar *et al.*, 2002). Recenti studi di laboratorio hanno dimostrato che le condizioni sperimentali in laboratorio non sono equiparabili con quelle riscontrate in campo e che nel suolo i rizobatteri effettivamente in grado ed implicati nell'assimilazione del fosforo non sono così abbondanti come si pensava. Inoltre, è stato appurato che la capacità di solubilizzare il fosfato minerale da parte dei batteri è dovuto alla presenza ed espressione di specifici geni che non tutti i PSB hanno nel loro corredo genetico (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Shaharoon *et al.*, (2008) in uno studio in campo sul grano hanno dimostrato l'efficacia dell'assimilazione del P da parte di ceppi di PGPR, che con il loro intervento portavano la produzione paragonabile a quella con la somministrazione di fertilizzanti chimici. Tuttavia per valutare l'efficacia dell'inoculo in campo di bisogna considerare che: 1) è conveniente che il batterio PSB sia già presente naturalmente nel suolo, per facilitare ed aumentare l'efficacia della colonizzazione rispetto agli altri batteri indigeni; 2) i composti rilasciati dai PSB in grado di solubilizzare il P hanno un'azione limitata nel tempo, sia perché sono velocemente degradati, sia perché il P solubilizzato viene subito trasformato in forme insolubili prima che raggiunga le radici (Barea *et al.*, 2002, 2004). Per questo attualmente si utilizzano inoculi contenenti sia PSB che funghi micorrizici arbuscolari; infatti i funghi catturando immediatamente gli ioni P, non appena è stato solubilizzato

dai batteri, evitano l'accadimento dei fattori limitanti descritti sopra e danno alla pianta la possibilità di sfruttare pienamente delle capacità dei PSB (Barea *et al.*, 2004; Puente *et al.*, 2004; Adesemoye *et al.*, 2008).

Assimilatori di metalli solubili

Oltre all'azoto ed al fosforo altri 15 elementi sono essenziali alle piante per la crescita e la riproduzione (Marschner e Dell, 1994). Dodici di questi elementi vengono assimilati dal suolo; tra cui 4 macronutrienti (potassio, zolfo, magnesio e calcio) ed altri 8 micronutrienti (boro, cloro, rame, ferro, manganese, molibdeno, nichel e zinco). Inoltre, le piante riescono ad assorbire ed accumulare anche altri elementi non essenziali o tossici per la sopravvivenza (come cadmio, piombo, sodio). Le piante riescono ad utilizzare la maggiorparte di queste risorse solo quando sono nel suolo in forma ionica. Poiché la crescita vegetativa è limitata dalla disponibilità del suolo di questi elementi così come dalla presenza degli elementi tossici, i rizobatteri, essendo in grado di solubilizzare gli elementi insolubili e di eliminare gli elementi tossici, sono indispensabili per il vigore vegetativo e produttivo (Morgan *et al.*, 2005; Jing *et al.*, 2007).

Un'efficiente assimilazione di questi elementi, soprattutto metalli, e la competizione per essi è considerato un vero e proprio meccanismo di antagonismo contro i patogeni (Loper e Lindow, 1994; Loper e Henkels, 1999). Ad esempio, nel caso del ferro, numerosi funghi e batteri producono molecole chelanti il ferro, dette siderofori (Winkelmann, 1991). La produzione di siderofori da parte dei PGPR permette loro una colonizzazione delle radici più efficiente rispetto ai patogeni, che generalmente ne producono meno o meno efficienti (De Bellis e Ercolani, 2001). Tra i diversi siderofori prodotti dai rizobatteri, quelli delle *Pseudomonas* spp. sono riconosciuti per essere molto competitivi; ad esempio le pioverdine (PVDS) sono molto efficaci nel chelare il ferro, quando questo è limitante nel suolo (Moon *et al.*, 2008), le piocheline (PCH) sono molto importanti per l'acquisizione di altri microelementi come il cobalto, il molibdeno ed il vanadio (O'Sullivan ed O'Gara, 1992).

Inoltre, sembra che i rizobatteri aumentino l'assimilazione degli ioni minerali del suolo, stimolando le pompe protoniche ATPasiche, ma su questo argomento gli studi sono ancora incompleti (Mantelin *et al.*, 2004).

2.3.1.2. PGPR interessati al biocontrollo

I rizobatteri probiotici interessati al biocontrollo sono uno dei principali protagonisti della cosiddetta lotta biologica in agricoltura, definita come l'uso degli organismi viventi e dei loro prodotti, allo scopo di proteggere le piante dagli agenti biotici dannosi (DeBach, 1979). Il ruolo dei rizobatteri nel controllo biologico è quello di contenere la popolazione dei patogeni entro una soglia di non pericolosità. I meccanismi di antagonismo espressi dai rizobatteri probiotici sono principalmente tre:

- la produzione di sostanze antagoniste, chiamate antibiotici, che interagiscono direttamente con il patogeno; o la produzione rizobatterica di metaboliti che degradano i fattori di patogenicità, come le tossine, o che inattivano le molecole, presenti negli essudati radicali, che agiscono come "stimoli" di questa patogenicità.
- l'induzione dei meccanismi di resistenza della pianta, da parte dell'agente PGPR;
- la competizione per i nutrienti, soprattutto metalli, e spazio, di si è parlato sopra.

Nessuno di questi meccanismi è necessariamente esclusivo di un singolo agente di biocontrollo che, spesso al contrario, esibisce più modi d'azione. Per molti agenti, diversi meccanismi o combinazioni di essi possono essere coinvolti nella soppressione di diversi patogeni.

Pseudomonas fluorescens si è dimostrata, grazie agli studi condotti negli ultimi venticinque anni, come una delle specie microbiche con le più grandi potenzialità nel biocontrollo (Barea *et al.*, 2005). Essa esplica la sua funzione benefica sia con l'antibiosi, sia con la competizione, a seconda della specie di fungo o batterio patogeno presente nella rizosfera (O'Sullivan e O'Gara, 1992).

Anche ceppi di *Bacillus* spp. sono molto usati ed introdotti negli inoculi commerciali per esplicare la funzione di controllo biologico, soprattutto per il fatto che questo batterio Gram positivo producendo endospore, rimane stabile e non risente delle lavorazioni e dello stoccaggio del prodotto (Kokalis-Burelle *et al.*, 2006). Tra i ceppi di *Bacillus*, *B. subtilis* e *B. pumilus* sono molto usati per la loro produzione di sostanze antibiotiche e per l'attivazione di meccanismi di resistenza della pianta (Raj *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2006)

A questo scopo vengono usati anche batteri di altri generi, come *Streptomyces*, attivo nel biocontrollo producendo sostanze antibiologiche, lisando la parete cellulare dei funghi patogeni, competendo per le fonti nutrizionali e con l'iperparassitismo. Infatti, è molto usato negli inoculi commerciali per prevenire l'attacco ed i disagi causati da *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., e *Phytophthora* spp. (Minuto *et al.*, 2006).

Infine, ceppi non patogeni di *Agrobacterium* vengono inoculati nel terreno per controllare gli *Agrobacterium tumefaciens* patogeni.

Antibiotici prodotti dai rizobatteri

Gli antibiotici con proprietà di "biocontrollo" più studiati includono composti solubili, come il 2,4-diacetilfloroglucinato (DAPG), le fenazine, la pioluteorina, la piocianina e la pirrolnitrina, e composti volatili, come l'ammoniaca e l'acido cianidrico (HCN) (Raaijmakers *et al.*, 2002).

La produzione di antibiotici sembra essere strettamente regolata da due componenti: una sorta di sensore ambientale (presumibilmente una proteina di membrana) e un fattore di risposta citoplasmatica (Whipps, 2001).

Diversi ceppi di *Pseudomonas*, un genere batterico probiotico tra i più importanti, possono produrre 2,4-diacetilfloroglucinato (DAPG), fenazina, pioluteorina, e/o piocianina (Raaijmakers *et al.*, 2002). Molti di questi antibiotici risultano contemporaneamente efficaci contro diversi batteri e funghi, mentre altri controllano specificatamente e selettivamente soltanto alcuni patogeni. Ad esempio, la pioluteorina prodotta da un ceppo di *P. fluorescens* risulta essere un efficace antibiotico contro l'attacco delle radici di cotone da parte di *Pythium* spp., mentre la pirrolnitrina prodotta da un altro ceppo di *Pseudomonas* è più efficace contro l'infezione di *Rhizoctonia solani*, sempre sulle radici di cotone (Howell e Stipanovic, 1979). L'antibiotico DAPG, purificato da diversi ceppi di *Pseudomonas* è efficace nella soppressione di molti patogeni, soprattutto contro la microflora patogena come *Fusarium* e *Pythium*. Il DAPG, limitando le popolazioni dei patogeni, gioca un ruolo fondamentale nella strutturazione delle comunità microbiche della rizosfera (Kent e Triplett, 2002). Infatti, si è osservato che, dopo l'infezione da parte di *Phytophthora* delle radici di avocado, la diversità microbica rizosferica aumenta perché aumenta anche la disponibilità di nutrienti liberati dalle radici attaccate dal fungo. Invece, se si opera una inoculazione con un ceppo di *Pseudomonas* produttore di DAPG,

spariscono sia i patogeni, sia i disagi dei tessuti radicali causati dall'infezione e per questo la biodiversità microbica diminuisce (Yang *et al.*, 2001).

L'acido cianidrico (HCN) è rilasciato come prodotto secondario del metabolismo da molti rizobatteri e, negli organismi sensibili, inibisce la produzione di ATP mediato dalla citocromo ossidasi. Per questo, i rizobatteri produttori di HCN possono essere visti non solo come probiotici a effetto biocontrollo, ma anche come microrganismi dannosi per la salute delle piante, a seconda della quantità prodotta (De Bellis e Ercolani, 2001). Il ruolo dell'HCN, prodotto da *P. fluorescens*, nel controllo di rizobatteri dannosi, non è ancora del tutto chiaro. È possibile che la produzione di HCN abbia differenti effetti in differenti specie di piante.

Induzione dei meccanismi di resistenza della pianta

Tra i meccanismi impiegati dai rizobatteri probiotici, l'induzione della resistenza delle piante è quello che negli ultimi anni ha avuto la maggiore espansione (Murphy *et al.*, 2000a; Zehender *et al.*, 2001; Ji *et al.*, 2006). La resistenza indotta, ISR (dall'inglese Induced Systemic Resistance) (Tuzun e Kloepper, 1994), è definita come "il processo di attiva resistenza, che dipende da barriere fisiche e chimiche della pianta ospite, innescata da agenti biotici o abiotici".

In alcuni casi, la produzione di HCN da parte di certi ceppi di *Pseudomonas spp.* sembra attivare la resistenza indotta della pianta per alcuni patogeni, ma sono ancora limitate le prove dell'intervento diretto di questi rizobatteri. I dubbi derivano dal fatto che si verifica il controllo di patogeni come *Phytophthora* e *Rhizoctonia in vivo*, ma non si riscontra il medesimo effetto *in vitro* (Kloepper *et al.*, 1991).

In altri studi, durante la colonizzazione di batteri coinvolti nell'ISR (*Pseudomonas* e *Bacillus*) c'è un incremento dell'espressione dei geni indotti dal giasmonato e dall'etilene che portano alla liberazione e di segnali diffusibili nell'ambiente (Van Loon *et al.* 1998; Pieterse *et al.* 2001). Una molecola segnale ben caratterizzata è *N*-acyl-*L*-homoserine lactones (AHLs), prodotta da molti batteri Gram negativi, che ha la funzione di controllare l'espressione di geni implicati in svariate funzioni e nel fenomeno del cosiddetto "quorum sensing". Recentemente si è dimostrato che questo gruppo di molecole segnale sono implicati nell'ISR, aumentando l'espressione da parte della pianta di geni deputati alla difesa con il risultato di un minore attacco del patogeno; nello specifico nel caso di *Serratia liquefaciens* e

Pseudomonas putida contro *Alternaria alternata* in piante di pomodoro (Schuhegger *et al.*, 2006).

Dal punto di vista pratico, sono in corso molti studi in campo, da quando si è avuto il primo risultato positivo di un vero proprio effetto dovuto all'ISR contro l'avvizzimento batterico nel cetriolo (Wei *et al.*, 1996), per ottimizzare la migliore strategia applicativa di questi PGPR. E' stata verificata l'efficacia di trattamenti nel seme e nel suolo in campo di ceppi di *Bacillus* spp. contro *Tabacco mosaic virus* (TMV) e *Tomato mottle virus* (ToMoV) (Murphy *et al.*, 2000a; Zehender *et al.*, 2001). Nel lavoro di Ji *et al.* (2006) si è accoppiata l'azione di biocontrollo di ceppi di PGPR (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus pumilus*) con agenti di controllo biologico, sostanze batteriofaghe somministrate sotto forma di spray fogliari, per combattere e/o diminuire la severità dei sintomi causati da *Xanthomonas campestris* pv. *vescicatoria* nel pomodoro. I risultati del lavoro dimostrano l'efficacia dell'azione combinata degli agenti di controllo e del meccanismo ISR, dovuto all'azione del trattamento dei PGPR nei semi e nelle radici, anche se i risultati ottenuti in campo, sono inferiori a quelli ottenuti dai saggi in serra. Nella ricerca di Raj *et al.* (2003), si confronta la migliore applicazione di 5 formulazioni commerciali contenenti ceppi di *Bacillus* spp. interessati all'ISR contro *Sclerospora graminicola* sia nel seme, nel suolo e nella duplice dose seme più suolo della coltivazione di miglio. Oltre a confermare l'efficacia di tutti i prodotti commerciali, dallo studio risulta che l'applicazione nel suolo dell'inoculo è la migliore applicazione, dando risultati maggiori dell'applicazione sul seme ed equiparabile a quella combinata seme più suolo.

2.4. Funghi antagonisti

La riduzione in agricoltura dei pesticidi di sintesi chimica richiesto dalla crescente e nuova concezione di agricoltura focalizzata nella gestione dei patogeni a basso impatto ambientale, hanno fatto aumentare le ricerche nell'identificare i migliori microrganismi con attività di biocontrollo e, successivamente, i prodotti a base di essi in commercio (Abo-Elyousr *et al.*, 2009). Oltre ai funghi micorrizici arbuscolari ed ai batteri promotori dello sviluppo vegetale, anche altri abitanti della rizosfera sono abili nel contenere la diffusione e l'attacco dei patogeni alle colture. Infatti, alcuni funghi saprofiti del suolo del genere *Trichoderma* spp. e *Glaucadium* spp (Hjeljord e Tronsmo, 1998) ed alcuni ceppi non patogeni di *Fusaria* (Benhamou *et al.*, 2002),

Rhizoctonia (Hwang *et al.*, 2003), più comunemente conosciuti per i gravi danni e malattie provocate dalle forme patogene e *Penicillium* e *Phoma* (Koike *et al.*, 2001), esplicano e sono conosciuti per la loro attività come agenti di controllo biologico. Tanto che attualmente sono denominati funghi antagonisti (dall'inglese Antagonistic Fungi) (Bruce e Highley, 1991). Tra questi, spicca per importanza il genere *Trichoderma* spp., sia per i molteplici modi di azione con cui contiene i patogeni (Harman *et al.*, 2004), sia per il fatto di essere molto attivo nelle radici, nel suolo e sulle foglie (Reino *et al.*, 2008), sia perché è stato usato con successo contro molte patologie sia in pieno campo (Hasna *et al.*, 2009) che in colture in serra (Utkhede e Mathur, 2006).

2.4.1. Genere *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. è un fungo saprofito del suolo molto attivo nelle radici, nel suolo ed anche nella parte aerea della pianta. Recenti studi hanno scoperto la sua natura opportunistica, capace d'instaurare simbiosi con le piante e parassitismo contro gli altri funghi patogeni del suolo. Rispetto agli altri funghi antagonisti, è il più efficace ed il più usato negli inoculi distribuiti in commercio per i suoi svariati modi di azione messi in atto nel biocontrollo. Può agire contro i patogeni sia in maniera indiretta, competendo con essi per i nutrienti e lo spazio, sia modificando le condizioni ambientali, sia stimolando la crescita ed i meccanismi di difesa dell'ospite. Infatti, almeno alcuni ceppi sono in grado di stabilire durevoli ed efficaci infezioni, penetrando nell'epidermide e negli strati cellulari poco al di sotto dell'ospite. Una volta penetrato, produce o rilascia diverse sostanze in grado di attivare una serie di risposte difensive e probabilmente a ciò è dovuto la sua non patogenicità. Queste associazioni radici-microrganismi attivano dei sostanziali cambiamenti nel metabolismo della pianta che la rendono protetta dall'attacco di numerosi patogeni. Questo meccanismo molto simile all'Induced Systemic Resistance (ISR) operato dai rizobatteri benefici del suolo, viene detto Systemic Acquired Resistance (SAR) per *Trichoderma* (Harman *et al.*, 2004). D'altro canto esplica attività di diretto biocontrollo con il micoparassitismo e producendo anche più di cento metaboliti, di diversa natura, conosciuti per la loro attività di antibiosi (Sivasithamparam e Ghisalberti, 1998).

Considerando i meccanismi indiretti di biocontrollo, in particolare la stimolazione della crescita dell'ospite, nei lavori di Harman *et al.*, 2004 e 2000 è stato provato nel

mais come l'inoculo di *Trichoderma* aumenti la superficie e la profondità dell'apparato radicale del doppio. In questo modo, la pianta è maggiormente avvantaggiata e soffre meno di stress idrico ed è più resistente alla pressione del suolo (Harman *et al.*, 2000). Inoltre, considerando la finalità del trattamento in pieno campo dell'inoculo e cioè ottenere un aumento dello sviluppo della biomassa, ma soprattutto della produzione, ci sono testimonianza di più di 500 casi sia di sperimentazione scientifica che commerciale, in cui l'inoculo di *Trichoderma* ha aumentato la produzione di almeno il 5% rispetto ai trattamenti senza inoculo (Harman *et al.*, 2004). Comunque bisogna considerare che, per il genere *Trichoderma* l'azione di promozione della crescita, è un effetto benefico inscindibile dall'azione di controllo sui patogeni. Infatti, in molti casi l'aumento della superficie radicale ed il conseguente incremento dello sviluppo vegetale è dovuto probabilmente all'azione di biocontrollo, all'azione che esso esercita indirettamente sulla microflora del terreno ed infine all'azione diretta di promozione della crescita della pianta. Più chiaramente: i microrganismi nocivi possono ridurre la crescita vegetale, anche in assenza di visibili disagi, infatti, producono cianide, probabilmente per competere con la microflora per i nutrienti e lo spazio, sostanza tossica per molti rizobatteri benefici del suolo. *Trichoderma* spp. non solo è resistente al cianide, ma produce nella rizosfera differenti enzimi capaci di degradarla, aiutando così i rizobatteri benefici (Ezzi e Lynch., 2002).

Poiché, come già detto sopra, è già stata appurata l'efficacia dell'azione di biocontrollo dei funghi antagonisti, poiché la richiesta dei consumatori si sta orientando verso un agricoltura sostenibile, e poiché i patogeni stanno diventando sempre più resistenti ai prodotti chimici (Utkhede e Mathur, 2006), è sempre più diffuso l'utilizzo di prodotti per il biocontrollo a base di *Trichoderma*. Tanto che c'è l'imbarazzo della scelta, visto i tantissimi prodotti in commercio (Cardoza *et al.*, 2005), specifici contro alcuni patogeni, ad ampio "spettro" con più agenti per prevenire diverse patologie, o specifici per l'ambiente (pieno campo, foresta, vivaio) in cui sono chiamati ad operare.

2.5. Interazioni probiotiche dei principali gruppi di PPM

Tutti i meccanismi di azione e le funzioni benefiche citate sopra, per i singoli gruppi di probiotici, in realtà sono il risultato dell'azione complementare e sinergica di più gruppi o tipologie di microrganismi della rizosfera. Ecco perché molti studi recenti sono focalizzati nel comprendere la diversità, la dinamica e l'importanza delle

cooperazioni tra le popolazioni rizosferiche, al fine di sfruttarle ed impiegarle in sistemi agricoli sostenibili (Johansson *et al.*, 2004; Barea *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005).

Un tipico esempio di questa cooperazione è data da batteri detti “mycorrhiza-helper-bacteria” (MHB), termine coniato da Garbaye (1994) proprio perché stimolano la crescita, l’espansione del micelio e la formazione dell’associazione simbiotica con la pianta. I batteri MHB agiscono: 1) modificando ed aumentando gli essudati radicali, in modo da stimolare simbiosi pianta-fungo; 2) producendo essi stessi fitormoni o sostanze stimolanti la germinazione delle spore e 3) la crescita delle ife extraradicali (Azcon-Aguilar e Barea, 1992, 1995). D’altro canto i AMF, sia con l’espansione del micelio extraradicale, e quindi creando nuovi siti per la colonizzazione (Andrade *et al.*, 1998), sia con l’essudazione di amino acidi, stimolano l’aumento e la diversità delle comunità rizobatteriche (Secilia e Bagyraj, 1987).

Un altro esempio di sinergia tra AMF e PGPR è la simbiosi a tre leguminose-AM funghi-*Rhizobia* per la fissazione dell’azoto molecolare. Nelle radici delle leguminose la formazione dei noduli radicali e l’associazione mutualistica nel suolo avvengono in contemporanea. I batteri fissano l’azoto non solo per la pianta, ma anche per le micorrize (Johansson *et al.*, 2004). Mentre, il ruolo dei funghi è quello di aumentare la formazione dei noduli e l’attività dei *Rhizobia*, fornire il fosforo P (Barea *et al.*, 1992), che è essenziale per gli enzimi coinvolti nella ed aumentare la tolleranza e facilitare la fissazione dell’azoto (N) in caso di stress idrico o salino (Ruiz-lozano *et al.*, 2001; Porcel *et al.*, 2003).

In generale, possiamo dire che tutti i gruppi funzionali dei PGPR biofertilizzanti collaborano con le micorrize per l’assorbimento dei nutrienti (Puente *et al.*, 2004; Finlay, 2008;) e di acqua nel suolo; le micorrize aiutano i PSB nell’assimilazione del fosforo (P), nel suo assorbimento da parte della pianta, evitando che le forme solubili di ioni P prodotte dai batteri si degradino prima di raggiungere le radici (Barea *et al.*, 2004; Adesemoye *et al.*, 2008); possono interagire sinergicamente per il risanamento di suoli contaminati da metalli pesanti (Vivas *et al.*, 2003, 2005).

Nel caso del biocontrollo tutti i microrganismi citati sopra (funghi micorrizici arbuscolari, PGPR, funghi antagonisti) collaborano e sono utilizzati insieme in formule commerciali per prevenire e ridurre l’attacco dei patogeni. Nel lavoro di Hasna *et al.* (2009) l’inoculo di un prodotto commerciale costituito da ceppi di funghi antagonisti (*Trichoderma* e *Glaucadium*) e da *Streptomyces* hanno una buona

inibizione dell'infezione causata da *Pyrenochaeta lycopersici* nel pomodoro; così come si sono avuti risultati interessanti nel co-inoculo di ceppi di *Trichoderma* spp. e *Pseudomonas* spp. Infine nel lavoro di Vestberg *et al.* (2004) si è saggiata l'efficacia di 5 agenti di biocontrollo (*Glomus mossae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* e *Gliocadium catenulatum*) introdotti in un singolo od un doppio inoculo contro 2 tra le maggiori patologie che attaccano le coltivazioni di fragola in serra. Benché in molti trattamenti sono stati significativi gli effetti indotti dall'inoculo ed il coinoculo con *T. harzianum* e *G. catenulatum* è il trattamento con maggiore successo, spesso non è stata trovata alcuna differenza tra il singolo inoculo e quello con 2 agenti di biocontrollo. Ciò significa che sfruttare l'interazioni rizosferiche per aumentare la tolleranza e la resistenza dai patogeni è utile ed efficace (nei sistemi agricoli ecocompatibili), ma maggiori ricerche e studi sono necessari per ottimizzare l'azione dell'inoculo in pieno campo.

3. Coltura del pomodoro col metodo biologico

La maggiore sensibilità del consumatore verso un prodotto agricolo di qualità ed, in generale, l'orientamento verso un'agricoltura sostenibile ed ecocompatibile, determinano sempre più l'impiego di mezzi di produzioni naturali. Per questo l'agricoltura biologica si sta velocemente espandendo con un tasso annuale del 20% negli ultimi 10 anni (Lotter, 2003), attualmente conta più di 24 milioni di ettari in tutto il mondo (Willer e Yussefi, 2004) e sta diventando il principale sistema di gestione del suolo di molte colture (Anon, 2004). Rispetto al metodo agricolo convenzionale l'agricoltura biologica reca dei potenziali benefici alla struttura e tessitura del suolo (Pulleman *et al.*, 2003), aumenta la biodiversità dei macro e micro-organismi indigeni del suolo, allevia i disagi arrecati dagli stress ambientali (Horrigan *et al.*, 2002) e migliora la qualità e la salubrità dei frutti (Giles, 2004). Inoltre, poiché l'assimilazione dei nutrienti ed il controllo dei patogeni sono influenzati dagli ammendanti organici introdotti e dai processi biologici operati dai microrganismi tellurici (Rigby e Caceres, 2001; Watson *et al.*, 2002), in agricoltura biologica si evita l'uso di fertilizzanti chimici di sintesi e le loro conseguenze nell'ambiente e nella salute dell'uomo.

Tra le orticole coltivate nel biologico, il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) è una delle più interessanti per diffusione e per gli ottimi livelli produttivi e qualitativi raggiunti (Piazza, 2004). Inoltre, il prodotto pomodoro, coltivato con il metodo convenzionale o biologico, è di per sé il secondo ortaggio più consumato in tutto il mondo, sia per il suo gradevole sapore, sia per la sua molteplicità di usi (come derivati) in cucina, sia per il fatto di essere un prodotto salutare che reca dei reali benefici alla salute. Infatti, il suo consumo diminuisce il rischio di alcune tipologie di cancro (Knekt *et al.*, 2002), malattie cardiovascolari (Hertog *et al.*, 1996; Willcox *et al.*, 2003) e disturbi legati all'età senile (Commenges *et al.*, 2000). Questo perché il pomodoro è una risorsa naturale di elementi benefici per la salute come minerali e, soprattutto antiossidanti quali la vitamina C ed E, licopene, β -carotene, luteina e flavonoidi come il quercetina. Nello specifico, ad esempio nel caso dei carotenoidi, dei 40 consumati abitualmente nella dieta e dei rimanenti 25 trovati fino ad ora nel sangue (dopo la selezione operata dal tratto gastrointestinale), un numero compreso tra 9 e 20 derivano dal consumo di pomodoro. Tra di essi i maggiormente presenti come quantità sono: licopene, α - e β -carotene, luteina, zeaxantina e β -criptoxantina

(Dorais *et al.*, 2008). Il licopene, che da solo costituisce circa l'80-90% del totale di carotenoidi del pomodoro rosso (Shi e Le Maguer, 2000) è il più efficace tra tutti gli antiossidanti grazie alla sua attività di cattura delle molecole di ossigeno libere ed eliminare i radicali peroxy (Stahl e Sies, 2003). Il β -carotene, il precursore della vitamina A (Olson, 1989) è presente circa al 7% nel contenuto di carotenoidi totale del pomodoro rosso (Nguyen e Schwartz, 1999). In ultimo anche l'acido ascorbico, il precursore della vitamina C, è un potente antiossidante (Smirnoff, 1996).

Sebbene ci sia un dibattito in corso sulla differenza del contenuto nutrizionale dei frutti coltivati con il metodo convenzionale rispetto a quelli cresciuti con metodologie sostenibili (Bourn e Prescott, 2002; Caris-Veyratl *et al.*, 2004; Chassy *et al.*, 2006), poiché sono stati fatte ancora poche ricerche a lungo termine a questo scopo e poiché c'è spesso troppa variabilità in termini di varietà colturale, condizioni ambientali e pratiche agricole adottate tra i 2 sistemi di coltivazione (Dorais *et al.*, 2008), sono state già trovate alcune indicazioni importanti sulla migliore qualità del pomodoro biologico. Infatti, nel lavoro di Mitchell *et al.*, 2007, il contenuto di flavonoidi varia in maniera significativa a seconda delle fonti di azoto, sotto forma di ammendanti convenzionali o biologici, somministrate. In altri lavori (Caris-Veyrat *et al.*, 2004; Dorais *et al.*, 2007) invece, il contenuto di antiossidanti, soprattutto licopene, è significativamente più alto nei pomodori coltivati in aziende biologiche. Tuttavia, come detto sopra, sebbene non sia ancora confermato l'effetto del metodo biologico sul contenuto nutrizionale del pomodoro poiché molti altri fattori, soprattutto ambientali come l'irradiazione solare e la temperatura, influiscono in maniera determinante sulla qualità, di sicuro il prodotto biologico è più salutare, avendo meno residui di pesticidi (Bourn e Prescott, 2002).

3.1. Origine e diffusione

L'importanza della coltura del pomodoro, ormai estesa a tutto il mondo, è dovuta al notevole consumo dei frutti sia allo stato fresco che nei diversi derivati dell'industria conserviera. Il centro di origine delle specie appartenenti al genere *Lycopersicon* si ritiene sia l'area dell'America Latina compresa tra Ecuador meridionale, Perù e Cile settentrionale, dove, tra la costa del Pacifico e la Cordigliera delle Ande, si trova ancora oggi diffuso allo stato spontaneo. Successivamente si è diffuso nell'America centrale (Messico meridionale, Guatemala, Honduras, S. Salvador) dove sarebbe avvenuta la prima domesticazione ad opera degli Aztechi

che furono i primi a coltivarlo e consumarlo. Gli Aztechi stessi, probabilmente, iniziarono i primi tentativi di selezione e miglioramento genetico, testimoniati dalla presenza di diverse cultivar (forme), tra le quali *L. esculentum* var. *cerasiforme*, presente attualmente anche allo stato spontaneo. Fu introdotto in Spagna nel XVI secolo dove suscitò interesse presso i giardinieri, interessati alle sue bacche colorate di giallo. Probabilmente in questo periodo avvennero i primi tentativi di miglioramento genetico per ottenere bacche di grandi dimensioni, e, quindi più ornamentali. Dalla Spagna si diffuse in Provenza, in Portogallo e poi in Italia. Abbiamo testimonianze risalenti al 1544 della presenza di alcuni esemplari nell'orto botanico di Padova ed al Mattioli si deve la denominazione "pomo d'oro". Gorge Oelinger, nel suo erbario illustrato del 1553, riporta due varietà a frutti gialli ed una a frutti rossi. Alla fine del '500, nonostante i dotti dell'epoca sconsigliassero il consumo dei frutti per la sua parentela con solanacee qual'è la belladonna e la mandragora, l'uso di mangiare i frutti di pomodoro bolliti o crudi, conditi con sale e pepe si era diffuso in tutta Italia ed in tutti i paesi del bacino del Mediterraneo. A metà del '700 è generalizzato il suo utilizzo nella preparazione di minestre in Germania ed Inghilterra ed è un alimento importante nella dieta spagnola. Cronache orticole del 1812 riferiscono di estese coltivazioni di pomodoro in Italia meridionale (Sicilia e Campania) e la produzione conferiva ai mercati di Napoli e Roma. L'utilizzo del pomodoro come conserva risale ai primi dell'800 e la coltivazione specializzata per la trasformazione industriale inizia nel 1875 (e si afferma dai primi del '900), grazie a Francesco Cirio che organizza un primo stabilimento in Piemonte e poi in Campania. Oltre oceano, la diffusione del pomodoro nell'America del Nord incontra inizialmente grande difficoltà per le prevenzioni che ne accompagnano l'utilizzo. Ogni residuo di pregiudizio nei confronti del frutto viene superato solo nel 1820, quando un certo R. G. Johnson mangiò pubblicamente un pomodoro sui gradini del palazzo di giustizia a Salem nei pressi di New York. Questo insignificante dato di cronaca sconfisse per sempre il luogo comune della sua velenosità ed il pomodoro divenne protagonista in tavola (Amadei *et al.*, 1990).

Oggigiorno, il pomodoro, dopo la patata, è il vegetale più consumato in tutto il mondo con una produzione annuale di 122.9 milioni di tonnellate di prodotto fresco (FAO, 2005). La sua coltivazione è diffusa nelle aree corrispondenti alle zone temperate, localizzate intorno al 40esimo parallelo in entrambi gli emisferi, soprattutto nell'emisfero Boreale dove c'è una maggiore produzione e consumo. La coltura è

particolarmente diffusa in U. S. A. (170.000 ha), India (365.000 ha), Cina (754.000 ha), Egitto (180.000 ha) ed Italia (170.000 ha) (Marzi, 1991). Negli USA ed in Europa, ad eccezione dell'Italia, è il secondo prodotto ortofrutticolo consumato. Negli USA ed in particolare in Florida, dove la coltivazione degli ortaggi è la fonte principale dell'economia agricola (72.000 ettari per un valore di 1.5 miliardi di dollari), il pomodoro da solo rappresentava il 42% delle coltivazioni pari a 1.6 miliardi di tonnellate di pomodoro in commercio (USDA, 2007). Bisogna aggiungere che negli Stati Uniti, più dell'80% del consumo annuale di pomodoro è sottoforma di prodotto trasformato quali pomodori essiccati, salse, passate, ketchup e condimenti vari (Shi e Le Maguer, 2000). In Italia, il pomodoro risulta il principale prodotto ortofrutticolo coltivato e consumato, sia come prodotto fresco, sia in tutti i suoi derivati. La coltura è diffusa in tutte le regioni, in maniera prevalente in quelle meridionali. La duplice attitudine della coltura caratterizza la diffusione nelle diverse situazioni ambientali. Per la destinazione industriale, le più importanti aree di coltivazione si concentrano in Emilia Romagna, in Puglia e in Campania. Per la destinazione al consumo fresco, una rilevante importanza ha la coltura in ambiente protetto, che ha conseguito una notevole espansione nella Sicilia orientale, nel Veneto, nel Lazio e nella Campania (Marzi, 1991).

Inoltre, con la diffusione del metodo biologico o a basso impatto in agricoltura, anche la coltivazione del pomodoro si è convertita con successo a questo trend ecocompatibile. Infatti, tra le orticole coltivate in biologico, il pomodoro, soprattutto da industria, è una delle più interessanti per diffusione e per gli ottimi livelli produttivi raggiunti. Nella nostra regione, l'Emilia Romagna, la coltivazione di questa orticola in bio, originariamente nata nella zona occidentale, si sta espandendo in quella orientale, cioè nella provincia di Ferrara (Piazza, 2004).

3.2. Produzione

Come già detto sopra, la coltura del pomodoro è praticata un po' in tutto il mondo, occupando una superficie stimata in 3.6 milioni di ha, con una produzione di circa 100 milioni di tonnellate ed una resa media di 27.5 tonnellate per ettaro. Inoltre, si rileva un costante aumento della produttività della coltura, sia per il consumo fresco, sia per l'industria conserviera, in seguito all'intenso lavoro di miglioramento genetico ed agrotecnico (Marzi, 1991).

L'Italia, collocata ai primi posti nella situazione mondiale, è il più importante produttore di pomodoro della Comunità Europea, seguita da Spagna e Grecia. La sua produzione da sola rappresenta il 15% della produzione lorda vendibile, pari a 800 Mln di euro (112.000-115.000 ettari). La produzione del pomodoro da industria è pari a 5.7 milioni di tonnellate e di essa circa il 50% è destinata alla trasformazione in concentrato, circa il 35% all'ottenimento di pelati ed il restante 15% per altri derivati (polpa, triturati e passate). Per quanto riguarda la coltura del pomodoro da mensa, è più difficile una valutazione attendibile, in considerazione della possibilità della duplice utilizzazione del pomodoro a livello familiare e della frequente destinazione della produzione da pieno campo al mercato ortofrutticolo per l'utilizzo culinario. Comunque, considerando la produzione in ambiente protetto, nel complesso, la quantità di pomodoro inviato annualmente ai mercati ortofrutticoli, proveniente sia dal pieno campo che dalle serre, si aggira intorno a 2-2.5 milioni di tonnellate (Marzi, 1991).

In generale, in relazione ai numerosi fattori che influenzano la coltura (tessitura del terreno, disponibilità di acqua e nutrienti), la produzione unitaria del pomodoro, nel convenzionale, è molto variabile, da punte superiori a 100-105 tonnellate per ettaro ($t \cdot ha^{-1}$) a rese bassissime di 5- 10 $t \cdot ha^{-1}$ in coltura asciutta. Comunque, la produttività media delle statistiche risulta essere intorno alle 45- 50 $t \cdot ha^{-1}$ (Marzi, 1991).

Poiché, come per le qualità nutritive della bacca di pomodoro, la grande variabilità tra le varietà colturali, condizioni ambientali e pratiche agricole adottate, potrebbe mascherare la presenza di un eventuale differenza di produzione, in termini di quantità, tra il sistema agricolo convenzionale e biologico, non si è ancora giunti ad una valutazione veritiera su quale dei 2 metodi sia il maggiormente produttivo. Infatti, in letteratura si trovano stime discordanti sulla produzione media del pomodoro in agricoltura biologica od a basso impatto ambientale rispetto all'agricoltura convenzionale. Nel lavoro di Bulluck *et al.*, 2002, (un esperimento in pieno campo di 2 anni) si confronta la produzione di pomodoro in 6 siti sperimentali diversi tra cui 3 con una storia colturale biologica su cui si è continuato ad introdurre ammendante biologico e 3 con storia colturale convenzionale sui quali sono stati introdotti fertilizzanti di sintesi. Il risultato della suddetta ricerca è che la fertilità e la produttività nelle aziende biologiche è maggiore rispetto ai valori delle aziende coltivate nel convenzionale, poiché c'è un grande contributo benefico distribuito nel tempo degli ammendanti biologici. Mentre altre ricerche condotte su prodotti ortofrutticoli in

California, hanno riportato valori nella produzione dei 2 sistemi agricoli equivalenti (Drinkwater *et al.*, 1995; Stamatiadis *et al.*, 1999). In particolare Clark *et al.*, 1999, confrontando i sistemi agricoli convenzionale, a basso impatto e biologico nella coltivazione del pomodoro, trovano che la produzione tra i metodi biologici ed a basso impatto è comparabile a quella ottenuta nella condizione convenzionale. Tuttavia in agricoltura biologica la gestione dei fattori limitanti la produzione come le fonti di azoto, l'acqua e la presenza d'infestanti, è più difficoltosa e potenzialmente più rischiosa per il raccolto.

3.3. Utilizzo fertilizzanti probiotici (PPM) nel BIO

Il principio fondamentale su cui si basa l'agricoltura sostenibile (a basso input e biologica) è la fertilità del terreno, mantenibile e migliorabile solo con un'oculata gestione della sostanza organica (Piazza *et al.*, 2005) e della flora microbica, in grado di rendere disponibili alle piante tutti gli elementi nutritivi. Tanto che ci si pone come obiettivo del 21esimo secolo quello di capire e sfruttare al meglio come le piante ed i microrganismi convivono e cooperano tra loro per aumentare la produttività vegetale, senza danneggiare l'ambiente e diminuire la biodiversità globale (Morrissey *et al.*, 2004). Inoltre, nella review di Bastida *et al.*, 2008, focalizzata nel dare una definizione corretta ed attuale di indice di qualità del suolo e nel trovare i parametri fondamentali che lo determinano, si nota che dal 2000 ad oggi sempre più autori impegnati nel coniare un indice di qualità (nei sistemi agricoli), prendono sempre più in considerazione parametri microbiologici (come la biomassa microbica, la respirazione, conta batterica totale) e Kang *et al.*, 2005 nel definire il suo "Sustainability Index" considera anche l'infezione micorrizica come un parametro biologico fondamentale. Bastida, quindi, arriva alla conclusione che individuare la struttura della comunità microbica del suolo, identificare la presenza o meno di alcune popolazioni implicate in importanti funzioni quali il ciclo e l'assimilazione dei nutrienti, il miglioramento della tessitura del suolo, la decontaminazione, sono, e lo saranno sempre di più nel futuro, fondamentali per definire un indice di qualità del suolo (Bastida *et al.*, 2008).

Per questo, ultimamente, si ricorre all'uso di bio-inoculi, costituiti da "probiotici per le piante" (PPM) (Has and Keel, 2003) per mantenere alta la produttività del suolo sia in condizioni di scarsa disponibilità nutritiva, sia in prevenzione dell'attacco di patogeni. L'introduzione dell'inoculo può essere, inoltre, accompagnata dall'aggiunta di

sostanze che potremo definire “prebiotiche” per la loro azione aiuto e sostentamento della microflora benefica, quali ammendanti compostati verdi, misti (Bulluck *et al.*, 2002; Perner *et al.*, 2007), vermicompostati (Gutierrez-Miceli *et al.*, 2007) o ammendanti a base di zeoliti (Mumpton, 1999; Leggo, 2000; Vosatka e Gryndler, 2000; Passaglia e Marchi, 2002).

I microrganismi benefici introdotti nel suolo sono influenzati dagli stessi fattori abiotici e biotici, che influiscono sulle comunità microbiche indigene. I fattori abiotici come la temperatura, il pH, la disponibilità di ossigeno e di acqua, la tessitura del suolo, giocano un ruolo cruciale nella sopravvivenza ed attività dei probiotici (Yang *et al.*, 2009). Mentre i fattori biotici come l'essudazione radicale e tutte le dirette ed indirette interazioni con gli altri micro e macro abitanti della rizosfera, influenzano l'abbondanza e la diversità delle popolazioni microbiche (Johansson *et al.*, 2004; Barea *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005). E' necessario studiare attentamente le dinamiche delle comunità microbiche, le proprietà chimico-fisiche del suolo, la storia agronomica del campo, prima di modificare le pratiche agricole utilizzando dei bio-inoculi. Infatti, le diverse lavorazioni del terreno sono uno dei fattori che maggiormente incidono sull'efficacia dell'inoculo. E' stato dimostrato, confrontando l'attività microbica, lo stato micorrizico e la stabilità del suolo di diverse lavorazioni del suolo agricolo, che un suolo non sottoposto a pesanti lavorazioni risulta il migliore rispetto a tutti i parametri valutati. Probabilmente, in questo suolo, le ife dei funghi micorrizici arbuscolari riescono a mantenersi attive anno dopo anno, aumentando così la colonizzazione. Inoltre, una maggiore colonizzazione di questi funghi influisce positivamente anche sull'aggregazione del suolo facilitando l'assimilazione delle sue componenti organiche (Roldan *et al.*, 2007).

Inoltre, oltre ai fattori biotici e abiotici descritti sopra, bisogna valutare, per rendere efficace l'introduzione dell'inoculo, alcuni parametri specifici come la densità dell'inoculo, la dose iniziale, lo stato fisiologico sia dei microrganismi introdotti sia della pianta ospite, il metodo d'introduzione e l'eventuale introduzioni di sostanze prebiotiche (Strigul e Kravchenko, 2005).

L'impiego di probiotici si sta diffondendo velocemente perché si sono dimostrati essere un rimedio efficace, sia nel risanamento delle aree sottoposte ad una coltivazione intensiva (Hobbs, 2007), ad inquinamento da parte di metalli pesanti (Khan, 2006; Jing *et al.*, 2007), sia nel “combattere” e contenere alcune tra le maggiori patologie che infettano importanti coltivazioni a livello mondiale. Nel caso

specifico dell'agricoltura biologica del pomodoro troviamo in letteratura molte testimonianze dell'efficacia dell'inoculo, di un singolo ceppo o del co-inoculo di più ceppi, nel biocontrollo. Ad esempio nel caso dei patogeni *Xanthomonas campestris* pv. *vescicatoria* e *Pseudomonas syringae*, responsabili rispettivamente delle patologie maculatura e picchiettatura batterica, Ji *et al.*, 2006 trovano che il coinoculo di batteri promotori della crescita (*Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus pumilus*) riesce a contenere l'infezione ed a mitigare l'effetto dei danni. In un altro lavoro, il co-inoculo di 2 ceppi di *Bacillus* contrastano efficacemente la diffusione di Virus mosaico del pomodoro (ToMV) del pomodoro con il meccanismo Induced Systemic Resistance (ISR) (Murphy *et al.*, 2000a). Anche l'inoculo di antagonisti micorrizici ha dato efficaci risultati nel combattere vari patogeni tra i quali *Rhizoctonia solani* (Berta *et al.*, 2005), *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Scheffknecht *et al.*, 2006) ed un fitoplasma dello Stolbur, responsabile della virescenza ipertrofica del pomodoro (Lingua *et al.*, 2002).

In secondo luogo, i bio-inoculi sono sempre più utilizzati nell'agricoltura biologica del pomodoro allo scopo di aumentare l'assorbimento di nutrienti ed acqua dal suolo, di migliorare la tessitura del terreno. Ad esempio, nel caso di stress idrico nella ricerca di Al-Karaki (2006), l'infezione delle radici delle piantine di pomodoro, dovuto all'inoculazione di ceppi micorrizici arbuscolari, mitiga l'effetto nocivo dell'irrigazione con acqua salata e di stress idrico (Al-Karaki *et al.*, 2004). Infatti, in generale, le micorrize sono efficaci nell'assorbimento di acqua dal suolo grazie ad un duplice meccanismo contemporaneo: la produzione di ife extraradicali e l'essudazione di una glicoproteina, la glomalina, che facilita ed aiuta l'estensione e la penetrazione delle suddette ife nel terreno (Wright and Upadhyaya, 1996). Per quanto riguarda l'azione benefica di assimilazione di nutrienti e di miglioramento della tessitura del terreno, risultati positivi sono stati ottenuti da Gamalero *et al.*, 2004, dove l'effetto sinergico dell'inoculazione di un ceppo batterico promotore della crescita ed un fungo micorrizico arbuscolare hanno aumentato l'assorbimento di P, e da Cavagnaro *et al.*, 2006, dove i funghi micorrizici svolgono un' importante funzione favorendo la nutrizione della pianta e l'aggregazione del suolo.

4. Metodi molecolari per lo studio delle comunità di PPM

Un problema focale in ecologia microbica è determinare in modo preciso la struttura e la composizione delle comunità microbiche e fungine in relazione ai cambiamenti ed ai processi ambientali e/o sperimentali. Per raggiungere questo obiettivo i metodi di microbiologia classica come l'isolamento su piastra, i test basati sulle caratteristiche fenotipiche, per quanto riguarda i batteri ed i metodi microscopici, i saggi con isozimi, lo studio della morfologia delle spore o dei corpi fruttiferi, per quanto riguarda i funghi, non sono sufficientemente esaustivi. I limiti di questi metodi "classici" sono: 1) la maggior parte dei microrganismi del suolo o della rizosfera non sono coltivabili in laboratorio (Roszak e Colwell, 1987; Torsvik e Øvreas, 2002) e nel caso delle micorrize l'impresa è quasi impossibile (Horton e Bruns, 2001) 2) spesso richiedono un notevole dispendio di tempo (Nilsson *et al.*, 2005). Per questo l'avvento e l'utilizzo dei metodi molecolari, indipendenti dalla fase di isolamento, ha rivoluzionato in ecologia microbica l'indagine della microflora del suolo, soprattutto nelle sperimentazioni in campo. L'uso di metodi molecolari nello studio delle comunità rizobatteriche non solo permette di evidenziare la presenza e la quantità di microrganismi in un determinato ambiente/campione, ma permette anche di studiare la popolazione microbica allo scopo di verificare il grado di polimorfismo genetico, o di identificare batteri con delle determinate capacità metaboliche, e di determinare le eventuali fluttuazioni di struttura e composizione della microflora.

A questo scopo esistono e sono utilizzati una grande varietà di metodi molecolari (Schloter *et al.*, 2000; Anderson e Cairney, 2004) che possono essere suddivisi in 2 grandi categorie (escludendo i metodi immunologici): 1) i metodi basati sull'amplificazione genica *in vitro* (PCR) (Saiki *et al.*, 1988); 2) tecniche d'ibridazione su probe di DNA o RNA.

Sebbene metodi molecolari appartenenti ad entrambe le categorie siano molto usati per studiare popolazioni genomiche di campioni ambientali, i metodi basati sulla PCR risultano i più utilizzati nel valutare la diversità (Mitchell e Zuccaro, 2006).

In breve, queste metodologie prevedono a) l'estrazione degli acidi nucleici dai campioni ambientali; b) l'amplificazione genica *in vitro* di molecole target; c) la separazione di entità individuali per la caratterizzazione e l'identificazione. Nella

prima fase (a) è importante appurare la purezza del DNA/RNA estratto, infatti nel caso di campioni ambientali è facile che rimangano delle sostanze inibitrici della PCR come acidi umici, polisaccaridi e tannini.

Il secondo step (fase b), ed in particolare la scelta delle sequenze target da amplificare via PCR, è la fase cruciale per la verifica delle ipotesi sperimentali. Infatti, la scelta delle sequenze target prevede una conoscenza a priori della variabilità genetica del gruppo probiotico considerato, dipende dalla studio ecologico e dal livello di discriminazione filogenetica a cui si mira (Mitchell e Zuccaro, 2006).

Nel prossimo paragrafo saranno elencate le regioni di DNA maggiormente utilizzate per studi di tipo tassonomico ed ecologico-applicativo, nell'analisi della struttura delle comunità rizobatteriche e dei funghi micorrizici arbuscolari.

Infine, nell'ultima parte di questo capitolo, saranno descritte alcune tra le tecniche maggiormente usate per la separazione dei prodotti PCR (fase c).

