



Progetto MiSaVi

La simbiosi micorrizica nella gestione sostenibile dei vigneti

Alessandra Turrini, Monica Agnolucci, Luciano Avio
(Università di Pisa)

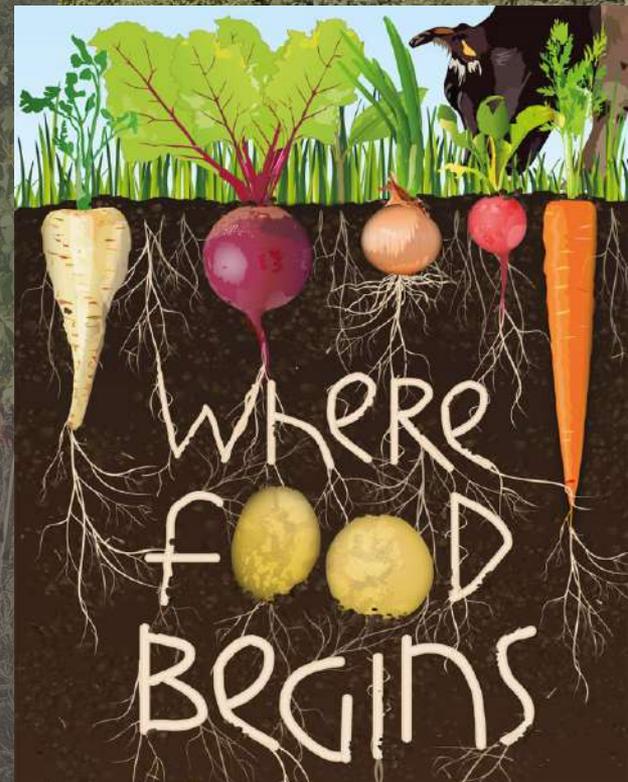


Partner 4: Dipartimento di Scienze Agrarie,
Alimentari ed Agro-ambientali (DISAAA-a)

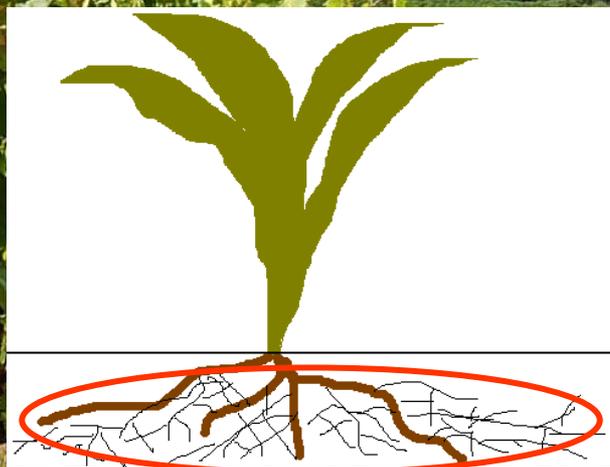


I suoli sono ambienti ricchi di vita dove i microrganismi svolgono un ruolo di primaria importanza

- contribuendo ai cicli di nutrienti ed energia
- limitando i processi di erosione
- fornendo servizi essenziali per l'ambiente, l'agricoltura e l'uomo