4.1. Regioni di DNA utilizzate nell'analisi delle comunità microbiche batteriche

Le comunità microbiche sono caratterizzate da una composizione in specie o ceppi assolutamente peculiare e complessa: ambienti simili possono presentare comunità microbiche molto diverse dal punto di vista tassonomico (Borneman *et al.*, 1996), la diversità risulta molto elevata anche a microscala (Ranjard *et al.*, 2000) e può variare in modo stagionale (Smit *et al.*, 2001). Non tutte le regioni del DNA degli organismi possono pertanto essere utilizzate per lo studio della struttura delle comunità microbiche. E' necessario che la regione di DNA analizzata permetta di differenziare le specie dal punto di vista filogenetico, così da esplorare la diversità delle popolazioni nel modo più approfondito possibile. Attualmente, le regioni di DNA maggiormente utilizzate per studi di tipo tassonomico e per l'analisi della struttura delle comunità microbiche sono:

- 16S rDNA
- la regione non codificante ITS, Internally Transcriber Spacer, posizionata tra il gene 16S e 23S

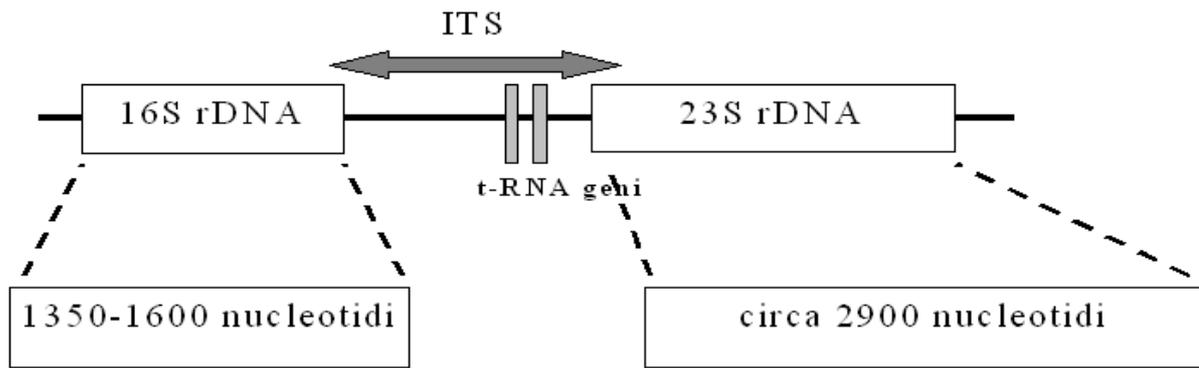


Figura 2. Operone ribosomale dei procarioti.

4.1.1. 16S

Nel mondo dei procarioti, il gene più utilizzato per questo tipo di analisi è quello che codifica per l'RNA ribosomale 16S, presente in tutti i microrganismi nell'operone ribosomale (Millis *et al.*, 2006). Questo gene rappresenta un orologio molecolare dell'evoluzione, poiché non è soggetto né a fenomeni di trasferimento orizzontale né di convergenza evolutiva, visto che non codifica per prodotti che hanno funzioni legate all'ambiente circostante, ma solo all'attività metabolica intracellulare degli organismi. Infatti, il prodotto del gene 16S è l'RNA ribosomale 16S, coinvolto esclusivamente nel processo di sintesi proteica. Questo processo non è influenzato dall'ambiente in cui si trova il batterio, perciò l'evoluzione del gene 16S è legata esclusivamente al tempo di divergenza delle varie specie dai rispettivi ancestrali comuni. Il 16S rDNA dei batteri è una sequenza di 1350-1600 nucleotidi suddivisa in regioni conservate e regioni variabili, in funzione del tasso di mutazione che presentano; esso varia all'intero dello stesso gene al variare dell'importanza che ogni subsequenza riveste per la funzionalità del prodotto.

4.1.2. Spaziatore ribosomale tra i geni 16S e 23S dell'operone ribosomale

Il gene 16S è quello per il quale esistono le banche dati più ricche e quindi permette facilmente l'identificazione dei ceppi; anche per questo motivo è ancora il più usato negli studi sulla struttura delle comunità microbiche. Ciononostante, presenta delle limitazioni dovute all'elevato livello di conservazione di gran parte della sua sequenza che riduce la possibilità di esplorare la diversità delle comunità microbiche a livello intraspecifico. Lo spaziatore ribosomale compreso tra i geni 16S e 23S dell'operone ribosomale é

una regione di DNA universalmente presente nel mondo dei procarioti ma ipervariabile rispetto ai geni adiacenti. La sua capacità di registrare le mutazioni senza che ciò comprometta la vita degli organismi è dovuta al fatto che questa regione non codifica per nessun prodotto finale. Le sue dimensioni vanno da circa 130 a circa 1500 nucleotidi e, in alcuni casi, contiene i geni per i tRNA dell'isoleucina e dell'alanina. Addirittura nello stesso genoma, le diverse copie di operone ribosomale possono presentare ITS 16S-23S differenti in lunghezza ed in sequenza.

4.2. Regioni di DNA utilizzate nell'analisi delle comunità fungine micorriziche

Come abbiamo già accennato sopra, lo studio filogenetico e della diversità delle comunità micorriziche basato sulla morfologia delle spore, non riflette a pieno e non permette di valutare la composizione e l'abbondanza delle specie presenti nel campione analizzato (Clapp *et al.*, 1995; Morton *et al.*, 1995). Inoltre le spore, essendo presenti nel suolo, non sono un buon indicatore della presenza e della cinetica della colonizzazione micorrizica *in planta*. Per questo, nel caso dei funghi micorrizici è stato ancora più importante rispetto ai PGPR, l'utilizzo dei metodi molecolari in grado di discriminare i cambiamenti nel corso del tempo e nello spazio nella composizione delle specie all'interno del tessuto vegetale ospite (Helgason *et al.*, 1998).

I principali geni micorrizici, ma in generale fungini, studiati sia a scopo filogenetico, sia a scopo applicativo sono:

- 18S rDNA o Small SubUnit (SSU)
- le regioni non codificanti ITS (ITS1 e ITS2) o Internally Strasciber Spacer, posizionate tra il gene 18S e 28S e che contengono al loro interno il gene 5.8S rDNA
- 28S rDNA o Large SubUnit (LSU)

Esistono una grande varietà di set di primer per amplificare tutti e tre i geni del rDNA fungino. Tuttavia, non tutti sono adatti per amplificare genoma provenienti da campioni ambientali. Infatti il riconoscimento di particolari sequenze fungine, soprattutto quelle rare, necessita di un alto grado di specificità e molte combinazioni di primer. Ad esempio i primi set di primer disegnati (ITS1-ITS4) da White *et al.*, 1990, non escludono l'amplificazione del DNA vegetale dell'ospite (Martin e Rygielwicz, 2005). Di solito i primer sono costruiti per amplificare un ampio spettro di

funghi, provenienti da diversi campioni radicali. La mancanza di specificità dei primer è un problema quando il DNA del fungo è poco presente nel campione rispetto al DNA totalmente presente.

Quindi nel caso dei funghi micorrizici arbuscolari ci si trova di fronte ad un paradosso:

- avere un set di primer in grado di amplificare il target fungino prescelto senza amplificare altro DNA eucariota estraneo (pianta, nematodi, etc...)
- allo stesso tempo il set di primer prescelto deve essere in grado di discriminare almeno a livello dell'ordine le differenti tipologie di AMF all'interno del *phylum Glomeromycota*.

Per questo spesso si procede con un'amplificazione con primer generali (con target Eucariota o regno Funghi) e poi con restrizione enzimatica e/o nested PCR, clonaggio e sequenziamento, al fine di ottenere un quadro esaustivo della diversità dell'infezione micorrizica dei campioni radicali analizzati (Helgason *et al.*, 2002; Renker *et al.*, 2003; Wirsal, 2004; Ma *et al.*, 2005; Oros-Sichler *et al.*, 2006; Picard *et al.*, 2008) .

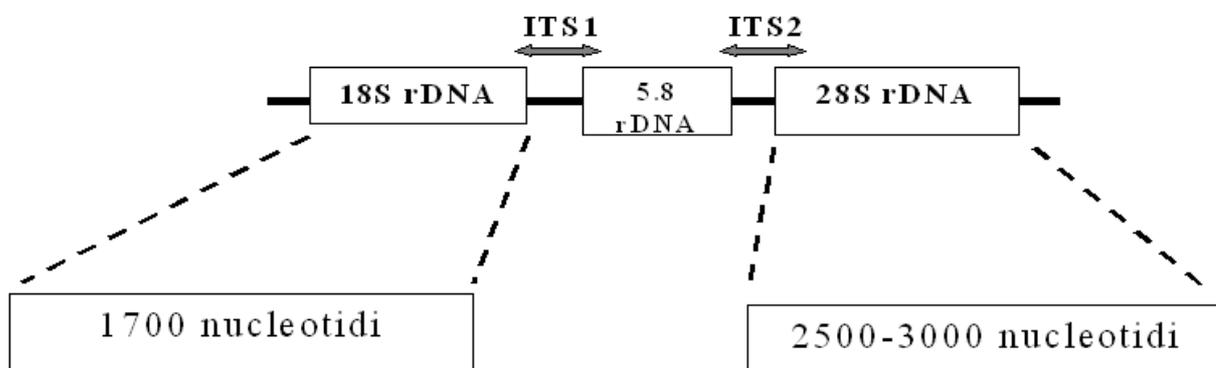


Figura 3. Operone ribosomiale degli eucarioti.

4.2.1. 18S o Small SubUnit (SSU)

L'identificazione tassonomica dei funghi, basata sulla sequenza della subunità ribosomiale 18S è più problematica rispetto a quella dei batteri, basata sul 16S rRNA. Infatti per i funghi, le scarse variazioni all'interno del 18S rRNA, dovuto al breve periodo in cui questi si sono evoluti e diversificati, ha provocato una mancanza di un database completo delle sequenze di riferimento (Anderson e Cairney, 2004).

I primer del 18S rDNA sono comunemente usati per discriminare i funghi micorrizici arbuscolari nel suolo ed, in questo caso, è sufficiente una variazione nella sequenza del 18S RNA per distinguerli (Vandenkoornhuysen e Leyial, 1998). Infatti, grazie alla

diversità delle sue regioni conservate e di quelle variabili, il target 18S rRNA è il più usato negli studi filogenetici (Horton e Bruns, 2001). Attraverso lo studio molecolare del gene SSU, si è potuto constatare che quello che prima era considerato l'ordine delle *Glomales* non appartiene al *phylum* delle *Zygomycota*, derivando da un gruppo monofiletico ben separato dagli altri funghi. Quindi per dare un'adeguata collocazione filogenetica ai AMF, è stato creato un nuovo *phylum*, i *Glomeromycota* (Schußler *et al.*, 2001).

In generale i primi primer ideati ed utilizzati per studiare la diversità genetica dei funghi, e quindi non specifici per le micorrize sono quelli di White *et al.*, 1990, tra cui NS1, NS3, NS5 e NS7 forward e NS2, NS4 e NS8 reverse, amplificano il gene 18S. Altri primer specifici per il target fungino, ma non specifici per le AMF sono quelli di Borneman e Hartin (2000), disegnati appunto per riconoscere il gene SSU dei maggiori *taxa* di funghi quali *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridomycota* e *Zycomycota*. Simon *et al.* (1992) si sono focalizzati sulle porzioni variabili del gene SSU per disegnare dei primer specifici per i AMF. In questo lavoro gli autori procedono dapprima con un'amplificazione con i primer set NS1-NS6 e NS3-NS8 di White *et al.*, 1990, per poi passare al sequenziamento delle regioni di gene amplificato allo scopo di costruire un primer specifico. Il primer specifico creato è VANS1 forward da accoppiare con il primer per i funghi NS21 ed NS2, e queste coppie amplificano specificatamente endomicorrize, come *Glomus* e *Gigaspora* e non DNA di piante od altri *phylum* fungini come *Basidiomycota* od *Ascomycota*.

Nei lavori di Helgason *et al.* si utilizzano i primer NS31 (Simon *et al.*, 1992) e AM1 (Helgason *et al.*, 1998), i prodotti PCR sono successivamente clonati e sottoposti alla Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) con 2 enzimi di restrizione (*AluI* e *HinfI*). Dal sequenziamento di alcuni di questi cloni si è appurata la specificità del metodo per discriminare membri delle *Glomales* appartenenti alle famiglie delle *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae* e *Glomusporaceae*. Inoltre, per questi 3 gruppi si è potuto valutare quanto siano determinanti i fattori data, stagione di campionamento e pianta ospite nel determinare fluttuazioni significative nella composizione della comunità micorrizica (Helgason *et al.*, 1999, 2002).

4.2.2. Spaziatori ribosomali tra i geni 18S-5.8S-28S

Anche le regioni ITS, localizzate tra i geni 18S ed 28S, che includono all'interno il gene 5.8S rDNA sono spesso dei buoni target di primer. Queste regioni

non codificanti hanno più variabilità nelle sequenze rispetto alle regioni codificanti, che invece si sono ben conservate (Lord *et al.*, 2002, Anderson *et al.*, 2003). Infatti, queste regioni permettono la discriminazione delle diverse famiglie all'interno dell'ordine delle *Glomales*, cosa che con i precedenti primer basati sul polimorfismo del gene 18S non era possibile ottenere (Redecker, 2000). Le regioni ITS sono usate comunemente anche per discriminare le diverse famiglie all'interno delle ectomicorrize (Buscot *et al.*, 2000).

White *et al.* (1990) hanno creato i primi set di primer, anche per amplificare le regioni ITS, costituiti da ITS1, ITS3 ITS5 forward e ITS2 e ITS4 reverse. Tuttavia, si è appurato che questi primer non escludevano DNA di altri organismi eucariotici, per questo successivamente è stata creata la coppia di primer ITS1F e ITS4B, che non amplificano erroneamente il DNA vegetale e che riconoscono preferibilmente le regioni ITS dei *Basidiomycota* (Gardes e Bruns, 1993).

Successivamente Redecker ha disegnato primer specifici per i AMF, dapprima amplificando il DNA con i primer universali eucariotici NS5-ITS4 e ITS1-ITS4, poi procedendo con il clonaggio e la restrizione enzimatica delle suddette regioni. Analizzando le risultanti sequenze ribosomali crea i set di primer per i 5 principali sottogruppi dei *Glomales* (Figura 4):

- GLOM1310/GLOM5.5S in combinazione con ITS1F, per il gruppo costituito da *Glomus mossae* o *G. intraradices*
- LETC1670 in combinazione con ITS4, per il gruppo costituito da *Glomus etunicatum* e *G. claroideum*
- ACAU1660 in combinazione con ITS4, per il gruppo delle *Acaulosporaceae in sensu stricto*
- GIGA5.8S in combinazione con ITS1F, per il gruppo delle *Gigasporaceae*
- ARCH1311 in combinazione con ITS4, per il gruppo costituito da *A. gardemannii*, *A. trapei*, *G. occultum* e *G. brasilianum* (Redecker, 2000).

Questi set di primer sono molto usati quando si vuole valutare la diversità delle comunità di AMF, anche in reazioni di nested PCR o DGGE, come ad esempio per il genere *Gigaspora* nel lavoro di De Sousa *et al.* (2004), per valutare la diversa composizione delle popolazioni micorriziche in seguito al genotipo della pianta ospite (Picard *et al.*, 2008).

Il grado di poliformismo delle regioni non codificanti ITS è stato utilizzato per disegnare i primer, specifici per le *Glomeromycota*, SSU-GLOM1 e LSU-GLOM1 da

Renker *et al.*, 2003. Gli autori procedono con una prima amplificazione usando i primer ITS5-ITS4 o ITS1-ITS4, ed una nested PCR con i primer specifici. Dapprima i primer non erano del tutto specifici, visto che amplificavano anche membri appartenenti al *phylum Basidiomycota*, ma con la restrizione enzimatica del prodotto nested PCR, si è risolto il problema.

Infine, nel lavoro di Isayenkov *et al.* (2004) sono stati creati ed utilizzati dei primer per amplificare la porzione di DNA tra il gene 5.8S e le regioni ITS, GLOM-RNSF e GLOM-RNSR specifici per *Glomus intradicis*, usando la real-time PCR. Inoltre, in questo lavoro è stata disegnata una coppia di primer che trascrivono per una proteina fosfato trasportatrice negli arbuscoli, così oltre all'informazione sulla colonizzazione di *G. intradicis* nelle radici di *Medicago truncatula*, c'è anche il dato sull'effettiva funzionalità ed efficacia dell'infezione micorrizica.

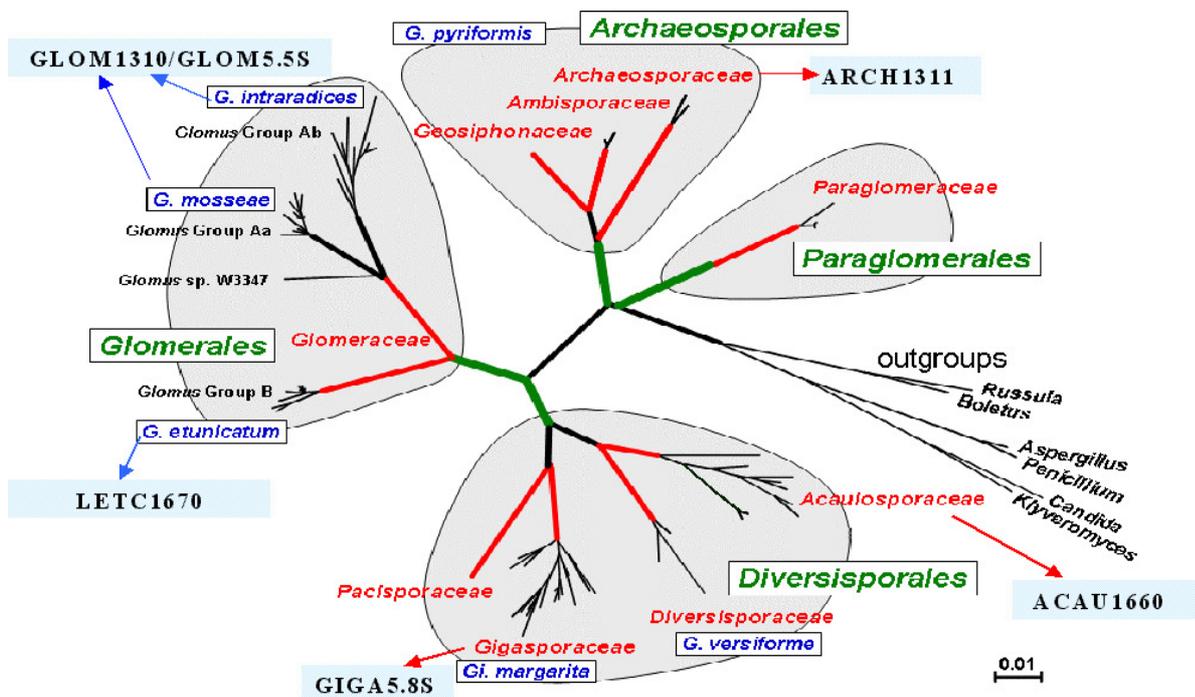


Figura 4. *Phylum Glomeromycota*, con i rispettivi 4 ordini (Schu ler *et al.*, 2001) ed i primer specifici di Redecker, 2000.

4.2.3. 28S o Large SubUnit (LSU)

Set di primer basati sullo studio delle sequenze del gene 28S sono stati ideati ed utilizzati da Alkan *et al.*, 2004 e 2006. In questi lavori sono stati appunto disegnati primer per il gene LSU specifici sia per *G. intradicis*, sia per *G. mossae* da utilizzare in una real-time PCR. Nello specifico, nel primo lavoro sono stati utilizzati i

primer GiAM ed il primer dell'ospite per la sintesi specifica del gene chitinasi o calcione sintasi, così da determinare la quantità dell'infezione nel tessuto vegetale ospite, costituito da pomodoro e medicago. E' importante aggiungere che in questa ricerca per la prima volta sono stati confrontati il metodo per la quantificazione dell'infezione *in planta* via real-time PCR con quello microscopico del *gride-line intersect method* di McGonigle *et al.*,1990, al fine di trovare un'equazione di correlazione tra le 2 quantificazioni (Alkan *et al.*, 2004). Nel lavoro successivo, oltre ad utilizzare i primer precedentemente ideati, ne disegna un'altra coppia specifica per *G. mossae* (gene 28S) ed una coppia specifica per un altro ospite vegetale, la carota. Con questi strumenti molecolari, attraverso la real-time PCR valuta come varia la colonizzazione *in planta* di *G. mossae* e di *G. intraradices* nelle radici di carota, pomodoro e medicago a seconda della zona radicale, degli input di fosforo introdotti e del grado di salinità del terreno (Alkan *et al.* 2006).

4.3. Tecniche molecolari per l'analisi della comunità di PPM

Dopo la scelta e l'amplificazione del target, il passaggio successivo nello studio della diversità delle comunità di probiotici è la separazione di entità individuali per la caratterizzazione e l'identificazione (fase c).

La separazione dei prodotti PCR può essere ottenuta attraverso molteplici modi:

1. si possono costruire delle banche dati di sequenze, clonando ed amplificando con specifici vettori delle singole molecole di DNA. Successivamente bisogna scegliere un numero rappresentativo di cloni, caratterizzarli attraverso la restrizione enzimatica (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), raggrupparli in base alla somiglianza genetica risultata dai profili e sequenziare almeno un rappresentante per ogni gruppo risultante. Quindi, questo metodo per essere rappresentativo della diversità dell'intera popolazione rizosferica richiede molto lavoro e molto dispendio di tempo.
2. altre tecniche di separazione prevedono la tradizionale elettroforesi su gel (di agarosio o acrilammide) o utilizzano sistemi di elettroforesi automatica capillare, molto più precisa e sensibile. La base della separazione molecolare dipende dalla diversità della lunghezza del frammento amplificato, come nella Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism (T-RFLP) (Osborn *et al.*, 2000), dell'amplificazione dello spaziatore intergenico nella Ribosomal

Intergenic Spacer Analysis (RISA) o Automated Intergenic Spacer Analysis (ARISA) (Fisher e Triplett, 1999; Ranjard *et al.*, 2001), dei prodotti ottenuti da una successiva restrizione enzimatica per l'Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) (Massol-Deya *et al.*, 1995), della sequenza per la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993). Queste metodologie basate sul confronto delle bande elettroforetiche sono molto diffuse tra gli ecologisti, poiché permettono l'analisi contemporanea di un grande numero di campioni nello stesso gel, e ciò è essenziale nello studio delle variazioni spaziali e temporali delle popolazioni rizosferiche (Heuer e Smalla, 1997; Osborn *et al.*, 2000; Kennedy e Clipson, 2003).

Di seguito, sono descritte alcune tra le tecniche molecolari maggiormente usate quando si vuole studiare la struttura delle comunità microbiche.

4.3.1. DGGE

La Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993) permette di separare i frammenti in base alla loro differente proprietà di dissociazione o melting. I diversi frammenti di rDNA amplificati, sono separati su un gel di acrilamide verticale contenente un gradiente chimico denaturante (generato con urea e formamide) crescente verso il basso (cioè verso la direzione di migrazione dei frammenti). La denaturazione del DNA (cioè la separazione nei due singoli filamenti), è influenzata, sia dal legame idrogeno formato tra paia di basi complementari (le regioni ricche in GC si dissociano a T° più alte rispetto a regioni ricche in AT), sia dalle altre attrazioni tra le basi dei singoli filamenti. Conseguentemente, una molecola di DNA possiede diversi "domini di melting" con temperatura di melting determinata dalle sequenze. Molecole differenti di DNA che differiscono anche solo di un nucleotide avranno differenti temperature di melting. I frammenti di DNA derivanti da specie diverse inizieranno a dissociarsi quindi in punti diversi del gradiente denaturante (cioè del gel) e formeranno un profilo complesso di bande che rispecchia la complessità e la composizione in specie della comunità analizzata. Le bande ottenute dal profilo, detto molecular fingerprinting possono essere successivamente estratte, amplificate nuovamente e sequenziale oppure trasferite su una membrana ed analizzate mediante l'uso di sonde molecolari. La separazione completa dei due strands (che permetterebbe alle molecole di DNA di continuare a migrare) è impedita dalla presenza di un alto dominio di melting, il quale è creato

artificialmente nei primers aggiungendo una "coda" di GC (la "GC clamp"). La DGGE è un metodo rapido, poiché come detto sopra permette l'analisi di un grande numero di campioni, e risulta essere appropriata nello studio delle comunità microbiche poco presenti nell'ambiente; tuttavia non mantiene la diversità quantitativa e quindi appare poco sensibile nel determinare sequenze rare (Mitchell e Zuccaro, 2006). Inoltre, nel caso di comunità molto eterogenee che producono un profilo con molte bande, è difficile interpretare i risultati ed assegnare le bande elettroforetiche a particolari microrganismi (Head *et al.*, 1998).

Questa tecnica si è dimostrata efficace nello studio della variazione delle popolazioni dominanti di batteri isolati dallo stesso tipo di suolo, ma provenienti da specie di piante differenti (Smalla *et al.*, 2001), oppure per valutare la diversità in relazione alle diverse specie vegetali ed alla diversa locazione geografica e tessitura del terreno (Costa *et al.*, 2006) o in relazione a diversi trattamenti del suolo agricolo (Yao *et al.*, 2006), in particolare l'introduzione di bio-inoculi (Roesti *et al.*, 2006).

Nel caso dello studio della diversità delle comunità fungine presenti nel suolo, la DGGE è stata utilizzata per valutare la composizione ed i cambiamenti delle popolazioni di AMF in relazione al suolo nudo ed alla rizosfera del mais (Gomes *et al.*, 2003), al suolo agricolo (Ma *et al.*, 2005), a diversi siti di campionamento (Oros-Sichler *et al.*, 2006).

4.3.2. T-RFLP

La tecnica Terminal- Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) è basata sulla digestione con endonucleasi dei prodotti di PCR (Osborn *et al.*, 2000). Uno o entrambi i primer utilizzati sono legati ad una molecola fluorescente, che permette di rilevare solo la presenza del frammento di restrizione terminale. Come regola generale, una singola specie avrà la stessa dimensione nel frammento terminale, ma alcune specie diverse possono avere frammenti terminali di uguale dimensione. Se la digestione dei prodotti PCR risulta essere incompleta, (cosa abbastanza frequente), si otterranno nel profilo T-RFLP dei picchi addizionali che rappresentano falsi T-RFs e che portano alla sovrastima della complessità della comunità (Egert e Friedrich, 2003). La T-RFLP è una metodologia robusta e riproducibile per la rapida analisi di comunità microbiche in campioni diversi, per lo studio della dinamica della comunità e cambiamenti, ma possiede il limite della

presenza dei “picchi falsi” ed il limite dovuto al fatto che differenti enzimi di restrizione danno risultati diversi.

Anch'essa risulta essere, quindi, una metodologia rapida, sensibile e riproducibile per l'analisi di comunità. E' stata utilizzata con successo per determinare i cambiamenti nella comunità microbica naturalmente presente nel suolo dovuti ad un aumento degli input di azoto e della specie vegetale (Kennedy *et al.*, 2004b), alla presenza di contaminanti ambientali come gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) (Grant *et al.*, 2006; Muckian *et al.*, 2007). Nello studio di Buckley e Schmidt (2001) si è potuto constatare, grazie alla T-RFLP, quanto sia importante l'impatto delle lavorazioni o trattamenti agricoli sulle popolazioni microbiche del terreno. Infatti in questo studio si confrontano le comunità di differenti campioni corrispondenti a 5 siti con una lunga storia agricola alle spalle e che differivano tra loro per coltivazioni e trattamenti con il suolo di un campo mai sottoposto a lavorazioni agricole. Il risultato è che le comunità microbiche dei 5 siti coltivati erano maggiormente simili tra loro, di quanto non lo fossero confrontando ciascuno di questi siti con il campo incolto.

In un altro lavoro si valuta quanto la variazione della comunità micorrizica del suolo sia influenzata maggiormente dalla pianta ospite rispetto all'altro fattore analizzato, l'introduzione di diverse dosi di fosforo, attraverso lo studio dei profili risultanti dalla T-RFLP (King-Salter *et al.*, 2007).

4.3.3. ARISA

L' Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA), rappresenta la versione automatica della RISA ed è una metodologia basata sull'amplificazione mediante PCR dello spaziatore tra i geni 16S e 23S nel genoma batterico e 18S e 28S nel genoma fungino, utilizzando una coppia di primer di cui uno legato ad una molecola fluorescente (Fisher e Triplett, 1999; Ranjard *et al.*, 2001). L'assunzione di questa tecnica è che ad una banda corrisponde un ceppo batterico o fungino nella comunità analizzata; la presenza di più picchi per uno stesso ceppo, dovuta alla variabilità interoperonica dello spaziatore ribosomale, viene bilanciata dalla possibilità di avere ceppi diversi che presentano la stessa dimensione dello spaziatore. La grande variabilità di sequenza dello spaziatore ribosomale rende possibile discriminare tra ceppi anche della stessa specie, semplicemente in base all'eterogeneità di lunghezza del frammento amplificato (Graham *et al.*, 1997; Hain *et al.*, 1997). Questa tecnica risulta quindi estremamente veloce e potente nella

discriminazione di specie e di popolazioni correlate, anche in ambienti complessi quale è la rizosfera. I frammenti amplificati sono processati su un analizzatore genetico mediante elettroforesi capillare con rivelazione laser dei frammenti fluorescenti. Grazie a questa tecnica sono state analizzate le fluttuazioni ed i cambiamenti della comunità microbica e fungina in relazione alle specie vegetali ed all'introduzione di diverse quantità di azoto introdotte (Kennedy *et al.*, 2005 a), alle pratiche agricole (Kennedy *et al.*, 2005b; Bastian *et al.*, 2009), alla diversa composizione del suolo ed alla presenza di metalli pesanti nel suolo (Gleeson *et al.*, 2006; Carson *et al.*, 2007).

5. Metodi bioinformatici per l'interpretazione dei dati

Come già detto, tutte le tecniche di molecular fingerprinting permettono di caratterizzare l'intera popolazione microbica e fungina di comunità complesse e di ottenere dettagliate informazioni sulla loro struttura e diversità. Infatti, i dati ottenuti (tabelle di picchi o profili di bande su gel) possono essere usati nel loro insieme come rappresentativi della struttura della comunità rizosferica, confrontando le comunità dei vari campioni analizzati, mediante l'allineamento delle bande o dei picchi. I profili vengono allineati e, per ogni banda o picco che compare in ogni profilo, viene considerata la sua presenza o assenza in tutti i profili. In questo modo i dati "grezzi" vengono trasformati in tabelle di dati discreti 0-1 che indicano l'assenza o la presenza delle bande o dei picchi in ogni profilo. Queste "tabelle 0-1" possono essere utilizzate per la costruzione di dendrogrammi che rappresentano le relazioni presenti tra i campioni analizzati in termini di similitudine della comunità microbica. Questa operazione è un'analisi statistica chiamata "analisi cluster" basata su algoritmi sviluppati nel campo della bioinformatica appositamente per questo tipo di studi. L'analisi bioinformatica dei dati ottenuti con le tecniche precedentemente descritte, permette di effettuare tutta una serie di approcci statistici (Scallan *et al.*, 2008) per stabilire se diversi ambienti, diversi ammendanti, diversi fattori ambientali e/o sperimentali, selezionano comunità microbiche strutturalmente diverse.

5.1. Tecniche di analisi statistica multivariata

A seguito dell'elettroforesi su gel o dell'elettroforesi automatica capillare, i dati possono essere analizzati da software informatici, in grado di operare molte tra le più comuni analisi statistiche multivariate, usate per visualizzare graficamente le somiglianze e/o le differenze tra le comunità rizosferiche prese in esame. Alcune tra le analisi statistiche multivariate più comunemente usate sono la *Principal Component analysis* (PCA), la non-metric multi-dimensional scaling (MDS) e l'*analysis of similarity* (ANOSIM).

La *Principal Component analysis* (PCA) è già stata largamente applicata a numerosi fenotipici e genotipici (dati ottenuti da tecniche di *molecular fingerprinting*) set di dati

ed una delle più famose multivariate analisi dei dati. Esempi di uso in studi di ecologia microbica sono forniti da Merrill e Halverson (2002), i quali con la PCA hanno valutato i cambiamenti della comunità microbica dovuti alla stagione ed alla zona geografica, oppure quelli dovuti alla colonizzazione di differenti parti della pianta in differenti età della pianta (Mougel *et al.*, 2006). La procedura è basata sul calcolo di nuove sintetiche variabili (*principal components*), che sono le lineari combinazioni delle variabili originali. Lo scopo è rappresentare gli oggetti e le variabili del set di dati in un nuovo sistema di coordinate, in cui sia descritta la massima variabilità; più chiaramente è preservare e rappresentare la relativa posizione degli oggetti e la grandezza della variabilità tra le variabili in uno spazio ridotto. La PCA è molto usata per descrivere variabili che hanno unità o scale di misura diverse o quando lo scopo è di mostrare le correlazioni tra le diverse variabili descrittive. La rappresentazione grafica è generalmente visualizzata come un *biplot*, in cui gli assi corrispondono ad un nuovo sistema di coordinate ed i campioni (punti) e le “variabili” (frecce) sono rappresentati. La direzione delle frecce indica il cambiamento più grande nei dati, mentre la sua lunghezza può essere indicata da una parte di questo cambiamento.

Tuttavia, opportune raccomandazioni e precauzioni sono da tenere in considerazione, se si vuole adottare la PCA. Quest’analisi, infatti, dovrebbe essere usata quando gli oggetti coprono un gradiente molto piccolo, quando le stesse specie sono principalmente riscontrate ubiquitarie nell’area di studio, e quando le specie si comportano linearmente ai gradienti ambientali. Poiché queste condizioni sono spesso non riscontrabili in ecologia microbica, altre analisi sono state progressivamente preferite alla PCA, come la *correspondence analysis* o la *multidimensional scaling* (Ramette, 2007).

Attualmente la metodologia del non-metric multi-dimensional scaling (MDS), inizialmente introdotta da Shepard (1962) e Kruskal (1964), per applicazioni nel campo della psicologia, sta trovando un crescente numero di applicazioni nel campo dell’ecologia microbica. Infatti, numerosi sono i vantaggi dell’ MDS:

- è una metodologia generalmente molto efficiente
- si basa su un concetto molto semplice: ottenere una mappa in cui la distanza tra i punti abbia lo stesso valore della classificazione, basata sulla somiglianza, dei valori tra loro

-utilizza i dati della matrice di somiglianza e, quindi, non lavora sui dati originali. In questo modo si ha libera scelta di definire la similarità della composizione di comunità, considerando qualunque sia l'interpretazione biologica più significativa.

-un secondo vantaggio di lavorare sulla matrice di somiglianza è che è irrilevante il numero complessivo dei dati originali.

-analisi può essere opportunamente applicata in svariate situazioni, poche assunzioni devono essere considerate a proposito della natura e della "qualità" dei dati.

Mentre gli svantaggi sono: 1) il tempo necessario affinché il PC riesca ad elaborare un grafico con un discreto numero di campioni; 2) l'algoritmo alla base è pensato in modo tale da dare importanza alla disposizione di tutti i punti, quindi, a volte può essere opportuno "eliminare manualmente" i punti *outlier* e ripetere il calcolo all'interno del *cluster* (Clarke e Warwick, 2001).

Per le primissime applicazioni nel campo molecolare, l'MDS è stata utilizzata per analizzare e confrontare tra loro la riproducibilità di svariate tecniche di *fingerprinting* come *amplified ribosomal intergenic spacer analysis* (ARISA), *terminal-restriction fragment length polymorphisms* (T-RFLP), e *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE), tra diversi laboratori per campioni con diversi livelli di salinità (Casamayor *et al.*, 2002). Recentemente, l'MDS è stata usata per confrontare la diversità della comunità microbica (ottenuta con la *length heterogeneity-PCR*) di campioni sottoposti a differenti tipologie di gestione dei suoli (Millis *et al.*, 2006).

Diverse analisi statistiche multivariate, come la *nonparametric multivariate ANOVA* (NPANOVA) e l'*analysis of similarity* (ANOSIM), hanno lo scopo di valutare se ci sono delle differenze significative tra i gruppi di campioni. L'ANOSIM, in particolare, è una procedura non parametrica che cerca di rilevare le differenze significative tra 2 o più gruppi, basandosi sulla distanza tra le misure (Clarke, 1993).

L'ANOSIM ha svariate applicazioni in ecologia microbica, come testare l'impatto sulla comunità microbica di diversi luoghi, dei cambiamenti climatici od ambientali. Ad esempio Kent *et al.*, (2007) ha determinato con ANOSIM se le comunità batteriche, campionate nello stesso lago, erano diverse dalle comunità batteriche provenienti da diversi laghi. Un altro esempio di applicazione di ANOSIM è dato dal lavoro di Nelson e Mele (2007), dove, partendo dai dati ottenuti con la T-RFLP, valuta l'impatto di sostanze quali Boro ed Cloruro di Sodio nella struttura della comunità rizobatterica del grano

PARTE SPERIMENTALE

6. Scopo della tesi e strategia sperimentale

Il lavoro sperimentale era inteso a capire le potenzialità dei microrganismi benefici del suolo, denominati “probiotici per le piante” (PPM, dall’inglese Plant-Probiotic Microorganism) (Haas e Keel, 2003) nel tamponare la riduzione degli *input* di fertilizzanti. Attraverso lo studio delle comunità microbiche rizosferiche, con metodi microscopici, molecolari e statistici (Bosco *et al.*, 2007b; Baruffa *et al.*, 2008) si è cercato di individuare le migliori combinazioni di input (PPM e compost) sulla produzione, sulla qualità delle bacche e sulla colonizzazione da parte dei funghi micorrizici arbuscolari nella coltura col metodo biologico del pomodoro da industria. Per conseguire questo obiettivo è stato allestito un esperimento in pieno campo dalle seguenti caratteristiche:

- durata 3 anni: ristoppio di pomodoro;
- disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati;
- introduzione nel suolo dell’inoculo probiotico, variante sperimentale del prodotto commerciale MICOSAT F prodotto da Centro Colture Sperimentali di Aosta, per il primo anno di sperimentazione; introduzione nel substrato di torba, al momento della semina delle piantine nel vivaio, dell’inoculo probiotico per il secondo anno;
- introduzione nel suolo del prebiotico, costituito dall’ammendante compostato verde, prodotto da Nuova Geovis S. P. A., per tutti i 3 anni di sperimentazione.

Un secondo obiettivo di ricerca è stato l’individuazione dei migliori effetti benefici sulla produzione, sulla qualità e, soprattutto, sulla colonizzazione da parte dei funghi micorrizici arbuscolari in diverse *cultivar* di pomodoro, in 2 diverse località sperimentali. Una di queste varietà era a sua volta suddivisa in tre diversi genotipi mutagenizzati (3 linee), provenienti da Metapontum Agrobios s. r. l. In questo caso si è voluto valutare se piccole variazioni nel genotipo della pianta riuscissero ad influenzare la dinamica delle comunità probiotiche, come era stato precedentemente dimostrato per l’eterosi nel mais (Picard *et al.*, 2008).

Ciò è stato possibile confrontando:

- la colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari in 2 diverse *cultivar* (Rio Grande, Red Setter) ed in 2 diversi siti sperimentali e delle 3 linee di pomodoro (linea 9, linea 7 e linea 5);

- la resa produttiva e la qualità della bacche di 2 *cultivar* diverse e delle 3 linee di pomodoro in due diverse siti sperimentali.

La strategia scelta per il raggiungimento degli scopi prevedeva:

1. il campionamento ogni anno delle radici, della bacche e la misura di altri parametri ritenuti interessanti (sviluppo della biomassa, qualità);
2. l'elaborazione e l'analisi statistica dei dati ottenuti con queste misurazioni di campo;
3. lo studio con metodi molecolari, tecniche basate sull'amplificazione polimerasica a catena (PCR) e sullo studio del polimorfismo genetico dei profili di elettroforesi capillare ottenuti dall'ARISA, della struttura della composizione e della dinamica delle popolazioni fungine della rizosfera.

7. Materiali e metodi

7.1. Sperimentazioni in pieno campo

7.1.1. Locazione geografica

La maggior parte delle prove sperimentali in pieno campo dei 3 anni di progetto si è svolta presso l'azienda agricola "Carioncella", un'azienda agricola biologica certificata dall'Istituto per la Certificazione Etica e Ambientale (I. C. E. A.) dal 1992. L'azienda agricola Carioncella è situata a Bondeno, in provincia di Ferrara. Il terreno, tipicamente caratteristico della zona della bassa pianura Padana, è di natura argillosa (Tabella 2),. Questo suolo, avendo particelle e pori di piccole dimensioni, è caratterizzato da scarsa aerazione, difficile drenaggio e, quindi è opportuno curare le lavorazioni (aratura profonda, lavori di preparazione prima della semina o trapianto, distribuzione delle unità azotate, in più interventi) e la sistemazione idraulica in modo da evitare ristagni d'acqua. Allo stesso tempo è fertile, ricco di sostanza organica ed è in grado di trattenere una maggiore quantità di acqua e nutrienti, rispetto ad un terreno di tipo sabbioso. Il pH e la conducibilità elettrica (Tabella 2) sono idonei sia alla coltivazione del pomodoro, sia all'attività microbica che contribuisce a rendere disponibili l'azoto, il fosforo e lo zolfo nel suolo. A partire dal secondo anno di sperimentazione si è introdotta una seconda *location* sperimentale, situata a Metaponto (MT) per testare in parallelo le stesse varietà per gli stessi parametri, ma in due suoli, condizioni climatiche-ambientali e gestione differenti. L'idea e la realizzazione di questa prova in parallelo è stata possibile grazie alla collaborazione del centro sperimentale Metapontum Agrobios s. r. l. ed, infatti la prova in pieno campo è stata effettuata nei loro campi sperimentali. Alcune tra le principali caratteristiche chimico-fisiche del terreno di Metaponto su cui sono state effettuate le prove sono schematizzate nella Tabella 2. Si tratta di un terreno fertile di tipo argilloso-limoso, con lievi differenze fra lo strato superficiale e quello più profondo. Rispetto al suolo di Bondeno, quello di Metaponto, avendo una maggiore concentrazione di limo, ha una minore capacità d'infiltrazione e di percolazione, una minore disponibilità di nutrienti e di acqua, ma una maggiore capacità di scambio cationico.

Tabella 2. Caratteristiche chimico-fisiche del terreno di Bondeno (Az. Carioncella) e di Metaponto (Metapontum Agrobios s.r.l.).

Analisi	Parametro	Az.Carioncella	Metaponto Agrobios s.r.l.
Meccanica	argilla	43%	44%
	limo	30%	50%
	sabbia	27%	6%
	tessitura	argilloso	argilloso-limoso
Chimica	pH (u di ph)	7.4 (debolmente alcalino)	8.1 (moderatamente alcalino)
	conducibilità (mScm ⁻¹)	0.50	0.59

7.1.2. Trapianto, materiale vegetale, introduzione fertilizzanti probiotici

In tutti e tre gli anni di sperimentazioni in pieno campo, dipendentemente dalla stagione climatica le piantine di ogni prova sperimentale saggiata sono state prelevate dal vivaio e trapiantate manualmente dopo circa 40-45 giorni di età.

In campo tutte le piante di pomodoro sono state trapiantate ad una distanza di circa 25 centimetri l'una dall'altra, per quanto riguarda le piante adiacenti all'interno della stessa fila, mentre ad una distanza di circa un metro e 40 centimetri, per quanto riguarda le piante tra le diverse file.

Nel corso dei 3 anni di sperimentazioni in pieno campo ed in cella fitoclimatica sono state soggetto delle prove diverse *cultivar* di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) tra cui:

- varietà Rio Grande, una varietà di pomodoro da industria, già coltivata e consigliata dall'agricoltore per la buona resa. La cultivar Rio Grande è caratterizzata da una pianta vigorosa di enorme produttività, frutti con peso medio di circa 90-100 g di forma allungata e buccia consistente, polpa soda di colore intenso. L'utilizzo ideale è la trasformazione in pomodoro pelati e concentrato.
- varietà Gordon, una varietà di pomodoro da mensa, già coltivata e consigliata dall'agricoltore. La pianta ha crescita determinata, caratterizzata da una buona copertura e buon vigore vegetativo. I frutti, di forma tondo-globosa, sono molto consistenti ed in grado di conservarsi a lungo in post raccolta. Le bacche sono di pezzatura molto regolare ed il peso medio è di circa 180 g.
- varietà Red Setter, una varietà di pomodoro da industria caratterizzata da una pianta di media copertura, compatta e mediamente produttiva. I frutti hanno forma squadrata e sono di pezzatura media con peso medio di circa 70 g,

ideale per pelati e polpa. Appartengono a questa *cultivar* i genotipi di pomodoro della prova sperimentale 3 linee prioritarie Metaponto. Questi genotipi provengono da una collezione di mutanti di pomodoro prodotti presso la Metapontum Agrobios, nell'ambito di un progetto che ha come obiettivo l'applicazione della tecnologia del TILLING (McCallum *et al.*, 2000; Gilchrist e Haughn, 2005) in pomodoro. Per gli esperimenti di mutagenesi è stato utilizzato l'agente chimico Etil Metan Sulfonato (EMS) che induce nel DNA mutazioni puntiformi (precisamente transizioni da G/C ad A/T). Le piantine M1 generate da ciascun seme mutagenizzato sono state trapiantate in pieno campo o in serra e da ciascuna di esse è stato raccolto il seme M2 (anno 2004). Durante la fenotipizzazione delle piante M2 (anno 2005) è risultato che alcune di esse si sono rivelate altamente produttive; infatti la produzione della Red Setter si aggira intorno 2.5-3 kg di frutti per pianta, mentre nei genotipi mutati selezionati è stata osservata una produzione di bacche di circa 4.5-5 kg per pianta. Per verificare il carattere "altamente produttivo", alcune piante (linee) M3 (progenie delle piante M2) sono state coltivate in pieno campo e confrontate con il genotipo non mutagenizzato Red Setter (anno 2006). Tre tra queste linee mutagenizzate, risultate significative sia per quanto riguarda la produttività delle piante, sia per la popolazione microbica del suolo (Picard *et al.*, 2007), sono state scelte per continuare la sperimentazione in campo (anno 2007 e 2008). Queste linee, denominate 3 linee prioritarie, sono la linea 9, la linea 5 e linea 7.

Nel 2006, 2007 e 2008 l'introduzione nel suolo del compost, o meglio ammendante compostato verde (ACV), così come è denominato a livello commerciale legislativo, è stato aggiunto nel suolo poco prima del trapianto. Il compost verde certificato dal Consorzio Italiano Compostatori (C. I. C.), messo in commercio da Nuova Geovis S. P. A., è costituito al 1.87% da fonti di Azoto e dal 30% da fonti di Carbonio. Questo ammendante è stato introdotto nel suolo, per la prova sperimentale Rio Grande e Gordon secondo il disegno sperimentale, in tre diverse dosi: zero, assenza di compost; 5.5 tonnellate per ettaro e 11 tonnellate per ettaro che espresse in concentrazione di azoto sono rispettivamente zero, 100 chilogrammi per ettaro e 200 chilogrammi per ettaro.

L'inoculo introdotto nel suolo è una variante sperimentale¹ del prodotto MICOSAT F, prodotta del Centro Colture Sperimentali (Ccs) di Aosta. MICOSAT F è un consorzio

di microrganismi, batteri e funghi, brevettato a livello internazionale ed utilizzato, soprattutto, nel campo dell'orticoltura e del vivaismo per la sua azione di biocontrollo contro svariati patogeni tra cui *Pythium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Agrobacterium*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus* (Figura 5). Questo consorzio di microrganismi probiotici per le piante contiene nello specifico:

- Funghi micorrizici arbuscolari (AMF) tra cui *Glomus mosseae* GP11, *G. viscosum* GC41, *G. intraradices* GB67;
- Batteri promotori dello sviluppo vegetale (PGPR) tra cui *Pseudomonas* sp. PN 01, *P. fluorescens* PA28, *Bacillus subtilis* BA41, *Streptomyces* sp. SB14;
- Funghi antagonisti saprofiti (AF) del suolo come *Trichoderma viride* TH03;
- Tre ceppi di batteri fissatori liberi di azoto provenienti dalla collezione BUSCoB¹.

L'aggiunta del suddetto inoculo è avvenuta con modalità e dosaggi differenti a seconda dell'anno e delle ipotesi sperimentali da verificare.

Nel primo anno di sperimentazioni in campo (2006) l'introduzione dell'inoculo è avvenuta in contemporanea con quella del compost verde (attraverso l'applicazione manuale al momento della fase pre trapianto) e, secondo il disegno sperimentale, è stato introdotto in tre diversi dosaggi: zero, assenza dell'inoculo, 40 chilogrammi per ettaro e 80 chilogrammi per ettaro.

Nel 2007, invece, l'inoculo è stato introdotto al momento della semina delle piantine di pomodoro nel vivaio, mischiandolo al substrato di torba per confermare ciò trovato da Al-karaki (2006) e cioè una maggiore colonizzazione e, quindi, maggiore vigore vegetativo delle piante, se l'aggiunta dell'inoculo avviene in un momento precedente al trapianto. In questo anno l'ammendante microbico è stato introdotto in due dosaggi: assenza o 15 gl⁻¹, pari a 0.84 g per pianta.

Nel 2008 non è stato introdotto alcun dosaggio d'inoculo per testare l'effetto di permanenza ed attività nel tempo di questo "fertilizzante speciale".

¹ l'introduzione di questi microrganismi è la variante sperimentale del prodotto in commercio, saggiata in questo progetto.

MICOSAT F AT WP
 PRODOTTO AD AZIONE SPECIFICA ad azione sul suolo
 INOCULO DI FUNGHI MICORRIZICI

Caratteristiche: l'associazione sinergica di micelio e spore di funghi micorrizici, funghi apicili e batteri della rizosfera agiscono armonicamente, associati alle radici, offrono vantaggi e benefici quali:
 - Aumento della superficie esplorata delle radici della pianta per effetto della micorizzazione.
 - Incremento della micorizzazione delle radici per effetto dei micorizzanti inoculati e della loro capacità nell'ambiente di nuovo lavoro.
 - Induttore di resistenza verso *Pestalotia*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Lasium*, *Anthracis*, *Fusarium* del tessuto *Phytophthora*, *Verticillium*, *Agrobacterium*, *hansenii*, *Motaxillagae* spp. e *nonovidi* *Ilari* (*Phytophthora* spp.).
 Formulazione: polvere bagnabile a supporto inerte.

Campo di azione: Induttore di resistenza verso *Fusarium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Lasium*, *Anthracis*, *Fusarium*, *Motaxillagae* e *Phytophthora* (*Phytophthora* spp.).
 Se le sementi s'innestano prima che accenga l'azione radicale (fruttiera solida), la pianta presenta maggiore resistenza verso la malattia.
Avvertenze: Il prodotto non contiene OGM (organismi geneticamente modificati) ed organismi patogeni quali salmonelli, coliformi fecali, mesofili aerobi e uova di nematodi.
 Nessuna precauzione è richiesta per l'uso del prodotto.
 Se consiglia di non usare il Micosat F AT WP in abbinamento a prodotti nematici.

DOSE E MODALITÀ DI EMPREGIO

CULTURE	Applicazione al suolo		Applicazione fogliare (dopo per trattamento)		
	il campo	in serra	in campo	in serra	in serra
FRUTTIFERA	5-10 kg/ha		1-1,5 kg/ha		in pieno campo dopo il trattamento ogni 8-12 gg 1 litro alle cime
VITE	5-10 kg/ha		0,5-1 kg/ha		in pieno campo dopo il trattamento ogni 8-12 gg 1 litro alle cime
CITRULLI di foglia e di frutto	3-5 kg/ha	3-5 kg/ha	1-1,5 kg/ha	5-5 kg/ha	in serra dopo il trattamento il 5-8 gg scorso il c.v. o de a seta
INDUSTRIALI	2-3 kg/ha	2-3 kg/ha	2-3 kg/ha	2-3 kg/ha	
ACQUEDUCI	5-10 kg/ha		2-3 kg/ha		
FRACIDA	3-5 kg/ha	3-5 kg/ha	1-1,5 kg/ha	2-3 kg/ha	
PIAZZA	3-5 kg/ha		1-1,5 kg/ha		

Senza aggravi con cura e fondo sterco di bovino. Non disperdere il contenuto nell'ambiente. In caso versare il tutto.

La vendita dell'inoculo degli azotoxidanti nei prodotti agricoli è stata vietata in collaborazione con il CNR di Pisa - Istituto di Fisiologia Clinica

ISCRIZIONE ALLA C.C.L.A.A. Aosta 07
 Registro Fungicidi Fertilizzanti n. 3036
 Data e numero di registrazione M.L.P.A. n. 1 (Legge 24/6)
 N° prov. 0706 - Decreto 3 novembre 2001
 pubblicato in G.U. n. 295 del 17 dicembre 2004
 Decreto legislativo 29 aprile 2000, n. 127
 Revisione della disciplina in materia di fertilizzanti
 Regolamento SANCO DnG 6021-09
 rev 27 del 22/03/2003
 Decreto Interministeriale
 1. 2006 "Uso di consociati microbiologici della rizosfera per ottimizzazione di nutrienti da prodotti agricoli e diminuzione delle micotossine e dei fitoni da prodotti agricoli ed incremento di anti-ossidanti in prodotti agricoli."
 N° PCU: EP2006/04186
 I.P.C.S.I. S.V.C. n. 5000306
 2. 2006 "Processo di benefici dei semi"
 N° PCU: EP2006/00047
 DEPOSITATO 07/09/2006.

CCS ADSTIA S.r.l.
 Fabbriano: C.C.S. Aosta s.r.l.
 Frazione Olneyes, 9 - 11100 Quart (AO)
 Tel. 0165/765146 - Fax 0165/755774
 ccs@ccsipa.com
 www.micosat.it

Peso netto 1000g

COMPOSIZIONE inoculo misto di:

Funghi simbiotici
 Ingredienti biologici attivi (crude inoculanti) 20%, capaci di punte (formanti colonie su radici dell'ospite in percentuale minima del 50% di radici micorrizzate e tritate, contenente spore e miceli) di funghi simbiotici dei generi:
 - *Glomus coronatum* CO 01
 - *Glomus californicum* GM 24
 - *Glomus coronatum* CU 33

Micoflora della rizosfera
 Ingredienti biologici attivi 15% e in misura di 5×10^8 C.F.U./g dei generi:
Batteri della rizosfera
Pseudomonas
 - *Pseudomonas* spp. SN 02
 - *Pseudomonas borealis* PA 37
Pseudomonas spp. PM 46
Streptomyces
 - *Streptomyces* spp. SB 19
Funghi saprofiti
 - *Trichoderma*
 - *Trichoderma harzianum* TH 02

Supporti inerti q.b. a 100

Figura 5. Presentazione commerciale del prodotto MICOSAT F.

7.1.3. Prova e disegno sperimentale Prova Rio Grande

7.1.3.1. 2006

Nel primo anno di sperimentazioni in pieno campo della varietà Rio Grande è stata allestita una prova con un disegno a 4 blocchi completamente randomizzati. Ogni blocco era costituito da 3 main plots, i 3 differenti dosaggi di compost descritti sopra. A loro volta ognuno di questi main plot è stato suddiviso in 3 sub plots, i 3 differenti dosaggi d'inoculo descritti sopra. Riassumendo: ogni blocco era costituito da 9 trattamenti o parcelle sperimentali, dati dalle differenti combinazioni dei 3 dosaggi di compost per i 3 dosaggi d'inoculo. Per ogni trattamento sono state trapiantate circa 20 piante di pomodoro varietà Rio Grande.

7.1.3.2. 2007

Nel secondo anno della prova sperimentale Rio Grande, il disegno sperimentale (così come le modalità ed i dosaggi dell'introduzione degli ammendanti) è stato leggermente modificato. Ciò che è rimasto invariato rispetto all'anno precedente è l'introduzione nelle stesse parcelle sperimentali degli stessi quantitativi di compost. A differenza della prova condotta nel 2006 sono:

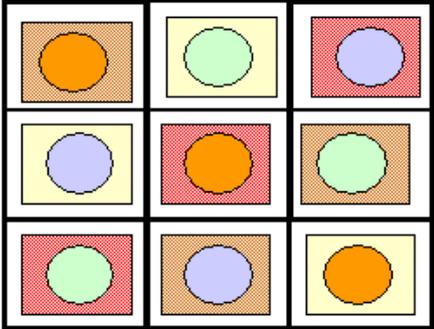
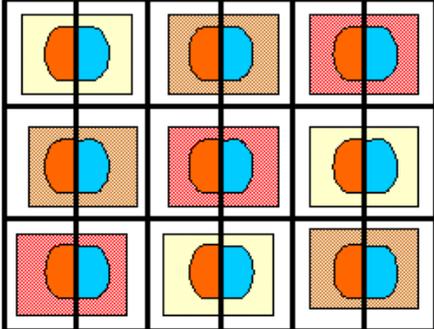
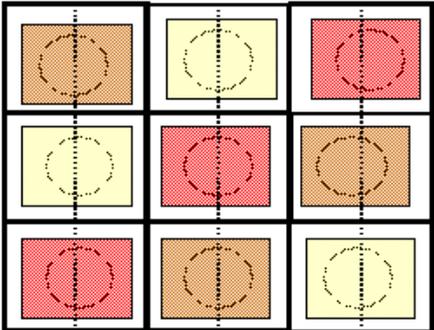
- i blocchi sperimentali (completamente randomizzati) sono 3 anziché 4;
- l'inoculo come detto sopra è stato introdotto nel vivaio ed in 2 dosaggi, anziché aggiungerlo nel suolo ed in 3 dosaggi;
- ogni parcella sperimentale del 2006, nel 2007 è stata suddivisa in 2 sottoparcelle costituite ciascuna da circa 10 piantine di pomodoro inoculate o

non inoculate con il consorzio microbico. Per un totale di 18 trattamenti sperimentali anziché 9.

7.1.3.3. 2008

Nel terzo è stata allestita una prova sperimentale a 4 blocchi completamente randomizzati. In analogia con la prova Rio Grande dei 2 precedenti anni, ogni blocco era costituito da 3 main plots, i 3 differenti dosaggi di compost. Inoltre, il compost è stato introdotto nel suolo nelle stesse parcelle sperimentali e negli stessi quantitativi dei 2 anni precedenti. Come detto già sopra in quest'ultimo anno di sperimentazione non è stato introdotto alcun dosaggio d'inoculo per testare e valutare l'effetto continuativo di permanenza ed attività delle popolazioni microbiche introdotte nel 2006 e nel 2007.

DISEGNI SPERIMENTALI PROVA RIO GRANDE

Anno	Legenda Inoculo	Disegno Sperimentale (1 blocco)
2006	<p>Inoculo (sub plots):</p> <ul style="list-style-type: none"> assenza inoculo inoculo dose 1: 40 Kg ha⁻¹ inoculo dose 2: 80 Kg ha⁻¹ 	<p>20 piante</p>  <p style="text-align: center;">No. Tot BLOCCHI= 4</p>
2007	<p>Inoculo vivaio (sub plots):</p> <ul style="list-style-type: none"> assenza inoculo inoculo dose 1 vivaio: 15 g l⁻¹ 	<p>10 piante</p>  <p style="text-align: center;">No. Tot BLOCCHI= 3</p>
2008	<p>Nessun inoculo:</p> <ul style="list-style-type: none"> dosaggi inoculo anni precedenti 	<p>20 piante</p>  <p style="text-align: center;">No. Tot BLOCCHI= 4</p>

Per tutti e 3 gli anni **COMPOST** (Main plots):

assenza compost
 compost dose 1: 100 kg ha⁻¹
 compost dose 2: 200 kg ha⁻¹

7.1.4. Prove e disegni sperimentali Varietà

7.1.4.1. Gordon 2006

Nel 2006 accanto alla prova sperimentale principale, la prova Rio Grande, è stata condotta una seconda prova con la varietà Gordon. Essendo questa una prova “satellite”, allestita, soprattutto per valutare un’eventuale differenza di colonizzazione da parte dei funghi micorrizici arbuscolari, in 2 diverse varietà di pomodoro, era costituita soltanto da un blocco sperimentale. Quest’unico blocco è stato suddiviso, come per la prova Rio Grande 2006 in 3 main plots, i 3 differenti dosaggi di compost. A loro volta ognuno di questi main plot è stato ripartito in 3 sub plots, i 3 differenti dosaggi d’inoculo (gli stessi della prova Rio Grande 2006). Per un totale di 9 trattamenti o parcelle sperimentali, dove ogni parcella era costituita da circa 20 piante di pomodoro varietà Gordon.

7.1.4.2. 3 Linee prioritarie 2007 e 2008

Bondeno

Nel 2007 nella locazione sperimentale di Bondeno è stata allestita la prova sperimentale tre linee prioritarie. Questa prova sperimentale era costituita da un solo blocco sperimentale suddiviso in 3 main plots, le tre differenti linee. A loro volta ogni main plot era suddiviso in 2 sub plots, piante inoculate o non inoculate nel vivaio. Per un totale di 6 parcelle sperimentali, costituite ciascuna da circa 10 piante di pomodoro.

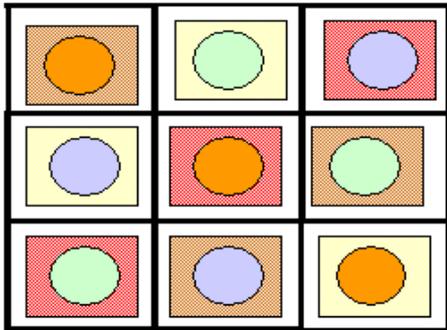
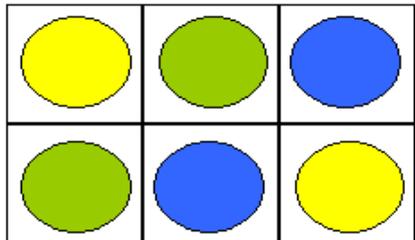
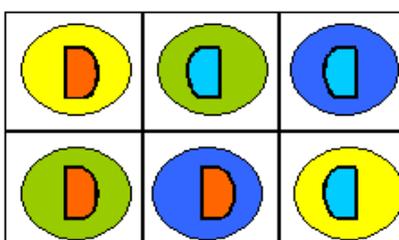
Nel 2008, visto i risultati interessanti ottenuti nel 2007, questa prova ha mantenuto lo stesso numero e tipologia di trattamenti, ma è stato aumentato il numero dei blocchi da uno a quattro, per avere un maggiore numero di repliche. Ne è risultato uno schema sperimentale a 4 blocchi completamente randomizzato, dove ogni blocco è costituito da 6 parcelle di 20 piante di pomodoro ciascuna.

Metaponto

Negli stessi 2 anni, 2007 e 2008, la stessa prova 3 linee prioritarie è stata allestita in parallelo in un'altra località, a Metaponto. Nel 2007 il disegno sperimentale era costituito da 3 main plots, corrispondenti alle 3 linee, completamente randomizzati in tre blocchi sperimentali.

Nel 2008 questa prova ha mantenuto lo stesso numero e tipologia di trattamenti_(3 main plots=3 linee, ripetute in 3 blocchi sperimentali).

DISEGNI SPERIMENTALI PROVE VARIETA'

Anno Varietà <u>Location</u>	Legenda	Disegno Sperimentale <small>(1 blocco)</small>
2006 Gordon <u>Bondeno</u>	Inoculo (sub plots):  assenza inoculo  inoculo dose 1: 40 Kg ha ⁻¹  inoculo dose 2: 80 Kg ha ⁻¹ Compost (main plots):  assenza compost  compost dose 1: 100 kg ha ⁻¹  compost dose 2: 200 kg ha ⁻¹	20 piante  No. Tot BLOCCHI= 1
2007,2008 3 linee <u>Metaponto</u>	Linee:  linea 9  linea 7  linea 5	 No. Tot BLOCCHI= 3
2007,2008 3 linee <u>Bondeno</u>	Linee:  linea 9  linea 7  linea 5 Inoculo vivaio (sub plots):  assenza inoculo  inoculo dose 1 vivaio: 15 g l ⁻¹	 No. Tot BLOCCHI= 1

7.2. Campionamento e parametri misurati (prove in pieno campo)

7.2.1. Campionamento produzione

In tutti e tre gli anni per la prova Rio Grande, così come nel 2006 per la prova Gordon e nel 2008 per la prova 3 linee prioritarie è stata valutata la produzione delle piante di pomodoro.

La raccolta è stata effettuata manualmente in più riprese (circa 4 date di campionamento) nel periodo compreso tra la 12esima e la 17esima settimana dopo il trapianto, essendo, soprattutto la varietà Rio Grande e Gordon, una varietà con produzione scalare. Ad ogni data di campionamento, è stata raccolta tutta la produzione (vendibile e scarto) di ogni parcella sperimentale. In un primo momento è stata pesata la produzione totale per parcella, quindi la produzione vendibile più la quota di scarto, poi immediatamente dopo è stata tolta la quota di scarto (accuratamente raccolta in un sacco) per pesare solo la produzione vendibile. Nell'ultima data di raccolta sono state inoltre contate il numero di piante sane e, quindi produttive, per parcella sperimentale per ricavare la produzione (totale, vendibile ed il rapporto tra vendibile e totale) per pianta. Infatti, sia il campionamento delle radici che le naturali avversità, come l'insorgere di malattie o l'estreme condizioni climatiche, probabilmente possono avere influito sul numero di piante produttive per parcella. Calcolando, in questo modo, la produzione per pianta si è cercato di mitigare la quota di variabilità di produzione della parcella, dovuta al fatto di avere più o meno piante sane.

7.2.2. Disease Index (D.I.)

Nell'ultimo anno di sperimentazioni in campo, poichè le avverse condizioni climatiche avevano favorito la diffusione del patogeno *Phytophthora infestans* (diagnosi effettuata dall'agricoltore), è stato ritenuto interessante valutare l'incidenza e la severità dell'infezione a scapito della produzione di bacche di pomodoro. E' stato scelto il metodo di Liu *et al.* (1995), poichè è un metodo rapido, ma allo stesso tempo riesce a dare all'operatore un'idea chiara della diffusione, e, quindi dei danni, apportati dall'agente patogeno. In pratica, nell'ultima data di campionamento della produzione, come detto già sopra sono state contate le piante sane e le piante malate per parcella. Le piante malate sono state suddivise in 4 classi (non 5 come in

realtà prevedeva il metodo originale, ma in questo lavoro non sono state distinte le piante soggette ad un disseccamento totale da quelle morte), in base al grado di severità delle sintomatologie tipiche del patogeno che avevano colpito la parte aerea (fusto e foglie). Le suddette classi sono:

- Classe 0: piante sane o per lo meno con sintomi non visibili;
- Classe 1: piante poco colpita dal patogeno, di cui le sintomatologie sono evidenti su circa il 5-30% della parte aerea;
- Classe 2: pianta colpita dal patogeno, di cui le sintomatologie sono visibili su circa la metà (30-50%) della copertura fogliare e sul fusto;
- Classe 3: pianta gravemente affetta dall'infezione, di cui le sintomatologie sono evidenti su circa il 50-75% della parte aerea;
- Classe 4: pianta completamente affetta dall'infezione del patogeno sia sulla copertura fogliare sia sui fusti, in maniera tale che la produzione risulta inesistente.

Dopo aver stimato il numero di piante per classi, si calcola il Disease Index secondo la seguente formula (Liu *et al.*, 1995):

$$D.I. = \frac{1 * n_1 + 2 * n_2 + 3 * n_3 + 4 * n_4}{4 * N} * 100$$

dove n_1 , n_2 , n_3 , n_4 rappresentano il numero di piante appartenenti alle classi 1, 2, 3, 4,. N è il numero totale di piante (sane + malate) considerate.

7.2.3. Campionamento sviluppo della biomassa

Nel primo anno di sperimentazione in pieno campo (2006) è stata misurato lo sviluppo della biomassa in tre diverse date, per cv Rio Grande ed in 2 date per la varietà Gordon, corrispondenti a tre diversi stadi vegetativi della pianta. A questo scopo si è deciso di procedere con un'indagine fotografica per valutare la crescita delle piantine di pomodoro di entrambe le varietà; infatti dalle foto ottenute sarà possibile confrontare tra loro le piante delle diverse tesi sperimentali per quanto riguarda la dimensione ed estensione della parte vegetativa aerea in tutte le sue parti: ramificazioni del fusto, foglie, fiori e frutti. Per ottenere delle foto facilmente confrontabili, è stato necessario munirsi di fogli in formato A3, su cui erano stati precedentemente disegnate 1 o 2 righe con tacche ogni 5 centimetri, di cartellini numerati e di tasche plastificate trasparenti adesive per inserire i suddetti cartellini. In campo sono state fotografate almeno 3 piante, scelte casualmente, per ciascuna

parcella, appartenente ai diversi blocchi. Al momento delle foto, sono stati posizionati a terra i fogli A3 perpendicolarmente rispetto alla direzione della fila. Collocati i fogli, è stato inserito il cartellino numerato nella tasca trasparente adesiva, precedentemente incollata al foglio di destra o di sinistra in base alla posizione dell'ombra solare. A questo punto, mettendosi sopra alla pianta in modo da inquadrare tutta la pianta, il cartellino e la riga centimetrata, è stata scattata la foto. Dalla foto si è risalito alla misura dello sviluppo della biomassa, espresso come proiezione su un piano superficiale (in centimetri) della parte aerea della pianta.

7.2.4. Campionamento rizosfere

Tutti e tre gli anni, per tutte le prove sperimentali in pieno campo, è stata effettuato il campionamento delle radici di pomodoro in due date a stagione produttiva, corrispondenti a due diversi stadi fenologici della pianta: la pianta in fiore e la pianta all'inizio della fase di fruttificazione. L'attrezzo utilizzato per sradicare (ma senza danneggiare le radici) e sollevare l'apparato radicale è il cavabietole, un utensile agricolo dotato di due denti ricurvi all'estremità. Con lo scavabietole, prima si procedeva incidendo il terreno tutto intorno alla pianta, delimitando un'aera circolare del raggio di circa 30 centimetri (zona di probabile estensione delle radici). Poi lavorando, meglio a due (uno di fronte all'altro), e facendo leva, è stata sollevata la zolla contenente tutto l'apparato radicale (Figura 6). A causa della tessitura del terreno, composto in maggioranza d'argilla, il prelievo è risultato essere laborioso e faticoso.

L'intero apparato radicale è stato distribuito uniformemente in 2 tubi tipo Falcon da 50 ml ed immerso in alcool denaturato. I campioni radicali, stoccati in questo modo, sono stati conservati a temperatura ambiente fino alle successive lavorazioni: la colorazione differenziale del tessuto fungino e l'estrazione del DNA metagenomico.



Figura 6. Foto campionamento produzione e rizosfere.

7.2.5. Campionamento per analisi di qualità

Negli ultimi 2 anni di sperimentazioni in campo (2007 e 2008) per la varietà Rio Grande e per la prova 3 linee prioritarie è stata valutata la qualità della produzione. Nell'ultima o penultima data di raccolta della produzione, una campione rappresentativo della produzione vendibile per parcella, corrispondente a 20 bacche o 2 chilogrammi di peso è stata separata e sottoposta alle analisi di qualità. La valutazione della qualità è stata effettuata presso il centro Metapontum Agrobios s.r.l. La qualità dei frutti è stata saggiata considerando i seguenti parametri:

Caratteristiche carpometriche	1. peso medio della bacca (g)
	2. diametro polare o longitudinale (cm)
	3. diametro equatoriale o trasversale (cm)

	4. consistenza, misurata con un penetrometro (Forge Gauge, Lutron FG-5000-A) usando un puntale da (6 mm di diametro)
Caratteristiche organolettiche	1. contenuto solidi solubili misurato in gradi Brix, misurato usando il rifrattometro Atago PR1 (Brix range 0-32% a 20 °C) 2. pH, misurato con lo strumento Metrohm Model 654 pH-meter 3. acidità titolabile, misurata in mEq di acido citrico per 100 g (mEq 100g ⁻¹) 4. conducibilità elettrica ² , misurata con lo strumento Metrohm 660 Conductometer (mS cm ⁻¹)

7.3. Metodi microscopici per la rilevazione e quantificazione dell'infezione micorrizica nei campioni radicali

Per quanto riguarda i funghi micorrizici arbuscolari (AMF), si è deciso di procedere con i metodi classici, quale la colorazione differenziale del fungo nel tessuto vegetale e l'osservazione e la quantificazione microscopica. Infatti, solo questi metodi permettono di visualizzare e riconoscere le strutture chiave di questo gruppo: le ife non settate, le vescicole e, soprattutto, gli arbuscoli (Brundrett, 2004). Dall'indagine bibliografica condotta sui metodi microscopici per quantificare la colonizzazione delle AMF, i più diffusi ed adottati, anche accoppiati a successivi screening molecolari, sono: "The gridline intersect method" (Giovannetti e Mosse, 1980); il metodo di Trouvelot *et al.*, 1986; e "The magnified intersect technique" (McGonigle *et al.*, 1990). I primi 2 metodi citati danno come risultato una stima della colonizzazione complessiva del campione radicale, cioè non distinguendo tra di loro le diverse strutture (arbuscoli, ife e vescicole), ma andando a valutare globalmente in percentuale la loro presenza e la loro abbondanza. Il metodo di McGonigle, invece, quantifica separatamente la presenza ed il numero delle tre diverse strutture. Poiché le 2 tipologie di quantificazioni sono diverse: i metodi di Giovannetti e Mosse e

² Sono nel 2008

Trouvelot sono, in un certo senso stime qualitative e soggettive dell'infezione ed, invece, il metodo di McGonigle è una quantificazione più oggettiva e precisa, la colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari di tutti i campioni radicali è stata saggiata, sia con il metodo di Trouvelot *et al.*, 1986, sia con il metodo di McGonigle *et al.*, 1990.

7.3.1. Preparazione dei campioni radicali

Come già detto sopra, si è deciso di procedere con la colorazione e l'osservazione microscopica per determinare la presenza e la quantità di funghi micorrizici arbuscolari nelle radici delle piante di pomodoro. Fra tutti i metodi di chiarificazione e di colorazione differenziale del micelio nel tessuto vegetale (distruttivi, non distruttivi; vitali, non vitali) (Vierheilig *et al.*, 2005), è stato deciso di adottare per la chiarificazione una soluzione di idrossido di potassio al 10% e per la colorazione una soluzione di acido acetico 5% e di inchiostro 5%, secondo il protocollo descritto da Vierheilig *et al.*, 1998. Questo è un metodo poco costoso, non tossico, ma allo stesso tempo dà degli eccellenti risultati. L'unico accorgimento da adottare per ottenere una buona qualità della colorazione differenziale del campione, è scegliere un buon inchiostro, preferibilmente nero o blu. Nel nostro caso è stato scelto l'inchiostro "Shaeffer Jet Black" come suggerito da Vierheilig *et al.*, 2005. Comunque, è stato necessario mettere a punto un protocollo specifico per le radici delle piante di pomodoro, poiché il tempo necessario per la fase di chiarificazione varia molto a seconda della specie vegetale (Vierheilig *et al.*, 2005).

Sui vari prelievi delle radici delle piante in cella nel primo anno (2006) sono state fatte alcune prove variando:

- 1) il volume della soluzione di KOH: 2-4 ml, se i campioni erano in provetta; 4-8 ml, se i campioni erano in piccole beute da 100ml
- 2) il tempo di permanenza in essa: 15, 17 e 20 minuti, se i campioni in provetta sono stati immersi in acqua a temperatura di ebollizione (Vierheilig *et al.*, 1998); 20 minuti, se i campioni nelle piccole beute sono stati messi in autoclave a 121 °C (Green *et al.*, 1998; Cornwell *et al.*, 2001; Liasu *et al.*, 2005)
- 3) il tempo di permanenza nella soluzione colorante (volume pari a 4 ml): 15, 17 e 20 minuti, ma sempre con i campioni in provetta immersi in acqua a temperatura di ebollizione

Dai saggi si è potuto osservare che, un buon compromesso tra l'integrità delle radici e la lisi cellulare per consentire un'efficace colorazione per una corretta quantificazione della colonizzazione, è quello descritto in Tabella 3:

Tabella 3. Protocollo fase di chiarificazione e colorazione differenziale dell'infezione micorrizica arbuscolare nei campioni radicali di pomodoro.

Fase	Soluzione	Tempo	Temperatura	Volume soluzione	Contenitore
Chiarificazione	10% KOH	20 min	121 °C	8 ml	beuta
Colorazione	5% CH ₃ COOH e 5% inchiostro	20 min	100 °C	4 ml	provetta

Bisogna aggiungere che il metodo prevede, sia tra la fase di chiarificazione e quella di colorazione, sia dopo quest'ultima diversi (almeno 3) lavaggi del campione radicale con acqua distillata.

A questo punto il campione è pronto per la quantificazione della colonizzazione e, quindi, secondo i protocolli dei metodi microscopici adottati, 10 frammenti di radici per campione della lunghezza di circa 1 centimetro sono stati disposti sullo stesso vetrino portaoggetti.

7.3.2. Metodo McGonigle

Sebbene, come già detto sopra, tutti i metodi microscopici, risentono molto della soggettività dell'operatore, è stato scelto il metodo di McGonigle, poiché è quello allo stesso tempo più preciso e meno soggettivo. Infatti, consiste in una vera e propria conta del numero di ife, vescicole ed arbuscoli su centimetri di radice osservata per campione.

Seguendo la procedura (di McGonigle *et al.*, 1990) sono stati effettuati i seguenti passaggi:

- 1) Ogni campione, corrispondente ad un vetrino con 10 frammenti di radice della lunghezza di circa 1 centimetro, è stato osservato al microscopio (ingrandimento 10X) in campo chiaro. L'obiettivo del microscopio è stato dotato di una griglia (a quattro quadranti), necessaria per la conta.
- 2) Infatti, per ogni frammento sono stati scelti casualmente 10 punti d'intersezione tra la crosshair verticale e la radice, facendo attenzione che la linea (*crosshair*) verticale sia perpendicolare al campione radicale, (Figura 7) ad eccezione dei 2 punti corrispondenti all'intersezione della linea verticale

con la parete cellulare. A questo punto, occorre sottolineare che il metodo di McGonigle è stato leggermente modificato, in quanto nel metodo originale la quantificazione è una conta della presenza o meno della categoria arbuscoli (A), ife (H), vescicole (V). Cioè, ad esempio, si contano con una A, sia che in quella crosshair ci siano 1, 2 o 6 arbuscoli. Mentre, in questo lavoro è stata effettuata una vera e propria somma aritmetica del numero di arbuscoli, di ife e di vescicole che cadevano sulla linea verticale. Cioè, ad esempio, sono stati contati 1A, 2A o 6A, nel caso in cui su quella crosshair fossero tagliati 1, 2 o 6 arbuscoli.

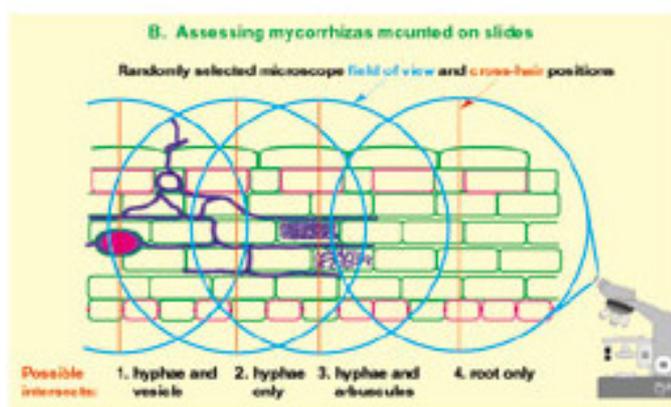


Figura 7. Analisi al microscopio delle radici per la quantificazione della colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (McGonigle *et al.*, 1990) presa da Brundrett *et al.* 1996 (Figure 4.4B)

- 3) Quindi, alla fine è stato calcolato il numero totale di arbuscoli, ife e vescicole, riscontrato in 100 (10 frammenti per 10 linee ciascuno) linee per campione rapportato alla lunghezza in centimetri (somma della lunghezza dei 10 frammenti).

7.3.3. Metodo di Trouvelot

Il secondo metodo microscopico utilizzato è quello messo a punto da Trouvelot *et al.*, 1986. Sebbene sia un metodo del 1986 è ancora molto usato, tanto che è stato creato il programma MYCOCALC per calcolare (in automatico) tutti gli indici ed i parametri previsti dal metodo di Trouvelot (Gollotte *et al.*, 2004; Mougél *et al.*, 2006; Farmer *et al.*, 2007).

Come già detto sopra questa metodologia risente maggiormente della soggettività dell'osservatore, poiché prevede l'assegnazione a classi in base alla percentuale della colonizzazione fungina secondo il seguente schema (Figura 8):

**SCORING MYCORRHIZAL COLONIZATION
IN CLASSES FROM 0 TO 5**

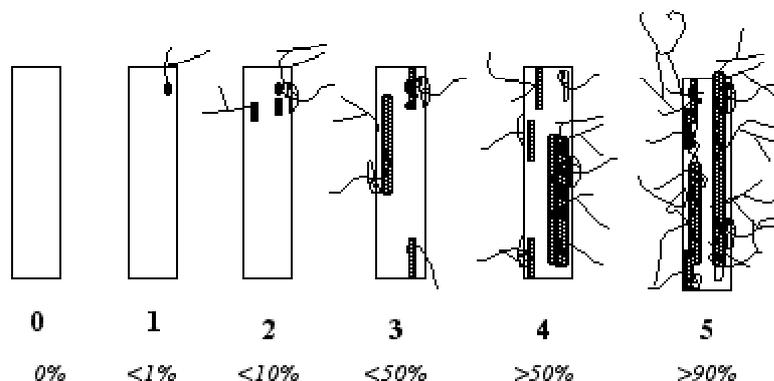


Figura 8. Schema della colonizzazione micorrizica corrispondente alle diverse classi assegnate con il metodo di Trouvelot *et al.*, 1986 (fonte: Mycorrhiza Manual, http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html#trouvelot).

Nello specifico, il metodo è costituito dai seguenti passaggi:

- 1) Ogni campione, corrispondente ad un vetrino con 10 frammenti di radice della lunghezza di circa 1 centimetro, è stato osservato al microscopio (ingrandimento 10X) in campo chiaro.
- 2) Ogni frammento di ciascun campione è stato osservato attentamente per l'assegnazione della classe corrispondente al grado di colonizzazione fungina.
- 3) Quest'operazione è stata ripetuta per tutti i dieci frammenti del campione.
- 4) Dopo aver classificato tutti i frammenti si calcola l'indice di micorrizzazione (M%) secondo la seguente formula:

$$M\% = \frac{95 * n_5 + 70 * n_4 + 30 * n_3 + 5 * n_2 + n_1}{N}$$

dove n_1 , n_2 , n_3 , n_4 , n_5 rappresentano il numero di frammenti appartenenti alle classi 1,2,3,4,5. N è il numero totale di frammenti osservati per campione.

In realtà il metodo originale prevede l'osservazione di 30 frammenti per campione, in questo lavoro di ricerca sono stati osservati 10 frammenti per campione, che, se moltiplicati per le 3 o 4 repliche (i blocchi sperimentali), fanno 30 o 40 frammenti osservati per trattamento.

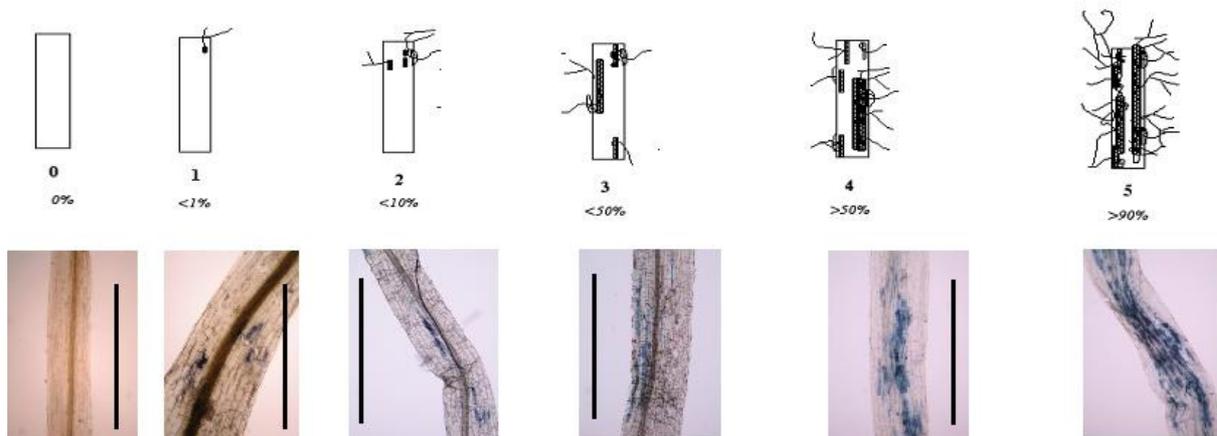


Figura 9. Classi Indice di micorrizzazione (M%) dello schema e corrispettivo esempio sui campioni radicali di pomodoro. Le foto sono state effettuate al microscopio ottico in campo chiaro (ingrandimento 10X), scala (barra nera) 1 mm.

7.4. Metodi molecolari per lo studio delle comunità di PPM

7.4.1. Estrazione DNA

L'estrazione dei campioni rizosferici di tutti e tre gli anni e di tutte le prove sperimentali sono state effettuate con il Kit POWERSOIL™ DNA ISOLATION, KIT (MoBio, California) apportando delle modifiche necessarie per ottimizzare l'estrazione. Infatti, il suddetto kit è stato progettato e studiato per l'estrazione degli acidi nucleici da campioni di suolo e non da campioni radicali.

Qui sotto sono elencati in maniera schematica, le modifiche apportate e tutti gli step necessari per l'estrazione.

Fase di preparazione:

- 1) I campioni prescelti vanno tolti dai rispettivi Falcon (in cui le radici sono state immerse nell'alcool denaturato per la conservazione del materiale genetico) e messi ciascuno in una vaschetta con la sigla del campione.
- 2) Bisogna lasciare le radici ad arieggiare (in cappa chimica) almeno una notte, affinché evapori tutto l'alcool.
- 3) Quando il campione è pronto, si passa alla fase di omogeneizzazione del campione, dapprima tagliando le radici con le forbici, poi polverizzandole su di un mortaio aggiungendoci l'azoto liquido.
- 4) Dopo aver polverizzato le radici, bisogna pesare e prendere la quantità ottimale di campione; il kit consiglia 250 mg di suolo, ma prove precedentemente effettuate nel nostro laboratorio rizosfera (Picard *et al.*, 2008) hanno stabilito che la quantità ottimale di campione radicale è 100 mg.

Ora si passa alla fase vera e propria di estrazione effettuata, come suggerita dal manuale del kit MoBio.

Fase di estrazione:

- 1) Mettere i 100 mg e 200 μ l di tampone TE (modifica apportata per ottimizzare l'estrazione; Picard *et al.*, 2008) di campione nel "powerbead tube": in questa fase si ha una omogeneizzazione e lisi del campione, infatti il tubo contiene un tampone che ha lo scopo di disperdere le particelle di suolo, dissolvere gli acidi umici e proteggere la degradazione degli acidi nucleici ed allo stesso tempo contiene delle palline che operano la lisi.
- 2) Mettere il tubo sul vortex, per miscelare il campione ed il contenuto del "powerbead tube".
- 3) Prendere la soluzione C1. Questa soluzione contiene sodio dodecil solfato (SDS) che completa la lisi, inoltre è un detergente anionico che rompe gli acidi grassi ed i lipidi delle membrane dei microrganismi.
- 4) Aggiungere 60 μ l di C1 e mettere il tutto ad agitare sul vortex
- 5) I tubi vanno agganciati sul vortex in posizione orizzontale, azionare il vortex per 10 min a massima velocità. Questa fase di agitazione è fondamentale per la completa omogeneizzazione e lisi cellulare del campione, infatti la lisi è resa possibile dall'unione degli agenti chimici, aggiunti nei 4 precedenti step e dall'agitazione delle palline.
- 6) Mettere i tubi in centrifuga a 10000 g = 11000 rpm (non superiore) per 30 secondi
- 7) Trasferire il supernatante, circa 300 μ l, in un altro tubo pulito
- 8) Aggiungere 250 μ l della soluzione C2 e mettere sul vortex per 5 secondi, poi tenere i tubi in frigorifero a 4 ° C per 5 minuti. La soluzione C2 contiene un reagente che fa precipitare il materiale inorganico ed organico, ma non il DNA, quindi è importante per migliorare la purezza del DNA estratto.
- 9) Centrifugare per 1 minuto a 11000 rpm.
- 10) Trasferire circa 600 μ l di supernatante in un tubo pulito (facendo attenzione a non prendere il pellet)
- 11) Aggiungere 200 μ l della soluzione C3 e mettere su vortex. Incubare in frigorifero a 4 °C per 5 min. La soluzione C3 è il secondo reagente, dopo C2, che serve per precipitare il materiale inorganico ed organico, quindi è importante per migliorare la purezza dell'estrazione.
- 12) Centrifugare i tubi a temperatura ambiente per 1 minuto a 11000 rpm.

- 13) Trasferire 750 μ l di supernatante in un tubo pulito
 - 14) Aggiungere 1,2 ml di C4 al supernatante e mettere sul vortex per 5 secondi. La soluzione C4 è una soluzione ad alta concentrazioni di sali per permettere ai legami -P del DNA di legarsi ad esso, mentre la porzione non DNA rimane libera.
 - 15) Prendere 675 μ l circa di questa soluzione e metterla nel tubo "spin filter" (colonna) e centrifugare per 1 minuto a 11000 rpm. Togliere il liquido che è passato attraverso il filtro e rimettere 675 μ l nel tubo e poi in centrifuga; il tutto va ripetuto 3 volte.
 - 16) Aggiungere 500 μ l della soluzione C5 e centrifugare per 1 min a 11000 rpm . La soluzione C5 è a base di etanolo e serve per staccare il DNA dal filtro del tubo "spin filter". Inoltre rimuove i sali, gli acidi umici ed altri contaminanti.
 - 17) Buttare via il liquido passato nel "collection tube" da 2 ml. Questo liquido è materiale non DNA organico ed inorganico, rimosso dalla membrana "spin filter" dalla soluzione di etanolo
 - 18) Centrifugare per almeno 1 min a 11000 rpm. Questa seconda centrifuga rimuove i residui della soluzione C5 (soluzione a base di etanolo). E' una fase critica per rimuovere tutte le tracce della soluzione di etanolo, poiché l'etanolo contenuto nella soluzione C5 può interferire con molte delle applicazioni successive del DNA come ad esempio, PCR, restrizioni enzimatiche ed elettroforesi su gel.
 - 19) Depositare con cura il "spin filter" in un "collection tube" da 2 ml (fornito dal Kit).
 - 20) Aggiungere 100 μ l della soluzione C6 al centro della membrana filtro bianca. Con il passaggio della soluzione C6 attraverso la membrana, il DNA, che era legato ad essa per la presenza di sali, è selettivamente rilasciato dalla soluzione C6 (10mM Tris), che non contiene sali.
 - 21) Centrifugare a temperatura ambiente per 30 secondi a 11000 rpm.
 - 22) Buttare via il "spin filter". Il DNA nel tubo è pronto per qualsiasi applicazione successiva. Non sono richiesti ulteriori passaggi.
- Si raccomanda di conservate il DNA ad una temperatura tra -20 °C a -80 °C, poiché la soluzione C6 non contiene acido etilendiamminotetraacetico (EDTA).

7.4.2. PCR verifica dell'estrazione

Tutti i campioni sono stati sottoposti all'amplificazione genica *in vitro* (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) per testare l'efficacia dell'estrazione. Sono stati scelti, per il target batterico i primer P0 (\rightarrow) e P6 (\leftarrow) (Grifoni *et al.*, 1995), primer in grado di amplificare

il 16S rDNA della maggior parte dei taxa batterici (Picard *et al.*, 2000), per il target fungino i primer NS5 (→) ed ITS4 (←) (White *et al.*, 1990), che amplificano le regioni non codificanti ITS posizionate tra i geni 18S e 28S.

Tabella 4. Coppie di primer usati nelle reazioni PCR post estrazione.

Primer	Sequence (5'-3')	Target
P0	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rDNA
P6	CTACGGCTACCTTGTACGA	
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	ITS Fungi
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Le miscele sono state preparate in Eppendorf da 200 µl arrivando ad un volume finale di 25 µl, costituito dalla miscela di reazione, acqua ultra pura sterile e 2 µl del DNA estratto.

In ogni reazione di amplificazione sono stati predisposti 2 tubi di controllo: uno senza DNA, in modo da determinare una eventuale contaminazione dei reagenti e un altro in cui è stato introdotto un DNA noto, che sappiamo amplificare con gli stessi primer, in modo da avere un controllo positivo.

La miscela di amplificazione contiene:

Tabella 5. Componenti delle miscele di reazione PCR post estrazione.

Componente	Concentrazione target batterico	Concentrazione target fungino
Tampone PCR	1X	1X
dNTPs	20 µM	20 µM
Glicerolo	2.5%	2.5%
Taq Polimerasi	1U	1U
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM
Primer 1 (→)	0.25 µM	0.1 µM
Primer 2 (←)	0.25µM	0.1 µM

Le miscele di reazione sono state incubate in un apparecchio PCR (Eppendorf modello MasterGradient96) con un protocollo di amplificazione che prevedeva 3 minuti a 95°C, 35 cicli consistenti in 15 secondi a 94°C, 15 secondi alla temperatura d'ibridazione pari a 55°C e 1 minuto e 20 secondi a 72°C. Infine le miscele sono state incubate a 72°C per 7 minuti.

Successivamente, la separazione elettroforetica è stata eseguita su gel di agarosio (agarosio in polvere 1,2% in rapporto peso/volume in una soluzione tampone di Tris-

Borato-EDTA (TBE)). La corsa elettroforetica è stata ottenuta immergendo il gel, costituito dai campioni di DNA (5 µl del prodotto PCR, a cui sono stati aggiunti 3-5 µl di tampone di migrazione blu) più almeno un pozzetto con un marcatore di peso molecolare (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) nella soluzione tampone TBE (concentrazione 1x) e sottoponendolo a una corrente costante di 120 V per 30-40 minuti. Quando la separazione è stata completata, il DNA è stato visualizzato bagnando il gel in una soluzione diluita (0,5 µl/ml) di tintura di bromuro di etidio (EtBr). Il bromuro di etidio tende a legarsi al DNA e, quindi, dopo che il gel è stato lavato per eliminare la tintura non legata e retroilluminato con raggi ultravioletti (300-350 nm), evidenzia la presenza di DNA, emettendo luce fluorescente nel visibile. Per ognuno dei casi analizzati ci si aspettava di identificare un'unica banda fluorescente, associata alla migrazione elettroforetica di frammenti di DNA di lunghezza pari a 1650 bp, nel caso del target batterico e pari a circa 1200 bp nel caso del target fungino.

7.4.3. Quantificazione del DNA estratto

Tutti i DNA, precedentemente estratti prima della partenza mediante metodologie moderne (Picard *et al.*, 2008), sono stati quantificati utilizzando lo spettrofotometro Nano Drop ® ND-1000. Questo particolare spettrofotometro è in grado di misurare anche un volume di 1 µl di campione con un alto grado di precisione e riproducibilità, inoltre, non necessitando di cuvette, permette la misura di campioni molto concentrati 50 volte maggiori rispetto agli altri strumenti.

L'effettiva misurazione della concentrazione dei campioni è, quindi stata effettuata mettendo 1 µl di campione sul sensore (*lower measurement pedestal*), chiudendo poi il "braccio" che contiene l'altro sensore (*upper measurement pedestal*) e cliccando sul PC sul software specifico, lo strumento inizia la lettura spettrofotometrica. Ogni 10-20 campioni, così come all'inizio ed alla fine, è stata fatta 1 o 2 misurazioni con acqua per pulire i sensori e ricalibrare lo strumento.

7.4.4. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)

Il DNA di tre repliche dei campioni rizosferici dell'esperimento in campo Rio Grande 2006 (i 3 migliori risultati ottenuti dalla PCR di verifica dell'estrazione) ed i DNA delle 3 repliche dei campioni del 2007 inoculati nel vivaio, sono stati sottoposti all'analisi automatizzata dello spaziatore intergenico ribosomale (ARISA, *Automated*

Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), presso il *Laboratory of Microbial Ecology and Bioremediation*, sotto la supervisione del Dr. *Nicholas Clipson*.

7.4.4.1. PCR (miscela di reazione)

I componenti della miscela di reazione che consentono l'amplificazione del DNA bersaglio sono, oltre all'enzima DNA-Polimerasi stabile al calore ed il relativo tampone, MgCl₂ come catalizzatore, BSA (Purified BSA 100X, BioLabs inc.), i primer scelti in modo da identificare le sequenze che fiancheggiano il bersaglio e che fungono da inneschi per la polimerizzazione operata dall'enzima e, infine, tutti e quattro i desossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs) che costituiscono il DNA (Tabella 6). Le miscele sono state preparate in Eppendorf da 200 µl arrivando ad un volume finale di 50 µl, costituito dalla miscela di reazione, acqua ultra pura sterile (acqua Millipore sterile) e 2 µl di DNA. In ogni reazione di amplificazione sono stati predisposti 2 tubi di controllo: uno senza DNA, in modo da determinare una eventuale contaminazione dei reagenti e un altro in cui è stato introdotto un DNA noto (ceppo di *Trichoderma*) per l'ARISA.

Tabella 6. Componenti delle miscele di reazione PCR pre ARISA.

Componente	Concentrazione
Tampone	5X
dNTPs	0.24 mM
BSA	25 mg
<i>Taq</i> Polimerasi	1.25 U
MgCl ₂	1.5 mM
Primer 1 (→)	3 µM
Primer 2 (←)	3 µM

E' stato amplificato lo spaziatore intergenico ribosomale del genoma fungino per la FARISA, con i primer ITS1-F (→) (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes e Bruns, 1993) e ITS4 (←) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). La sequenza amplificata contiene le 2 regioni non codificanti ed il gene 5.8S più 22 paia di basi (pb) del primer Forward ed una parte del 28S rDNA. Il primer Forward ITS1-F è stato precedentemente marcato con il fluoroforo Beckman Coulter fluorescent dye D4 (Proligo).

7.4.4.2. Protocollo di amplificazione

Le miscele di reazione per la tecnica di *molecular fingerprinting* utilizzata, ARISA, per il target fungino FARISA (da Fungal-ARISA), sono state incubate in un apparecchio PCR (PX2 Thermal Cycles, Thermo Electron Corporation) a 95 °C per 4 minuti e, quindi, sottoposte a 35 cicli consistenti in 1 minuto a 95 °C, 45 secondi alla temperatura d'ibridazione (56 °C) ed un minuto a 72 °C. Infine le miscele sono state incubate a 72°C per 7minuti.

7.4.4.3. Visualizzazione dei frammenti di DNA amplificati

Il procedimento più utile e immediato per rivelare se il DNA bersaglio sia stato sufficientemente amplificato è la sua visualizzazione mediante il elettroforesi su gel. La separazione elettroforetica è stata eseguita su gel di agarosio, un mezzo di supporto stabilizzante particolarmente indicato per la separazione di molecole biologiche. Il gel è stato preparato sospendendo 1,2% in rapporto peso/volume di agarosio in polvere nella soluzione tampone, costituita da (TAE), portandolo all'ebollizione. Prima della solidificazione del gel è stato aggiunto 1 µl di tintura di bromuro di etidio (EtBr) (10mg/ml) (Bio-Rad Laboratoires). In ogni pozzetto, ricavato nel gel mediante un pettine, sono stati caricati 5 µl del prodotto PCR, a cui sono stati prima aggiunti 5 µl di tampone di migrazione blu (Bromophenol Blue (BPB)) che favorisce, aumentando la densità, la discesa del campione nel pozzetto stesso e funziona da marcatore visibile durante la corsa elettroforetica. La corsa elettroforetica è stata ottenuta immergendo il gel nella soluzione tampone TAE (concentrazione 1x) e sottoponendolo a una corrente costante di 83 V per 15 minuti. Dopo il gel è retroilluminato con raggi ultravioletti (300-350 nm), evidenzia la presenza di DNA, emettendo luce fluorescente nel visibile.

Per ognuno dei casi analizzati ci si aspettava di identificare un'unica banda fluorescente, associata alla migrazione elettroforetica di frammenti di DNA di lunghezza pari a quella del controllo positivo, in quanto identificativa dell' rDNA cercato. Il gel con bande fluorescenti viene infine fotografato, per poi procedere con la preparazione dell'ARISA, per il target fungino.

7.4.4.4. Elettroforesi capillare ARISA

All'amplificazione PCR con i primer ITS1F- ITS4 è seguita la preparazione dei campioni per la tecnica molecolare ARISA.

Questa tipologia di analisi non prevede né restrizione enzimatica, né lunghe preparazioni dei prodotti dell'amplificazione, ma consiste solamente nella preparazione delle multipiastre (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystem) e nell'elettroforesi capillare da parte del sequenziatore ABI-Applied Biosystems (ABI 3130xL genetic analyser). Per quanto riguarda l'allestimento delle multipiastre è necessario mettere in ciascun pozzetto 1 µl del corrispettivo prodotto PCR, 0.5 µl di Size standard (Beckman Coulter size standard 1200 (dye D1)) e 8.5 µl di Hi-Di formamide deionizzata (Applied Biosystem), in modo tale da raggiungere 10 µl di volume in totale. Infine, dopo aver centrifugato la multipiastra per alcuni secondi, è stata messa nello strumento PCR a 94 °C, per denaturare i frammenti di DNA per alcuni minuti. L'elettroforesi capillare è stata effettuata utilizzando il sequenziatore ABI-Applied Biosystems (ABI 3130xL genetic analyser) ed i risultati sono stati analizzati utilizzando il software GeneMapper®.

7.5. Analisi statistiche dati prove sperimentali in pieno campo

Tutti i set di dati, ricavati dai vari campionamenti effettuati in pieno campo, sia per la prova Rio Grande, Gordon e 3 linee prioritarie nei vari anni di sperimentazione, sono stati analizzati con un'analisi di varianza (ANOVA) ad uno o più fattori, dipendentemente dal caso, usando il programma MSTAT-C (Michigan State University East Lansing, MI) o Analyse-it (pacchetto di analisi statistica disponibile per Microsoft Office).

7.5.1. Dati produzione

7.5.1.1. Prova Rio Grande

Per i dati di produzione dei singoli anni (2006, 2007, 2008) è stata effettuata un'analisi di varianza a 2 fattori (Compost e Inoculo), applicata ad un disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati.

Mentre, per confrontare tra loro i dati dei 3 anni è stata effettuata un'analisi di varianza a 2 fattori combinata con il fattore anno, sempre applicata ad un disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati.

Tabella 7. Fattori e tipologia ANOVA utilizzate per i dati di produzione della prova Rio Grande.

Fattori	Singoli anni		3 anni	
	Fattori Principali	ANOVA	Fattori Principali	ANOVA
Fattore replica (No. blocchi)		MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design		MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design Combined over Year
Fattore Anno	A		✓	
Fattore Compost	C		✓	
Fattore Inoculo	M		✓	

Per i risultati significativi³ l'analisi è continuata con i test post Hoc: 1) Tukey's Honestly Significant Difference Test; 2) Duncan's Multiple Range Test (per entrambi $\alpha=0.05$), per testare come e quanto i vari livelli dei singoli fattori si differenziassero tra loro.

A questo punto è importante rammentare che il disegno sperimentale del 2007 è in realtà costituito da 18 trattamenti (trt) sperimentali: 9 trt in cui è stato aggiunto l'inoculo microbico (+) e 9 trt senza l'aggiunta dell'inoculo microbico (-). Per analizzare e confrontare tra loro i dati del 2007 e degli altri 2 anni, i dati di ogni trt (+) e (-) sono stati sommati tra loro (visto che l'ANOVA ad 1 fattore non aveva trovato differenze significative), così d'avere lo stesso numero di trattamenti. In questo modo, sommando i dati (+) e (-), è aumentato il numero di blocchi sperimentali (del 2007) da 3 a 6. Di conseguenza, sono stati eliminati i dati dei 2 blocchi sperimentali de 2007, la cui media differiva maggiormente dalla media generale (dati outlier).

7.5.1.2. Prova varietà

Nelle diverse prove varietà messe in campo nei 3 anni di sperimentazioni (prova varietà Gordon nel 2006; prova 3 linee prioritarie in due diverse *location* nel 2007 e nel 2008), è stato possibile analizzare statisticamente i dati di produzione solo dell'esperimento 3 linee nel secondo anno a Bondeno. Infatti, il disegno sperimentale della prova Gordon era costituito da un solo blocco sperimentale

³ Quando il *p value* risultante dall'ANOVA è <0.05.

(quindi pochi dati per essere analizzati) ed, invece, per la prova 3 linee nel 2007 non è stata raccolta la produzione.

3 Linee Prioritarie 2008

I dati di produzione delle 3 linee trapiantate a Bondeno nel 2008 è stata effettuata un'analisi di varianza a 2 fattori, applicata ad un disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati.

Tabella 8. Fattori e tipologia ANOVA utilizzata per i dati di produzione della prova varietà.

Fattori		Fattori Principali	ANOVA
Fattore replica (No. blocchi)			MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design
Fattore Linee	L	✓	
Fattore 2 Elementi ⁴	E	✓	

Nel caso in cui il p value indicasse uno dei 2 fattori significativo, l'analisi è continuata con i test di Tukey ed il test di Duncan (con $\alpha=0.05$), per testare come e quanto i vari livelli del fattore si differenziassero tra loro.

7.5.2. Dati infezione micorrizica (metodi microscopici)

7.5.2.1. Prova Rio Grande

Per i dati d'infezione micorrizica dei singoli anni (2006, 2007, 2008) è stata effettuata un'analisi di varianza a 3 fattori, applicata ad un disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati.

Mentre, confrontare tra loro i dati dei 3 anni è stata effettuata un'analisi di varianza a 2 fattori combinata con il fattore anno ed il fattore Sampling Time (data di campionamento).

⁴ Il fattore 2 Elementi indica le piante inoculate o no nel vivaio.

Tabella 9. Fattori e tipologia ANOVA utilizzata per i dati di colonizzazione micorrizica delle radici corrispondenti alla prova Rio Grande.

Fattori	Singoli anni		3 anni	
	Fattori Principali	ANOVA	Fattori Principali	ANOVA
Fattore replica (No. vetrini)				MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design Combined over Year and over Sampling Time
Fattore Anno A		MSTAT-C: Three Factor Randomized Complete Block Design	✓	
Fattore Sampling Time ⁵ S	✓		✓	
Fattore Compost C	✓		✓	
Fattore Inoculo M	✓		✓	

Per i risultati significativi⁶ l'analisi è continuata con i test post Hoc: 1) Tukey's Honestly Significant Difference Test; 2) Duncan's Multiple Range Test (per entrambi $\alpha=0.05$), per testare come e quanto i vari livelli dei singoli fattori si differenziassero tra loro.

Per i dati d'infezione micorrizica non è stato possibile usare come replica il numero di blocchi perché:

1) Il disegno sperimentale del 2007 è in realtà costituito da 18 trattamenti (trt) sperimentali: 9 trt con l'inoculo (+) e 9 trt senza l'inoculo (-). Per analizzare e confrontare tra loro i dati del 2007 e degli altri 2 anni, i dati di ogni trt (+) e (-) sono stati sommati tra loro (visto che l'ANOVA ad 1 fattore non aveva trovato differenze significative), così d'avere un totale di trt pari a 9 anche per questo anno. Sommando i dati (+) e (-), come detto sopra, aumenta il numero di blocchi sperimentali, e quindi anche il numero di vetrini osservati. Di conseguenza il numero di vetrini del 2007 (12) non coincide con quello degli altri 2 anni (8). Per questo motivo sono stati eliminati i dati di 4 vetrini osservati, corrispondenti ai valori, la cui media differiva maggiormente dalla media generale (dati outlier). Adottando questo criterio, i dati dei vetrini scelti, non sempre, corrispondono agli stessi 4 blocchi.

2) Nella prima data di campionamento del 2008 è stata campionato un blocco.

⁵ Il fattore Sampling Time indica la data di campionamento.

⁶ Quando il *p value* risultante dall'ANOVA è <0.05.

7.5.2.2. Prova varietà

Prova Gordon

I dati d'infezione micorrizica, rilevati con i 2 metodi microscopici, della varietà Gordon trapiantata in campo nel 2006 sono stati analizzata statisticamente con un'analisi di varianza a 2 fattori: l'aggiunta o meno in diversi livelli di compost e d'inoculo.

Tabella 10. Fattori e tipologia ANOVA utilizzata per i dati di colonizzazione micorrizica della prova Gordon.

Fattori		Fattori Principali	ANOVA
Fattore replica (No. vetrini)			MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design
Fattore Compost	C	✓	
Fattore Inoculo	M	✓	

In questo caso, per l'infezione micorrizica delle radici nelle piante di pomodoro Gordon, non è stato possibile inserire il fattore Sampling Time (data di campionamento), poiché entrambe le 2 date di campionamento erano composte da soltanto una replica. I 2 campioni (campione data 1 + campione data 2) per trattamento sono stati utilizzati come fattore replica (No. vetrini).

Per i risultati significativi⁷ l'analisi è continuata con i test post Hoc: 1) Tukey's Honestly Significant Difference Test; 2) Duncan's Multiple Range Test (per entrambi $\alpha=0.05$), per testare come e quanto i vari livelli dei singoli fattori si differenziassero tra loro.

3 Linee Prioritarie

2007

Volendo verificare se le diverse linee prioritarie confermassero i risultati preliminari sull'infezione micorrizica, ottenuti nel 2006, sono state fatte diverse analisi a seconda dell'ipotesi da verificare:

- 1) I dati d'infezione micorrizica campionati nel loro sito originale di sperimentazione a Metaponto sono stati analizzati con un'analisi di varianza

ad un fattore (MSTAT-C: *One Factor Randomized Complete Block Design*): le 3 differenti Linee (L), per testare se e come ci fossero delle differenze significative tra le linee.

- 2) I dati d'infezione micorrizica delle tre linee trapiantate a Bondeno, sono stati analizzati con un'analisi di varianza a 2 fattori (MSTA-C: *Two Factor Randomized Complete Block Design*). In quest'analisi i fattori sono: 1) le 3 Linee (L); 2) il fattore Sampling Time (S).
- 3) Per i dati d'infezione micorrizica delle tre linee trapiantate, nello stesso anno, nelle due diverse *location* sperimentali, è stata effettuata un'analisi di varianza ad 1 fattore, le Linee (L), combinata per il fattore Location (P) (MSTAT-C: *One Factor Randomized Complete Block Design Combined over Locations*).

A seguito delle suddette analisi di varianza, nel caso il *p value* fosse significativo per le variabili considerate, l'elaborazione statistica è proseguita sia con il Tukey test, sia con il test di Duncan, per trovare quanto i livelli del fattore fossero significativamente differenti tra loro.

2008

I dati d'infezione micorrizica dei campioni radicali delle linee trapiantati nel 2008 sono stati confrontati ed analizzati in maniera differente a seconda del disegno e dell'ipotesi sperimentale da verificare.

- 1) I dati di colonizzazione delle radici di pomodoro messe in campo a Bondeno sono stati analizzati statisticamente con un'analisi di varianza a due fattori (MSTAT-C: *Two Factor Randomized Complete Block*), dove i fattori considerati sono le 3 Linee (L) ed il fattore Sampling Time (S).
- 2) I dati di colonizzazione delle radici di pomodoro messe in campo a Metaponto sono stati analizzati statisticamente con un'analisi di varianza a ad un fattore (MSTAT-C: *One Factor Randomized Complete Block Design*): le 3 differenti Linee (L), per testare se e come ci fossero delle differenze significative tra le linee.
- 3) Per i dati d'infezione micorrizica delle tre linee trapiantate, nello stesso anno (2008), nelle due diverse *location* sperimentali, è stata effettuata un'analisi di

⁷ Quando il *p value* risultante dall'ANOVA è <0.05.

varianza ad 1 fattore, le Linee (L), combinata per il fattore Location (P) (MSTAT-C: *One Factor Randomized Complete Block Design Combined over Locations*).

Nel caso in cui il *p* value indicasse qualche fattore significativo, l'analisi è continuata con i test di Tukey ed il test di Duncan (con $\alpha=0.05$), per testare come e quanto i vari livelli dei singoli fattori si differenziassero tra loro.

2 Anni a confronto

I dati d'infezione micorrizica delle tre linee trapiantate a Bondeno e Metaponto nel 2007 e nel 2008 sono stati esaminati con un'analisi di varianza a due fattori (MSTAT-C: *Two Factor Randomized Complete Block Design*), dove i fattori considerati sono:

Tabella 11. Fattori e tipologia ANOVA utilizzata per i dati di colonizzazione micorrizica delle radici corrispondenti alla prova 3 linee nei 2 anni di sperimentazione sia a Bondeno che Metaponto.

Fattori		Fattori Principali	ANOVA
Fattore replica (No. vetrini)			MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design
Fattore Anno	A	✓	
Fattore Linee	L	✓	

Per i risultati significativi⁸ l'analisi è continuata con i test post Hoc: 1) Tukey's Honestly Significant Difference Test; 2) Duncan's Multiple Range Test (per entrambi $\alpha=0.05$), per testare come e quanto i vari livelli dei singoli fattori si differenziassero tra loro.

7.5.3. Dati sviluppo della biomassa

7.5.3.1. Prova Rio Grande

I dati dello sviluppo della biomassa, rilevati solo nel primo anno di sperimentazione in campo (2006), sono stati analizzati con un'analisi di varianza a 3 fattori, applicata ad un disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati. Nel caso in cui il *p* value risultante dall'ANOVA per uno dei 3 fattori fosse significativo, l'elaborazione è proseguita sia con il test di Tukey, sia con il test di

⁸ Quando il *p* value risultante dall'ANOVA è <0.05.

Duncan (con $\alpha=0.05$), per trovare le differenze significative tra i vari livelli del fattore considerato.

7.5.3.2. Prova Gordon

I dati dello sviluppo della biomassa *cv* Gordon, rilevati nel 2006, sono stati sottoposti ad un ANOVA a 3 fattori, comando MSTAT-C: *Three Factor Randomized Complete Block Design*. I fattori considerati sono gli stessi applicati per i dati della varietà Rio Grande (vedi sopra). L'unica differenza è che, essendo la prova Gordon costituita da un solo blocco sperimentale, il fattore replica in questo caso sono le repliche (5) delle misurazioni effettuate per tesi sperimentale. In analogia con i dati *cv* Rio Grande, l'analisi è proseguita con gli stessi test post Hoc, nel caso in cui il *p value* risultante dall'ANOVA per uno dei 3 fattori fosse significativo.

Tabella 12. Fattori e tipologia ANOVA dei dati dello sviluppo della biomassa della prova Rio Grande e Gordon.

Fattori		Rio Grande ANOVA	Fattori Principali	Gordon ANOVA
Fattore replica (No. blocchi)		MSTAT-C: Three Factor Randomized Complete Block Design		MSTAT-C: Three Factor Randomized Complete Block Design Combined over Year
Fattore Sampling Time S			✓	
Fattore Compost C	✓		✓	
Fattore Inoculo M	✓		✓	

7.5.4. Dati analisi di qualità

7.5.4.1. Prova Rio Grande

Tutti i dati di qualità della bacca dei diversi parametri misurati (nel 2007 e nel 2008) sono stati stati analizzata statisticamente con un'analisi di varianza a 2 fattori: l'aggiunta o meno in diversi livelli di compost e d'inoculo.

Mentre per confrontare tra loro i dati di qualità delle bacche dei 2 anni è stata effettuata un'analisi di varianza a 2 fattori combinata con il fattore anno.

Dopo l'ANOVA, nel caso il *p value* fosse significativo per le variabili considerate, l'analisi è proseguita sia con il Tukey test, sia con il test di Duncan (con $\alpha=0.05$), per trovare quanto i livelli del fattore fossero significativamente differenti tra loro.

Tabella 13. Fattori e tipologia ANOVA utilizzata per i dati di qualità della bacca della prova Rio Grande.

Fattori	Singoli anni		2 anni	
	Fattori Principali	ANOVA	Fattori Principali	ANOVA
Fattore replica (No. blocchi)		MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design		MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design Combined over Year
Fattore Anno	A		✓	
Fattore Compost	C		✓	
Fattore Inoculo	M		✓	

Come nel caso dei dati di produzione e d'infezione micorrizica della cv Rio Grande, anche per i dati di qualità è stato necessario adottare gli stessi accorgimenti per confrontare i dati sperimentali del 2007 e quelli del 2008. Quindi, anche in questo caso il numero di trattamenti sperimentali del 2007 (18) è stato ridotto a nove, applicando le stesse avvertenze e precauzioni adottate per gli altri set di dati della varietà Rio Grande.

7.5.4.2. Prova varietà: 3 linee prioritarie

Nel 2007 tutti i dati di qualità della bacca (delle piante di pomodoro *cultivar* Red Setter cresciute a Bondeno) dei diversi parametri misurati sono stati analizzati statisticamente con un'analisi di varianza ad un fattore, il fattore 3 linee.

Nel 2008, i dati relativi alla qualità della bacche (in aggiunta è stata valutata anche la conducibilità elettrica), delle 3 linee trapiantate a Bondeno, sono stati esaminati con un'analisi di varianza a 2 fattori, applicata ad un disegno sperimentale a blocchi completamente randomizzati.

Per confrontare tra loro i dati di qualità dei 2 anni è stata effettuata un'analisi di varianza a 2 fattori: il fattore anno ed il fattore linee.

Tabella 14. Fattori e tipologia ANOVA dei dati di qualità della bacca della prova 3 linee.

Fattori	Singoli anni				3 anni	
	2007		2008		Fattori Principali	ANOVA
	Fattori Principali	ANOVA	Fattori Principali	ANOVA		
Fattore replica (No. blocchi)		MSTAT-C: One Factor Randomized Complete Block Design		MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design		MSTAT-C: Two Factor Randomized Complete Block Design
Fattore Anno A			✓			
Fattore Linee L	✓		✓			
Fattore 2 Elementi ⁹ E			✓			

Nel caso in cui il p value indicasse qualche fattore significativo, l'analisi è continuata con i test di Tukey ed il test di Duncan (con $\alpha=0.05$), per testare come e quanto fosse differente la qualità delle bacche delle 3 linee.

7.6. Interpretazione bioinformatica risultati ottenuti dall'ARISA

I profili di analisi elettroforetica ottenuti dalla tecnica ARISA sono stati utilizzati nel loro insieme come rappresentativi della struttura della comunità microbica analizzata. Con struttura di una comunità microbica s'intende una rappresentazione sintetica della comunità in un profilo di bande o picchi. Questo tipo di rappresentazione è stato studiato mediante approcci statistici, per stabilire se diversi ambienti, diversi ammendamenti e diversi fattori ambientali o sperimentali, selezionano comunità microbiche strutturalmente diverse.

7.6.1. Software utilizzati

Lo strumento utilizzato per l'elettroforesi capillare è il "sequencer" ABI-Applied Biosystems ABI 3130XL genetic analyser. I dati ottenuti (tabelle di picchi) sono stati elaborati mediante diversi software bioinformatici:

- Dapprima, è stato necessario utilizzare il software GeneMapper® Software Version 4.0, che consente di studiare e confrontare in maniera simultanea i profili di bande ottenuti dalle tecniche molecolari di "amplified fragments length polymorphisms" (ALFP®), nel caso l'ARISA. Nello specifico, GeneMapper

⁹ Il fattore 2 Elementi indica le piante inoculate o no nel vivaio.

permette di controllare e visualizzare i profili di restrizione ottenuti, la presenza ottimale e l'efficienza dello Size Standard e di creare le matrici con i dati in ampiezza (size) ed in altezza (picchi) di tutti i singoli profili di restrizione ottenuti per ogni campione analizzato, denominati *ABI multiple profiles*. Questa matrice può poi essere utilizzata ed elaborata da altri software per ulteriori analisi.

- Il secondo software utilizzato è R, in particolare il suo pacchetto Ribosort (Scallan *et al.*, 2008). La funzionalità di questo programma è di ordinare, raggruppare, sottoporre a prime elaborazioni statistiche, in maniera automatica gli ABI multiple profiles. La vera convenienza di Ribosort è che, come tutti i pacchetti di R è gratuito, e dopo aver elaborato i dati li trasforma in file in formato “*comma separated values*” (csv), facilmente convertibili e leggibili all'intero di un foglio di calcolo (e.g.: Microsoft Excel).
- Finalmente, questi dati elaborati possono essere analizzati da veri e propri programmi di analisi statistica, quali Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research (PRIMER-E) versione 6 e Canoco for Windows versione 4.5. Questi programmi sono in grado di operare molte tra le più comuni analisi statistiche multivariate, usate per visualizzare graficamente la somiglianza e/o differenza tra le comunità microbiche prese in esame, come la Principal Component analysis (PCA), non metric Multidimensional scaling (MDS) ed altre per trovare eventuali differenze significative tra i gruppi considerati nei dati di profili di restrizione, come ad esempio l'Analysis of similarity (ANOSIM).

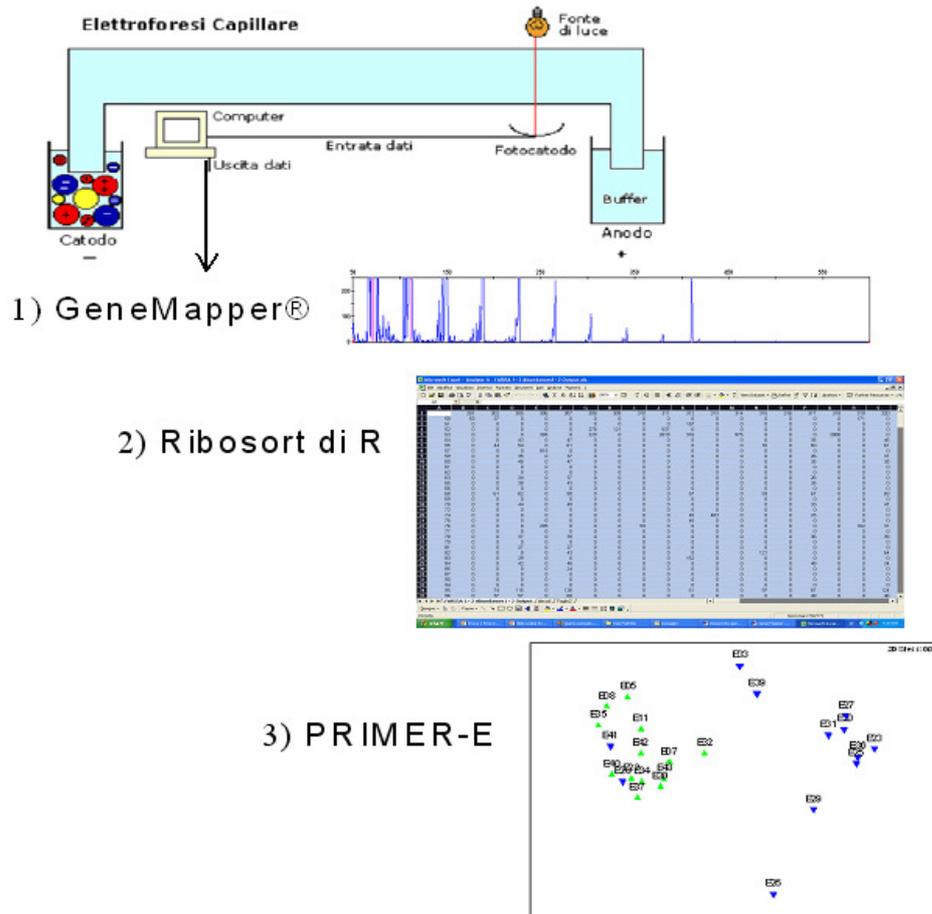


Figura 10. Schema software informatici utilizzati per l'interpretazione dei risultati molecolari.

7.6.2. Analisi effettuate

7.6.2.1. Non-metric multi-dimensional scaling (MDS)

I dati dei profili ottenuti da entrambe le tecniche molecolari effettuate sono stati elaborati dai programmi R e PRIMER-E, come detto sopra, per effettuare l'analisi statistica multivariata quale è la non metric Multi dimensional scaling (MDS).

La non-metric MDS è una metodologia generalmente molto efficiente, in grado di rivelare e convertire le relazioni di somiglianza e/o differenza tra diverse tipologie di misurazioni, in relazioni di "distanze" tra i valori. Lo scopo di questa analisi è molto semplice: costruire una mappa (configurazione) dei campioni, rappresentati come punti in uno spazio (con un numero basso di dimensioni 2-3), in modo che la distanza relativa tra i punti sia corrispondente alla relativa similarità tra i campioni, dopo aver elaborato i dati in un' appropriata "matrice di somiglianza". In questa rappresentazione grafica, la vicinanza tra gli oggetti corrisponde alla loro

somiglianza, ma l'ordinamento (sistemazione) delle distanze non corrisponde all'originale distanza degli oggetti tra loro.

L'algoritmo alla base della MDS assegna delle distanze tra i punti, ed utilizza queste classi per mappare i punti non lineari in un semplice spazio a 2 o 3 dimensioni, in modo da preservare queste classificazioni e non le distanze originali (Shepard, 1966). Il procedimento lavora nel seguente modo: i punti sono inizialmente disposti a random nello spazio (in numero di dimensioni va deciso a priori), e la distanza tra i punti è confrontata attraverso una *monotonic regression* con le distanze della matrice dei dati originali, basata sulla funzione di stress. Il valore di stress indica quanto sono diversi tra loro la disposizione spaziale dei punti nel grafico e le classi nella matrice originale delle distanze. Per ottenere il valore più basso di stress ottenibile, vengono caricate molteplici ripetizioni della MDS procedura. In generale per valutare se la rappresentazione grafica dell'MDS è accettabile si usano i seguenti criteri:

- $Stress < 0.05$ il grafico MDS è un'eccellente fotografia della reale somiglianza tra i dati, senza alcuna possibilità di male interpretazioni
- $Stress < 0.1$ MDS corrisponde ad una buona rappresentazione dei dati senza un reale pericolo di male interpretazione
- $Stress < 0.2$ MDS è una potenziale fotografia della somiglianza tra loro dei dati, ma valori al di sopra di questa soglia dovrebbero essere confrontati con un'altra analisi per fare delle considerazioni più veritiere
- $Stress > 0.3$ indica che i valori nell'MDS plot sono stati posizionati arbitrariamente nello spazio. Quindi, bisogna adottare un'altra analisi per valutare e trarre delle considerazioni/conclusioni sulla similarità dei campioni.

7.6.2.2. Analysis of similarity (ANOSIM)

La seconda analisi bioinformatica effettuata sui dati ottenuti dalle metodologie molecolari è l'*analysis of similarity* (ANOSIM). L'ANOSIM è una procedura non parametrica che cerca di rilevare le differenze significative tra 2 o più gruppi, basandosi sulla distanza tra le misure (Clarke, 1993). La procedura confronta le classi tra le distanze tra i gruppi con le classi delle distanze all'interno dei gruppi. I valori di queste 2 tipologie di classi sono confrontate ed il risultante R del test statistico indica se c'è una netta separazione nella struttura della comunità ($R=1$), o se non c'è separazione ($R=0$). Valori $R > 0.75$ sono interpretati come ben separati;

$R > 0.5$ come separati fino a valori $R < 0.25$, che sono considerati come scarsamente separati (Clarke and Gorley, 2001).

7.6.2.3. Analisi statistica dei dati UNIVARIATA

Accanto alle analisi, descritte qui sopra, di tipo multivariata è stata eseguita un'analisi statistica univariata sui dati di profili elleroforetica ottenuti dall'ARISA, successivamente elaborati con R. Infatti, per avere un'idea globale quantitativa "*species richness*" del numero di *ribotype*, considerato come ogni banda, essi si possono sommare, raggruppare per il codice scelto, fare la media, ed analizzare come qualunque dato, con un'analisi statistica univariata. Per quest'analisi è stato usato SAS versione 9.1.

E' stata eseguita un'analisi di varianza multifattoriale, in cui l'intero set di dati è stato analizzato prima per i 4 parametri, poi con i test Ryan-Einot-Gabriel-Welsh Multiple range test e Tukey's Studentized Range (HSD) si è testato se, i diversi livelli di ciascuna variabile avessero delle differenze significative tra loro

8. Risultati e discussione

8.1. *Risultati parametri misurati prove in pieno campo*

8.1.1. Prova Rio Grande

8.1.1.1. Parametro Biomassa

La valutazione dello sviluppo vegetativo della pianta (biomassa) è stata saggiata soltanto nel primo anno di sperimentazioni (2006), in entrambe le varietà Rio Grande e Gordon. L'analisi di varianza a più fattori ha trovato delle differenze significative nelle 2 variabili indipendenti prese in esame: l'aggiunta di diversi livelli di compost e l'aggiunta di diversi livelli d'inoculo (Tabella 15).

Dai risultati ottenuti si nota chiaramente che il compost aggiunto in dose minore (C1) influisce in maniera significativamente positiva sullo sviluppo della biomassa, mentre sono inferiori le biomasse rispettivamente della dose maggiore e del controllo (Tabella 16, Figura 11). Risultati simili a quelli sopra citati sono stati trovati anche da Piazza *et al.*, 2005. Questo lavoro, condotto su un terreno a tessitura franco-argillosa (con una buona dotazione di sostanza organica, 2%) dimostra che l'aggiunta di compost migliora, sia la crescita vegetativa superiore, quando la pianta di pomodoro è allo stato fenologico della fioritura, sia lo stato fitosanitario, inteso come una maggiore taglia della pianta ed una maggiore copertura dei frutti. Quindi, il compost, aumentando la disponibilità di azoto minerale del suolo nel momento in cui è presente la coltura ha un effetto benefico sullo sviluppo della biomassa della pianta di pomodoro. Infatti, la disponibilità di azoto è un fattore condizionante lo sviluppo della coltura e del raccolto ottenibile, influenzandone la produzione e gli aspetti qualitativi, in quanto parte fondamentale delle molecole enzimatiche che presiedono a tutte le funzioni metaboliche vegetali (Silvestri e Siviero, 1991). Inoltre, nel nostro caso come nel lavoro di Piazza, la dose 1 di compost ha un effetto positivo (non significativo per i nostri dati) sulla produzione in tutti e tre i parametri misurati (produzione totale, produzione vendibile e resa produttiva). Mentre, se aggiunto in alte dosi determina una riduzione della produttività, dovuta probabilmente all'insorgere di squilibri di sviluppo (prolungamento della fioritura) e di fertilità. A questo punto, occorre precisare che la produttività non è correlata solamente alla

disponibilità di azoto minerale nel terreno, ma è legata soprattutto al contenuto di sostanza organica, che in un campo coltivato biologico può diventare una caratteristica intrinseca del terreno e può determinare una buona/alta produzione, come si è verificato nel nostro controllo 2006 e nel lavoro di Piazza.

Chiaramente più complicata, è l'interpretazione dei risultati e delle relazioni tra l'aggiunta dell'inoculo e gli effetti ottenuti sullo sviluppo vegetale. Infatti, sebbene, in alcuni casi, si sia già mostrato quanto e come l'inoculo di funghi micorrizici arbuscolari (AMF) e di batteri promotori della crescita (dall'inglese Plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) influiscano positivamente sulla biomassa (almeno il 34%) (Lekberg e Koide, 2005), è difficile dimostrare in condizioni di campo e generalizzare una qualsiasi relazione, di tipo additiva, sinergica o nociva tra l'assenza, la presenza, l'aumentare delle dosi dell'inoculo, con lo sviluppo vegetale. Come in uno studio focalizzato sull'interazione tra l'inoculo di un ceppo di AMF, di un batterio e di un fungo del suolo, entrambi fosfato solubilizzatori, ed i loro effetti sullo sviluppo vegetale della lattuga (Kohler *et al.*, 2007), è difficile dimostrare e quantificare una stretta relazione tra i livelli d'infezione delle radici-dose d'inoculo introdotta e l'effetto sulla biomassa, perché entrano in gioco le interazioni dei diversi gruppi di batteri e di funghi indigeni del suolo. Nel nostro caso, dove la quantificazione delle micorrize con metodi microscopici non ha rilevato differenze statisticamente significative tra la colonizzazione ed i diversi livelli d'inoculo, i trattamenti senza e con dose minore del consorzio microbico generano uno sviluppo vegetativo significativamente superiore rispetto alla dose maggiore. Ciò fa supporre che la microflora naturalmente presente sia molto più competitiva nello sfruttare le risorse nutritive del "suo" suolo, e a permettere alle piante un maggiore vigore vegetativo, di quanto riesca a fare quella dell'inoculo. E che quindi, non sia tanto importante valutare la quantità dell'infezione micorrizica, quanto, invece, sia fondamentale e specifico in ogni caso (dipendentemente soprattutto dal suolo e dalla pianta) conoscere la struttura e la diversità della comunità microbica. Tuttavia, la composizione delle popolazioni attive del suolo possono essere attualmente analizzate e studiate solo attraverso metodologie molecolari, poiché le metodologie microscopiche non consentono di discriminare in dettaglio se, quando e come l'infezione sia dovuta a più generi o specie (Redecker, 2000; Alkan *et al.*, 2006). Inoltre, risulta significativa l'interazione tra i 2 fattori, compost ed inoculo e la

biomassa, ciò vuol dire che, l'efficacia dell'introduzione di fertilizzanti ha un effetto sinergico a seconda delle combinazioni.

Tabella 15. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Three Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Biomassa
Replication	N. S.
Sampling Time (S)	$p < 0.0001$
Compost (C)	$p < 0.0001$
Interazione S x C	$p = 0.023$
Inoculo (M)	$p < 0.0001$
Interazione S x M	N. S.
Interazione C x M	$p < 0.0001$
Interazione S x C x M	$p < 0.0001$

Tabella 16. Dati sviluppo della biomassa prova Rio Grande 2006 in relazione all'introduzione dei fertilizzanti. Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha = 0.05$). La sigla *Sign* indica risultati significativi.

2006		BIOMASSA Proiez. Sup Fogliare
Fattore Compost	C0	58.810 b (1.699)
	C1	63.342 a (1.830)
	C2	60.235 ab (1.835)
Fattore Inoculo	M0	62.365 a (1.748)
	M1	61.903 a (1.888)
	M2	58.120 b (1.728)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	* Sign

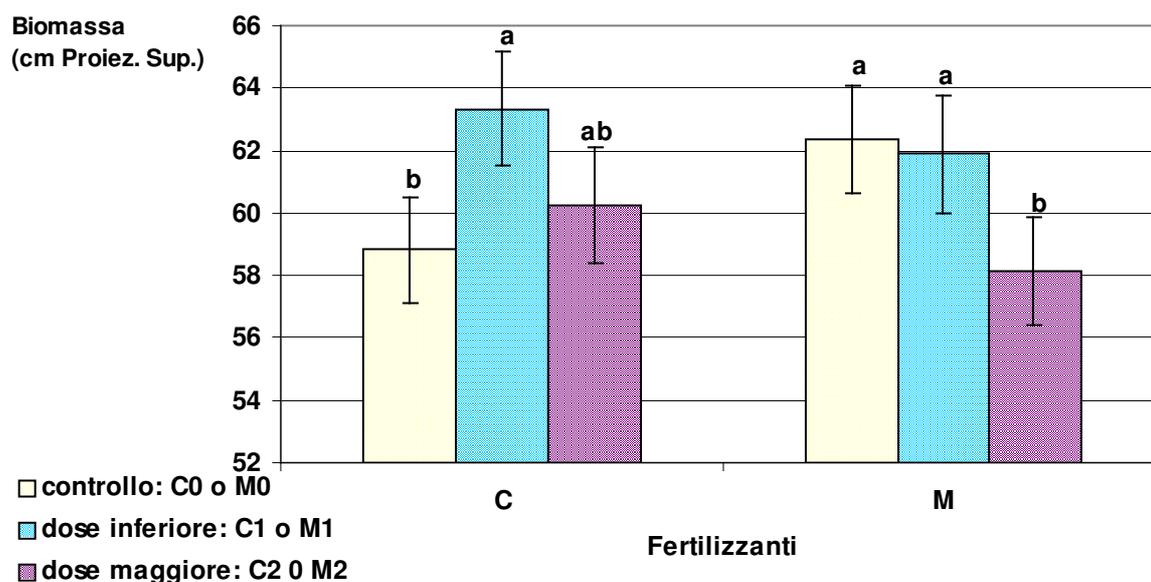


Figura 11. Variazione dello sviluppo della biomassa in relazione ai diversi dosaggi di fertilizzanti. Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha = 0.05$).

8.1.1.2. Parametro Produzione

La produzione di bacche di pomodoro, nei suoi tre parametri, produzione totale, vendibile ed il rapporto tra vendibile e totale, è stata misurata nei 3 anni di sperimentazione. Dapprima i dati di ciascun anno sono stati trattati con un'analisi di varianza a 2 fattori, i 2 fattori principali, l'aggiunta e le diverse dosi di compost e d'inoculo dove, considerando il disegno sperimentale adottato a blocchi completamente randomizzati, le 4 repliche sono i dati dei 4 blocchi. In un secondo momento, i dati di produzione dei singoli anni sono stati confrontati tra loro in un'analisi di varianza a 2 fattori, i fattori principali, combinata per il fattore anno. Come spiegato in dettaglio qui sotto, la produzione ha avuto un comportamento e ha risentito in maniera differente degli effetti dell'aggiunta di compost e d'inoculo nei singoli 3 anni. Ciò probabilmente è dovuto sia alle diverse condizioni climatiche dei singoli anni, sia all'effetto "continuità" dell'introduzione del compost ed all'effetto nel tempo della somministrazione dell'inoculo i primi 2 anni. In effetti, si è cercato di verificare e valutare l'esistenza di un eventuale effetto additivo e di un effetto tampone sia effettuando l'esperimento nello stesso campo per l'intera durata del progetto, senza rotazioni, sia somministrando gli stessi trattamenti (dose C) ogni anno.

Innanzitutto, bisogna sottolineare che, in relazione ai numerosi fattori che influenzano la coltura (tessitura del terreno, disponibilità di acqua e nutrienti), la produzione unitaria del pomodoro, nel convenzionale, è molto variabile, da punte superiori a 100-105 tonnellate per ettaro ($t \cdot ha^{-1}$) a rese bassissime di 5- 10 $t \cdot ha^{-1}$ in coltura asciutta. Comunque, la produttività media delle statistiche risulta essere intorno alle 45- 50 $t \cdot ha^{-1}$ nel convenzionale (Marzi, 1991). Nel nostro caso, possiamo stimare che la produzione di partenza, cioè quella che è in grado di sostenere il nostro campo (senza alcun ammendante) è di circa 49 $t \cdot ha^{-1}$ del controllo, perfettamente in media con quella dello studio sopra citato. Da questo risultato si può supporre che, le eventuali fluttuazioni e/o cambiamenti nella produzione siano dovuti, probabilmente o a fattori climatici ed ambientali o agli effetti del nostro esperimento.

Al contrario, in letteratura si trovano stime discordanti sulla produzione media del pomodoro in agricoltura biologica od a basso impatto ambientale rispetto all'agricoltura convenzionale: secondo Bulluck *et al.*, 2002, la fertilità e la produttività nelle aziende biologiche è maggiore rispetto ai valori delle aziende coltivate nel convenzionale, poiché c'è un grande contributo benefico, distribuito nel tempo, degli

ammendanti biologici, mentre secondo Clark *et al.*, 1999, la produzione del pomodoro nei diversi sistemi agricoli è comparabile.

Singoli anni

Nel primo anno di sperimentazioni, la produzione risultava significativamente differente sia per il fattore blocchi, sia per il fattore inoculo, per quanto riguarda la produzione vendibile, mentre il rapporto tra il raccolto vendibile e totale non è stato significativo per alcun fattore (Tabella 17).

Per quanto riguarda il fattore blocchi, troviamo che la produzione vendibile varia significativamente a seconda del blocco di appartenenza; in particolare il blocco 3 ha una produzione superiore rispetto al blocco 4 ed 1, mentre il blocco 2 ha una produzione intermedia. Poiché l'intero campo soggetto a sperimentazione era stato coltivato a grano tenero nella precedente stagione produttiva (2004-2005), la differenza non può essere attribuita alla storia colturale/avvicendamenti agricoli. Nel nostro caso, invece, la differenza è probabilmente dovuta alla posizione dei blocchi e a ciò che ne deriva (lavorazione e/o composizione del terreno disomogenea); infatti i blocchi con la minore produzione, non a caso sono localizzati rispettivamente ai bordi del campo sperimentale, potrebbero aver risentito del cosiddetto "effetto bordo". Qualunque sia la causa, l'effetto bordo o, ad esempio, un disomogeneo livellamento del terreno che, in un suolo argilloso come il nostro, può provocare ristagno idrico e quindi asfissia radicale, ciò che è importante notare è non tanto che ci siano delle differenze significative tra i blocchi nel 2006, quanto queste scompaiano negli anni successivi (2007-2008). Infatti, un possibile effetto nel tempo della coltivazione pomodoro su pomodoro su pomodoro della stessa *cultivar*, con gli stessi ammendanti, potrebbe essere una stabilizzazione della produzione tra i blocchi.

Per quanto riguarda il fattore inoculo e la produzione totale e vendibile, troviamo che il controllo e la dose 1 dell'inoculo hanno una produzione di pomodori maggiore rispetto alla dose 2 (Figura 12). Questo può essere spiegato con il fatto che l'aggiunta dell'inoculo in dose maggiore ha destabilizzato, peggiorandola, la fertilità biologica del suolo. Sebbene i valori della resa produttiva si comportino nello stesso modo nei confronti dell'inoculo, gli effetti indotti non sono significativi. D'altro canto, considerando i valori d'infezione micorrizica, rilevata con i metodi microscopici, bisogna dire che l'inoculo non ha indotto effetti significativi sulla colonizzazione, ma in generale la tendenza è in disaccordo con gli effetti sulla produzione, avendo il

valore di colonizzazione, rispetto alla dose 2 d'inoculo, il maggior numero di arbuscoli ed il secondo migliore per quanto riguarda l'indice di micorrizzazione. Comunque, i nostri risultati sono in accordo con quelli trovati nel lavoro di Farmer *et al.*, 2007, condotto allo scopo di valutare la persistenza e gli effetti dell'introduzione di diversi consorzi fungini micorrizici arbuscolari sulla produzione in campo di patata. In quello studio, nel primo anno di sperimentazioni, nessuna tipologia d'inoculo risulta manifestare degli effetti nei parametri misurati: produzione, qualità (contenuto di zuccheri e carotene) e la colonizzazione. Solo confrontando singolarmente (sempre nel primo anno) il controllo con alcune tipologie d'inoculo (2 su 5), per quanto riguarda la colonizzazione ed (1 su 5), per quanto riguarda il contenuto di carotene, sono stati trovati risultati significativi. Poiché l'efficacia e la riuscita dell'inoculazione dei AMF è un fenomeno molto complesso, gli autori hanno supposto che i risultati ottenuti non siano dovuti alla colonizzazione ed alla persistenza dell'inoculo introdotto, ma piuttosto all'interazione della competitività delle popolazioni introdotte nei confronti delle popolazioni microbiche indigene, con le caratteristiche ambientali e del suolo.

Tabella 17. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot
Replication	p<0.01	p<0.01	N.S.
Compost (C)	N. S.	N. S.	N.S.
Inoculo (M)	p<0.001	p<0.01	N.S.
Interazione C x M	N.S.	N.S.	N.S.

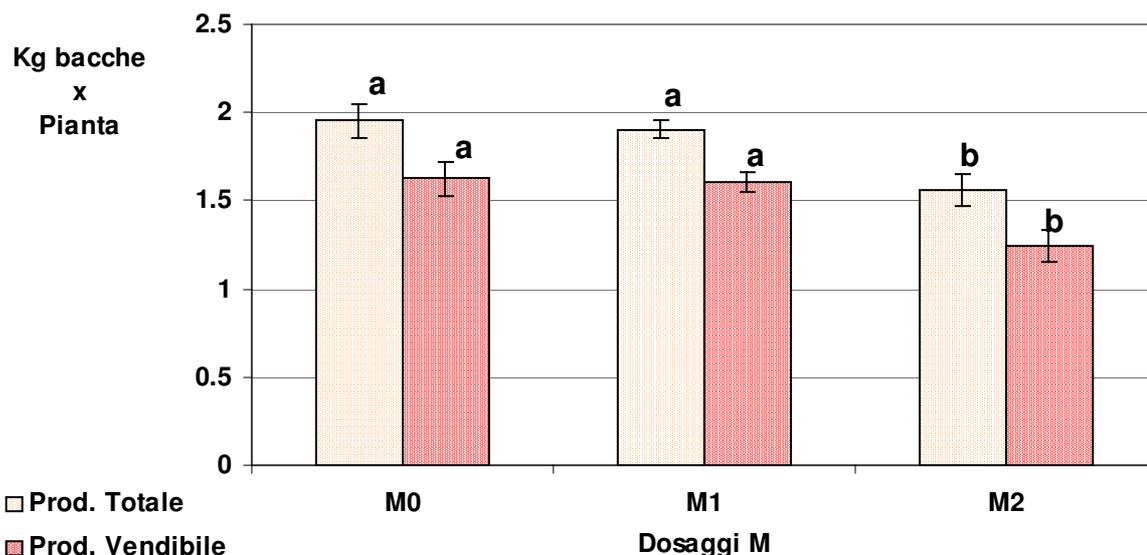


Figura 12. Variazione della produzione totale e vendibile in relazione all'introduzione dell'inoculo (M). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

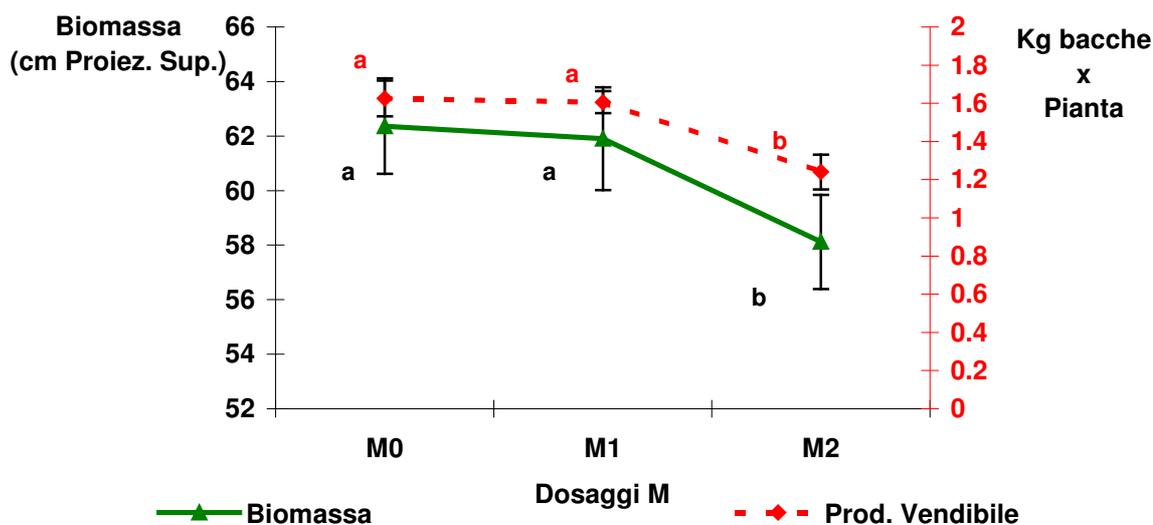


Figura 13. Variazione della produzione vendibile e dello sviluppo della biomassa in relazione all'introduzione dell'inoculo (M). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

Nel 2007, secondo anno di sperimentazioni, troviamo che la resa produttiva, cioè il rapporto tra la produzione vendibile e quella totale, varia significativamente con le diverse dosi di compost introdotte nel suolo, sia l'anno precedente sia lo stesso anno, se considero il possibile effetto additivo dei trattamenti ed il fatto che le fonti di azoto, disponibili con il compost possono richiedere tempi più lunghi per la mineralizzazione (Rinaldi *et al.*, 2003; Heeb *et al.*, 2006), così come potrebbe essere

una conseguenza dello sviluppo del micelio extra-radiale (Roldan *et al.*, 2007). In generale, si nota, guardando i valori di produzione totale e vendibile che la produzione per pianta ha valori maggiori rispetto a quelli ottenuti nel 2006. Invece, se considero i valori della resa si vede che, per quando riguarda il fattore inoculo ci sono valori simili a quelli del 2006, mentre per il fattore compost ci sono sia valori maggiori, sia minori rispetto a quelli dell'anno prima. Nello specifico (nel 2007), la resa del trattamento senza alcuna aggiunta di compost è significativamente maggiore rispetto al trattamento con la dose 1, mentre la dose 2 ha una posizione intermedia. Confrontando complessivamente i dati di produzione (Figura 15), si nota che la diminuzione della resa è dovuta all'aumentare della quota "scarto" in relazione alla dose 1 e 2 del fertilizzante. Quindi, quello che nel primo anno è tendenzialmente il dosaggio di compost più idoneo da somministrare, aggiungendolo per 2 anni consecutivi diventa il trattamento meno indicato (Figura 14). In realtà, la differenza nella percentuale di scarto (17% per il controllo, 49 % per la dose 1 e 34% per la dose 2) della produzione (Figura 16), potrebbe essere dovuta al fatto che la somministrazione di più anni consecutivi di compost ha provocato una irregolarità nella maturazione dei frutti, con minore resistenza alla sovrammaturazione ed un aumento di recettività e sensibilità di fronte agli agenti patogeni (Silvestri e Siviero, 1991; Rinaldi *et al.*, 2003).

Tabella 18. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattore	Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot
Replication	N. S.	N. S.	N. S.
Compost (C)	p=0.0128	N. S.	p=0.0378
Inoculo (M)	N. S.	N. S.	N. S.
Interazione C x M	N. S.	N. S.	N. S.

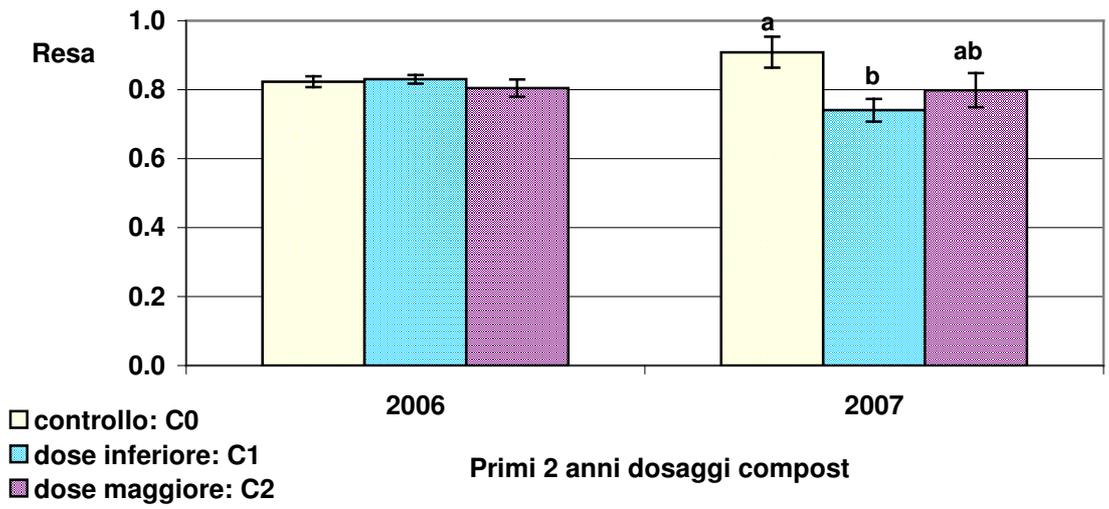


Figura 14. Variazione della resa produttiva nel 2006 e nel 2007 in relazione all'introduzione del compost (C). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

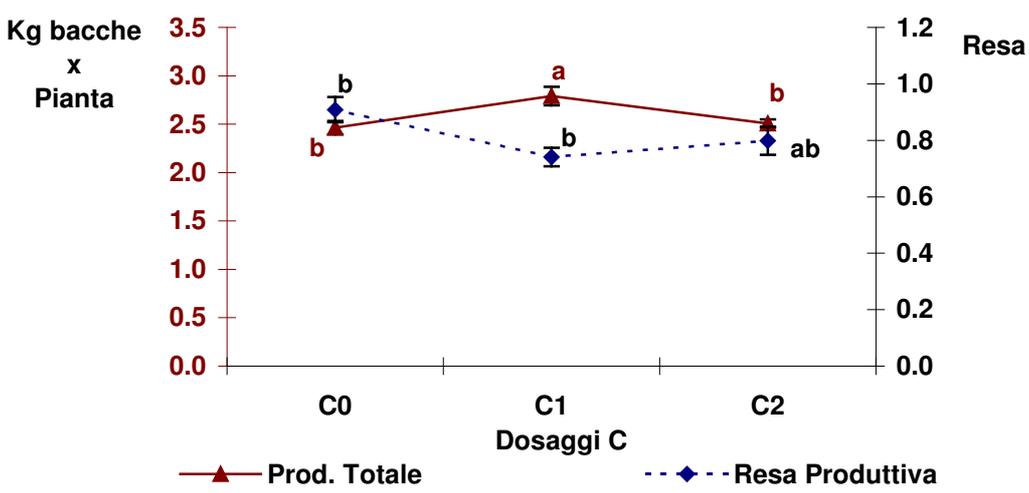


Figura 15. Variazione della produzione e della resa in relazione all'introduzione di compost (C). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

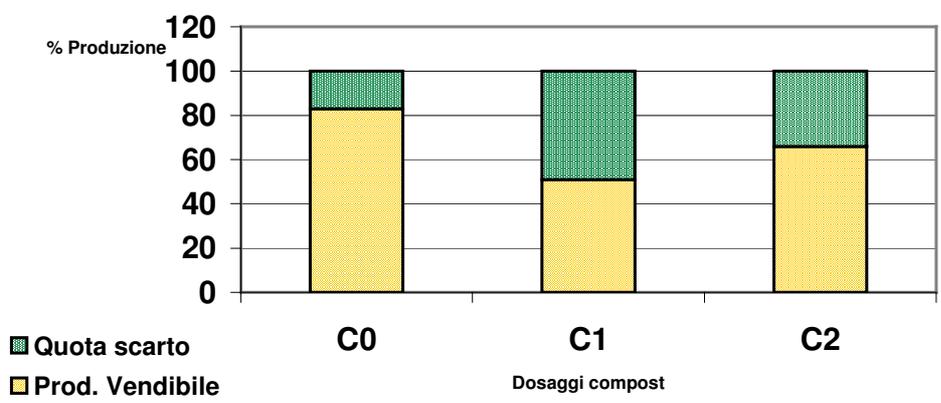


Figura 16. Variazione della percentuale della produzione vendibile e della quota scarto in relazione all'introduzione di compost (C).

Per quanto riguarda il terzo anno di sperimentazione e la produzione non si sono rilevate differenze significative in nessun fattore principale preso in esame (Tabella 19). Ciò che risulta molto evidente nel confronto tra i valori di produzione tra i 3 anni, è la diminuzione, pari a metà, della produzione, sia essa totale, vendibile o resa, dovuto alle differenti condizioni climatiche.

Tabella 19. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot
Replication	N. S.	N. S.	p=0.0307
Compost (C)	N. S.	N. S.	N. S.
Inoculo (M)	N. S.	N. S.	N. S.
Interazione C x M	N. S.	N. S.	N. S.

3 anni a confronto

Come anticipato sopra, nel confronto dei valori dei 3 anni risulta interessante come la produzione diminuisca nell'ultimo anno di sperimentazioni. Infatti, per quanto riguarda i valori di produzione totale e vendibile si vede una riduzione progressiva, partendo dal valore massimo registrato nel 2007, passando per il 2006, dove la riduzione è di circa 30% rispetto al 2007, e finendo con i valori del 2008, rispettivamente circa il 60%, per il totale ed 70%, per la quota vendibile, in meno (Figura 17). Per questi dati, produzione totale e vendibile, risulta significativa anche l'interazione tra l'anno ed il fattore inoculo: ciò sta a significare che i 2 fattori interagiscono tra loro e che nei 3 diversi anni c'è stato un differente effetto produttivo delle dosi d'inoculo, somministrate nel 2006, a seconda delle condizioni climatiche-ambientali e sperimentali del 2006, del 2007 e del 2008.

Considerando, invece, i valori di resa produttiva, si vede una riduzione vertiginosa tra i valori del 2006 e del 2007 e l'ultimo anno, 2008 di circa la metà (Figura 17). La spiegazione di questi risultati va ricercata considerando le condizioni climatiche avute nel 2008, e le loro conseguenze. Nello specifico, in quest'ultima stagione produttiva abbiamo registrato 246 mm di pioggia, quasi tutti concentrati nell'arco di circa 2 settimane, comprese tra fine Maggio-inizio Giugno, poco dopo aver effettuato il trapianto in campo. Mentre nei 2 anni precedenti erano caduti circa 120 mm di pioggia nell'arco dell'intera stagione produttiva, tanto che si è dovuto ricorrere all'irrigazione. Quindi il 2008, a causa delle piogge ravvicinate e del crearsi di un microclima umido a livello della fillosfera delle piantine, è stato un anno favorevole alla diffusione dell'agente patogeno della Peronospora del Pomodoro (*Phytophthora*

infestans), un fungo polifago appartenente alla famiglia delle *Peronosporaceae*. Inoltre, nell'agricoltura biologica, non potendo somministrare anticrittogamici ed antiperonosporici di sintesi, è fondamentale basarsi su "norme" di buona pratica agronomica come, adozione di ampi avvicendamenti colturali, impiego di varietà poco suscettibili, concimazioni azotate e potassiche equilibrate ed accurato drenaggio (Gengotti, 2006), norme che, per come era impostato il nostro esperimento, non è stato possibile adottare. Infatti, il nostro esperimento in campo non prevedeva rotazione colturale, ma prevedeva invece il ristoppio di pomodoro su pomodoro su pomodoro, in più, il suolo di natura argillosa, può aver causato un inadeguato drenaggio, ritenzione idrica e quindi asfissia radicale. Sebbene si sia cercato d'intervenire con soluzione idroalcolica di propoli e poltiglia bordolese (miscela di solfato di rame e calce), il nostro raccolto ha risentito molto dell'incidenza dell'infezione del patogeno (Tabella 21), circa il 12% delle piante è stato colpito. Sono stati riscontrati sintomi dell'infezione a vari livelli ed ai vari organi della pianta; dalle macchie decolorate irregolari delle foglie, che successivamente imbruniscono e si seccano diventando bruno-bronzeo, dai fusti che presentano striature longitudinali di colore bruno, in corrispondenza delle quali gli organi si spezzano, alle bacche che, già quando sono verdi manifestano aree edematose e alla fine si disidratano, interrompono la maturazione, si distaccano dalla pianta e marciscono (Silvestri e Siviero, 1991). Concentrandosi sulle sintomatologie fogliari abbiamo riscontrato che, del 12% di piante colpite, più della metà (54%) presentava una gravità tale dell'infezione (classi 3 e 4 D. I.), per cui la produzione è molto inferiore (Tabella 21). Quindi, in base a questi risultati, si può pensare che il patogeno sia stato una delle cause principali della riduzione drastica della produzione in quest'ultimo anno.

Tabella 20. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design Combined over Years) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot
Anno (A)	p<0.0001	p<0.0001	p<0.0001
A x Replication	N. S. (p=0.0539)	p<0.01	p=0.0469
Compost (C)	N.S.	N.S.	N.S.
Interazione A x C	N. S. (p=0.0595)	N.S.	p=0.0332
Inoculo (M)	N.S.	N.S.	N.S.
Interazione A x M	p<0.01	p=0.0169	N.S.
Interazione C x M	N.S.	N.S.	N.S.
Interazione A x C x M	N.S.	N.S.	N.S.

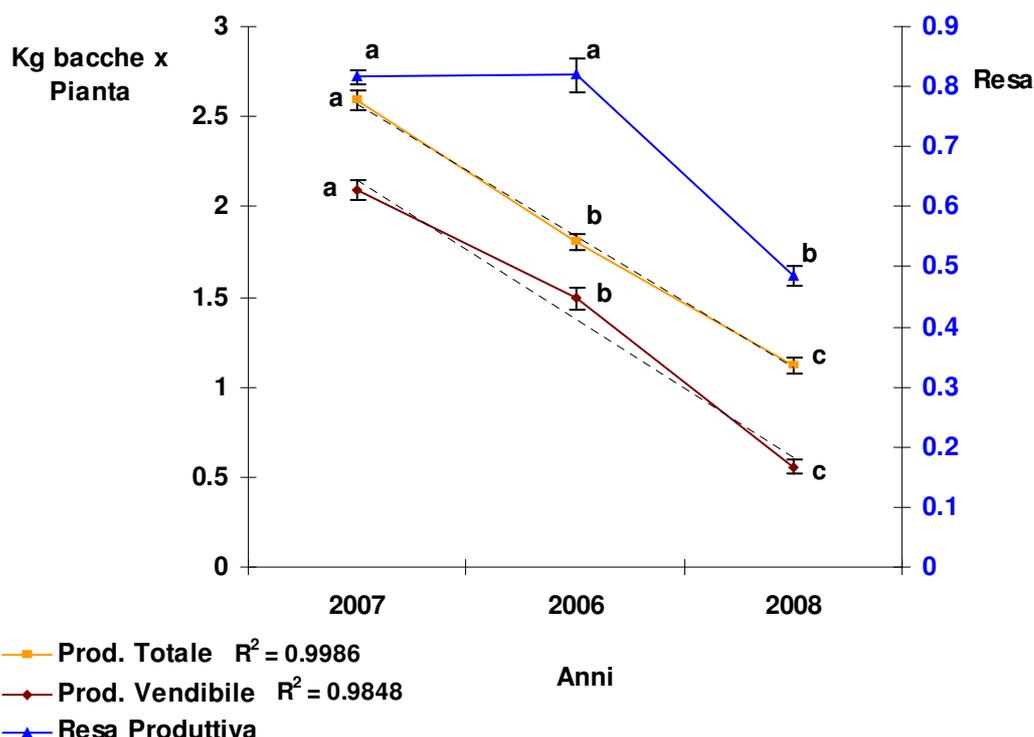


Figura 17. Variazione nei 3 anni di sperimentazione della produzione. Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$). Per la produzione totale e vendibile è riportata la retta di regressione lineare (linea tratteggiata) ed il coefficiente R^2 .

Tabella 21. Dati diffusione dell'infezione e severità sintomatologie (D. I.) del patogeno.

2008		Severità Sintomi			
No. Piante Totali	No. Piante affette	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
603	72	0	33	5	34

8.1.1.3. Parametro Micorrize

I dati d'infezione fungina di ciascun anno sono stati sottoposti ad un'analisi di varianza a 3 fattori: la data di campionamento, l'aggiunta e le diverse dosi di compost e d'inoculo. In un secondo momento, i dati di micorrizzazione dei singoli anni sono stati confrontati tra loro in un'analisi di varianza con i 3 fattori principali, combinata per il fattore anno.

L'infezione micorrizica è stata misurata con 2 metodi microscopici, il metodo di McGonigle (McGonigle *et al.*, 1990) ed il metodo di Trouvelot (Trouvelot *et al.*, 1986). Sebbene questi 2 metodi microscopici si basino su principi differenti, hanno dato risultati concordanti. Infatti, le differenze tra i valori d'infezione sono entrambe significative per gli stessi fattori (compost, inoculo), o l'una è significativa e l'altra non lo è di poco (in base al *p value*), od entrambe non sono significative.

Prima di esaminare e discutere i dati dei singoli anni, è importante sottolineare come in ogni anno sia significativo, o per il numero di arbuscoli per lunghezza di radice osservata, o per l'indice di micorrizzazione, il fattore data di campionamento (Figura 18 e Figura 19). Infatti, in tutti e 3 gli anni riscontriamo un netto aumento della colonizzazione radicale nella seconda data di campionamento rispetto alla prima data. Ciò può essere riconducibile sia alla tempistica necessaria all'instaurarsi della simbiosi fungo-pianta (la perturbazione della competizione tra la comunità microbica introdotta con l'inoculo e la microflora naturalmente presente nel suolo), sia al fatto che il grado e l'efficacia della colonizzazione dipende dallo stato fenologico della pianta, soprattutto per quanto riguarda il numero di arbuscoli (Landwehr *et al.*, 2002). E' infatti risaputo che le piante, cambiando la composizione e la quantità delle sostanze rilasciate dalle radici, gli essudati radicali, in relazione all'età od al loro stato fisiologico, determinano cambiamenti rilevanti nella struttura della comunità micorrizica e rizobatterica (Lynch e Whipps, 1990) e, quindi, anche sulla sopravvivenza e sull'azione delle popolazioni microbiche introdotte artificialmente (Lerner *et al.*, 2006) o naturalmente presenti (Picard e Bosco, 2003; Picard *et al.*, 2000). Lerner *et al.* (2006) hanno dimostrato, confrontando tra loro l'efficacia di inoculi di *Azospirillum brasilense* (rizobatterio azoto fissatore libero e che produce fitormoni vegetali) in sistemi radicali cresciuti su due suoli diversi, con diversi sistemi di crescita ed a differenti età della pianta ospite, che proprio quest'ultimo è l'unico fattore che influisce sulla struttura della popolazione batterica introdotta.

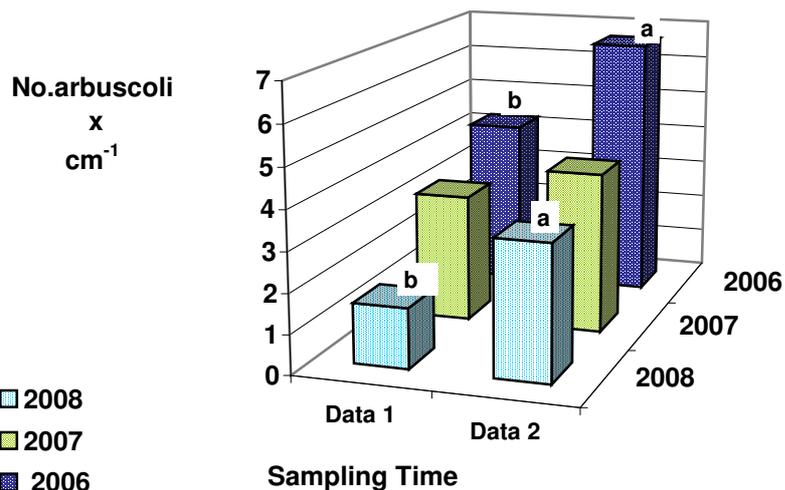


Figura 18. Variazione della colonizzazione micorrizica arbuscolare (No. arbuscoli) nei 3 anni in relazione alla data di campionamento (Sampling Time). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

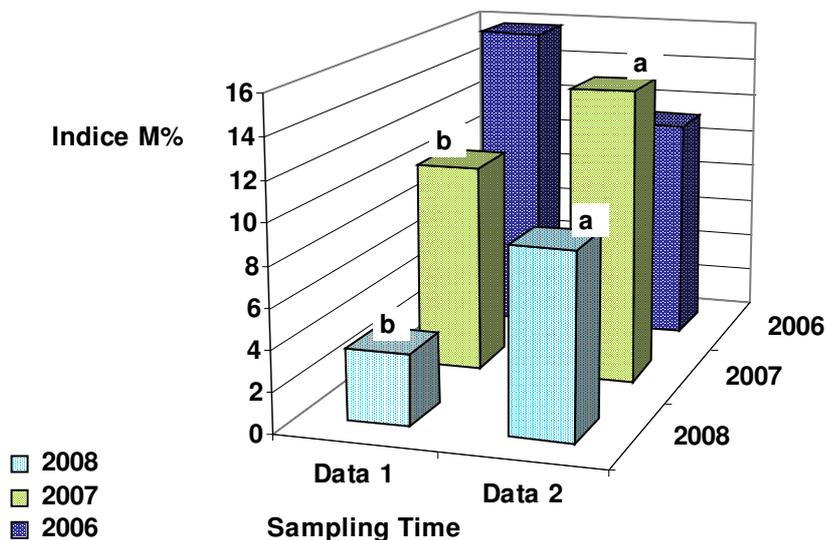


Figura 19. Variazione della colonizzazione micorrizica arbuscolare (Indice M%) nei 3 anni in relazione alla data di campionamento (Sampling Time). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

Singoli anni

Il primo anno di sperimentazioni (2006) è stato caratterizzato dalle seguenti condizioni sperimentali:

- trapianto della coltivazione di pomodoro succeduta al grano tenero;
- temperatura molto alta, ma con circa 120 mm di pioggia e l'irrigazione non c'è stato stress da siccità;
- infine è opportuno ipotizzare che il suolo, grazie ai 15 anni alle spalle di gestione secondo i canoni dettati dal metodo biologico, fosse molto ricco sia

nella microflora, sia per quanto riguarda la disponibilità delle sostanze nutritive.

La ricchezza del suolo si è rivelata nei valori d'infezione micorrizica ottenuti, in cui l'analisi di varianza non ha trovato differenze significative né per il fattore compost né per il fattore inoculo (Tabella 22). E' importante notare che, considerando i valori d'infezione nei 3 livelli del fattore inoculo, il controllo è stato quello con l'indice di micorrizzazione maggiore (anche se la differenza non è significativa) rispetto ai trattamenti in cui è stato introdotto. Questo dimostra che il suolo era densamente popolato da funghi micorrizici arbuscolari, in grado di colonizzare le radici delle piantine di pomodoro Rio Grande, e che l'inoculo con i suoi funghi micorrizici, non è riuscito a competere con quelli indigeni del suolo, ma anzi ne provoca una diminuzione, destabilizzando il naturale equilibrio microbico presente. C'è da ricordare che il controllo, non solo è stata la combinazione più colonizzata dai funghi micorrizici arbuscolari, ma è stata anche quella significativamente maggiore nella produzione totale, vendibile e nello sviluppo della biomassa. Ciò vuol dire che in questo primo anno di sperimentazione, la combinazione pomodoro *cultivar* Rio Grande-comunità micorrizica del suolo è risultata maggiormente efficace rispetto all'inoculo (ma anche al fattore compost). Infatti, la scelta della *cultivar* del pomodoro è stata presa, in base al suggerimento dell'agricoltore, che sebbene non abbia mai introdotto inoculi di alcun genere e valutato la comunità microbica del suolo, si era accorto empiricamente che il vigore e la produttività di questa varietà (nelle sue condizioni) era superiore ad altre provate nel passato.

Tabella 22. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Three Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattore	No. A x cm⁻¹	M%
Replication	N. S.	N. S.
Sampling Time (S)	p=0.0455	N. S. (p=0.0955)
Compost (C)	N. S.	N. S.
Interazione S x C	N. S.	N. S.
Inoculo (M)	N. S.	N. S.
Interazione S x M	N. S.	N. S.
Interazione C x M	N. S.	N. S.
Interazione S x C x M	N. S.	N. S.

Nel secondo anno di sperimentazioni in campo, come è avvenuto anche per il 2006, l'infezione micorrizica non è stata influenzata in maniera significativa né dal fattore compost, né dall'inoculo (Tabella 23).

E' interessante sottolineare come, già solo dopo 1 anno dopo la somministrazione dell'inoculo, ci sia stato un cambiamento nell'effetto tendenziale tra l'inoculo e l'infezione micorrizica stimata. Infatti, il controllo non è stato più il trattamento con la maggiore colonizzazione, anzi è stato quello meno colonizzato (Figura 20). Probabilmente il ristoppio del pomodoro, stessa varietà, ha aumentato la forza competitiva delle popolazioni microbiche aggiunte nei confronti di quelle indigene in accordo con Picard *et al.* (2008) sul mais, e, quindi, l'infezione da noi stimata in questi 2 trattamenti potrebbe essere dovuta alla sinergia tra le 2 comunità fungine. Questa maggiore biodiversità nella rizosfera, potrebbe spiegare anche l'aumento (in maniera tendenziale) della resa produttiva, rispettivamente in relazione alla dose 1 e 2 dell'inoculo. Purtroppo, senza alcun analisi molecolare, in grado di discriminare specificatamente le popolazioni dell'inoculo da quelle indigene, ciò detto sopra, rimane, per ora soltanto un'ipotesi. Comunque, ciò potrebbe significare che soltanto al 2° anno dopo la somministrazione d'inoculo in dose 1 od in dose 2, l'ampiezza delle popolazioni si avvicina alla giusta quantità in grado d'indurre un effetto (Strigul e Kravevchenko, 2005). Tuttavia, nel 2007 si è registrata una diminuzione generale della colonizzazione da parte dei funghi micorrizici arbuscolari (solo di questo parametro), dovuta ad un peggioramento delle condizioni pedoclimatiche.

Tabella 23. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Three Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattore	No. A x cm⁻¹	M%
Replication	N. S.	N. S.
Sampling Time (S)	N. S. (<i>p</i> =0.1260)	<i>p</i>=0.0483
Compost (C)	N. S.	N. S.
Interazione S x C	N. S.	N. S.
Inoculo (M)	N. S.	N. S.
Interazione S x M	N. S.	N. S.
Interazione C x M	N. S.	N. S.
Interazione S x C x M	N. S.	N. S.

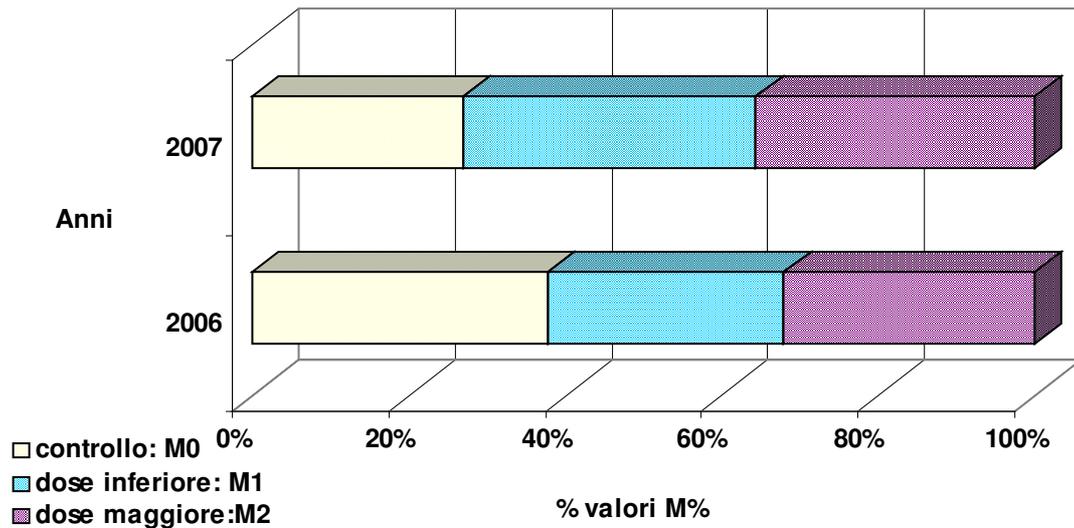


Figura 20. Variazione della colonizzazione micorrizica arbuscolare (% valori) in relazione all'introduzione d'inoculo (M) nel 2006 e nel 2007.

Nell'ultimo anno di sperimentazioni (2008) è risultato significativo ciò che era tendenzialmente positivo l'anno precedente e cioè il fattore inoculo in relazione alla colonizzazione micorrizica riscontrata con i metodi microscopici (Tabella 24). Infatti, la colonizzazione corrispondente alla dose maggiore d'inoculo è stata più elevata rispetto al controllo e significativamente maggiore, per l'indice di micorrizzazione, mentre tendenzialmente maggiore per il numero di arbuscoli, rispetto a quella riscontrata nelle radici corrispondenti alla dose minore (Figura 21). Quindi, in generale possiamo dire che l'inoculo in dose 2 ha aumentato l'infezione fungina, non tanto per il numero di arbuscoli (differenze non significative), ma quanto per la presenza e l'abbondanza di tutte e tre le strutture peculiari delle micorrize, quali arbuscoli, ife e vescicole. In secondo luogo è stata significativa, per entrambi i metodi di conta microscopici adottati, l'interazione tra i 2 fattori, compost ed inoculo, ciò vuol dire che, alcuni trattamenti, dati dalle diverse combinazioni dei dosaggi di compost ed inoculo (9), hanno avuto un effetto sinergico. Inoltre, poiché il trattamento controllo era significativamente inferiore, si dimostra che alcuni trattamenti sono stati più efficaci nell'aumentare la colonizzazione micorrizica; in particolare le combinazioni estreme incrociate (senza o con la dose maggiore di compost o d'inoculo e viceversa) sono risultate le migliori. Infine, anche se non in maniera significativa, si è osservata una corrispondenza nei valori di produzione totale, vendibile e resa, dove il controllo si è confermato il peggiore tra i trattamenti.

Questi risultati sono chiaramente comprensibili, tenendo in considerazione il fatto che la stagione produttiva del pomodoro del 2008 è stata caratterizzata d'abbondanti

piogge ravvicinate che hanno causato l'insorgere e la diffusione del patogeno *Phytophthora infestans*. Infatti, i bio-inoculi sono utilizzati sempre più spesso e risultano più efficaci in condizioni di stress, siano essi dovuti a fattori abiotici o biotici (Turnau e Haselwandter, 2002; Smith e Read, 1997; Piculell *et al.*, 2008), poiché molti dei geni repressi dalle AMF codificanti proteine, si attivano in risposta a situazioni di stress (Hohnjec *et al.*, 2005). Ad esempio, l'inoculo di micorrize e/o di batteri probiotici del suolo risulta efficace nel caso di stress idrico in condizioni di scarsità di acqua (Kaya *et al.*, 2003) o nel caso di salinità dell'acqua per l'irrigazione (Al-Karaki, 2006), oppure in condizioni di scarsa disponibilità dei nutrienti (Artursson *et al.*, 2006; Gamalero *et al.*, 2004; Sharma e Johri, 2003) o nel caso di stress chimico-fisico del suolo dovuto ad una coltivazione intensiva e con l'uso sconsiderato di fertilizzanti e pesticidi di sintesi (Hobbs, 2007; Timsina e Connor, 2001). Per quanto riguarda gli stress biotici, l'inoculo di probiotici (AMF e/o PGPR) è impiegato frequentemente e in maniera soddisfacente, in agricoltura biologica o nei sistemi agricoli a basso input, per contrastare gli effetti negativi dovuti a patogeni di varia natura, cioè nel biocontrollo (Ji *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2000b; Barea *et al.*, 1998; Minuto *et al.*, 2006). In particolare, contro i membri della famiglia delle *Peronosporaceae*, come *Phytophthora*, si stanno sempre più adottando strategie di controllo biologico, come l'introduzione di antagonisti batterici o micorrizici (Pozo *et al.*, 2002; Tofazzal Islam *et al.*, 2005), poiché oramai questo patogeno risulta resistente a molti fungicidi. Nel nostro caso, considerando e classificando la severità dei sintomi indotti dal patogeno *Phytophthora infestans* sull'apparato aereo delle piante di pomodoro, è stata rilevata un'importante relazione di proporzionalità inversa tra la colonizzazione micorrizica e la severità dell'infezione del patogeno in base alla percentuale di foglie attaccate (Figura 22 e Figura 23). Infatti le piante inoculate con la dose maggiore, corrispondente alle radici significativamente maggiormente colonizzate, sono quelle in cui, secondo il "Disease Index" (D. I.) (Liu *et al.*, 1995), sono state colpite meno severamente dal patogeno (D. I. pari a 7.50%), così le radici del controllo che sono state le seconde meno colonizzate con un indice intermedio (8.99%), ed, infine, le radici corrispondenti alla dose 1 dell'inoculo, caratterizzate da una colonizzazione significativamente inferiore, hanno mostrato una maggiore severità dei sintomi (10.56%) (Tabella 25). Questo dimostra che i funghi micorrizici e gli altri agenti di biocontrollo presenti nell'inoculo (*P. fluorescens* PA28, *Bacillus subtilis* BA41, *Streptomyces* sp. SB14, and *Trichoderma viride* TH03) e nel suolo

(M0) hanno agito e contrastato il patogeno. In accordo con i nostri risultati sono i lavori di Lingua *et al.* (2002) e Pozo *et al.* (1999) e Zheng *et al.* (2005), dove l'inoculazione dei funghi micorrizici ha determinato una diminuzione ed effetti moderati dell'infezione del patogeno.

Tabella 24. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Three Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla N.S. indica risultati non significativi.

Fattore	No. A x cm ⁻¹	M%
Replication	N. S.	N. S.
Sampling Time (S)	p<0.001	p<0.001
Compost (C)	N. S.	N. S.
Interazione S x C	N. S.	N. S.
Inoculo (M)	N. S.	p=0.0296
Interazione S x M	N. S.	N. S.
Interazione C x M	N. S.	p<0.01
Interazione S x C x M	N. S.	N. S.

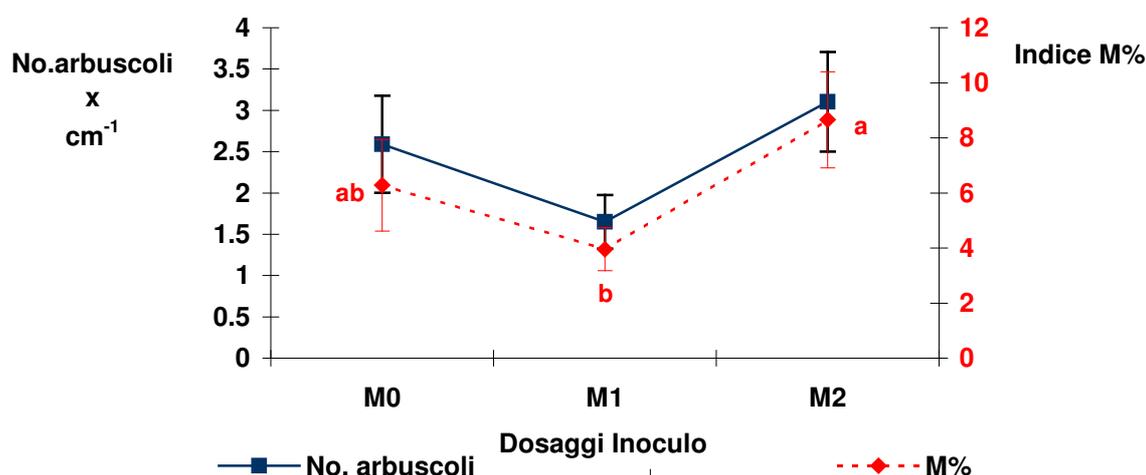
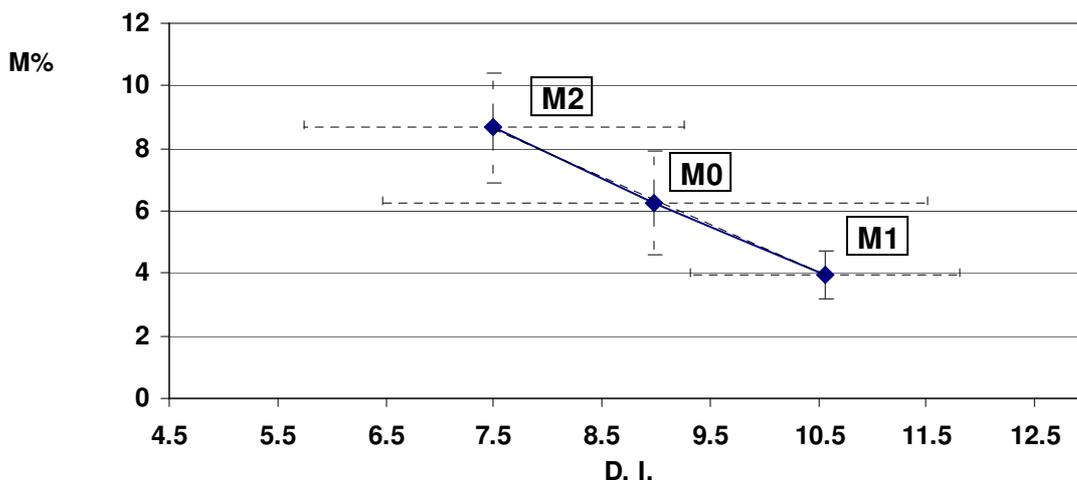


Figura 21. Variazione della colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (No. arbuscoli e M%) in relazione all'introduzione d'inoculo (M). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

Tabella 25. Dati infezione patogeno (D. I.) in relazione all'introduzione dei fertilizzanti. Tra parentesi è indicato l'errore standard (E.S.).

2008		PATOGENO Disease Index (Liu et al., 1995)
Fattore Compost	C0	9.582 (2.241)
	C1	9.917 (1.977)
	C2	7.497 (1.649)
Fattore Inoculo	M0	8.99 (2.519)
	M1	10.56 (1.252)
	M2	7.50 (1.758)



----- Lineare (Regressione D. I. e M%) $y = -1.5354x + 20.144$
 $R^2 = 0.9995$

Figura 22. Relazione di proporzionalità diretta tra i dati d'infezione del patogeno (D. I.) e la colonizzazione di funghi micorrizici arbuscolari (M%). Sotto il grafico sono indicati l'equazione della retta di regressione ed il coefficiente R^2 . Nel grafico (in riquadro) sono indicati i dosaggi d'inoculo (M) corrispondenti.

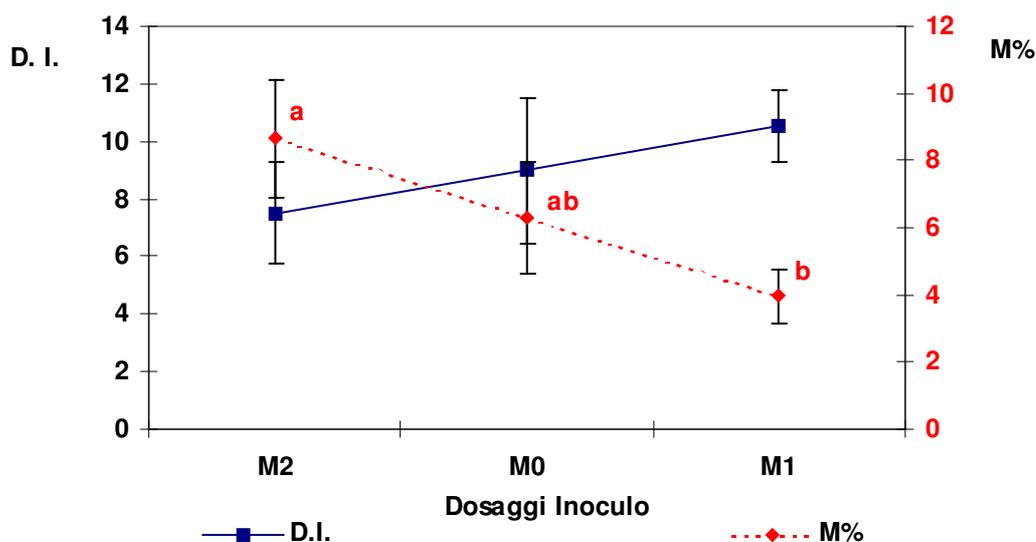


Figura 23. Variazione dell'infezione del patogeno (D. I.) e della colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (M%) in relazione all'introduzione dell'inoculo (M). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

3 anni a confronto

Come già accennato, confrontando tra loro i valori dei 3 anni si nota in maniera evidente ed, infatti, è significativa, la diminuzione della colonizzazione dei AMF con il passare del tempo (Tabella 26). L'andamento di questa diminuzione è risultata diversa tra le stime dell'infezione dei 2 metodi adottati (Figura 24). Per quanto riguarda la quantificazione, rilevata con il metodo di McGonigle si è registrato

un calo progressivo partendo dal valore massimo del primo anno, passando per il valore intermedio del 2007 e finendo con il valore del 2008. L'ANOVA in quest'analisi ha trovato differenze tra il valore d'infezione del 2006, significativamente maggiore rispetto ai valori di colonizzazione degli altri 2 anni successivi, non significativamente diversi tra loro. Per quanto riguarda l'indice di micorrizzazione i valori d'infezione, si sono mantenuti alti nei primi 2 anni, ed infatti l'ANOVA ed il successivo test di Tukey ($\alpha=0.05$) non hanno trovato differenze e li collocano nello stesso gruppo, mentre c'è un repentino ed improvviso calo, di circa la metà, della colonizzazione micorrizica arbuscolare corrispondente all'ultimo anno. La differenza riscontrata tra le 2 metodologie nella diminuzione dell'infezione potrebbe indicare che la presenza e l'abbondanza degli arbuscoli, gli organi dove avviene effettivamente lo scambio (soprattutto di nutrienti, acqua e fonti di carbonio) tra la pianta ed il fungo, è maggiormente influenzata ed è più sensibile all'interazione pianta-fungo, alle perturbazioni ambientali, alle condizioni sperimentali, di quanto non siano le ife e le vescicole (Mullen e Schmidt, 1993; Landwehr *et al.*, 2002). Concentrandosi sul risultato in comune ai 2 metodi di quantificazione, cioè il brusco calo della presenza di micorrize nel 2008, bisogna nuovamente considerare le conseguenze delle condizioni climatiche. Infatti, i 247 mm di pioggia caduti nell'arco di 2 settimane, subito dopo il trapianto, oltre all'insorgere dell'infezione causata da *Phytophthora*, potrebbero aver determinato condizioni deleterie per la sopravvivenza dei funghi micorrizici arbuscolari. Infatti, l'eccessiva pioggia, in un terreno argilloso come il nostro ha determinato un cattivo drenaggio e, di conseguenza, asfissia radicale, condizione che ostacola lo sviluppo delle micorrize. Come dimostrato da Burke *et al.*, 2002, la mancanza di ossigeno, in quel lavoro dovuta alla profondità, crea un declino della colonizzazione delle micorrize e, inoltre, la diminuzione del potenziale redox, causata anch'essa dalla limitazione di ossigeno, inibisce la formazione e l'attività delle ife extra-radicali. Queste considerazioni, ci fanno capire quanto sia tutto collegato in un ecosistema così complesso come la rizosfera; infatti la presenza di meno micorrize, e quindi, di meno ife extra-radicali, non consente di migliorare, sia per azione diretta meccanica, sia per la produzione di glicoproteine (Wright e Upadhyaya, 1999), la porosità del terreno, fondamentale, se esso è di natura argillosa. Thomas *et al.*, 1986 in un lavoro condotto su un suolo argilloso dimostra che la colonizzazione micorrizica, migliorando la porosità del suolo, migliora naturalmente anche la permeabilità dell'acqua ed, in conseguenza, anche la massa

radicale. Quindi c'è una diretta relazione tra l'aumento della massa radicale ed aumento della colonizzazione. Nel nostro caso, poiché è evidente e statisticamente confermato che la diminuzione della colonizzazione è stato proporzionale alla diminuzione della resa produttiva, si è avuta una relazione di diretta proporzionalità tra la colonizzazione micorrizica arbuscolare e la produzione di pomodoro nei 3 anni (Figura 25).

Tabella 26. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design Combined over Sampling Time and Years) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Anno (A)	p<0.0001	p<0.0001
Sampling Time (S) (x A)	p<0.01	p<0.01
Interazione Replication x A x S	N.S.	N.S.
Compost (C)	N.S.	N.S.
Interazione A x C	N.S.	N.S.
Interazione S x C	N.S.	N.S.
Inoculo (M)	N.S.	N.S. (p=0.0662)
Interazione A x M	N.S.	N.S.
Interazione S x M	N.S.	N.S.
Interazione C x M	N.S.	N.S.
Interazione A x C x M	p=0.0257	p<0.01
Interazione A x S x C X M	N.S.	N.S.

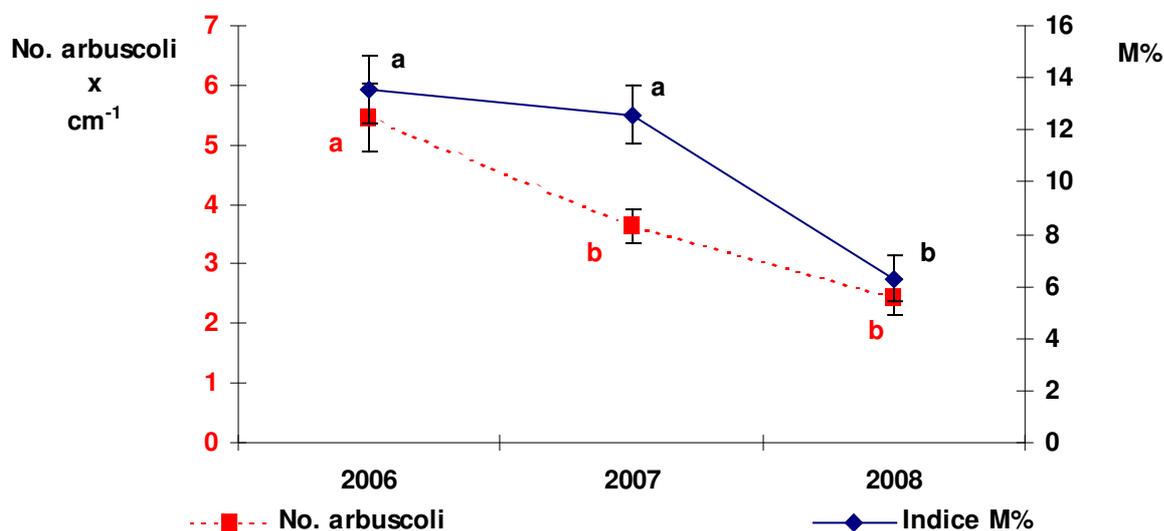


Figura 24. Variazione della colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (No. arbuscoli e M%) in relazione all'anno di sperimentazione. Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

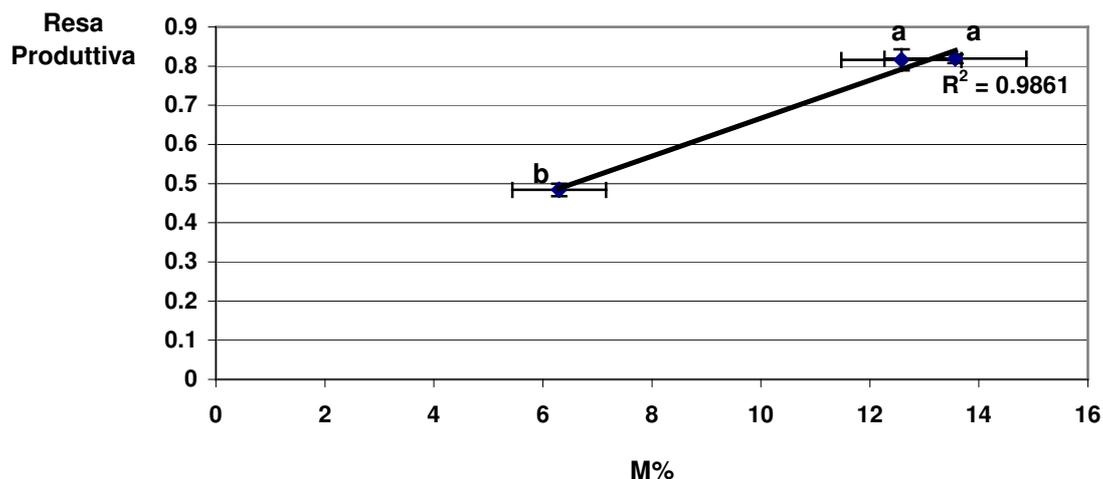


Figura 25. Regressione lineare tra i dati indice micorrizzazione (M%) e resa produttiva dei 3 anni (Rio Grande). Nel grafico è riportato il coefficiente R^2 . Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

8.1.1.4. Parametro Qualità

La valutazione della qualità delle bacche di pomodoro è stata effettuata per gli anni 2007 e 2008, e non per il 2006, dove, invece è stata misurato lo sviluppo della biomassa.

Infatti, dopo aver sperimentato il primo anno la valutazione dello sviluppo della biomassa, un parametro prettamente interessante dal punto di vista agronomico, si è deciso di focalizzarsi sulla qualità del prodotto, caratteristica invece molto importante dal punto di vista commerciale.

La qualità di un campione rappresentativo della produzione vendibile è stata valutata con diversi parametri di qualità quali peso medio della bacca, diametro polare ed equatoriale, contenuto di solidi solubili (misurato in gradi °Brix), pH, acidità titolabile e conducibilità elettrica (solo nel 2008), sono stati misurati ed analizzati con un'analisi di varianza a 2 fattori: i diversi dosaggi di compost e d'inoculo. In un secondo momento i dati dei 2 singoli anni sono stati confrontati tra loro con un'analisi di varianza a 2 fattori, i soliti, in più combinata per il fattore anno.

Come si vedrà in dettaglio qui sotto, nelle analisi dei 2 singoli anni non sono state trovate differenze significative tra i diversi dosaggi di compost od inoculo, soprattutto, per quanto riguarda le caratteristiche organolettiche della bacca. Questo risultato è in accordo con Mitchell *et al.* (2007) e Toor *et al.* (2006), dove, sebbene altre caratteristiche qualitative come il contenuto dei flavonoidi nel primo lavoro e la concentrazione di macronutrienti e di antiossidanti nel secondo, risultano significativamente differenti a seconda delle fonti di azoto (convenzionale o biologico

ammendante) somministrate, nei valori del peso medio della bacca, del contenuto di solidi solubili non sono differenti. Inoltre nel lavoro di Mitchell *et al.* (2007), in cui i trattamenti, le diverse fonti di azoto sono molto diversi tra loro (più di quanto non lo siano i nostri trattamenti), l'acidità titolabile ed il pH risultano significativamente diverse solo in un trattamento, e quindi si può dire che le diverse fonti di fertilizzanti possono influire significativamente sul contenuto di macronutrienti ed antiossidanti, ma non sugli altri parametri qualitativi. Neppure confrontando la qualità della produzione di pomodori coltivati in 3 siti diversi, con diverse gestioni di concimi ed irrigazione, non si sono trovate differenze significative nel contenuto di solidi solubili e nell'acidità titolabile (Stellacci *et al.*, 2006).

Singoli anni

Innanzitutto, bisogna dire che nel 2007 il fattore compost non ha influenzato in maniera significativa nessuno dei parametri di qualità analizzati (Tabella 27). In generale, nonostante le dimensioni medie della bacca, sono risultate pressoché uguali, ciò che cambia leggermente è stato il peso medio, diminuendo all'aumentare dei dosaggi di compost. E poiché il peso della bacca aumenta con la maturazione, in seguito all'aumentare del contenuto di acqua, ciò potrebbe provare il ritardo della maturazione dovuto all'aumentare della disponibilità azotate a lenta cessione (Toor *et al.*, 2006). Dai risultati emerge che il controllo è stato il trattamento tendenzialmente migliore anche per le caratteristiche organolettiche. Infatti, è stato il trattamento con consistenza minore, ed è risaputo che la consistenza si abbassa con la maturazione dei frutti, con il contenuto di solidi solubili (°Brix) più alto e l'acidità titolabile intermedia. Bisogna ricordare che per gli aspetti qualitativi riguardanti il gusto, il contenuto di zuccheri (compreso nel contenuto di solidi solubili) ed acidi organici ed il loro rapporto, sono fondamentali nel conferire il sapore dolce-acido del pomodoro (De Bruyn *et al.*, 1971; Stevens *et al.*, 1977). Generalmente un alto contenuto di zuccheri ed un relativamente alto contenuto di acidi organici sono necessari per una bacca dal buon sapore. Un alto contenuto di acidi ed un basso contenuto di zuccheri conferiscono alla bacca un sapore acido, mentre un alto contenuto di zuccheri ed un basso contenuto di acidi così come pochi zuccheri e pochi acidi rendono il pomodoro insipido (Grierson e Kader, 1986). Il valore di pH è rimasto invece il medesimo in tutti i 3 dosaggi di C, ed 4.6, perfettamente in media con i valori riscontrati negli ultimi anni.

Per quanto riguarda il confronto tra i parametri di qualità e le diverse dosi d'inoculo non sono state trovate differenze significative in nessun parametro, ad eccezione del diametro polare della bacca, caratteristica abbastanza importante, in quanto il pomodoro da industria è caratterizzato e contraddistinto per la sua forma allungata. In particolare, è risultato più lungo il frutto corrispondente al controllo ed, inoltre, anche se non in maniera significativa, è risultato più alto il peso medio, il contenuto di solidi solubili, ed il rapporto tra solidi solubili ed acidità.

Tabella 27. Fattori principali e risultati (p value) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla N.S. indica risultati non significativi.

Fattori	Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)	°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Replication	N. S.	p=0.0488	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Compost (C)	N. S.	N. S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Inoculo (M)	p=0.0446	p<0.01	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Interazione C x M	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Nel 2008, ultimo anno di sperimentazioni in campo e secondo anno di valutazione della qualità, l'analisi di varianza ha riscontrato differenze significative tra i valori di qualità corrispondenti ai 4 blocchi sperimentali, mentre non sono state trovate differenze significative, ad eccezione del diametro polare medio della bacca, per gli altri fattori principali in tutti i parametri di qualità misurati (Tabella 28).

In generale, considerando il fattore compost, è emerso che i valori di alcuni parametri come i diametri (polare ed equatoriale), la consistenza, e l'acidità titolabile si sono comportati come l'anno precedente e, quindi, il controllo è stato tendenzialmente il trattamento migliore. Invece altri parametri, come il contenuto di solidi solubili, il pH, e la conducibilità elettrica, il trattamento con dose maggiore ha mostrato valori leggermente maggiori rispetto agli altri 2.

Per quanto riguarda il confronto tra i dati di qualità ed i diversi dosaggi d'inoculo si sono trovate differenze significative nel parametro lunghezza media della bacca. In particolare, il controllo e la dose minore d'inoculo hanno avuto valori di lunghezza maggiori rispetto alla dose 2. Tuttavia, non trovando differenze significative negli altri parametri, ma anzi in alcuni come i gradi Brix, l'acidità titolabile e la conducibilità, ed avendo i trattamenti con l'inoculo con valori maggiori, si potrebbe concludere che l'inoculo ha stabilizzato e leggermente aumentato la qualità.

Tabella 28. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)	°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)	Cond (mS cm ⁻¹)
Replication	N. S.	p<0.01	p=0.0391	p=0.0140	N.S.	N.S.	p=0.0296	N.S.
Compost (C)	N. S.	N. S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Inoculo (M)	N. S. (p=0.06)	p<0.01	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Interazione C x M	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

2 anni a confronto

Nel confronto dei parametri di qualità della produzione vendibile del 2007 e 2008, quello che è emerso in maniera prepotente è stata la differenza tra i dati dei 2 anni. Infatti, sebbene nei confronti singoli dei 2 anni non ci siano state differenze significative, nel confronto complessivo tutti i parametri hanno avuto valori significativamente diversi tra un anno e l'altro (Tabella 29, Figura 26). Per quanto riguarda i caratteri qualitativi dell'aspetto della bacca come il peso, i diametri (polare ed equatoriale) e la consistenza, il 2008 è stato caratterizzato da un frutto significativamente più piccolo, più pesante e di consistenza inferiore. Sapendo che il peso medio della bacca aumenta e la consistenza diminuisce con l'avanzare maturazione (a causa della metabolizzazione delle pectine, in seguito alla quale si verifica lo sfaldamento delle lamelle mediane ed all'idrolisi della cellulosa) e considerando il fatto che nel 2008 il campionamento per le analisi di qualità è stato effettuato nell'ultima data di raccolta (mentre nel 2007 nella penultima), si può supporre che le differenze nei dati ottenuti siano state la causa del campionamento non parallelo tra i 2 anni. Soprattutto, il fatto che la consistenza media della bacca nel 2008 sia diminuita del 20%, induce a pensare che le bacche, o al momento della raccolta od al momento delle analisi, siano state oltre lo stato di maturazione ottimale. Considerando i parametri organolettici della qualità risulta che il 2008 è stato caratterizzato da un frutto significativamente maggiore nel contenuto di solidi solubili, nell'acidità titolabile e con un pH più acido. Quindi la differenza nei valori di qualità dei 2 anni, si è tradotta in un effettivo peggioramento della qualità nel 2008, che come il calo della produzione e dell'infezione dei funghi micorrizici arbuscolari può essere stato causato dalle avverse condizioni climatiche, dall'infezione del patogeno *Phytophthora infestans* e, come già detto, dal campionamento e dalle analisi di un prodotto in stato di sovrammaturazione.

Per quanto riguarda i confronti tra i valori di qualità dei 2 anni ed il fattore compost non ci sono state differenze significative a riprova di ciò detto sopra (Mitchell *et al.*, 2007 ; Toor *et al.*, 2006) ed a dimostrazione del fatto che una buona dotazione di nutrienti al momento del trapianto può consentire la realizzazione di una produzione di pomodoro qualitativamente valido (Rinaldi *et al.*, 2003). Inoltre è da sottolineare che è risultata significativa l'interazione compost per anno per contenuto di solidi solubili (°Brix); cioè i diversi dosaggi di compost si comportano in maniera differente nei 2 anni. In particolare, nel 2008 il contenuto di solidi solubili aumenta con l'aumentare dell'aggiunta di compost, mentre nell'anno precedente si ha che il valore con Brix maggiore corrisponde al controllo, quello intermedio corrisponde al dosaggio 2 di compost e quello minore corrisponde alla dose 1.

Per quanto riguarda i confronti tra i valori di qualità dei 2 anni ed il fattore inoculo si sono avuti valori significativamente differenti nei parametri a riguardo la dimensione della bacca ed il peso; in generale il controllo ha valori maggiori rispetto a quelli corrispondenti all'inoculo in dose 2. Quindi il controllo è stato caratterizzato da bacche più grandi, ma, poiché non ci sono state differenze significative negli altri parametri organolettici, si può dire che l'inoculo non ha influito negativamente nella qualità della produzione. Inoltre, le caratteristiche qualitative dell'aspetto della bacca sono molto importanti per i distributori commerciali, ed invece sono di secondaria importanza per il consumatore di prodotti biologici, rispetto alla qualità del prodotto, in termini di gusto e di contenuto di nutrienti, vitamine ed antiossidanti, al costo ed all'impatto ambientale (Grierson e Kader, 1986).

Tabella 29. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design Combined over Years) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)	°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Anno (A)	p<0.0001						
A x Replication	N. S.	p<0.01	N. S.	N. S.	p<0.01	N. S.	p<0.01
Compost (C)	N. S.						
Interazione A x C	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	p=0.0364	N. S.	N. S.
Inoculo (M)	p<0.01	p<0.0001	p=0.0460	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
Interazione A x M	N. S.						
Interazione C x M	N. S.						
Interazione A x C x M	N. S.	p=0.0331	N. S.				

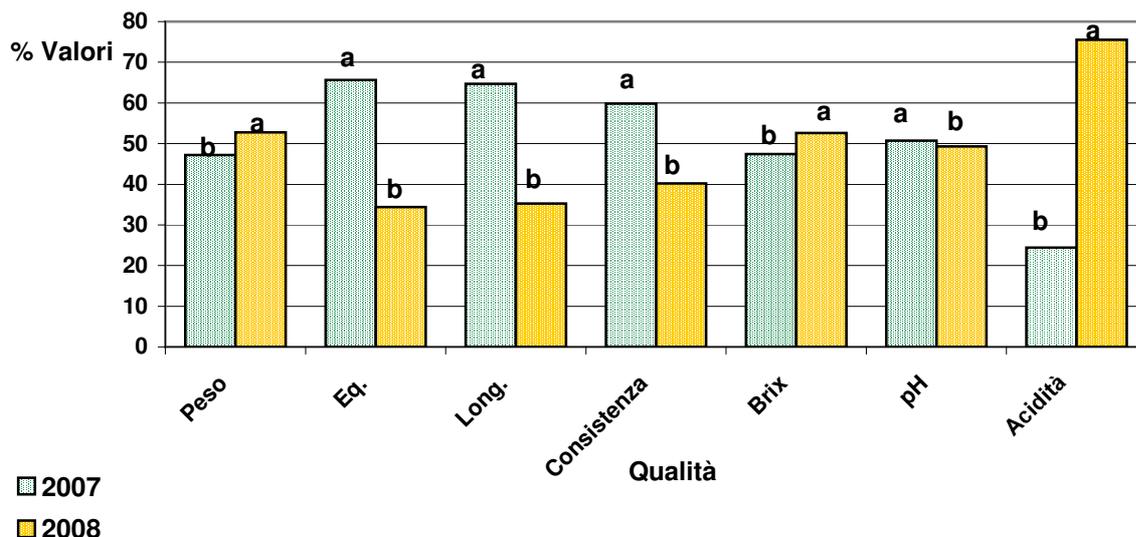


Figura 26. Variazione dei dati di qualità (% valori) in relazione all'anno di sperimentazione. Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

8.1.2. Prove varietà

8.1.2.1. Gordon 2006

Parametro Biomassa

La valutazione dello sviluppo vegetativo della pianta (biomassa) è stata misurata nel primo anno di sperimentazioni (2006), anche per la varietà Gordon. L'analisi di varianza ha trovato differenze significative nei 2 fattori principali presi in esame: l'aggiunta di diversi livelli di compost e l'aggiunta di diversi livelli d'inoculo (Tabella 30). Tenendo in considerazione i risultati ottenuti per la cv Rio Grande, è importante notare quale sia e come sia l'influenza (positiva o negativa) della dose di questi 2 ammendanti. Le 2 varietà di pomodoro hanno manifestato effetti diversi dello sviluppo della biomassa. Ciò può essere ovvio, tenendo in considerazione il fatto che, anche tra diverse *cultivar* della stessa specie vegetale, le esigenze nutritive, in termini di quantità delle risorse azotate disponibili nel suolo, possono essere diverse, tanto più tra 2 varietà come le nostre: Rio Grande e Gordon che sono rispettivamente una varietà di pomodoro da industria e l'altra di pomodoro da insalata. Inoltre, essendo diverse tra loro sia per la forma e dimensione della bacca, sia per lo sviluppo dell'apparato radicale e per il rigoglio vegetativo, hanno inevitabilmente diversi fabbisogni della concimazione azotata.

Nella varietà Gordon ha avuto un effetto positivo sullo sviluppo vegetativo della pianta l'aggiunta di entrambi gli ammendanti nel livello maggiore, in maniera

significativamente positiva, per quanto riguarda il compost rispetto al controllo ed alla dose minore, e tendenzialmente positiva, per quanto riguarda l'inoculo (Figura 27). Anche in questo caso, non c'è una diretta relazione con la quantificazione della colonizzazione micorrizica, a ribadire il concetto che, probabilmente, sebbene si usi spesso lo sviluppo della biomassa come indice per valutare l'efficacia della colonizzazione, esso non è sempre un buon indicatore (Li *et al.*, 06).

Tabella 30. Fattori principali e risultati (*p* value) dell'ANOVA (Three Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Biomassa
Replication	N.S.
Sampling Time (S)	p<0.0001
Compost (C)	p<0.01
Interazione S x C	p=0.0001
Inoculo (M)	N.S.
Interazione S x M	N.S.
Interazione C x M	N.S.
Interazione S x C x M	N.S.

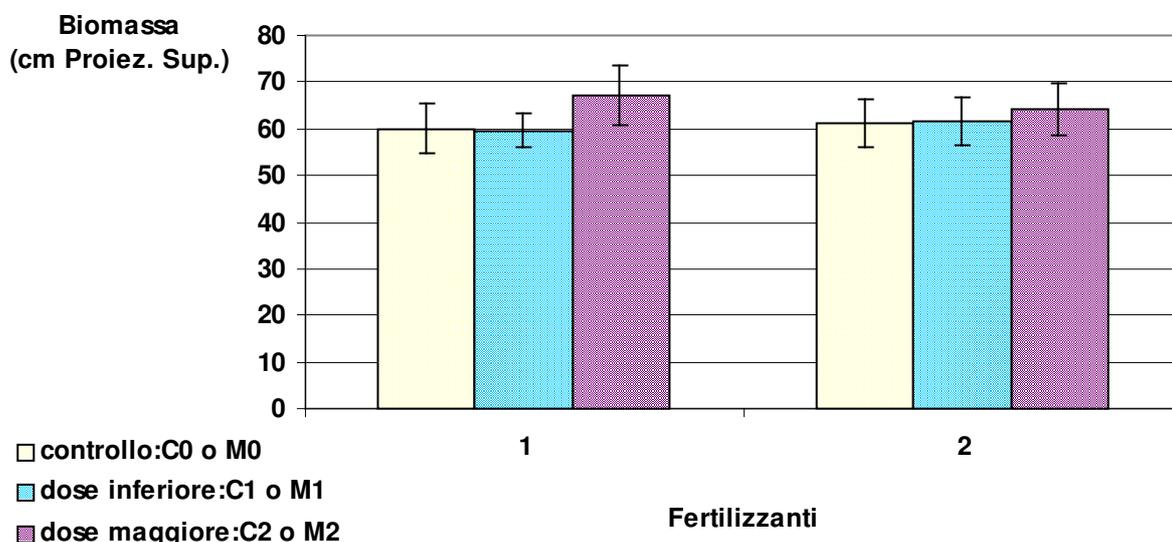


Figura 27. Variazione dello sviluppo della biomassa in relazione all'introduzione dei fertilizzanti.

Parametro Produzione

Poiché la prova Gordon era stata allestita allo scopo di testare eventuali differenze, rispetto alla cv Rio Grande, negli effetti indotti dagli ammendanti aggiunti nello sviluppo della biomassa e nell'infezione micorrizica, il disegno sperimentale è stato progettato e realizzato di un solo blocco, e, quindi non è stato possibile

effettuare sui dati di produzione alcun analisi statistica a più di fattori. In generale, considerando i dati di produzione delle 9 combinazioni di trattamenti, si può dire che c'è stata una buona resa produttiva, da un valore massimo del 90% ad un minimo del 73%. Per quanto riguarda le aggiunte di compost e d'inoculo ed i valori di produzione, si può stimare che, possano aver influenzato positivamente la produzione, avendo il controllo un valore pari a 78% (il penultimo valore) di resa produttiva e per la produzione totale rispettivamente il penultimo e terz'ultimo valore (Figura 28). Soprattutto l'aggiunta di compost sembra aver influenzato positivamente la produzione, così come è avvenuto per lo sviluppo della biomassa.

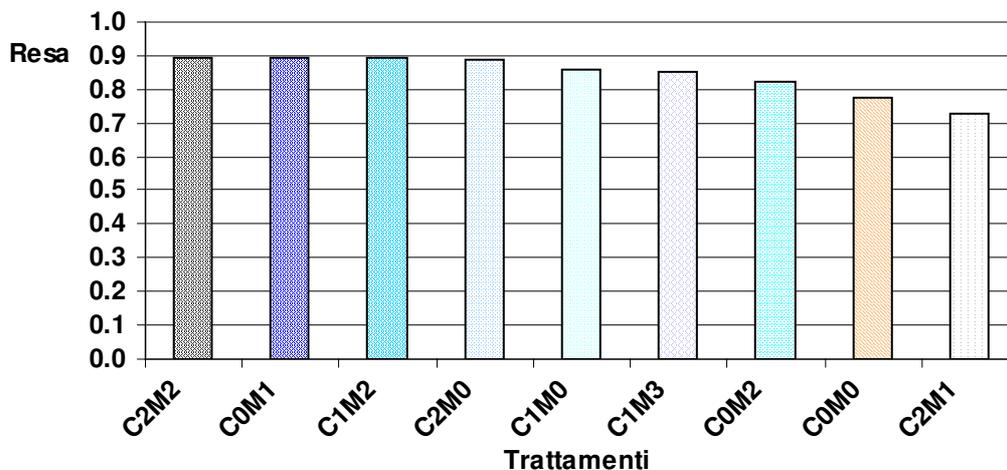


Figura 28. Variazione della resa produttiva a seconda del trattamento sperimentale, combinazione dei fattori compost (C) e inoculo (M).

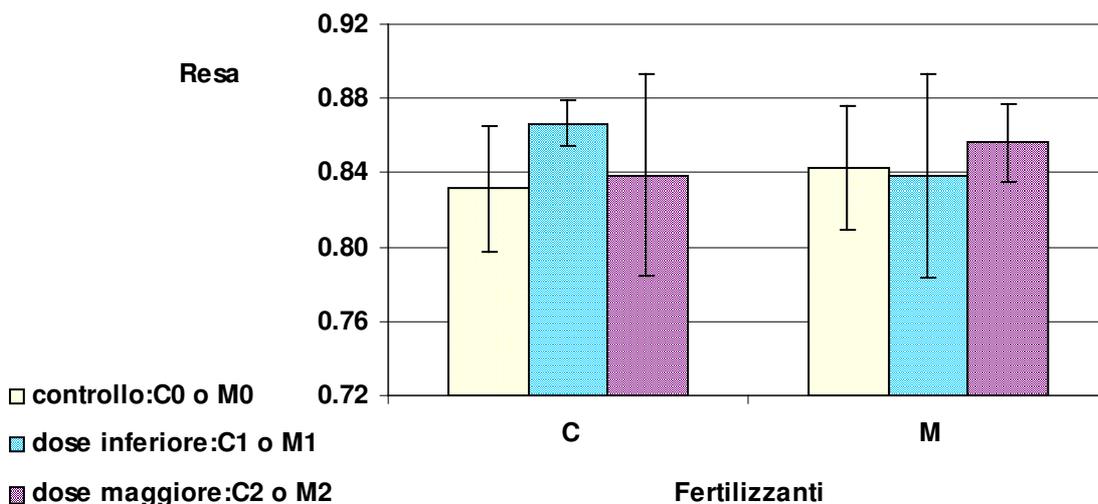


Figura 29. Variazione della resa produttiva in relazione all'introduzione dei fertilizzanti.

Parametro Micorrizzazione

Innanzitutto bisogna precisare che per la cv Gordon non è stato possibile inserire il fattore data di campionamento nell'analisi di varianza, poiché entrambe le data di campionamento erano composte da poche repliche. Comunque, considerando i valori d'infezione di tutti i trattamenti, si nota un aumento della colonizzazione nei campioni corrispondenti allo stato fisiologico più avanzato della pianta, l'inizio della fruttificazione.

Per il parametro micorrizzazione, l'analisi statistica non ha evidenziato alcuna differenza significativa tra i valori corrispondenti alle diverse dosi di compost ed inoculo introdotte nel suolo (Tabella 31). E' importante notare, come, in analogia con la varietà Rio Grande:

- le 2 metodologie di quantificazione, numero di arbuscoli su cm (McGonigle *et al.*, 1990) e l'indice di micorrizzazione (Trouvelot *et al.*, 1986), abbiano dato risultati concordanti;

- siano stati simili gli effetti tendenziali del compost e dell'inoculo (Tabella 32).

Infatti, per il fattore compost il controllo è risultato il trattamento maggiormente colonizzato, seguito dal trattamento con dose 1 ed, infine dal trattamento con dose 2. Per il fattore inoculo, il controllo è stato il trattamento con la maggiore infezione micorrizica riscontrata, seguito dal trattamento con dose 2, ed infine da quello corrispondente alla dose 1 (Figura 30). Quindi, il suolo era ricco di funghi micorrizici arbuscolari, in grado di colonizzare efficacemente le radici delle piante di pomodoro cv Gordon e l'unico effetto, non significativo, che l'inoculo introdotto è riuscito ad indurre è una diminuzione dell'infezione, verosimilmente dovuta alla competizione tra le popolazioni indigene ed introdotte artificialmente (van Veen *et al.*, 1997). Come detto sopra, non c'è stata una relazione di proporzionalità diretta tra livelli di colonizzazione e lo sviluppo della biomassa: comunque, si può concludere che il trattamento con dose 2 d'inoculo ha avuto una biomassa tendenzialmente maggiore. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che i funghi introdotti nell'inoculo in dose elevata siano riusciti a colonizzare maggiormente la rizosfera ed abbiano stimolato leggermente la proliferazione della parte aerea della pianta.

Tabella 31. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Replication	N.S.	N.S.
Compost (C)	N.S.	N.S.
Inoculo (M)	N.S.	N.S.
Interazione C x M	N.S.	N.S.

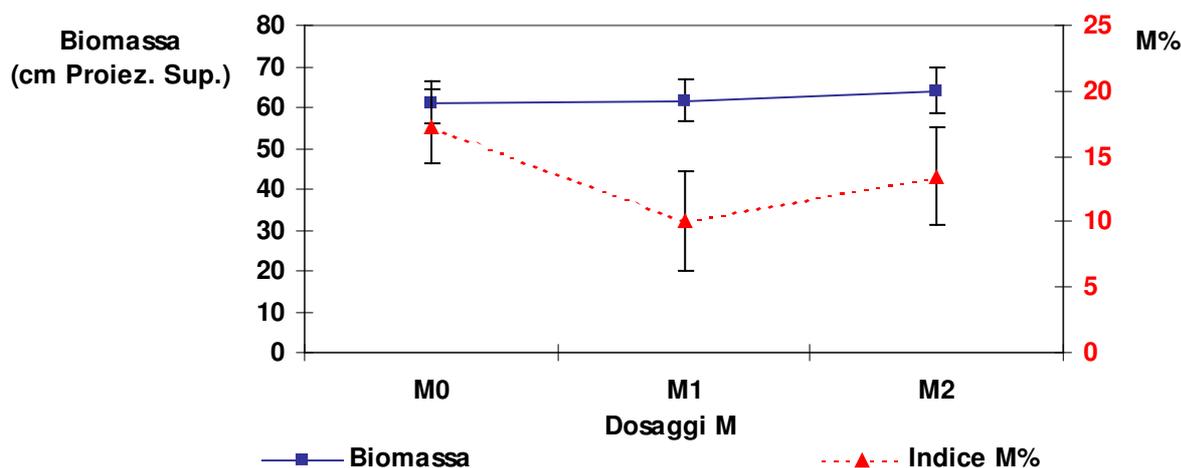


Figura 30. Variazione dello sviluppo della biomassa e della colonizzazione micorrizica (M%) in relazione all'introduzione dell'inoculo (M).

Tabella 32. Dati misurazioni qualità Prova Gordon 2006. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi. La sigla *Sign* indica risultati significativi.

2006		AMF		BIOMASSA
		No. A x cm ⁻¹	M%	Proiez. Sup Fogliare
Fattore Compost	C0	3.360 (0.487)	18.850 (3.212)	60.070 b (5.395)
	C1	2.457 (0.829)	12.667 (3.255)	59.610 b (3.685)
	C2	2.245 (0.889)	9.250 (3.406)	67.155 a (6.329)
Fattore Inoculo	M0	3.073 (0.585)	17.267 (2.845)	61.115 (5.198)
	M1	2.187 (0.707)	10.033 (3.844)	61.698 (5.163)
	M2	2.802 (0.965)	13.467 (3.726)	64.021 (5.515)
Interazione Compost * Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S
Fat Sampling Time	S1	-----	-----	39.116 b (0.906)
	S2	-----	-----	85.441 a (2.334)
Interazione Sam. Time*Compost	S*C	-----	-----	* Sign
Interazione Sam. Time*Inoculo	S*M	-----	-----	N.S
Interazione Compost*Inoculo*Sam.Time	S*C*M	-----	-----	N.S

8.1.2.2. 3 linee Prioritarie nelle 2 location sperimentali (2007 e 2008)

Nel 2007 e nel 2008 3 linee, già messe in campo e sottoposte a prove sperimentali precedenti nei campi sperimentali (coltivati secondo il metodo convenzionale) in dotazione all'azienda Metaponto Agrobios s.r.l., a Metaponto (MT), riguardanti la produttività e la qualità della produzione, sono state saggiate anche a Bondeno. Queste linee sono state definite "prioritarie" e scelte per continuare la sperimentazione, in quanto tra le 11 linee saggiate nel 2006 (Picard *et al.*, 2007) erano state quelle che avevano ottenuto i risultati più interessanti a riguardo della colonizzazione micorrizica. Per questo, in questa prova durata 2 anni ci si è focalizzati sull'infezione micorrizica.

Parametro Produzione 2008

La produzione delle 3 linee prioritarie è stata saggiata solo nell'ultimo anno di sperimentazioni in campo, con un'analisi di varianza a 2 fattori: le linee ed i 2 elementi (pianta inoculata e non). Inoltre, sia per i valori di produzione totale, sia di produzione vendibile, è stato fatto un test T di Student per confrontare i 2 elementi di ciascuna linea (uno inoculato ed uno no). Questi confronti a coppie non hanno dato risultati significativi, quindi la somministrazione o meno dell'inoculo non ha influito sulla produzione. Sebbene non si siano trovate delle differenze significative (Tabella 33), valutando i valori della produzione vendibile e della resa produttiva, bisogna evidenziare che le linee 9 e 5 sono risultate più produttive rispetto alla linea 7.

In analogia con la prova Rio Grande anche le piante di pomodoro della cv Red Setter, sono state colpite nel 2008 dall'infezione del patogeno *Phytophthora infestans*. In generale, si può dire che questa varietà è stata colpita meno severamente rispetto alla cv Rio Grande. Infatti, è stato minore il numero di piante appartenenti alle classi del *Disease Index* (D. I.) maggiori (37% piante appartenenti alle classi 3 e 4 del D. I. rispetto al 54% della cv Rio) (

Tabella 34).

Tabella 33. Fattori principali e risultati (p value) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati. La sigla N.S. indica risultati non significativi.

Fattori	Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot
Replication	p<0.01	p<0.01	N.S.
Fattore 3 linee (L)	N. S.	N. S.	N.S.(p=0.060)
Fattore 2 elementi (E)	N. S.	N. S.	N.S.
Interazione L x E	N.S.	N.S.	N.S.

Tabella 34. Dati diffusione dell'infezione e severità sintomatologie (D. I.) del patogeno.

2008		Severità Sintomi			
No. Piante Totali	No. Piante affette	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
431	41	6	20	11	4

Parametro Micorrizzazione

Singoli anni

Volendo verificare se le diverse linee confermassero i risultati preliminari sull'infezione micorrizica, ottenuti nel 2006 nel sito originale di sperimentazione (Metaponto), nel 2007 nello stesso campo sperimentale e in un'altra *location* (Bondeno), caratterizzato da un suolo diverso in tessitura e composizione, è stata effettuata un'analisi di varianza ad 1 o più fattori, dipendentemente dal confronto (Tabella 35, Tabella 36, Tabella 37). Sono state adottate le stesse metodologie quantitative microscopiche, utilizzate per i campioni Rio Grande e Gordon e, quindi, sono stati elaborati ed analizzati i dati del numero di arbuscoli per centimetri di lunghezza di radice osservata ed i valori relativi all'indice di micorrizzazione.

In generale, l'infezione micorrizica si è comportata in maniera differente nelle 2 *location*. Infatti le tre linee a Bondeno hanno avuto un numero di arbuscoli inferiore rispetto alle stesse 3 linee a Metaponto, mentre l'indice di micorrizzazione ha avuto valori superiori nella località Emiliana (Figura 31, Figura 32). Ciò potrebbe essere dovuto ad una colonizzazione differenziale nei 2 siti di sperimentazioni; differenti gruppi di micorrize a seconda del sito, caratterizzate da una diversa tipologia d'infezione. Infatti, nel lavoro di Abbott (1982) si dimostrò che le micorrize appartenenti al genere *Gigaspora*, *Glomus* e *Acaulospora* differivano tra loro per la produzione di arbuscoli, vescicole, e per la ramificazione ed il diametro delle ife intracellulari. Inoltre, confrontando la colonizzazione delle piante Rio nello stesso anno a Bondeno, si è osservato che queste hanno un numero di arbuscoli maggiore (non significativo) di quello delle 3 linee a Bondeno, ma minore di quello delle stesse 3 linee a Metaponto. Quindi si potrebbe pensare ad una colonizzazione differenziale dipendente sia dal sito sperimentale, sia dalla varietà della pianta. Risultati a proposito sono noti già da tempo: Smith e Read (1997) dimostrarono che il grado di colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari, inteso come il numero di arbuscoli e vescicole, varia a seconda della pianta e del sito e che il grado di plasticità e di

ramificazione delle ife è regolato da variazioni del genoma fungino e della pianta ospite, Smith e Smith, 1997. Più recentemente si è attestato che diverse varietà della stessa pianta, genere *Puccinellia*, hanno importanti differenze nel grado di colonizzazione dipendentemente dal sito e dalla varietà (Hildebrandt *et al.*, 2001; Landwehr *et al.*, 2002). In generale, confrontando i valori d'infezione micorrizica arbuscolare, sia per il numero di arbuscoli che per l'indice, delle 3 linee in entrambe le località, si nota, anche se non statisticamente provato, che la linea 9 è quella maggiormente colonizzata, segue poi la linea 7 ed infine la linea 5.

Inoltre, confrontando solo i dati di colonizzazione delle 3 linee a Bondeno dove, grazie al numero sufficiente di repliche, è stato possibile effettuare un'analisi di varianza a 2 fattori, le linee ed il fattore data di campionamento, è risultata una differenza significativa tra l'infezione e la data. La differenza significativa si è osservata tra l'indice di micorrizzazione dei campioni corrispondenti alla data zero, cioè ai campioni prima del trapianto e di quelli delle 2 date di campionamento, corrispondenti ai 2 diversi stadi fenologici della pianta. Quindi, in questo caso non c'è stata differenza tra i livelli d'infezione delle piante di pomodoro in fiore e di quelle già in fruttificazione. Il risultato trovato è comunque importante poiché dimostra che le piante, al momento del trapianto erano pressoché prive d'infezione e che, quindi hanno instaurato la simbiosi con i funghi micorrizici del suolo o dell'inoculo in un secondo momento.

Tabella 35. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Bondeno). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Replication	N.S.	N.S.
Fattore 3 linee (L)	N.S.	N.S.
Sampling Time (S)	N.S.	p<0.01
Interazione L x S	N.S.(p=0.0620)	N.S.

Tabella 36. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (One Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Metaponto). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Replication	N.S.	N.S.
Fattore 3 linee	N.S.	N.S.

Tabella 37. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (One Factor Randomized Complete Block Design combined over location) utilizzata in questo set di dati (confronto tra i dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Bondeno con Metaponto). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Location (P)	p=0.0490	N.S.
Fattore 3 linee (L)	N.S.	N.S.
Interazione P x L	N.S.	N.S.

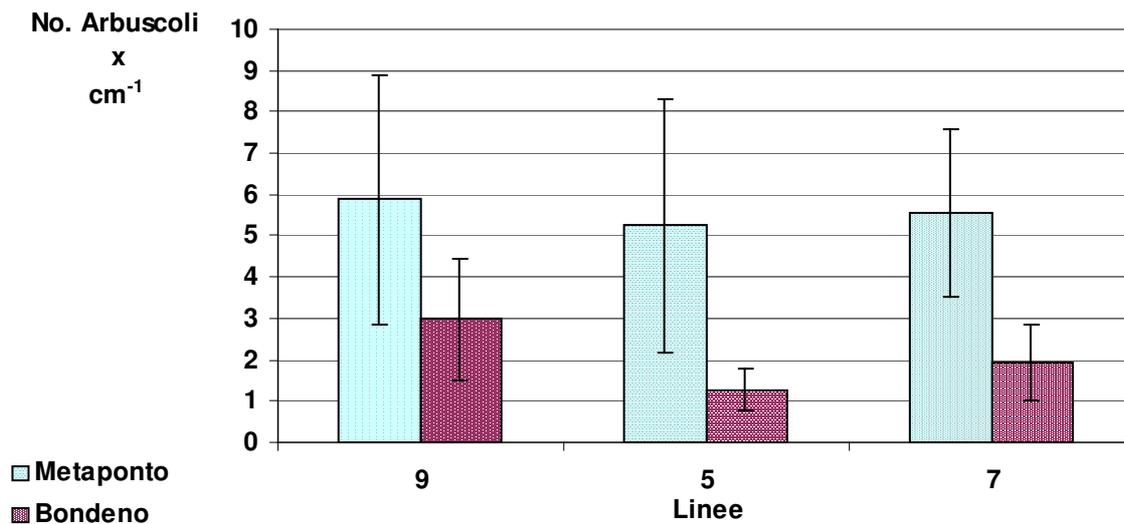


Figura 31. Variazione della colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (No. arbuscoli) in relazione alle diverse linee nelle 2 location sperimentali.

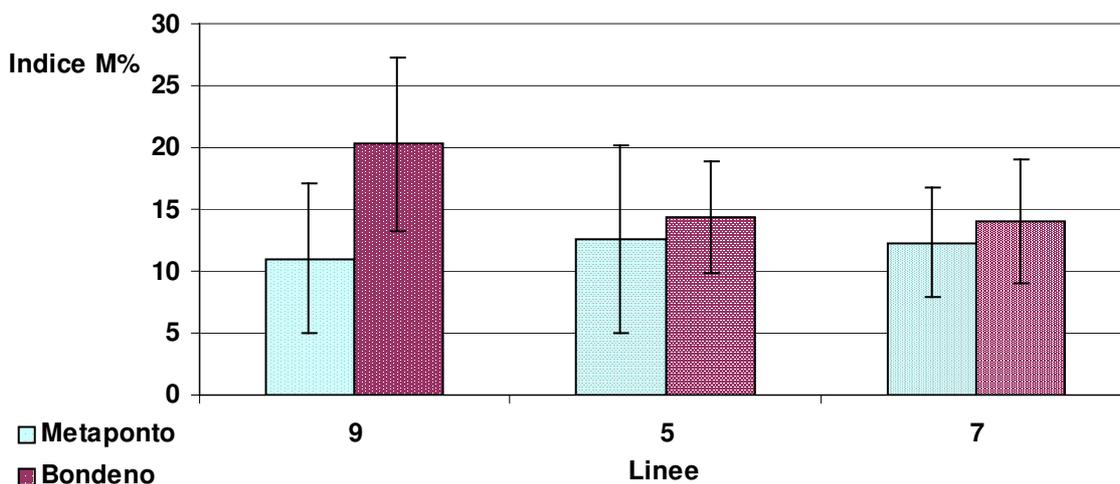


Figura 32. Variazione della colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (M%) in relazione alle diverse linee nelle 2 location sperimentali.

Nel secondo anno di trapianto delle linee prioritarie nel sito sperimentale di Bondeno, si è notato che l'infezione micorrizica tende ad assumere la cinetica e la tipologia di

quella avvenuta per la varietà Rio Grande. Infatti, in primo luogo si è avuto una corrispondenza tra il numero di arbuscoli delle linee e quello riscontrato per l'altra varietà, quindi c'è stato un aumento della formazione di arbuscoli nella colonizzazione del 2007 e del 2008. In secondo luogo, in analogia con la cv Rio Grande, c'è stata una differenza significativa tra l'infezione delle radici corrispondenti alla prima data, pianta in fioritura, e quelle della seconda data, pianta all'inizio della fruttificazione (Figura 33, Figura 34). Infine, a conferma di quanto evidenziato per le linee nell'anno precedente, la linea 9 è quella maggiormente colonizzata dai funghi micorrizici arbuscolari rispetto alle linee 7 e 5. C'è da aggiungere che è risultata significativa l'interazione tra il fattore linee ed il fattore data di campionamento; cioè è emerso che la linea 9 è significativamente più colonizzata alla prima data di quanto non lo sia la linea 5 alla seconda. Ciò vuol dire che la linea 9 è stata la più precoce nell'instaurare l'infezione micorrizica, caratteristica molto importante per l'assimilazione dei nutrienti dal suolo da parte dei funghi per la pianta in un momento delicato come l'inizio della fioritura. Questo risultato, quindi, potrebbe essere la ragione per cui la linea 9 ha i valori di produzioni maggiori a Bondeno.

Come già detto sopra, anche le piante di pomodoro della cv Red Setter, sono state colpite dall'infezione del patogeno *Phytophthora infestans*. Confrontando i valori medi del Disease Index in relazione alle diverse linee, si può notare che tendenzialmente la linea 7 è stata quella maggiormente colpita, seguita dalla linea 9 e poi dalla linea 5 (Tabella 41). Quindi per questi valori d'infezione del patogeno non c'è stata alcuna relazione di proporzionalità con i valori di colonizzazione micorrizica arbuscolare, come invece è stato trovato per i dati della varietà Rio Grande.

Tabella 38. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Bondeno). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Replication	N.S.	N.S.
Fattore 3 linee (L)	N.S.	N.S.
Sampling Time (S)	p=0.0260	p<0.01
Interazione L x S	N.S.(p=0.0622)	N.S.

Tabella 39. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (One Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Metaponto). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Replication	N.S.	p=0.0493
Fattore 3 linee	N.S.	N.S.

Tabella 40. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (One Factor Randomized Complete Block Design combined over location) utilizzata in questo set di dati (confronto tra i dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Bondeno con Metaponto). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Location (P)	p<0.001	p<0.001
Fattore 3 linee (L)	N.S.	N.S.
Interazione P x L	N.S.	N.S.

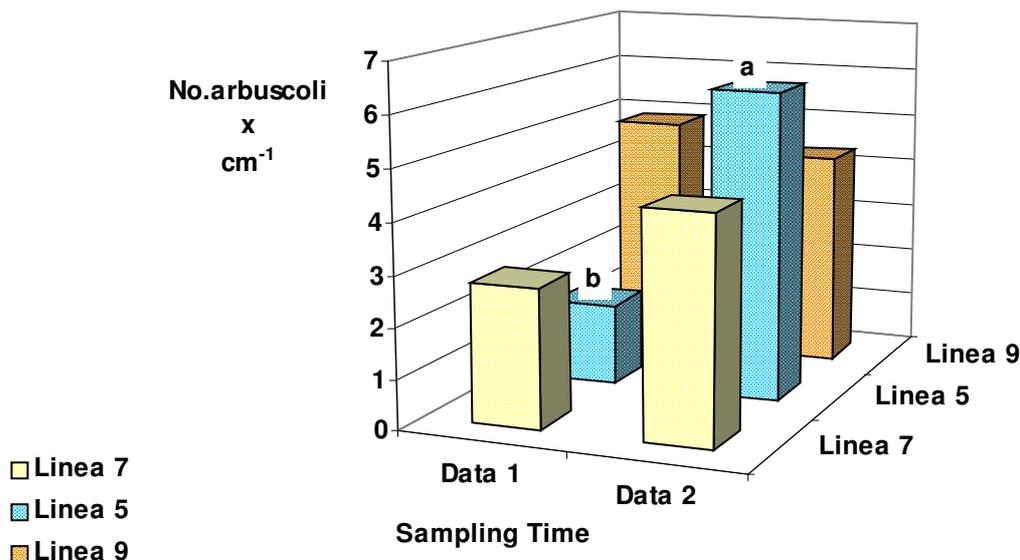


Figura 33. Variazione nelle 3 linee della colonizzazione micorrizica arbuscolare (No. arbuscoli) sul periodo di 2 anni in relazione alla data di campionamento (Sampling Time). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

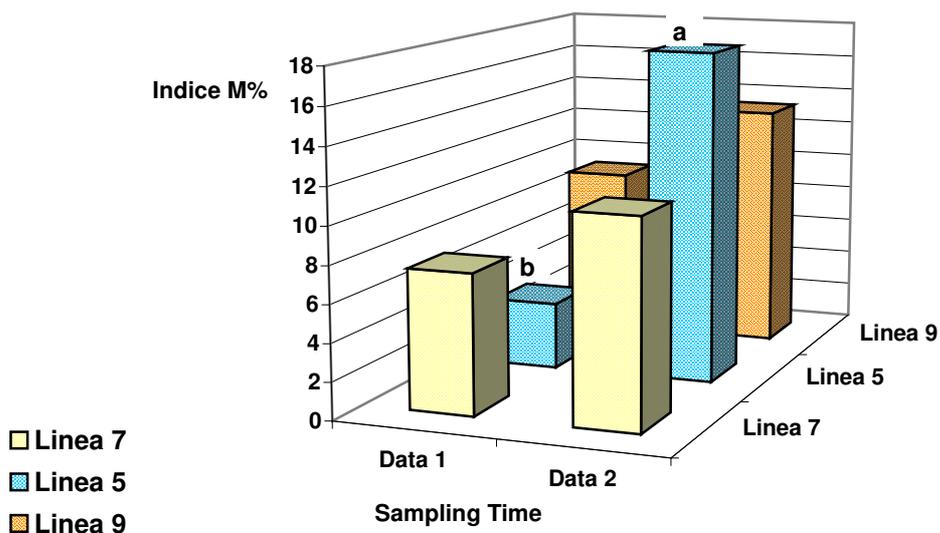


Figura 34. Variazione nelle 3 linee della colonizzazione micorrizica arbuscolare (M%) sul periodo di 2 anni in relazione alla data di campionamento (Sampling Time). Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

Tabella 41. Dati infezione patogeno (D. I.) in relazione alle diverse linee. Tra parentesi è indicato l'errore standard (E.S.).

2008		PATOGENO Disease Index (Liu et al., 1995)
Fattore Linee	L9	5.679 (1.502)
	L5	7.307 (1.343)
	L7	3.676 (1.029)

2 anni a confronto

Confrontando tra loro i dati dell'infezione micorrizica delle 3 linee nei due anni di sperimentazioni a Bondeno (2007 e 2008), si nota come siano discordanti i risultati ottenuti dalle 2 metodologie microscopiche di quantificazione. Infatti i valori del 2007 sono stati significativamente superiori per il numero di arbuscoli e significativamente inferiori per l'indice di micorrizzazione e viceversa (Figura 35). Ciò potrebbe essere dovuto, come già detto sopra, alla colonizzazione di differenti gruppi di funghi, caratterizzati da diverse tipologie, quantità e struttura delle formazioni peculiari della micorrize; arbuscoli, vescicole ed ife intracellulari (Abbott, 1982). Non sono state riscontrate differenze significative nella colonizzazione delle 3 linee (Tabella 42 e Tabella 43), ma come trovato nelle analisi dei singoli 2 anni, la linea 9 è quella con i risultati migliori di colonizzazione.

Tabella 42. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (confronto tra i dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Bondeno nei 2 anni di sperimentazione). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm⁻¹	M%
Replication	p=0.0358	p<0.01
Fattore anno (A)	p=0.0205	p=0.0253
Fattore 3 linee (L)	N.S.	N.S.
Interazione A x L	N.S.	N.S.

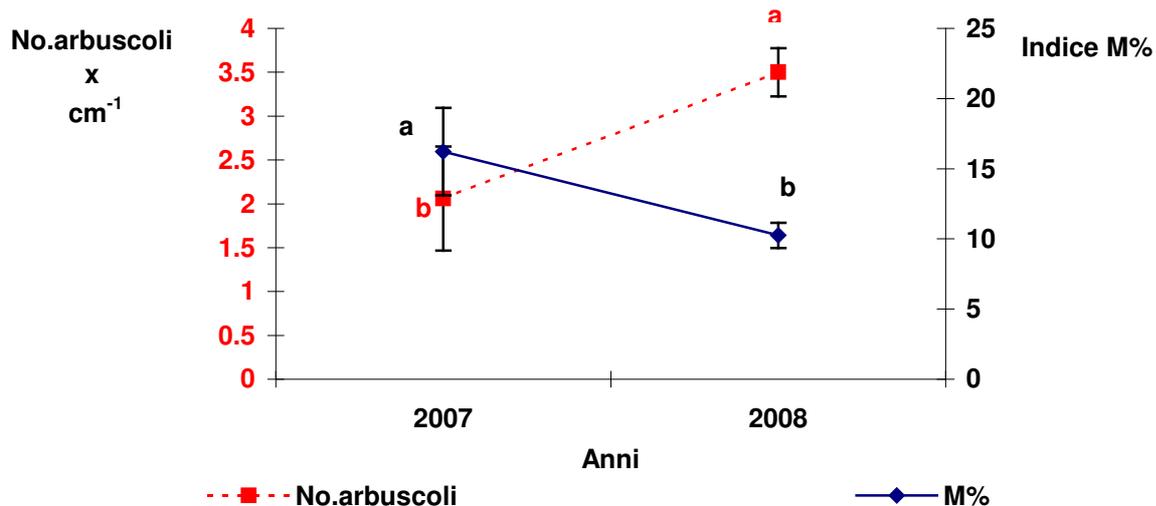


Figura 35. Variazione della colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari in relazione all'anno. Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

Tabella 43. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (confronto tra i dati colonizzazione AMF delle 3 linee cresciute a Metaponto nei 2 anni di sperimentazione). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	No. A x cm ⁻¹	M%
Replication	p=0.024	p<0.001
Fattore anno (A)	N.S.	N.S.
Fattore 3 linee (L)	N.S.	N.S.
Interazione A x L	N.S.	N.S.

Parametro Qualità

Come per la varietà Rio, la valutazione della qualità delle 3 linee coltivate a Bondeno è stata effettuata, per gli anni 2007 e 2008, su di un campione rappresentativo della produzione vendibile e sono stati misurati ed analizzati gli stessi parametri qualitativi dell'aspetto della bacca e gli stessi sulle caratteristiche organolettiche. Questi valori sono stati statisticamente analizzati, in entrambi gli anni, con un'analisi di varianza ad un fattore, le 3 linee. In un secondo momento è stata effettuata un'analisi di varianza complessiva, considerando il fattore anno.

2007

Per nessuno dei parametri qualitativi considerati, siano essi riguardanti l'aspetto della bacca come il peso medio e la dimensione oppure riguardanti le caratteristiche carpometriche come la consistenza, il grado di solidi solubili, il pH e l'acidità titolabile sono state trovate differenze significative (Tabella 44). In generale,

come per i valori d'infezione micorrizica dello stesso anno, le linee 9 e 7 sembrerebbero migliori rispetto alla linea 5. Infatti quest'ultima ha presentato valori di peso medio della bacca, consistenza, ed acidità inferiori a quelli delle altre 2.

Tabella 44. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (One Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (dati parametri qualità delle 3 linee cresciute a Bondeno). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)	°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Replication	N. S.	p=0.0315	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Fattore 3 linee	N. S.	N. S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

2008

Come per l'anno precedente, in nessuno dei parametri qualitativi valutati, ci sono state delle differenze significative (Tabella 45), a ribadire il concetto che piccoli cambiamenti nelle stesse condizioni sperimentali, non modificano la qualità del prodotto (Mitchell *et al.*, 2007 e Toor *et al.*, 2006). Mentre, invece, fattori come il genotipo, l'irradiazione solare, la temperatura e la scarsa disponibilità di potassio possono influire su caratteristiche qualitative come il colore della bacca, il contenuto di zuccheri e di solidi solubili e l'acidità titolabile (Grierson e Kader, 1986). A conferma di quanto trovato per la qualità nel 2007, per la produzione (2008) e per l'infezione micorrizica in entrambi gli anni, la linea 9 è sempre stata quella con risultati più promettenti.

Tabella 45. Fattori principali e risultati (*p value*) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (dati parametri qualità delle 3 linee cresciute a Bondeno). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)	°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)	Cond (mS cm ⁻¹)
Replication	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N.S.(p=0.0582)	N.S.
Fattore Compost (C)	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N.S.	N.S.
Fattore 2 elementi (E)	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
Interazione C x E	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.

2 anni a confronto

Nel confronto delle analisi qualità tra i 2 anni (2007 e 2008), è risultato che il 2007 è quello in cui la produzione è stata qualitativamente superiore; essendo caratterizzato da una bacca di aspetto migliore (più grande, più pesante e più consistente) e con caratteristiche organolettiche (contenuto di solidi solubili, pH, ed acidità) più idonee a conferire un buon gusto alla bacca (Figura 36). Probabilmente la ragione è da attribuire, come è stato già detto per i risultati della varietà Rio Grande,

al peggioramento delle condizioni climatiche, all'infezione del patogeno e, forse anche al un campionamento, nel 2008, di un prodotto in stato di sovrammaturazione. Per quanto riguarda le 3 linee, invece, non sono state trovate differenze significativamente parlanti, ma considerando i valori di consistenza, del peso medio, pH ed acidità, sembrerebbe che le linee 9 e 7 hanno avuto valori qualitativamente superiori.

Tabella 46. Fattori principali e risultati (*p* value) dell'ANOVA (Two Factor Randomized Complete Block Design) utilizzata in questo set di dati (confronto tra i dati parametri qualità delle 3 linee cresciute a Bondeno nei 2 anni di sperimentazione). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

Fattori	Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)	°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Replication	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
Fattore anno (A)	N. S.	p<0.001	p<0.001	N. S.	p=0.0123	p<0.01	p=0.0283
Fattore 3 linee (L)	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.
Interazione A x L	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.	N. S.

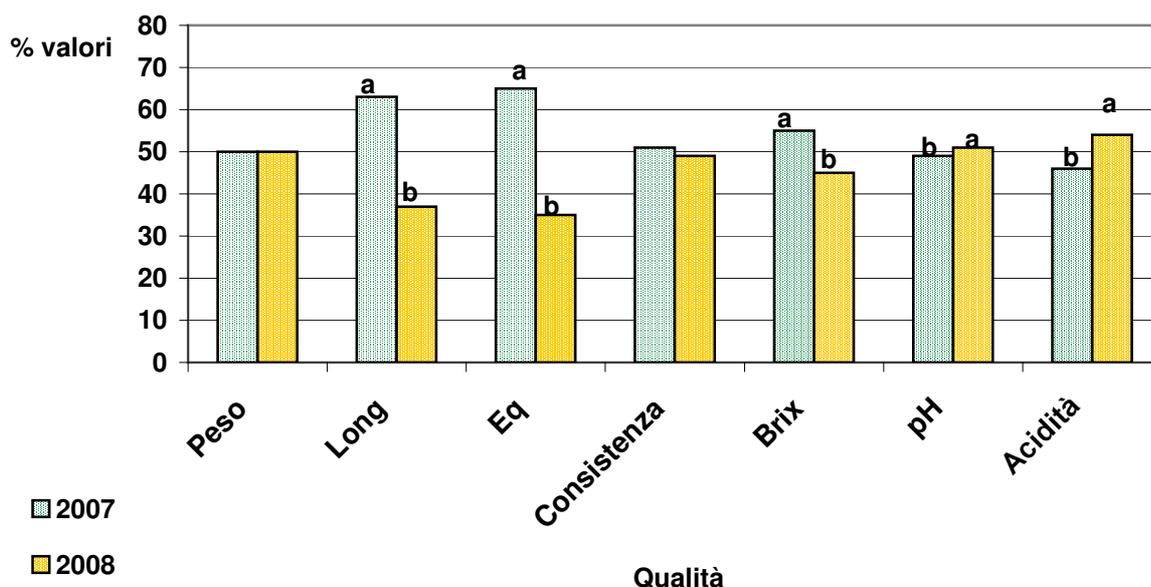


Figura 36. Variazione della qualità delle bacche (%valori) in relazione all'anno di sperimentazione. Le diverse lettere indicano gruppi statisticamente differenti (Tukey test $\alpha=0.05$).

8.2. Risultati molecolari studio delle comunità di PPM

Tutti i risultati descritti in questa sezione sono stati elaborati ed ora presentati secondo:

- Code 1: un codice che ha permesso di raggruppare le tre repliche di ciascun trattamento di entrambi gli anni;

- Code 2: un codice che ha permesso di suddividere ed analizzare i dati in relazione ai fattori principali considerati.

8.2.1. PCR verifica dell'estrazione

L'rDNA 16S (target batterico) e la regione non codificante tra i geni 18S e 28S (target fungino) di tutti i campioni di DNA estratti, sono stati amplificati con successo. I prodotti PCR ottenuti con i primer P0 (→) e P6 (←) hanno dato un unico frammento di DNA di 1650 bp. I prodotti PCR ottenuti con i primer per il target fungino, NS5 (→) ed ITS4 (←), hanno dato come risultato un unico frammento di DNA di circa 1200 bp.

8.2.2. Quantificazione del DNA estratto

Tutti i DNA, precedentemente estratti e corrispondenti a tre repliche dei campioni rizosferici dell'esperimento in campo Rio Grande 2006 ed i DNA delle 3 repliche dei campioni del 2007 inoculati nel vivaio, sono stati quantificati utilizzando lo spettrofotometro Nano Drop® ND-1000 (Tabella in appendice).

Tenendo conto che:

- 1) il rapporto dell'assorbanza dei campioni a 260 e 280 nm è un'indicazione della purezza del DNA e RNA. Un valore di circa 1.8–2.0 è considerato come un DNA ben purificato, mentre un valore inferiore significa che sono presenti proteine, fenoli o altri contaminanti;
- 2) il rapporto dell'assorbanza dei campioni a 260 e 230 nm si aggira per un DNA ben purificato intorno a valori compresi tra 1.8-2.2.

In generale, si può dire che la grande maggioranza dei campioni di DNA, avendo valori inferiori a $1.8 < 260/280 < 2.0$ e $1.8 < 260/230 < 2.2$, contiene proteine, fenoli ed altri contaminanti.

Comunque, il DNA ottenuto dall'estrazione con il Kit Mobio anche se non perfettamente purificato, è stato di una qualità sufficiente da aver permesso l'amplificazione genica *in vitro* con ben 3 coppie diverse di primer: P0-P6 (Grifoni *et al.*, 1995), NS5-IST4 (White *et al.*, 1990) e ITS1-F-ITS4 (Gardes e Bruns, 1993; White *et al.*, 1990).

8.2.3. Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)

Di tutti i campioni di DNA (campioni radicali corrispondenti al 2006 e 2007) è stato amplificato con successo lo spaziatore intergenico ribosomale del genoma fungino, con i primer ITS1-F (→) (Gardes e Bruns, 1993) e ITS4 (←) (White *et al.*, 1990).

In un secondo momento tutti i 126 campioni sono stati sottoposti alla preparazione ed all'esecuzione della Fungal-ARISA, avvenuta con successo.

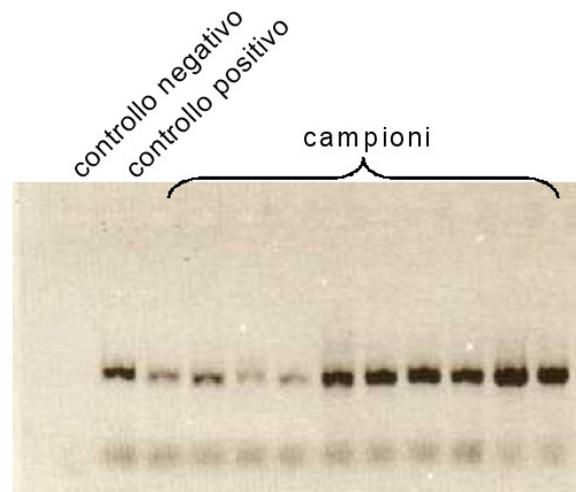


Figura 37. Risultati dell'amplificazione PCR (pre ARISA) dello spaziatore intergenico ribosomale del genoma fungino, visualizzati su gel elettroforetico.

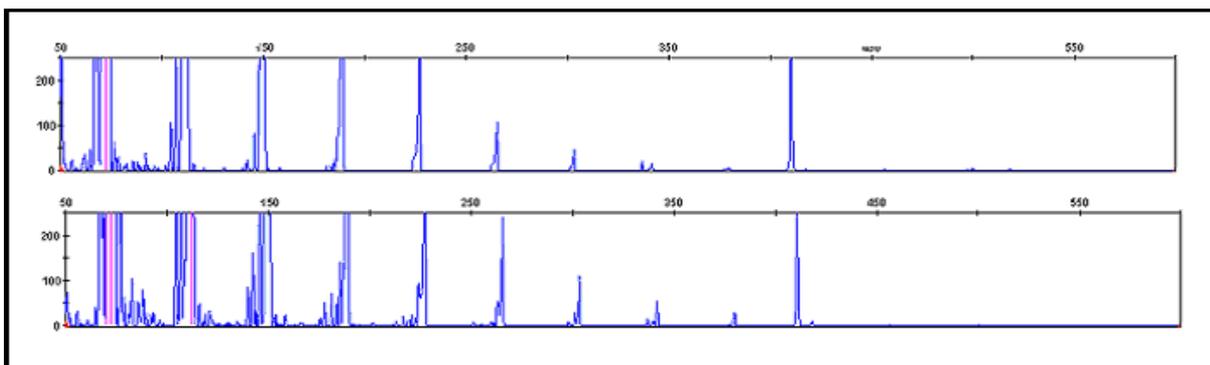


Figura 38. Esempio su 2 campioni dei risultati dell'elettroforesi capillare ARISA.

8.3. Analisi statistica con metodi bioinformatici

8.3.1. Analisi statistica risultati ARISA

8.3.1.1. Non-metric multi-dimensional scaling (MDS)

Tutti i risultati ottenuti dalla F-ARISA, sono stati analizzati con la metodologia della non-metric multi-dimensional scaling (MDS). Per una prima analisi sono stati analizzati tutti i risultati dei profili ottenuti, raggruppandoli per il Code 1, cioè per le repliche.

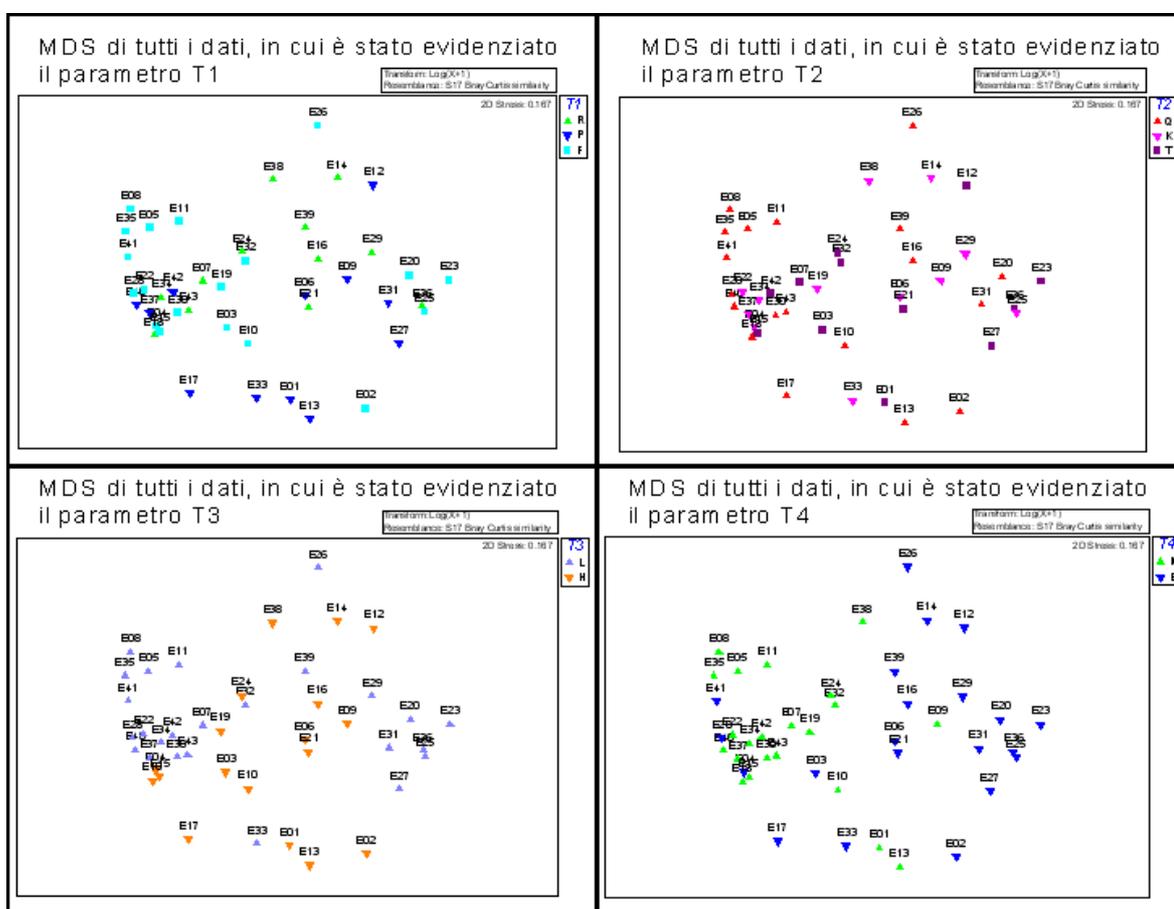


Figura 39. MDS ottenuta dall'ARISA di tutti i dati. In ogni rappresentazione grafica sono stati indicati i differenti parametri. Per ognuno dei grafici, il valore di stress è pari a 0.167.

Per avere una maggiore chiarezza grafica ed in secondo luogo per abbassare il valore di stress risultato alto (0.167), i dati sono stati:

1. Raggruppati secondo il Code 1, come era già stato fatto precedentemente;
2. All'interno dell'intero set di dati, sono state considerate una alla volta le 4 diverse variabili che costituiscono il Code 2.

Avendo notato dai grafici che solo i parametri T3 e T4 sono stati quelli in grado di discriminare in maniera evidente il set di dati, le analisi successive sono state concentrate su queste 2 variabili; nello specifico sono stati selezionati di volta in volta i dati:

1. Parametro T3	solo dati H	in ognuna di queste analisi sono stati considerati anche gli effetti degli altri 3 parametri (T1, T2, T3 o T4).
	solo dati L	
2. Parametro T4	solo dati N	
	solo dati B	

Considerando solo il parametro T3 e solo i valori N (del parametro T4), è stato calcolato l'MDS plot indicando una alla volta i 3 parametri rimanenti. In questo modo è stato trovato che i valori L ed H del parametro T3 risultano ben separati tra loro.

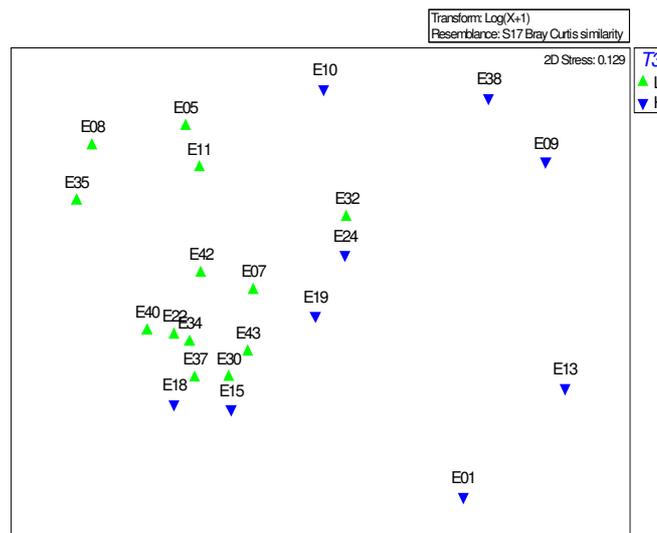


Figura 40. MDS plot del parametro T3. Per questo grafico, il valore di stress è pari a 0.129.

Considerando solo il parametro T4 e solo i valori L (del parametro T3), è stato calcolato l'MDS plot indicando una alla volta i 3 parametri rimanenti. Con questa elaborazione è risultato che i valori N e B del parametro T4 sono ben separati tra loro.

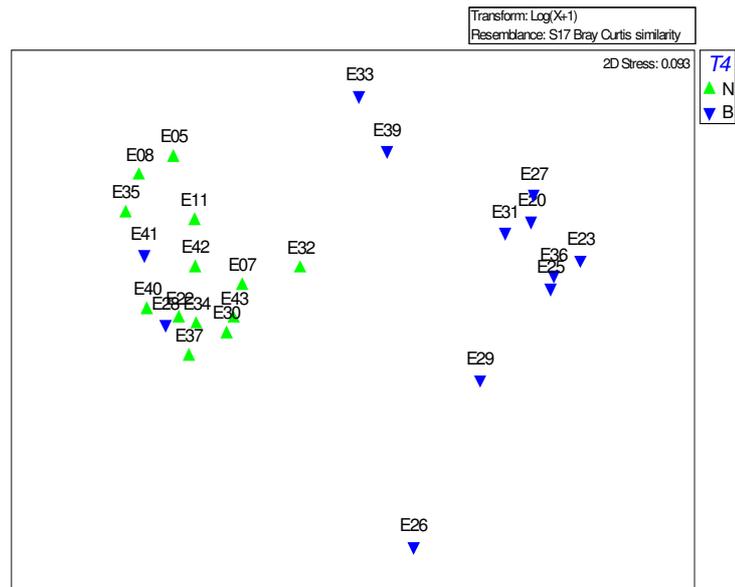


Figura 41. MDS plot del parametro T4. Per questo grafico, il valore di stress è pari a 0.093.

8.3.1.2. Analysis of similarity (ANOSIM)

Tutte le rappresentazioni grafiche MDS plot, che suggerivano qualche tendenza o netta separazione dei dati, sono state sottoposte ad analysis of similarity (ANOSIM), per verificarne la significatività. In questo modo è stata confermata e supportata:

- 1) La differenza tra i valori L ed H del parametro T3.

```

Factor Values
Factor: T3
L
H

Global Test
Sample statistic (Global R): 0.392
Significance level of sample statistic: 0.1%

```

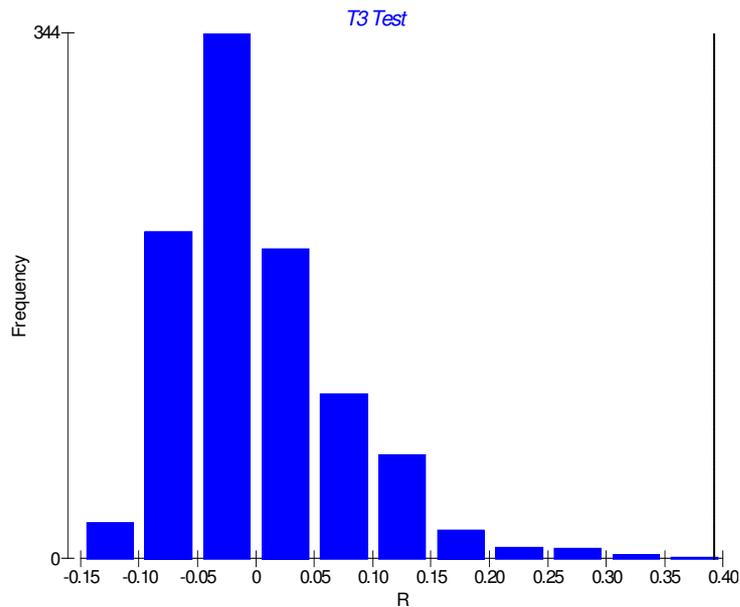


Figura 42. Rappresentazione grafica dell'ANOSIM, calcolato per i dati L e H.

2) La differenza tra i valori N e B del parametro T4

```

Factor Values
Factor: T4
N
B
Global Test
Sample statistic (Global R): 0.516
Significance level of sample statistic: 0.1%

```

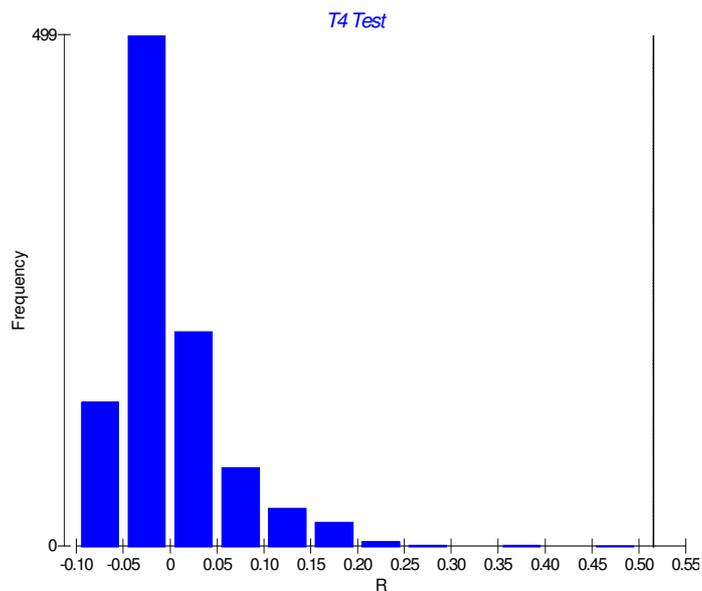


Figura 43. Rappresentazione grafica dell'ANOSIM, calcolato per i dati N e B.

Quindi considerando questi set di dati, le variabili all'interno di T3 e T4 discriminano 2 sottopopolazioni significativamente diverse tra di loro.

A questo punto è stato deciso di continuare l'analysis of similarity, per constatare, se all'interno di questo set di dati, i parametri T1 e T2 influissero in qualche modo.

Per questo sono stati analizzati i dati ottenuti dalle seguenti combinazioni:

dati NH	in ognuna di queste analisi sono stati anche considerati l'effetto dei parametri (T1, T2, e T1*T2) avevano.
dati NL	
dati BH	
dati BL	

Non sono state trovate differenze significative tra i fattori T1, T2 e T1*T2.

8.3.2. Analisi statistica dei dati UNIVARIATA

E' stata eseguita un'analisi di varianza multifattoriale della "species richness", considerata come il numero di numero complessivo di *ribotype* ottenuti dai profili di elettroforesi capillare ottenuti dall'ARISA e successivamente elaborati con Ribosort. Quindi, l'intero set di dati è stato analizzato con un ANOVA considerando i 4 parametri del Code 2, poi con il test post hoc quali 1) Ryan-Einot-Gabriel-Welsh Multiple range e 2) Tukey's Studentized Range, si è testato se, i diversi livelli di ciascuna variabile avessero delle differenze significative tra loro.

Tabella 47. Fattori principali e risultati (p value) dell'ANOVA utilizzata in questo set di dati. La sigla N.S. indica risultati non significativi.

Fattori	No. Ribotypes
T1	N. S.
T2	N. S.
T3	N. S.
T4	p<0.001

L'ANOVA ha trovato differenze significative all'interno del parametro T4, quindi l'analisi è proseguita con i test post hoc. Entrambi i test hanno riscontrato che i 2 livelli di T4 sono significativamente diversi tra loro per quanto riguarda la "species richness". Decodificando si può dire che N ha un numero significativamente maggiore di ribotype rispetto a B sia per il test Ryan-Einot-Gabriel-Welsh Multiple range, sia per il Tukey's Studentized Range test

9. Conclusioni

In conseguenza allo scopo prefissato (capitolo 6), le strategie sperimentali adottate (capitolo 7) ed i risultati ottenuti (capitolo 8), si è potuto constatare che:

- il ristoppio di pomodoro, largamente sconsigliato per evitare i rischi di infezioni fungine e scadimenti produttivi-qualitativi, se controbilanciato dai trattamenti sperimentali, non ha avuto effetti deleteri né sulla produzione, né sulla colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari. Infatti, ha stabilizzato la produzione tra i blocchi sperimentali che si era trovata differente nel 2006, ed ha portato ad una produzione vendibile maggiore ed una resa comparabile nell'anno successivo. Infine, anche se nell'ultimo anno si è registrata la diffusione del patogeno, non è da attribuire al ristoppio, poiché ne sono stati colpiti ed in maniera pesante anche i campi di pomodoro dell'agricoltore, in cui è stata effettuata la rotazione colturale.
- la somministrazione consecutiva di ammendante compostato verde non ha avuto un effetto benefico sulla produzione, andando a provocare squilibri nella maturazione dei frutti, con minore resistenza alla sovrammaturazione ed un aumento di recettività e sensibilità di fronte agli agenti patogeni (Silvestri e Siviero, 1991; Rinaldi *et al.*, 2003). I nostri dati mostrano che sebbene la produzione totale risulti alta, ciò che è veramente importante a livello commerciale (cioè la produzione vendibile e la resa produttiva) risulta minore, essendo aumentata la quota di scarto;
- l'introduzione dell'inoculo ha avuto un effetto positivo e persistente nel tempo. Infatti, grazie a com'è stata impostata la prova e cioè la somministrazione nel suolo dell'inoculo solo al primo anno, è stato possibile valutare la persistenza e l'efficacia delle popolazioni microbiche introdotte. L'attività benefica nel tempo dell'inoculo è risultata evidente sia dal fatto che nell'ultimo anno i trattamenti che avevano ricevuto il maggiore dosaggio hanno mostrato una significativa maggiore colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari, sia dal fatto che proprio questi trattamenti sono stati quelli colpiti meno severamente dal patogeno;

- tenendo in considerazione che l'aspetto dei costi della produzione è fondamentale, affinché arrivi sul mercato un prodotto biologico di buona qualità ed accessibile ad un qualsiasi consumatore, questa ricerca ha dato un'indicazione importante: l'introduzione combinata d'inoculo e di compost non ha avuto un effetto significativamente positivo (ma neanche negativo) nei primi 2 anni di sperimentazioni. Nel terzo anno, quando c'è un'interazione significativa tra la somministrazione dei 2 fertilizzanti, ciò che è emerso a vantaggio di una maggiore colonizzazione, sono le combinazioni estreme incrociate. Queste combinazioni sono costituite dall'introduzione di solo uno dei due fertilizzanti nel maggior dosaggio. Quindi, nell'ottica di ridurre i costi della produzione, un possibile approccio conveniente ed efficace potrebbe essere l'introduzione dell'inoculo in dose maggiore (anche solo per un anno), in grado di apportare un effetto positivo nel tempo nella colonizzazione micorrizica arbuscolare delle radici delle piante di pomodoro. Questo a sua volta, potrebbe avere un effetto protettivo nei confronti dei fattori biotici (avversità) e quindi, un riscontro positivo sulla produzione, avendo piante più sane.

Un obiettivo secondario della presente ricerca è stato valutare l'interazione tra la colonizzazione dei funghi micorrizici arbuscolari (AMF), la resa produttiva e differenti suoli (condizioni climatiche, sperimentali) o tra la colonizzazione micorrizica arbuscolare e diverse varietà di pomodoro. Ciò è stato ottenuto confrontando la colonizzazione dei AMF (introdotti con l'inoculo o naturalmente presenti) di diverse cultivar (cv) cresciute nello stesso sito sperimentale e su siti differenti. Dai risultati ottenuti è emerso che ciascun suolo, caratterizzato da una differente composizione e struttura delle comunità microbiche e fungine, ha reagito in maniera differente all'introduzione dell'inoculo ed ha interagito in maniera altrettanto differente con le diverse cv di pomodoro, sia per quanto riguarda la produzione, sia per quanto riguarda la colonizzazione.

La differente interazione tra la colonizzazione AMF ed i differenti suoli è stata riscontrata per la cv Red Setter (della prova 3 linee) coltivata in 2 località sperimentali differenti, Bondeno (FE) e Metaponto (MT). Infatti, la tipologia della colonizzazione AMF è risultata diversa a seconda del sito; da una parte (Bondeno) si ha una

colonizzazione caratterizzata da un minore numero di arbuscoli, ma da una maggiore colonizzazione generale (indice di micorrizzazione, M%), mentre nell'altro sito (Metaponto) la colonizzazione è caratterizzata da una maggiore formazione di arbuscoli e da una minore colonizzazione complessiva. Ciò potrebbe essere dovuto ad una colonizzazione differenziale nei 2 siti di sperimentazione; da parte di differenti generi di funghi micorrizici, differenti tra loro per la produzione di arbuscoli, vescicole, e per la ramificazione ed il diametro delle ife intracelluarie, a seconda della località (Abbott, 1982).

La colonizzazione differenziale dei funghi micorrizici arbuscolari, a seconda della varietà della pianta ospite, è nota già da tempo: è stato dimostrato che il numero di arbuscoli, di vescicole ed il grado di plasticità e di ramificazione delle ife è regolato da variazioni del genoma fungino e della pianta ospite (Smith e Smith, 1997) e che diverse varietà della stessa pianta hanno importanti differenze nel grado di colonizzazione (Hildebrandt *et al.*, 2001; Landwehr *et al.*, 2002). In questo lavoro, la differente interazione tra la colonizzazione AMF e la differente cultivar, inteso come un dissimile numero di arbuscoli, è stata riscontrata tra le varietà Rio Grande e Red Setter nel 2007. Inoltre, un altro aspetto importante da considerare è il carattere "precocità della colonizzazione" in relazione alle diverse varietà, che potrebbe essere determinante per l'efficacia dell'introduzione dell'inoculo nei confronti dei parametri produttivi. Nei nostri dati, questa indicazione è stata valutata considerando i risultati dell'interazione tra le diverse linee e la colonizzazione riscontrata nelle diverse età della pianta. Infatti la linea 9, oltre ad essere quella tendenzialmente maggiormente colonizzata dai AMF, risulta anche la più precoce.

Tutte queste considerazioni, a proposito dell'effetto del suolo e della varietà sul grado di colonizzazione, risultanti dall'interpretazione dei dati ottenuti con i metodi microscopici, non sono sufficientemente esaustivi per tracciare un quadro dettagliato, specifico sulla variazione della struttura e della composizione della comunità microbica (Ingleby *et al.*, 2007). Per questo, in parallelo, su una parte dei campioni sono state effettuate analisi di tipo molecolare. Purtroppo, poiché l'elaborazione e l'interpretazione dei dati è ancora in corso, non è stato possibile confrontare i risultati ottenuti con i metodi microscopici con quelli ottenuti con i metodi molecolari.

10. Prospettive

A proposito delle considerazioni sui risultati delle prove sperimentali in pieno campo, sarebbe interessante confermare i risultati della persistenza dell'efficacia delle popolazioni probiotiche l'anno o gli anni seguenti all'introduzione in campo dell'inoculo.

Per quanto riguarda la prova varietà, poiché è già stata dimostrata ampiamente l'influenza di diverse cultivar e dello stadio fenologico della pianta sulle popolazioni della rizosfera (Picard *et al.*, 2000; Picard e Bosco, 2003), si potrebbe approfondire "il carattere precocità" della colonizzazione, comparandolo anche ad una valutazione sulla produzione o sulla qualità del prodotto.

Sarà necessario affinare i metodi di studio ed i risultati della struttura e della composizione delle comunità microbiche, ottenuti con i metodi molecolari.

In questo modo, confrontando i dati della colonizzazione micorrizica arbuscolare, ottenuti con i metodi microscopici con quelli molecolari per il target fungino (Ingleby *et al.*, 2007), sarà possibile avere tutte le informazioni necessarie per interpretare la variazione della colonizzazione in relazione ai fattori sperimentali considerati.

Inoltre, visto che la metodologia molecolare utilizzata, ARISA, permette di valutare i cambiamenti della comunità fungina, ma non permette di discriminare a livello di genere o di specie le popolazioni interessate, sarebbe opportuno indagare, ad esempio usando dei primer specifici (Redecker, 2000), come è variata la microflora del suolo a livello di genere. Inoltre, sarebbe interessante confrontare i dati molecolari ottenuti con quelli da ricavare utilizzando altre metodologie molecolari, come la T-RFLP o la DGGE, selezionando anche altri target genici.

11. Appendice

11.1. Tabelle dati parametri misurati prove pieno campo

11.1.1. Prova Rio Grande

11.1.1.1. Produzione e colonizzazione micorrizica arbuscolare

Tabella 48. Dati parametri misurati nel 2006, prova Rio Grande. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla N.S. indica risultati non significativi.

2006		PRODUZIONE			AMF	
		Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot	No. A x cm ⁻¹	M%
Fattore Compost	C0	1.789 (0.116)	1.480 (0.107)	0.823 (0.016)	5.084 (0.987)	14.700 (2.244)
	C1	1.837 (0.082)	1.532 (0.084)	0.831 (0.013)	5.500 (0.957)	14.179 (2.300)
	C2	1.791 (0.086)	1.458 (0.101)	0.804 (0.025)	5.792 (1.018)	11.825 (2.278)
Fattore Inoculo	M0	1.954 a (0.094)	1.625 a (0.094)	0.828 (0.011)	5.585 (1.103)	15.346 (2.604)
	M1	1.904 a (0.050)	1.606 a (0.058)	0.842 (0.017)	4.500 (0.689)	12.342 (2.058)
	M2	1.559 b (0.089)	1.240 b (0.091)	0.788 (0.023)	6.292 (1.084)	13.017 (2.119)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 49. Dati parametri misurati nel 2007, prova Rio Grande. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla N.S. indica risultati non significativi.

2007		PRODUZIONE			AMF	
		Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot	No. A x cm ⁻¹	M%
Fattore Compost	C0	2.465 b (0.069)	2.216 (0.085)	0.909 a (0.045)	3.369 (0.450)	10.025 (1.461)
	C1	2.791 a (0.095)	2.063 (0.104)	0.741 b (0.033)	4.418 (0.580)	15.133 (2.089)
	C2	2.507 b (0.044)	1.997 (0.122)	0.798 ab (0.050)	3.145 (0.431)	12.575 (2.033)
Fattore Inoculo	M0	2.574 (0.060)	2.055 (0.088)	0.802 (0.037)	3.168 (0.628)	10.171 (1.908)
	M1	2.518 (0.067)	2.043 (0.137)	0.817 (0.058)	4.324 (0.385)	14.138 (1.767)
	M2	2.670 (0.111)	2.177 (0.088)	0.829 (0.046)	3.440 (0.437)	13.425 (2.013)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 50. Dati parametri misurati nel 2008, prova Rio Grande. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi. La sigla *Sign* indica risultati significativi.

2008		PRODUZIONE			AMF	
		Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot	No. A x cm ⁻¹	M%
Fattore Compost	C0	1.150 (0.087)	0.570 (0.076)	0.475 (0.029)	2.721 (0.566)	6.996 (1.638)
	C1	1.067 (0.060)	0.530 (0.047)	0.489 (0.026)	2.337 (0.537)	5.750 (1.434)
	C2	1.145 (0.079)	0.573 (0.065)	0.487 (0.028)	2.283 (0.498)	6.150 (1.445)
Fattore Inoculo	M0	1.112 (0.071)	0.551 (0.053)	0.486 (0.027)	2.588 (0.587)	6.279 ab (1.661)
	M1	1.184 (0.084)	0.592 (0.072)	0.485 (0.029)	1.649 (0.325)	3.958 b (0.784)
	M2	1.066 (0.072)	0.530 (0.064)	0.481 (0.027)	3.104 (0.603)	8.658 a (1.744)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	* Sign	* Sign

Tabella 51. Dati parametri misurati nei 3 anni, prova Rio Grande. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi. La sigla *Sign* indica risultati significativi.

06*07*08		PRODUZIONE			AMF	
		Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot	No. A x cm ⁻¹	M%
Fattore Anno	A1	1.806 b (0.054)	1.490 b (0.055)	0.819 a (0.011)	5.459 a (0.563)	13.568 a (1.303)
	A2	2.587 a (0.047)	2.092 a (0.061)	0.816 a (0.027)	3.644 b (0.287)	12.578 a (1.100)
	A3	1.121 c (0.043)	0.558 c (0.036)	0.484 b (0.016)	2.447 b (0.305)	6.299 b (0.861)
Fattore Compost	C0	1.801 (0.105)	1.422 (0.125)	0.736 (0.036)	3.725(0.419)	10.574 (1.098)
	C1	1.899 (0.127)	1.375 (0.117)	0.687 (0.028)	4.085 (0.437)	11.688 (1.231)
	C2	1.814 (0.102)	1.342 (0.114)	0.697 (0.032)	3.740 (0.436)	10.183 (1.161)
Interaz. Anno Compost	A*C	N.S	N.S	* Sign	N.S	N.S
Fattore Inoculo	M0	1.880 (0.110)	1.410 (0.116)	0.705 (0.030)	3.781 (0.485)	10.599 (1.270)
	M1	1.869 (0.100)	1.414 (0.116)	0.715 (0.035)	3.491 (0.320)	10.146 (1.067)
	M2	1.765 (0.125)	1.315 (0.123)	0.699 (0.032)	4.279 (0.464)	11.700 (1.147)
Interaz. Anno Inoculo	A*M	* Sign	* Sign	N.S	N.S	N.S
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S
Interaz. Anno Compost Inoculo	A*C*M	N.S	N.S	N.S	* Sign	* Sign

11.1.1.2. Qualità

Tabella 52. Dati misurazioni qualità carpometriche Prova Rio Grande 2007. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

2007		QUALITA' CARPOMETRICHE			
		Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)
Fattore Compost	C0	77.29 (2.329)	6.50 (0.075)	4.73 (0.052)	633.9 (32.03)
	C1	76.03 (1.486)	6.56 (0.061)	4.73 (0.042)	667.0 (32.87)
	C2	75.11 (1.985)	6.62 (0.0719)	4.63 (0.042)	642.9 (31.99)
Fattore Inoculo	M0	78.49 (1.529)	6.66 a (0.037)	4.75 (0.035)	661.7 (25.01)
	M1	77.45 (1.953)	6.63 a (0.070)	4.71 (0.043)	642.9 (41.30)
	M2	72.49 (2.088)	6.38 b (0.075)	4.63 (0.054)	639.2 (28.56)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 53. Dati misurazioni qualità organolettiche Prova Rio Grande 2007. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

2007		QUALITA' ORGANOLETTICHE		
		°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Fattore Compost	C0	4.17 (0.112)	4.64 (0.015)	2.94 (0.064)
	C1	3.89 (0.071)	4.63 (0.017)	2.91 (0.058)
	C2	4.07 (0.068)	4.61 (0.018)	3.05 (0.065)
Fattore Inoculo	M0	4.07 (0.074)	4.65 (0.016)	2.89 (0.059)
	M1	4.04 (0.064)	4.62 (0.018)	2.98 (0.063)
	M2	4.02 (0.122)	4.62 (0.014)	3.02 (0.067)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S

Tabella 54. Dati misurazioni qualità carpometriche Prova Rio Grande 2008 Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

2008		QUALITA' CARPOMETRICHE			
		Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)
Fattore Compost	C0	87.60 (4.166)	3.63 (0.062)	2.48 (0.039)	407.87 (29.265)
	C1	81.70 (2.636)	3.50 (0.084)	2.46 (0.031)	408.33 (32.534)
	C2	85.10 (2.985)	3.53 (0.074)	2.48 (0.049)	488.05 (47.034)
Fattore Inoculo	M0	85.88 (2.926)	3.59 a (0.069)	2.48 (0.041)	427.65 (36.838)
	M1	89.75 (3.410)	3.68 a (0.068)	2.53 (0.035)	435.40 (35.442)
	M2	78.77 (2.997)	3.40 b (0.066)	2.41 (0.038)	441.20 (43.508)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 55. Dati misurazioni qualità organolettiche Prova Rio Grande 2008 Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). La sigla N.S. indica risultati non significativi.

2008		QUALITA' ORGANOLETTICHE			
		°Brix	pH	Cond. (mS cm ⁻¹)	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Fattore Compost	C0	4.38 (0.082)	4.51 (0.047)	4.55 (0.081)	8.81 (0.372)
	C1	4.46 (0.093)	4.55 (0.032)	4.94 (0.170)	9.35 (0.621)
	C2	4.47 (0.086)	4.44 (0.044)	4.95 (0.134)	9.55 (0.593)
Fattore Inoculo	M0	4.44 (0.092)	4.49 (0.041)	4.76 (0.123)	9.59 (0.607)
	M1	4.46 (0.080)	4.46 (0.039)	4.88 (0.180)	9.24 (0.340)
	M2	4.40 (0.090)	4.54 (0.046)	4.79 (0.121)	8.88 (0.629)
Interaz. Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 56. Dati misurazioni qualità carpometriche Prova Rio nei due anni 2007 e 2008. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla N.S. indica risultati non significativi.

07*08		QUALITA' CARPOMETRICHE			
		Peso (g)	Equat (cm)	Long (cm)	Cons (6 mm)
Fattore Anno	A1	75.82 b (1.203)	4.71 a (0.023)	6.53 a (0.040)	647.7 a (14.42)
	A2	84.80 a (1.910)	2.47 b (0.023)	3.56 b (0.043)	434.8 b (21.75)
Fattore Compost	C0	83.27 (2.627)	3.63 (0.241)	5.05 (0.301)	522.8 (31.06)
	C1	77.98 (1.652)	3.58 (0.235)	5.02 (0.320)	534.1 (32.35)
	C2	79.68 (1.997)	3.55 (0.227)	5.06 (0.322)	566.6 (31.24)
Interazione Anno Compost	A*C	N.S	N.S	N.S	N.S
Fattore Inoculo	M1	83.16 a (1.751)	3.63 a (0.239)	5.12 a (0.321)	540.8 (30.94)
	M2	82.70 a (2.441)	3.60 ab (0.226)	5.15 a (0.310)	541.5 (32.33)
	M3	75.07 b (1.854)	3.54 b (0.237)	4.86 b (0.309)	541.3 (32.09)
Interazione Anno Inoculo	A*M	N.S	N.S	N.S	N.S
Interazione Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S	N.S
Interazione Anno Compost Inoculo	A*C*M	N.S	N.S.	N.S	N.S

Tabella 57. Dati misurazioni qualità organolettiche Prova Rio nei due anni 2007 e 2008. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi. La sigla *Sign* indica risultati significativi.

07*08		QUALITA' ORGANOLETTICHE		
		°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Fattore Anno	A1	3.99 b (0.032)	4.62 a (0.008)	2.99 b (0.029)
	A2	4.43 a (0.049)	4.49 b (0.024)	9.24 a (0.308)
Fattore Compost	C0	4.24 (0.057)	4.57 (0.027)	5.93 (0.629)
	C1	4.16 (0.078)	4.58 (0.019)	6.13 (0.738)
	C2	4.23 (0.070)	4.53 (0.030)	6.28 (0.740)
Interazione Anno Compost	A*C	* Sign	N.S	N.S
Fattore Inoculo	M1	4.25 (0.065)	4.57 (0.026)	6.28 (0.752)
	M2	4.20 (0.069)	4.53 (0.025)	6.12 (0.673)
	M3	4.18 (0.073)	4.58 (0.025)	5.94 (0.686)
Interazione Anno Inoculo	A*M	N.S	N.S	N.S
Interazione Compost Inoculo	C*M	N.S	N.S	N.S
Interazione Anno Compost Inoculo	A*C*M	N.S	* Sign	N.S

11.2. Prove Varietà

11.2.1. 3 linee prioritarie

11.2.1.1. Produzione e colonizzazione micorrizica arbuscolare

Tabella 58. Dati infezione micorrizica 3 linee rilevati nel 2007 nelle 2 location sperimentali. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

2007		Metaponto (MET)		Bondeno (BON)		MET vs BON	
		No. A x cm ⁻¹	M%	No. A x cm ⁻¹	M%	No. A x cm ⁻¹	M%
Location	P1	-----	-----	-----	-----	1.60 b (0.598)	12.04 (3.923)
	P2	-----	-----	-----	-----	5.57 a (1.437)	11.93 (3.233)
Fattore Linee	L9	5.89 (3.016)	11.03 (6.079)	2.98 (1.469)	20.28 (7.040)	3.83 (1.682)	12.74 (5.048)
	L5	5.25 (3.065)	12.55 (7.560)	1.28 (0.501)	14.33 (4.510)	3.00 (1.670)	11.08 (4.339)
	L7	5.56 (2.038)	12.28 (4.455)	1.93 (0.935)	14.04 (4.977)	3.92 (1.303)	12.13 (4.052)
Fattore Sampling Time	S1	-----	-----	0.11 (0.051)	0.88 b (0.269)	-----	----
	S2	-----	-----	3.11 (0.816)	23.23 a (4.184)	-----	----
	S3	-----	-----	2.98 (1.325)	24.55 a (3.354)	-----	----
Interazione Location Linee	P*L	-----	-----	-----	-----	N.S	N.S
Interazione Linee Sam. Time	L*S	-----	-----	N.S	N.S	-----	-----

Tabella 59. Dati infezione micorrizica 3 linee rilevati nel 2008 nelle 2 location sperimentali. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

2008		Metaponto (MET)		BON vs MET	
		No. A x cm ⁻¹	M%	No. A x cm ⁻¹	M%
Location	P1	-----	-----	3.65 b (0.397)	9.08 b(0.901)
	P2	-----	-----	8.32 a (1,188)	21.15 a (3.321)
Fattore Linee	L9	7.50 (2.019)	18.53 (5.598)	6.02 (1.086)	14.89 (2.877)
	L5	9.44 (1.762)	25.86 (6.072)	6.38 (1.204)	16.38 (3.856)
	L7	8.04 (2.515)	19.07 (5.931)	5.56 (1.382)	14.08 (3.208)
Interazione Location Linee	P*L	-----	-----	N.S	N.S

Tabella 60. Dati produzione ed infezione micorrizica 3 linee rilevati nel 2008 nelle 2 location sperimentali. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi. La sigla *Sign* indica risultati significativi.

2008		PRODUZIONE			AMF	
		Prod Tot (Kg X Pianta)	Prod Vend (Kg X Pianta)	Resa Vend/Tot	No. A x cm ⁻¹	M%
Fattore Linee	L9	1.80 (0.180)	1.24 (0.138)	0.688 (0.027)	4.65 (0.628)	11.24 (1.814)
	L5	1.75 (0.175)	1.10 (0.125)	0.624 (0.017)	3.90 (1.017)	10.72 (3.410)
	L7	1.96 (0.189)	1.24 (0.140)	0.628 (0.019)	3.60 (0.720)	9.21 (1.849)
Fattore 2 Elementi	E1	1.84 (0.164)	1.23 (0.125)	0.662 (0.021)	-----	-----
	E2	1.83 (0.128)	1.16 (0.089)	0.631 (0.017)	-----	----
Fattore Sampling Time	S1	----	----	----	3.08 b (0.572)	6.73 a (1.391)
	S2	----	----	----	5.01 a (0.675)	14.04 b (2.223)
Interazione Linee Sam. Time	L*S	----	----	-----	*Sign	N.S
Interazione Linee 2 Elementi	L*E	N.S	N.S	N.S	----	----

Tabella 61. Dati infezione micorrizica 3 linee 2007 *versus* 2008 nelle 2 location sperimentali. Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

3 Linee 07*08		BON		MET	
		No. A x cm ⁻¹	M%	No. A x cm ⁻¹	M%
Fattore Anno	A1	2.06 b (0.592)	16.22 a (3.125)	5.57 (1.437)	11.95 (3.22)
	A2	3.50 a (0.274)	10.25 b (0.892)	6.59 (0.913)	16.07 (3.207)
Fattore Linee	L9	3.48 (0.724)	15.65 (3.646)	5.39 (1.627)	10.41 (3.553)
	L5	2.35 (0.506)	11.82 (2.549)	6.71 (1.727)	17.22 (5.098)
	L7	2.52 (0.528)	12.24 (2.514)	6.14 (1.091)	14.39 (2.943)
Interazione Anno* Linee	A*L	N.S	N.S	N.S	N.S

11.2.1.2. Qualità

Tabella 62. Dati misurazioni qualità carpometriche Prova 3 linee 2007 (cresciute a Bondeno). Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.).

2007		QUALITA' CARPOMETRICHE			
		Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)
Fattore Linee	L9	70.50 (14.500)	5.22 (0.165)	4.56 (0.210)	508.3 (11.10)
	L5	68.50 (9.500)	5.27 (0.235)	4.49 (0.010)	493.0 (33.40)
	L7	73.50 (0.500)	5.04 (0.115)	4.36 (0.090)	570.2 (48.80)

Tabella 63. Dati misurazioni qualità organolettiche Prova 3 linee 2007 (cresciute a Bondeno). Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.).

2007		QUALITA' ORGANOLETTICHE		
		°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Fattore Linee	L9	5.10 (0.500)	4.18 (0.090)	7.97 (1.565)
	L5	5.20 (0.300)	4.31 (0.030)	7.05 (0.134)
	L7	5.10 (0.500)	4.22 (0.035)	7.76 (0.191)

Tabella 64. Dati misurazioni qualità carpometriche Prova 3 linee 2008 (cresciute a Bondeno). Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). La sigla N.S. indica risultati non significativi.

2008		QUALITA' CARPOMETRICHE			
		Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)
Fattore Linee	L9	72.75 (1.982)	3.05 (0.060)	2.44 (0.032)	492.88 (41.312)
	L5	68.88 (3.006)	2.95 (0.063)	2.39 (0.040)	446.73 (34.582)
	L7	71.15 (2.823)	3.03 (0.056)	2.39 (0.035)	523.98 (35.237)
Fattore 2 Elementi	E1	69.50 (2.400)	2.97 (0.059)	2.37 (0.028)	459.52 (17.264)
	E2	72.35 (1.792)	3.05 (0.031)	2.44 (0.026)	516.20 (38.694)
Interazione Linee 2 Elementi	L*E	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 65. Dati misurazioni qualità organolettiche Prova 3 linee 2008 (cresciute a Bondeno). Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

2008		QUALITA' ORGANOLETTICHE			
		Peso (g)	pH	Cond (mS cm ⁻¹)	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Fattore Linee	L9	72.75 (1.982)	4.47 (0.046)	4.58 (0.188)	9.21 (0.773)
	L5	68.88 (3.006)	4.41 (0.039)	4.36 (0.121)	9.01 (0.716)
	L7	71.15 (2.823)	4.47 (0.035)	4.38 (0.093)	8.08 (0.845)
Fattore 2 Elementi	E1	69.50 (2.400)	4.46 (0.038)	4.54 (0.140)	8.76 (0.677)
	E2	72.35 (1.792)	4.44 (0.028)	4.34 (0.073)	8.77 (0.599)
Interazione Linee 2 Elementi	L*E	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 66. Dati misurazioni qualità carpometriche Prova 3 linee 2007 e 2008 (cresciute a Bondeno). Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

07*08		QUALITA' CARPOMETRICHE			
		Peso (g)	Long (cm)	Equat (cm)	Cons (6 mm)
Fattore Anno	A1	70.83 (4.571)	5.17a (0.091)	4.47 a (0.070)	523.8 (21.54)
	A2	71.33 (0.859)	3.00 b (0.000)	2.40 b (0.000)	497.0 (13.19)
Fattore Linee	L9	71.55 (5.953)	4.11 (0.643)	3.48 (0.629)	499.1 (7.91)
	L5	68.60 (3.879)	4.13 (0.661)	3.45 (0.603)	482.5 (15.73)
	L7	73.10 (0.420)	4.02 (0.589)	3.38 (0.567)	549.7 (25.45)
Interazione Anno*Linee	A*L	N.S	N.S	N.S	N.S

Tabella 67. Dati misurazioni qualità organolettiche Prova 3 linee 2007 e 2008 (cresciute a Bondeno). Tra parentesi è riportato l'errore standard (E. S.). I valori in grassetto e le lettere indicano i gruppi trovati dal Tukey test. La sigla *N.S.* indica risultati non significativi.

07*08		QUALITA' ORGANOLETTICHE		
		°Brix	pH	Acid (Meq 100g ⁻¹)
Fattore Anno	A1	5.13 a (0.199)	4.24 b (0.036)	7.59 b (0.445)
	A2	4.18 b (0.048)	4.45 a (0.018)	9.00 a (0.246)
Fattore Linee	L9	4.65 (0.333)	4.32 (0.088)	8.52 (0.728)
	L5	4.65 (0.343)	4.36 (0.032)	7.95 (0.628)
	L7	4.68 (0.320)	4.36 (0.078)	8.42 (0.395)
Interazione Anno*Linee	A*L	N.S	N.S	N.S

12. Glossario

Statistica

Abbreviazione	Significato
ANOVA	Analysis of Variance
N. S.	Non significativo
* Sign	Significativo
p	p value
R ²	Coefficiente di correlazione al quadrato
E.S.	Errore Standard
MDS	Non metric Multi dimensional scaling
ANOSIM	Analysis of similarity
HSD	Tukey's Studentized Range

Unità di misura

Abbreviazione	Significato
Proiez. Sup Fogliare	Proiezione superficiale dello sviluppo della biomassa
D.I.	Disease Index (Liu <i>et al.</i> , 1995)
M%	Indice di Micorrizzazione (Trouvelot <i>et al.</i> , 1986)
No. A x cm ⁻¹	Numero arbuscoli per centimetri di radice osservati
Prod Tot	Produzione totale
Prod Vend	Produzione vendibile
Resa Vend/Tot	Resa produttiva: rapporto Prod. Vend e Prod. Tot.
Equat	Diametro equatoriale delle bacche
Long	Diametro polare delle bacche
Cons	Consistenza
Acid	Acidità titolabile
Cond	Conducibilità elettrica

Fattori

Abbreviazione	Livelli	Significato
C		Fattore compost
	C0	Assenza introduzione compost
	C1	Dosaggio inferiore
	C2	Dosaggio maggiore
M		Fattore inoculo
	M0	Assenza introduzione inoculo
	M1	Dosaggio inferiore
	M2	Dosaggio maggiore
A		Fattore anno
S		Fattore Sampling Time: data di campionamento
L		Fattore Linee
P		Fattore Location
E		Fattore 2 elementi: piante inoculate o no nel vivaio

ACKNOWLEDGEMENT

The authors gratefully acknowledge funding from the European Community financial participation under the Sixth Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration Activities, for the Integrated Project QUALITYLOWINPUTFOOD, FP6-FOOD-CT-2003- 506358.

DISCLAIMER

The views expressed in this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

Neither the European Commission nor any person acting on behalf of the Commission is responsible for the use which might be made of the information contained herein.

Bibliografia

- Abbott, L. K. (1982) Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Australian Journal of Botany* **30**, 485-489.
- Abo-Elyousr, K., Hashem, M. & Ali, E. H. (2009) Integrated control of cotton root rot disease by mixing fungal biocontrol agents and resistance inducers. *Crop Protection*, **28**, 295-301.
- Adesemoye, A. O., Torbert, H. A. & Kloepper, J. W. (2008) Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Canadian Journal of Microbiology*, **54**, 876-886.
- Al-Karaki, G., McMichael, B. & Zak, J. (2004) Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, **14**, 263-9.
- Al-Karaki, G. N. (2006) Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Scientia Horticulturae*, **109**, 1-7.
- Alkan, N., Gadkar, V., Coburn, J., Yarden, O. & Kapulnik, Y. (2004) Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. *New Phytologist*, **161**, 877-885.
- Alkan, N., Gadkar, V., Yarden, O. & Kapulnik, Y. (2006) Analysis of quantitative interactions between two species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, *Glomus mossae* and *G. intraradices*, by Real-Time PCR. *Applied And Environmental Microbiology*, **72**, 4192-4199.
- Amadei, G., Trentini, L. & Soressi, G. P. (1990) Il Pomodoro. pp. 102. Enichem Agricoltura e Agrimont, Milano.
- Anderson, I. C. & Cairney, J. W. G. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, **6**, 769-779.
- Anderson, I. C., Campbell, C. D. & Prossere, J. I. (2003) Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*, **5**, 36-47.
- Andrade, G., Mihara, K. L., Linderman, R. G. & Bethlenfalvay, G. J. (1998) Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant and Soil*, **201**, 89-96.
- Anon (2004) Organic farming enters the mainstream. *Nature*, **428**, 783.
- Arshad, M. & Frankeberger, W. T. (1991) Microbial production of plant hormones. *Plant and Soil*, **133**, 1-18.
- Artursson, V., Finlay, R. D. & Jansson, J. K. (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology*, **8**, 1-10.
- Azcon-Aguilar, C. & Barea, J. M. (1992) Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere micro-organisms. *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process* (ed M. J. Allen), pp. 163-198. Chapman & Hall, New York.
- Azcon-Aguilar, C. & Barea, J. M. (1995) Saprophytic growth of arbuscular-mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology* (eds B. Hock & A. Varma), pp. 391-407. Springer-Verlag, Heildeberg, Germany.

- Azcon-Aguilar, C. & Barea, J. M. (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens-an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, **6**, 457-464.
- Balestrini, R. & Lanfranco, L. (2006) Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, **16**, 509-524.
- Barazani, O. & Friedman, J. (1999) Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 2397-2406.
- Barea, J. M., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C. (2002) Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General Molecular Microbiology*, **81**, 343-351.
- Barea, J.-M., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C. (2004) Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. *Plant surface microbiology* (eds A. Varma, L. Abbot, D. Werner & R. Hampp), pp. 351-371. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Barea, J.-M., Pozo, M. J., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C. (2005) Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1761-1778.
- Barea, J. M., Andrade, G., Bianciotto, V., Dowling, D., Lohrke, S., Bonfante, P., O'Gara, F. & Azcon-Aguilar, C. (1998) Impact on Arbuscular Mycorrhiza Formation of Pseudomonas Strains Used as Inoculants for Biocontrol of Soil-Borne Fungal Plant Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 2304-2307.
- Barea, J. M., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C. (1992) Vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. *Methods in microbiology* (eds J. R. Norris, D. J. Read & A. Varma), pp. 391-416. Academic Press, London.
- Baruffa, E., Picard, C., Sabbioni, F., Petrozza, A., Giovannetti, G. & Bosco, M. (2008) Plant-probiotic microorganisms for a sustainable buffer of input reduction in organic and low-input tomato production systems. *Cultivate the Future. 16th IFOAM Organic World Congress*, pp. 160-163. IBSN, Modena, Italy.
- Bashan, Y. & Holguin, G. (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 1225-1228.
- Bastian, F., Bouziri, L., Nicolardot, B. & Ranjard, L. (2009) Impact of wheat straw decomposition on successional patterns of soil microbial community structure. *Soil Biology & Biochemistry*, **41**, 262-275.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernandez, T. & Garcia, C. (2008) Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma*, **147**, 159-171.
- Benhamou, N., Garand, C. & Goulet, A. (2002) Ability of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 4044-4060.
- Benizri, E., Courtade, A., Picard, C. & Guckert, A. (1998) Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas Fluorescens* M. 3.1. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 1481-1484.
- Berta, G., Sampo, S., Gamalero, E., Massa, N. & Lemanceau, P. (2005) Suppression of *Rhizoctonia* root-rot of tomato by *Glomus mossae* BEG12 and *Pseudomonas fluorescens* A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on the root morphogenesis. *European Journal of Plant Pathology*, **111**, 279-288.
- Borneman, J. & Hartin, R. J. (2000) PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4356-4360.

- Borneman, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J., Nienhuis, J. & Triplett, E. W. (1996) Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 1935-1943.
- Bosco, M., Baruffa, E. & Picard, C. (2007a) Anche le piante hanno bisogno di organismi probiotici. *Rivista di frutticoltura e di orticoltura*, **12**, 40-45.
- Bosco, M., Giovannetti, G., Picard, C., Baruffa, E., Brondolo, A. & Sabbioni, F. (2007b) Commercial plant-probiotic microorganisms for sustainable organic tomato production system. *Improving Sustainability in Organic and Low Input Food Production Systems*, pp. 268-271. Hohenheim, Germany.
- Bosco, M. & Lumini, E. (2003) Attinomiceti azotofissatori del genere *Frankia*. *Metodi di Analisi Microbiologica del Suolo*. (eds G. Picci & P. Nanniperi), pp. 35-57. Franco Angeli, Milano.
- Bourn, D. & Prescott, J. (2002) A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **42**, 1-34.
- Bowen, G. D. & Rovira, A. D. (1999) The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*, **66**, 1-102.
- Bruce, A. & Highley, T. L. (1991) Control of growth of wood decay *Basidiomycetes* by *Trichoderma* spp. and other potentially antagonistic fungi. *Forest Products Journal*, **41**, 63-67.
- Brundrett, M. (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **79**, 473-95.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. & Malajczuk, N. (1996) Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. *ACIAR Monograph 32*, pp. 374. Australian Centre for International Agriculture Research, Canberra.
- Brundrett, M. C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, **154**, 275-304.
- Buckley, D. H. & Schmidt, T. M. (2001) The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology*, **42**, 11-21.
- Bulluck III, L., R., Brosius, M., Evanylo, G., K. & Ristaino, J., B. (2002) Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. *Applied Soil Ecology*, **19**, 147-160.
- Burke, D. J., Hamerlynck, E. P. & Hahn, D. (2002) Effect of arbuscular mycorrhizae on soil microbial populations and associated plant performance of the salt marsh grass *Spartina patens*. *Plant and Soil*, **239**, 141-154.
- Buscot, F., Munch, J. C., Charcosset, J. Y., Gardes, M., Nehls, U. & Hampp, R. (2000) Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**, 601-614.
- Cardoza, R. E., Hermosa, M. R., Vizcaino, J. A., Sanz, L., Monte, E. & Gutierrez, S. (2005) Secondary metabolites produced by *Trichoderma* and their importance in the biocontrol process. *Microorganisms for industrial enzymes and biocontrol* (eds E. Mellado-Duran & J. L. Barredo), pp. 207. Research Signpost, India.
- Caris-Veyrat, C., Amiot, M.-J., Tyssandier, V., Grasselly, D., Buret, M., Mikolajczak, J.-C. G., Bouteloup-Demange, C. & Borel, P. (2004) Influence of organic versus conventional Agricultural Practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6503-6509.

- Carlsen, S. C. K., Understrup, A., Fomsgaard, I. S., Mortensen, A. G. & Ravnskov, S. (2008) Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and a pathogenic fungus. *Plant and Soil*, **302**, 33-43.
- Carson, J., Rooney, D., Gleeson, D. B. & Clipson, N. (2007) Altering the mineral composition of soil causes a shift in microbial community structure. *Microbial Ecology*, **61**, 414-423.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Ovreas, L., Diez, B., Goddard, V. J., Gasol, J. M., Joint, I., Rodriguez-Valera, F. & Pedros-Alio, C. (2002) Changes in archeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environmental Microbiology*, **4**, 338-348.
- Casella, S. (2003) Batteri in associazione simbiotica diazotrofa (Rizobi). *Metodi di Analisi Microbiologica del suolo* (eds G. Picci & P. Nanniperi), pp. 17-34. Franco Angeli Editore, Milano, Italy.
- Cavagnaro, T. R., Jackson, L. E., Six, J., Ferris, H., Goyal, S., Asami, D. & Scow, K. M. (2006) Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production. *Plant and Soil*, **282**, 209-225.
- Chassy, A. W., Bui, L., Renaud, E. N. C., Van Horn, M. & Mitchell, A. E. (2006) Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 8244-8252.
- Clapp, J. P., Young, J. P. W., Merryweather, J. W. & Fitter, A. H. (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist*, **130**, 259-265.
- Clark, M. S., Howrath, W. R., Shennan, C., Scow, K. M., Lantni, W. T. & Ferris, H. (1999) Nitrogen, weeds and water as yield-limiting factors in conventional, low-input, and organic tomato systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **73**, 257-270.
- Clarke, K. R. (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology*, **18**, 117-143.
- Clarke, K. R. & Gorley, R. N. (2001) PRIMER v5: user manual/tutorial., pp. 91. PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK.
- Clarke, K. R. & Warwick, R. M. (2001) Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. *PRIMER-E: Plymouth, UK.* , 172 pp.
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Berberger-Gateau, P. & Dartigues, J. F. (2000) Intake of flavonoids and risk of dementia. *European Journal of Clinical Nutrition*, **16**, 357-363.
- Compact, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. & Ait Barka, E. (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 4951-4959.
- Cornwell, W. K., Bedford, B. L. & Chapin, C. T. (2001) Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in a phosphorus-poor wetland and mycorrhizal response to phosphorus fertilization. *American Journal of Botany*, **88**, 1824-1829.
- Costa, R., Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. & Smalla, K. (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds *FEMS Microbiology Ecology*, **56**, 236-249.

- Costacurta, A. & Vanderleyden, J. (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, **21**, 1-18.
- Daei, G., Ardekani, M. R., Rejali, F., Teimuri, S. & Miransari, M. (2008) Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. *Journal of Plant Physiology*.
- Davidson, F. A. (2007) Mathematical modelling of mycelia: a question of scale. *Fungal Biology Reviews*, **21**, 30-41.
- De Bellis, P. & Ercolani, G. L. (2001) Growth Interactions during Bacterial Colonization of Seedling Rootlets. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1945-1948.
- De Bruyn, J. W., Garretsen, F. & Kooistra, E. (1971) Variation in taste and chemical composition of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Euphytica*, **20**, 214-227.
- De Sousa, F. A., Kowalchuk, G. A., Leeftang, P., van Veen, J. A. & Smith, E. (2004) Pcr-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of internal-intraspecies 18S rRNA gene sequences heterogeneity is an accurate and sensitive method to asses species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 1413-1424.
- DeBach, P. (1979) Biological control by natural enemies. pp. 323. Cambridge University Press London.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Francisco Aguirre, J., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, S., Sarig, S. & Okon, Y. (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 871-879.
- Dodd, J. (2000) The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro- and natural ecosystems. *Outlook on Agriculture*, **29**, 55-62.
- Dorais, M. (2007) Effect of cultural management on tomato fruit health qualities. *Acta Horticulturae*, **744**, 279-294.
- Dorais, M., Ehret, D. L. & Papadopoulos, A. P. (2008) Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 231-250.
- Drinkwater, L. E., Letourneau, D. K., Workneh, F., van Bruggen, A. H. C. & Shennan, C. (1995) Fundamental differences between conventional and organic tomato agroecosystem in California. *Ecology Applied*, **5**, 1098-1112.
- Egert, M. & Friedrich, M. W. (2003) Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 2555-2562.
- Ezawa, T., Smith, S. E. & Smith, F. A. (2002) P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil*, **244**, 221-230.
- Ezzi, M. I. & Lynch, J. M. (2002) Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 1042-1047.
- FAO (2005) <http://www.fao.org>.
- Farmer, M., J., Li, X., Feng, G., Zhao, B., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., Gianninazzi-Pearson, V. & van Tuinen, D. (2007) Molecular monitoring of field-inoculated AMF to evaluate persistence in sweet potato crops in China. *Applied and Soil Ecology*, **35**, 599-609.
- Finlay, R. D. (2004) Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, **18**, 91-96.

- Finlay, R. D. (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1115-1126.
- Fisher, M., M. & Triplett, E., W. (1999) Automated approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4630-4636.
- Fitter, A. H. (2005) Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology*, **93**, 231-243.
- Florenzano, G. (1983) Fondamenti di microbiologia del terreno. pp. 748. Reda.
- Frank, A. B. (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, **3**, 128-145.
- Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**, 365-378.
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M. G. & Berta, G. (2004) Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza*, **14**, 185-92.
- Garbaye, J. (1994) Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, **128**, 197-210.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for *basidiomycetes*-application to the identification of *mycorrhizae* and rusts. *Molecular Ecology*, **2**, 113-118.
- Gengotti, S. (2006) Pomodoro da industria: la difesa in coltura integrata. *La tecnica/Orticole*, **Gennaio 2006**, 80-82.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. & Barker, D. G. (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intercellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *The Plant Cell*, **17**, 3489-3499.
- Gianinazzi, S. & Schuepp, H. (1994) Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystem. pp.226. Birkhauser-Verlag, Basel.
- Gilchrist, E. J. & Haughn, G. W. (2005) TILLING without a plough: a new method with applications for reserve genetic. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 211-215.
- Giles, J. (2004) Is organic food better for us. *Nature*, **428**, 796-797.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, **84**, 489-500.
- Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R. & Varma, A. (2005) Microbial diversity in soils. *Micro-organism in soils: roles in genesis and functions*. (eds F. Buscot & S. Varma), pp. 195-212. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Gleeson, D., McDermott, F. & Clipson, N. (2006) Structural diversity of bacterial communities in a heavy metal mineralized granite outcrop. *Environmental Microbiology*, **8**, 383-393.
- Gollotte, A., van Tuinen, D. & Atkinson, D. (2004) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, **14**, 111-117.
- Gomes, N. C. M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N. G., Buchner, A., Mendona-Hagler, L. & Smalla, K. (2003) Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 3758-3766.

- Gonzalez-Chavez, M. C., Carrillo-Gonzalez, R., Wright, S. F. & Nichols, K. (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, **130**, 317-323.
- Graham, T. A., Golsteyn-Thomas, E. J., Thomas, J. E. & Gannon, V. P. (1997) Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. *International Journal Systematic Bacteriology* **47**, 863-869.
- Grant, R. J., Muckian, L. M., Clipson, N. J. W. & Doyle, E. M. (2006) Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Letters in Applied Microbiology*, **44**, 293-300.
- Green, C. D., Stodola, A. & Augé, R. M. (1998) Transpiration of detached leaves from mycorrhizal and nonmycorrhizal cowpea and rose plants given varying abscisic pH, calcium, and phosphorus. *Mycorrhiza*, **8**, 93-99.
- Grierson, D. & Kader, A. A. (1986) Fruit ripening and quality. *The Tomato Crop* (eds J. G. Atherton & J. Rudich), pp. 241-280. Chapman & Hall, London.
- Grifoni, A., Bazzicalupo, M., Di Serio, C., Fancelli, S. & Fani, R. (1995) Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and the histidine operon. *FEMS Microbiology Letters*, **127**, 85-91.
- Gutierrez-Miceli, F., Santiago-Borraz, J., Molina, J. A. M., Nafante, C. C., Abud-Archila, M., Llaven, M. A. O., Rincon-Rosales, R. & Dendooven, L. (2007) Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Bioresourse Technology*, **98**, 2781-2786.
- Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L. J. & Poole, P. S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, **245**, 83-93.
- Haas, D. & Keel, K. (2003) Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annals review of Phytopathology*, **41**, 117-153.
- Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1997) Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal dna intergenic spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **47**, 202-206.
- Harman, G. E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. *Plant Disease*, **84**, 377-393.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004) *Trichoderma* species- opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 43-56.
- Harrier, L. A. (2001) The arbuscular mycorrhizal symbiosis: a molecular review of the fungal dimension. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 469-478.
- Harrison, M. J. (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Reviews of Microbiology*, **59**, 19-42.
- Hasna, M. K., Ogren, E., Persson, P., Martensson, A. & Ramert, B. (2009) Management of corky root disease of tomato in participation with organic tomato growers. *Crop Protection*, **28**, 155-161.
- He, Z. L., Yang, X. E. & Stoffella, P. J. (2005) Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **19**, 125-140.

- Head, I. M., Saunders, J. R. & Pickup, R. W. (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbiol Ecology*, **35**, 1-21.
- Heeb, A., Lundegardh, B., Savage, G. & Ericsson, T. (2006) Impact of organic and inorganic fertilizers on yield, taste, and nutritional quality of tomatoes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **169**, 535-541.
- Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H. & Young, J. P. W. (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, **384**, 431.
- Helgason, T., Fitter, A. H. & Young, J. P. W. (1999) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology*, **8**, 658-666.
- Helgason, T., Merryweather, J. W., Denison, J., Wilson, P., Young, J. P. W. & Fitter, A. H. (2002) Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology*, **90**, 371-384.
- Hertog, M. G. L. & Hollman, P. C. H. (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *European Journal of Clinical Nutrition*, **50**, 63-71.
- Heuer, H. & Smalla, K. (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. *Modern soil microbiology* (ed M. Dekker), pp. 353-373. New York.
- Hildebrandt, P. W., Janetta, K., Ouziad, F., Renne, B., Nawrath, K. & Bothe, H. (2001) Arbuscular mycorrhizal colonization of *halophytes* in Central European salt marshes. *Mycorrhiza*, **10**, 175-183.
- Hiltner, L. (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie. *Arbeiten der Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft*, **98**, 59-78.
- Hjeljord, L. & Tronsmo, A. (1998) *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics* (eds C. P. Kubicek & G. E. Harman), pp. 135-151. Taylor and Francis, London
- Hobbs, P. R. (2007) Conservation Agriculture: What Is It and Why Is It Important for Future Sustainable Food Production? *Journal of Agricultural Science*, **145**, 127-137.
- Hodge, A., Campbell, C. D. & Fitter, A. H. (2001) An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*, **413**, 297-299.
- Hohnjec, N., Vieweg, M. F., Puhler, A., Becker, A. & Kuster, H. (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*, **137**, 1283-301.
- Horrigan, L., Lawrence, R. S. & Walker, P. (2002) How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives*, **110**, 445-456.
- Horton, T. R. & Bruns, T. D. (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Molecular Ecology*, **10**, 1855-1871.
- Howell, C. R. & Stipanovic, R. D. (1979) Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium *Phytopathology*, **69**, 480-482.

- Hwang, J. & Benson, D. M. (2003) Expression of induced resistance in poinsettia cuttings against *Rhizoctonia* stem rot by treatment of stock plants with binucleate *Rhizoctonia*. *Biological Control*, **27**, 73-80.
- Ingleby, K., Wilson, J., Munro, R. C. & Cavers, S. (2007) Mycorrhizas in agroforestry: spread and sharing of arbuscular mycorrhizal fungi between trees and crop: complementary use of molecular and microscopic approaches. *Plant and Soil*, **294**, 125-136.
- Isayenkov, S., Fester, T. & Hause, B. (2004) Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *Journal of Plant Physiology*, **61**, 1379-1383.
- Jansa, J., Smith, F. A. & Smith, S. E. (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist*, **177**, 779-789.
- Ji, P., Campbell, H. L., Kloepper, J. W., Jones, J. B., Suslow, T. V. & Wilson, M. (2006) Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, **36**, 358-367.
- Jing, Y. D., He, Z. L. & Yang, X. E. (2007) Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **8**, 192-207.
- Johansen, A., Jakobsen, I. & Jensen, E. S. (1993) External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum*. 3. Hyphal transport ³²P and ¹⁵N. *New Phytologist*, **124**, 61-68.
- Johansson, J., Paul, L. & Finlay, R. D. (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**, 1-12.
- Kampert, M., Strzelczyk, E. & Ppkojska, A. (1975) Production of auxin by bacteria isolated from the roots of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). *Acta Microbiologica Polonica*, **7**, 135-143.
- Kang, G. S., Beri, V., Sidhu, B. H. & Rupela, O. P. (2005) A new index to assess soil quality and sustainability of wheat-based cropping system. *Biology and Fertility of Soils*, **41**, 389-398.
- Kapoor, A. & Viraraghavan, T. (1995) Fungal biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. *Bioresource Technology*, **53**, 195-206.
- Kaya, C., Higgs, D., Kirnak, H. & Tas, I. (2003) Mycorrhizal colonisation improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions. *Plant and Soil*, **253**, 287-292.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A. & Kecskes, M. (2004a) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology & Biochemistry*, **36**, 1229-1244.
- Kennedy, N., Brodie, E., Connolly, J. & Clipson, N. (2004b) Impact of lime, nitrogen and plant species on bacterial community structure in grassland microcosms. *Environmental Microbiology*, **6**, 1070-1080.
- Kennedy, N. & Clipson, N. J. W. (2003) Fingerprinting of fungal community. *Mycologist*, **17**, 158-163.
- Kennedy, N., Connolly, J. & Clipson, N. (2005a) Impact of lime, nitrogen and plant species on fungal community structure in grassland microcosms. *Environmental Microbiology*, **7**, 780-788.

- Kennedy, N., Gleeson, D. & Clipson, N. (2005b) Seasonal and management influences on bacterial community structure in an upland grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**, 329-337.
- Kent, A. D. & Triplett, E. W. (2002) Microbial communities and their interaction in soil and rhizosphere ecosystem. *Annual Review of Microbiology*, **56**, 211-236.
- Kent, A. D., Yannarell, A. C., Rusak, J. A., Triplett, E. W. & McMahon, K. D. (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *ISME J*, **1**, 38-47.
- Khan, A. G. (2006) Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, **7**, 503-514.
- King-Salter, G., Bending, G., Gosling, P., Culleton, N. & Mitchell, D. (2007) Response of arbuscular mycorrhizal communities to seasonality and long-term phosphate application. *Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology*, pp. 220. Elsevier Inc., Glasgow, Scotland.
- Kloepper, J. W. & Schroth, M. N. (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 879-882. Station de Patologie Vegetal et Phytobacteriologie, Angers, France.
- Kloepper, J. W., Zablotowic, R. M., Tipping, E. M. & Lisfritz, R. (1991) Plant growth promoting mediated by bacterial rhizosphere colonizer. *The rhizosphere and plant growth* (eds D. L. Keister & P. B. Cregan), pp. 315-326. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T. & Aroma, A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, **76**, 560-568.
- Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L. & Roldan, A. (2007) Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology*, **35**, 480-487.
- Koike, N., Hyakumachi, M., Kageyama, K., Tsuyumu, N. & Doke, N. (2001) Induction of Systemic Resistance in Cucumber against Several Diseases by Plant Growth-promoting Fungi: lignification and Superoxide Generation. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 523-533.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J. W. & Reddy, M. S. (2006) Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*, **31**, 91-100.
- Kruskal, J. B. (1964) Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Journal Psychometrika*, **29**, 1-27.
- Kumar, P., Dushenkov, V., Motto, H. & Raskin, I. (1995) Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology*, **29**, 1232-1238.
- Landwehr, M., Hildebrandt, P. W., Nawrath, K., Toth, T., Biro, B. & Bothe, H. (2002) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza*, **12**, 199-211.
- Larsen, J. & Bodker, L. (2001) Interaction between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acid. *New Phytologist*, **149**, 487-493.
- Leake, J. R. (2004) Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 422-428.
- Leggo, P. (2000) An investigation of plant growth in a organic-zeolitic substrate and its ecological significance. *Plant and Soil*, **219**, 135-146.

- Lekberg, Y. & Koide, R. T. (2005) Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist*, **168**, 189-204.
- Lerner, A., Herschkovitz, Y., Baudoin, E., Nazaret, S., Moenne-Loccoz, Y., Okon, Y. & Jurkevitch, E. (2006) Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated ribosomal intergenic spacer analysis. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**, 1212-1218.
- Li, H., Smith, S. E., Holloway, R. E., Zhu, Y. & Smith, F. A. (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. *New Phytologist*, **172**, 536-43.
- Liasu, M. O., Atayese, M. O. & Osonubi, O. O. (2005) Mycorrhizal inoculation effects on continuous hedgerow-biomass production and nutrient contribution to alley-cropped cassava in Ibadan, Nigeria. *Agroforestry Systems*, **64**, 61-71.
- Linderman, R. G. (1988) Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora - the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology*, **39**, 366-371.
- Lingua, G., D'Agostino, G., Massa, N., Antosiano, M. & Berta, G. (2002) Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza*, **12**, 191-198.
- Lioussanne, L., Jolicoeur, M. & St. Arnaud, M. (2003) Effects of the alteration of tomato root exudation by *Glomus intraradices* colonization on *Phytophthora parasitica* var. *Nicotiamae* zoospores. *Abstract Book ICOM* 4 pp. 291. Montreal, Canada.
- Liu, L., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. (1995) Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, **85**, 695-698.
- Loper, J. E. & Henkels, M. (1999) Utilization of Heterologous Siderophores Enhances Levels of Iron Available to *Pseudomonas putida* in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 5357-5363.
- Loper, J. E. & Lindow, S. E. (1994) A Biological Sensor for Iron Available to Bacteria in Their Habitats on Plant Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 1934-1941.
- Lord, N. S., Kaplan, C. W., Shank, P., Kitts, C. L. & Elrod, S. L. (2002) Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiology Ecology*, **42**, 327-337.
- Lotter, D. W. (2003) Organic agriculture. *Journal of Sustainable Agriculture*, **21**, 59-128.
- Lynch, J. M. & Whipps, J. M. (1990) Substrate flow in rhizosphere. *Plant and Soil*, **129**, 1-10.
- Ma, W. K., Siciliano, S. D. & Germina, J. J. (2005) A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**, 1589-1597.
- Malakoff, D. (1998) Coastal ecology: death by soffocation in the Gulf of Mexico. *Science*, **281**, 190-192.
- Mantelin, S. & Touraine, B. (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, **55**, 27-34.
- Marschner, H. & Dell, B. (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*, **159**, 89-102.

- Martin, K. J. & Rygiewicz, P. T. (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extract *BMC Microbiology*, **5**.
- Marzi, V. (1991) Pomodoro *Lycopersicon esculentum* Mill. *Coltivazioni erbacee* (ed P. editore), pp. 290-322. Patron editore.
- Massol-Deya, A. A., Oldelson, D. A., Hickey, R. F. & Tiedje, J. M. (1995) Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal RNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA) *Molecular Microbiol Ecology Manual* (eds A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas & F. J. Bruijn), pp. 1-8. Kluwer, Dordrecht.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A. & Henikoff, S. (2000) Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology*, **123**, 439-442.
- McCully, M. E. (1999) Roots in soil: unerthing the Complexity of Roots and Their Rhizospheres. *Plant Molecular Biology*, **50**, 695-718.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L. & Swan, J. A. (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **115**, 495-501.
- Merrill, L. & Halverson, L. J. (2002) Seasonal variation in microbial communities and organic malodor indicator compound concentrations in various types of swine manure storage systems. *Journal of Environmental Quality* **31**, 2074-2085.
- Miller, R. M. & Jastrow, J. D. (1990) Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biology and Biochemistry*, **22**, 579-584.
- Millis, D. K., Entry, J. A., Voss, J. D., Gillvet, P. M. & Mathee, K. (2006) An assement of the hypervariable domains of the 16S rRNA genes for their value in determining microbial community diversity: the paradox of traditional ecological indices. *FEMS Microbiol Ecol*, **57**, 496-503.
- Minuto, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M. L. (2006) Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection*, **25**, 468-475.
- Miransari, M., Bahrami, H. A., Rejali, F. & Malakouti, M. J. (2009) Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (*Zea mays* L.) nutrient uptake. *Soil and Tillage Research*, Article in Press, doi:10.1016/j.still.2008.10.015.
- Miransari, M., Bahrami, H. A., Rejali, F., Malakouti, M. J. & Torabi, H. (2007) Using arbuscular mycorrhiza to reduce the stressfull effects of soil compaction on corn (*Zea mays* L.) growth. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 2014-2026.
- Mitchell, A. E., Hong, Y.-J., Koh, E., Barrett, D. M., Bryant, D. E., Denison, R. F. & Kaffka, S. (2007) Ten-Year Comparison of the Influence of Organic and Conventional Crop Management Practices on the Content of Flavonoids in Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6154-6159.
- Mitchell, J. I. & Zuccaro, A. (2006) Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, **20**, 62-74.
- Moon, C. D., Zhang, X.-X., Matthijis, S., Schafer, M., Budzikiewicz, H. & Rainey, P. B. (2008) Genomic, genetic and structural analysis of pyoverdine-mediated iron acquisition in the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *BMC Microbiology*, **2008**, 7.
- Morgan, J. A. W., Bending, G. D. & White, P. J. (2005) Biological costs and benefits to plant–microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1729-1739.
- Morrisey, J. P., Dow, M. J. & O'Gara, F. (2004) Are microbe at the root of a solution to world food production? *European Molecular Biology Organization Reports*, **5**, 922-926.

- Morton, J. B., Bentivenga, S. P. & Bever, J. D. (1995) Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (*Glomales*, *Zygomycetes*). *Canadian Journal of Botany*, **73**, 25-32.
- Morton, J. B. & Redecker, D. (2001) Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera, *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, **93**, 181-195.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C. & Lemanceau, P. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago trunculata* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist*, **170**, 165-175.
- Muckian, L., Grant, R., Doyle, E. & Clipson, N. (2007) Bacterial Community structure in soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, **68**, 1535-1541.
- Mullen, R. B. & Schmidt, S. K. (1993) Mycorrhizal infection, phosphorus uptake, and phenology in *Ranunculus adoneus*: implication for the functioning of mycorrhizal in alpine systems. *Oecologia*, **94**, 229-234.
- Muller, M., Deigele, C. & Ziegler, H. (1989) Hormonal interactions in the rhizosphere of mais (*Zea mays*) and their effects on plant development *Zeitung fur pflanzenernahrung Bodenkunde*, **152**, 247-254.
- Mumpton, F. A. (1999) *La roca magica*: uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 3463-3470.
- Murphy, J. F., Zehender, G. W., Schuster, D. J., Sikora, E. J., Polstan, J. E. & Kloepper, J. W. (2000a) Plant growth-promoting rhizobacteria mediated protection in tomato against tomato mottle virus. *Plant Disease*, **84**, 779-784.
- Murphy, J. G., Rafferty, S. M. & Cassells, A. C. (2000b) Stimulation of wild strawberry (*Fragaria vesca*) arbuscular mycorrhizas by addition of shellfish waste to the growth substrate: interaction between mycorrhization, substrate amendment and susceptibility to red core (*Phytophthora fragariae*) *Applied Soil Ecology*, **15**, 153-158.
- Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of a complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
- Nelson, D. R. & Mele, P., M. (2007) Subtle changes in rhizosphere microbial community structure in response to increased boron and sodium chloride concentrations. *Soil Biology and Biochemistry*, **39**, 340-351.
- Newman, E. I. & Rovira, A. D. (1975) Allelopathy among some British grassland species. *Journal of Ecology*, **63**, 727-737.
- Nguyen, M. L. & Schwartz, S. J. (1999) Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technology*, **53**, 39-45.
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M. & Larsson, K.-H. (2005) Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases - an example from the mycorrhizal fungi. *BMC Bioinformatics*, **6**.
- O'Donnel, K., Lutzoni, F. M., Ward, T. J. & Benny, G. L. (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (*Zygomycota*): Evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia*, **93**, 286-296.
- O'Sullivan, D. J. & O'Gara, F. (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology Reviews*, **56**, 662-676.

- Okon, Y. (2005) PGPR-technology cases of application and future prospects. *Rhizosphere 2004- Perspectives and Challenges, a tribute to Lorenz Hiltner*, pp. 29. Munich, Germany.
- Okon, Y. & Labandera-Gonzalez, C. (1994) Agronomic applications of Azospirillum : an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**, 1591-1601.
- Olah, B., Brière, C., Bécard, G., Dénarie, J. & Gough, C. (2005) Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The plant Journal*, **44**, 195-207.
- Olson, J. A. (1989) Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *Journal of Nutrition*, **119**, 105-108.
- Oros-Sichler, M., Gomes, N. C. M., Neuber, G. & Smalla, K. (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods* **65**, 63-75.
- Osborn, M., A., Moore, E., R.B. & Timmis, K., N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **21**, 39-50.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S. & Isolauri, E. (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology*, **82**, 279-289.
- Pal Bais, H., Park, S.-W., Weir, T. L., Callaway, R. M. & Vivanco, J. M. (2004) How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, **9**, 26-32.
- Passaglia, E. & Marchi, E. (2002) Dalle zeoliti nuove risorse per zootecnia e agricoltura. *Terra e Vita*, **17**, 77-79.
- Patten, C. L. & Glick, B. R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in development of the host plant rott system. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3795-3801.
- Perner, H., Schwarz, D., Bruns, C., Mader, P. & George, E. (2007) Effect of arbuscular mycorrhizal colonization and two levels of compost supply on nutrient uptake and flowering of pelargonium plants. *Mycorrhiza*, **17**, 469-474.
- Piazza, C. (2004) Il pomodoro da industria. *Agricoltura*, **Luglio 2004**, 60-61.
- Piazza, C., Foutry, H. & Reggiani, R. (2005) Sovesci e compost "nutrono" il pomodoro biologico. *Agricoltura*, **Luglio/Agosto**, 125-126.
- Picard, C., Baruffa, E. & Bosco, M. (2008) Enrichment and diversity of plant-probiotic microorganisms in the rhizosphere of hybrid maize during four growth cycles. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**, 106-115.
- Picard, C. & Bosco, M. (2003) Soil antimony pollution and plant growth stage affect the biodiversity of auxin-producing bacteria isolated from rhizosphere of *Achillea ageratum* L. *FEMS Microbiology Ecology*, **46**, 73-80.
- Picard, C., Carriro, F., Petrozza, A., Zamariola, L., Baruffa, E. & Bosco, M. (2007) Selecting tomato (*Solanum lycopersicon* L.) lines for mycorrhizal competence: a prerequisite for breeding the plants of the future. *RHIZOSPHERE 2, International Conference, Book of Abstracts*, pp. 5. INRA, Montpellier, France.
- Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. & Guckert, A. (2000) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 948-955.

- Piculell, B. J., Hoeksema, J. D. & Thompson, J. N. (2008) Interactions of biotic and abiotic environmental factors in an ectomycorrhizal symbiosis, and the potential for selection mosaics. *BMC Biology*, **6**, 23.
- Pieterse, C. M. J., van Pelt, J. A., van wees, S. C. M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K. M., Keurentjes, J. J. B., Verhagen, B. W. M., Knoester, M., Van der Sluis, I., Bakker, P. A. H. M. & Van Loon, L. C. (2001) Rhizobacteria-mediated Induced Systemic Resistance: Triggering, Signalling and Expression. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 51-61.
- Pinton, R., Varanini, Z. & Nannipieri, P. (2001) The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants, and microorganisms. *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. (eds R. Pinton, Z. Varanini & P. Nannipieri), pp. 1-17. Marcel Dekker, New York, USA.
- Porcel, R., Aroca, R., Azcon, R. & Ruiz-Lozano, J. M. (2006) PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, **60**, 389-404.
- Porcel, R., Barea, J. M. & Ruiz-Lozano, J. M. (2003) Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*, **157**, 135-143.
- Poulsen, K. H., Nagy, R., Gao, L.-L., Smith, S. E., Bucher, M., Smith, F. A. & Jakobsen, I. (2005) Physiological and molecular evidence for Pi uptake via the symbiotic pathway in a reduced mycorrhizal colonization mutant in tomato associated with a compatible fungus. *New Phytologist*, **168**, 445-454.
- Pozo, M. J., Azcon-Aguillar, C., Dumas-Gaudot, E. & Barea, J. M. (1999) β -1,3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science*, **141**, 149-157.
- Pozo, M. J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J. M. & Azcon-Aguilar, C. (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 525-534.
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y. & Lebsky, V. K. (2004) Microbial populations and activities in the rizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of indigenous rocks. *Plant Biology*, **214**, 215-232.
- Pulleman, M., Jongmans, A., Marinissen, J. & Bouma, J. (2003) Effects of organic versus conventional arable farming on soil structure and organic matter dynamics in a marine loam in the Netherlands. *Soil Use and Management*, **19**, 157-165.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M. & De Souza, J. T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General Molecular Microbiology*, **81**, 537-547.
- Raj, S. N., Deepak, S. A., Basavaraju, P., Shetty, H. S., Reddy, M. S. & Kloepper, J. W. (2003) Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Protection*, **22**, 579-588.
- Ramette, A. (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, **62**, 142-160.
- Ranjard, L., Elisabeth, B. & Nazaret, S. (2000) Sequencing Bands of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints for Characterization and Microscale

- Distribution of Soil Bacterium Populations Responding to Mercury Spiking. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5334-5339.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J.-C., Mougel, C., Thioulouse, J. & Nazaret, S. (2001) Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4479-4487.
- Redecker, D. (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*, **10**, 73-80.
- Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernandez-Galan, R. & Collado, I. G. (2008) Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, **7**, 89-123.
- Remy, W. T., Taylor, H., Hass, H. & Kerp, H. (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 11841-11843.
- Renker, C., Blanke, V. & Buscot, F. (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental pollution*, **135**, 255-266.
- Renker, C., Heinrichs, J., Kaldorf, M. & Buscot, F. (2003) Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcriber spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza*, **13**, 191-198.
- Rigby, D. & Caceres, D. (2001) Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agricultural Systems*, **68**, 21-40.
- Riley, D. & Barber, S. A. (1971) Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced pH changes at the root-soil interface. *Soil Science Society of American Proceedings*, **35**, 301-306.
- Riling, M. C. (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil quality. *Canadian Journal of Soil Science*, **84**, 355-363.
- Riling, M. C. & Mummey, D. L. (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, **171**, 41-53.
- Rinaldi, M., Trotta, A., Convertini, G., Vonella, A. V. & Elia, A. (2003) Impiego su pomodoro da industria di fertilizzanti azotati alternativi. *L'informatore agrario*, **11**, 75-78.
- Rodriguez, H. & Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, **17**, 319-339.
- Roesti, D., Gaur, R., Johri, B. N., Imfeld, G., Sharma, S., Kawaljeet, K. & Aragno, M. (2006) Plant growth stage, fertiliser management and bio-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria affect the rhizobacterial community structure in rain-fed wheat fields. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**, 1111-1120.
- Roldan, A., Salinas-Garcia, J. R., Alguacil, M. M. & Caravaca, F. (2007) Soil sustainability indicators following conservation tillage practices under subtropical maize and bean crops. *Soil and Tillage Research*, **93**, 273-282.
- Rozak, D. B. & Colwell, R. R. (1987) Survival strategies of bacterial in the natural environment. *Microbial Reviews*, **51**, 365-379.
- Rufyikiri, G., Thiry, Y. & Declerck, S. (2003) Contribution of hyphae and root to uranium uptake and translocation by arbuscular mycorrhizal carrot roots under root-organ culture conditions. *New Phytologist*, **158**, 391-399.
- Ruiz-Lozano, J. M., Collados, C., Barea, J. M. & Azcon, R. (2001) Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought induced nodule senescence in soybean plants. *New Phytologist*, **151**, 493-502.

- Ruiz-Lozano, J. M., Porcel, R. & Aroca, R. (2006) Does the enhanced tolerance of arbuscular mycorrhizal fungi plants to water deficit involve modulation of drought induced plant genes? *New Phytologist*, **171**, 693-698.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Harn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Scallan, U., Liliensiek, A., Clipson, N. & Connolly, J. (2008) RIBOSORT: a program for automated data preparation and exploratory analysis of microbial community fingerprints. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 95-98.
- Scheffknecht, S., Mammler, R., Steinkelner, S. & Vierheilig, H. (2006) Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. *Mycorrhiza*, **16**, 365-370.
- Schlöter, M., Leubhn, M., Heulin, T. & Hartmann, A. (2000) Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**, 647-660.
- Schnepf, A., Roose, T. & Schweiger, P. (2008) Growth model for arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of the Royal Society Interface*, **5**, 773-784.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Van Breusegem, F., Eberl, L., Hartmann, A. & Langebartels, C. (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment*, **29**, 909-918.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, **105**, 1413-1421.
- Secilia, J. & Bagyarai, D. J. (1987) Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Canadian Journal of Microbiology*, **33**, 1069-1073.
- Selosse, M.-A., Baudoin, E. & Vandenkoornhuyse, P. (2004) Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*, **327**, 639-648.
- Shaharoon, B., Naveed, M., Arshad, M. & Zahir, Z. A. (2008) Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonas* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**.
- Sharma, A. & Johri, B. N. (2003) Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. *Microbiological Research*, **158**, 243-248.
- Shepard, R. N. (1962) The analysis of proximities: Multidimensional scaling with an unknown distance function. *Journal Psychometrika* **27**, 125-140.
- Shepard, R. N. (1966) Metric structure in ordinal data. *Journal of Mathematical Psychology*, **3**, 287-315.
- Shi, J. & Le Maguer, M. (2000) Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology*, **20**, 293-334.
- Silvestri, G. P. & Siviero, P. (1991) La coltivazione del pomodoro da industria. pp. 192. L'informatore Agrario.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C. & Lalonde, M. (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, **363**, 67-69.

- Simon, L., Lalonde, M. & Bruns, T. D. (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 291-295.
- Siqueira, J. O., Safir, G. R. & Nair, M. G. (1991) Stimulation of VAM formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist*, **118**, 87-93.
- Sivasithamparam, K. & Ghisalberti, E. L. (1998) Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics* (eds C. P. Kubicek & G. E. Harman), pp. 139-191. Taylor and Francis, London.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. & Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacteria communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shift revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 4742-4751.
- Smirnoff, N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, **78**, 661-669.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van de Broek, J., van Mil, S. & Wernars, K. (2001) Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2284-2291.
- Smith, F. A. & Smith, S. E. (1997) Structural diversity in (vesicular)—arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, **137**, 373-388.
- Smith, S. E. (2002) Soil microbes and plants-raising interest, mutant gains. *New Phytologist*, **156**, 142-144.
- Smith, S. E. & Read, D. J. (1997) Mycorrhizal symbiosis. pp. 605. Academic Press, San Diego, California.
- Sprent, J. I. (2002) Nodulation in legumes. pp. 156. Kew Publishing, UK.
- Stahl, W. & Sies, H. (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, **24**, 345-351.
- Stamatiadis, S., Werner, M. & Buchanan, M. (1999) Field assesment of soil quality as affected by compost and fertilizer application in a broccol field (San Benito Country, California). *Applied Soil Ecology*, **12**, 217-225.
- Stellacci, A. M., Caliendo, A., De Tommaso, B., Uricchio, V. U. & Cassano, D. (2006) Validazione di due modelli per la gestione delle pratiche agronomiche di concimazione ed irrigazione: risultati preliminari di prove effettuate su pomodoro da industria. *Convegno nazionale di agrometeorologia*. Torino.
- Stevens, M. A., Kader, A. A., Albright-Halton, M. & Algazzi, M. (1977) Genotypic variation for flavour and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, **102**, 680-689.
- Strigul, N. S. & Kravchenko, L. V. (2005) Mathematical modeling of PGPR inoculation into the rhizosphere. *Environmental Modelling & Software*, **21**, 1158-1171.
- Suresh, C. K. & Bagyarai, D. J. (2002) Mycorrhiza—microbe interactions: effects on rhizosphere. *Arbuscular Mycorrhiza, Interactions in Plants, Rhizosphere and Soils*. (eds S. A. K. & B. N. Johri), pp. 7-28. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, New Delhi.
- Tarafdar, J. C. & Marschner, H. (1995) Dual inoculation with *Aspergillus fumigatus* and *Glomus mossae* enhances biomass production and nutrient uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) supplied with organic phosphorus as Na-phytate. *Plant and Soil*, **173**, 97-102.
- Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F. N., de Siqueira, M. F., Grainger, A.,

- Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A. S., Midgley, G. F., Miles, L., Ortega-Huerta, M. A., Peterson, A. T., Phillips, O. L. & Williams, S. E. (2004) Extinction risk from climate change. *Nature*, **427**, 145-148.
- Thomas, R. S., Dakessian, S., Ames, R. N., Brown, M. S. & Bethlenfalvay, G. J. (1986) Aggregation of a Silty Clay Loam Soil by Mycorrhizal Onion Roots. *Soil Science Society of America*, **50**, 1494-1499.
- Thorn, G. (1997) The Fungi in Soil. *Modern Soil Microbiology* (eds J. D. Elsas, J. T. Trevors & E. M. H. Wellington), pp. 63-128. Dekker, M.
- Tilman, D., Reich, P. B., Knops, J., Wedin, D., Mielke, T. & Lehman, C. (2001) Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, **294**, 843-845.
- Timsina, J. & Connor, D. J. (2001) Productivity and management of rice–wheat cropping systems: issues and challenges. *Field Crops Research*, **69**, 93-132.
- Tofazzal Islam, M., Hashidoko, Y., Deora, A., Ito, T. & Tahara, S. (2005) Suppression of Damping-Off Disease in Host Plants by the Rhizoplane Bacterium *Lysobacter* sp. Strain SB-K88 Is Linked to Plant Colonization and Antibiosis against Soilborne *Peronosporomycetes*. *Applied And Environmental Microbiology*, **71**, 3786-3796.
- Toor, R. K., Savage, G. P. & Heeb, A. (2006) Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 20-27.
- Torsvik, V. & Ovreas, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, **5**, 240-245.
- Trouvelot, A., Kough, J. & Gianinazzi-Pearson, V. (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un systeme radicaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. *Mycorrhizae: Physiology and Genetics* (eds V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi), pp. 217-221. INRA Press, Paris.
- Turnau, K. (1998) Heavy metal content and localization in mycorrhizal *Euphorbia cyparissias* from zinc wastes in Southern Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **67**, 105-113.
- Turnau, K. & Haselwandter, K. (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi, an essential component of soil microflora in ecosystem restoration. *Mycorrhizal technology: from genes to bioproducts* (eds S. Gianinazzi & H. Schuepp), pp. 137-149. Birkhauser, Basel.
- Turnau, K., Orłowska, E., Ryszka, P., Zubek, S., Anielska, T., Gawronki, S. & Jurkiewicz, A. (2006) Role of mycorrhizal fungi in phytoremediation and toxicity monitoring of heavy metal rich industrial wastes in southern Poland *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation*, **69**, 533-551.
- Tuzun, S. & Kloepper, J. W. (1994) Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria* (eds M. H. Ryder, P. M. Stephens & G. D. Bowen), pp. 104-109. CSIRO.
- USDA (2007) Newroom: Background Statistics: Fresh-market Tomatoes. Available at the web site <http://www.ers.usda.gov/News/tomatocoverage.htm>.
- Utkhede, R. S. & Mathur, S. (2006) Preventive and curative biological treatments for control of *Botrytis cinerea* stem canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, **51**, 363-373.
- van der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I. R. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, **396**, 69-72

- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. & Pieterse, C. M. J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 453-483.
- van Veen, J. A. (2005) The rhizosphere - A historical perspective from the soil scientist's viewpoint. *Rhizosphere 2004 - Perspective and Challenges, a tribute to Lorenz Hiltner.*, pp. 29-34. GSF.GmbH, Munich, Germany.
- van Veen, J. A., van Overbeek, L. S. & van Elsas, J. D. (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**, 121-135.
- Vandenkoornhuyse, P. & Leyval, C. (1998) SSU rDNA sequencing and PCR fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia*, **90**, 791-797.
- Vessey, K. J. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**, 571-586.
- Vessey, K. J., Pawlowski, K. & Bergman, B. (2004) Root-based N₂-fixing symbiosis: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycas *Plant and Soil*, **266**, 205-230.
- Vestberg, M., Kukkonen, S., Saari, K., Parikka, P., Huttunen, J., Tainio, L., Devos, N., Weekers, F., Kevers, C., Thonart, P., Lemoine, M.-C., Cordier, C., Alabouvette, C. & Gianinazzi, S. (2004) Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology*, **27**, 243-258.
- Vierheilig, H. (2004) Regualtory mechanisms during the plant-arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany*, **82**, 1166-1176.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. & Piche, Y. (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied Environmental Microbiology*, **64**, 5004-7.
- Vierheilig, H., Schweiger, P. & Brundrett, M. (2005) An overview of methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal fungi in roots. *Physiologia Plantarum*, **125**, 393-404.
- Villa-Astoria, M., Ellery, A. P., Catalan-Valencia, E. A. & Ramming, M. D. (2003) Salinity and nitrogen rate effects on the growth and yield of Chile pepper plant. *Soil Science Society of America*, **67**, 1781-1789.
- Vivas, A., Azcon, R., Birò, B., Barea, J. M. & Ruiz-Lozano, J. M. (2003) Influence of bacterial strains isolated from lead-polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity. *Canadian Journal of Microbiology*, **49**, 577-588.
- Vivas, A., Barea, J. M. & Azcon, R. (2005) Interactive effect of *Brevibacillus brevis* and *Glomus mossae*, both isolated from Cd-contaminated soil, on plant growth, physiological mycorrhizal fungal characteristics and soil enzymatic activities in Cd polluted soil *Environmental Pollution*, **134**, 257-266.
- Vogelsang, K. M., Reynolds, H. L. & Bever, J. D. (2006) Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist*, **172**, 554-562.
- Vosatka, M. & Gryndler, M. (2000) Response of micropropagated potatoes transplanted to peat media to post-vitro inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Soil Ecology*, **15**, 145-152.
- Watson, C. A., Atkinson, D., Gosling, P., Jackson, L. R. & Rayns, F. W. (2002) Managing soil fertility in organic farming systems. *Soil Use and Management*, **18**, 239-247.

- Wei, G., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. (1996) Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, **86**, 221-224.
- Whipps, J. M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 487-511.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J. (1990) Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (eds M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 315-322. Academic Press, New York.
- Willcox, J. K., Catignani, G. L. & Lazarus, S. (2003) Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Science and Technology*, **43**, 1-18.
- Willer, H. & Yussefi, M. (2004) *The World of Organic Agriculture: Statistics and Emerging Trends*. International Federation of Organic Agriculture Movements, Bonn, Germany.
- Winkelmann, G. (1991) Handbook of microbial iron chelates. pp. 366. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Wirsel, S. G. R. (2004) Homogenous stands of a wetland grass Harbour diverse contortia of a arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, **48**, 129-138.
- Wright, S. F. & Upadhyaya, A. (1996) Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein from arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* **161**, 575- 586.
- Wright, S. F. & Upadhyaya, A. (1999) Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza*, **8**, 283-285.
- Yang, C. H., Crawley, D. E. & Menge, J. A. (2001) 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS Microbiology Ecology*, **35**, 129-136.
- Yao, S., Merwin, I. A., Abawi, G. S. & Thies, J. E. (2006) Soil fumigation and compost amendment alter soil microbial community composition but do not improve tree growth or yield in an apple replant site. *Soil Biology & Biochemistry*, **38**, 587-599.
- Zehender, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J. & Kloepper, J. W. (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 39-50.
- Zheng, H., Cui, C., Zhang, Y., Wang, D., Jing, Y. & Kim, K. Y. (2005) Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, **68**, 778-786.
- Zhou, J. L. (1999) Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 686-693.
- Zhu, J., Kaeppeler, S. M. & Lynch, J. P. (2005) Topsoil foraging and phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays* L.). *Functional Plant biology*, **32**, 749-762.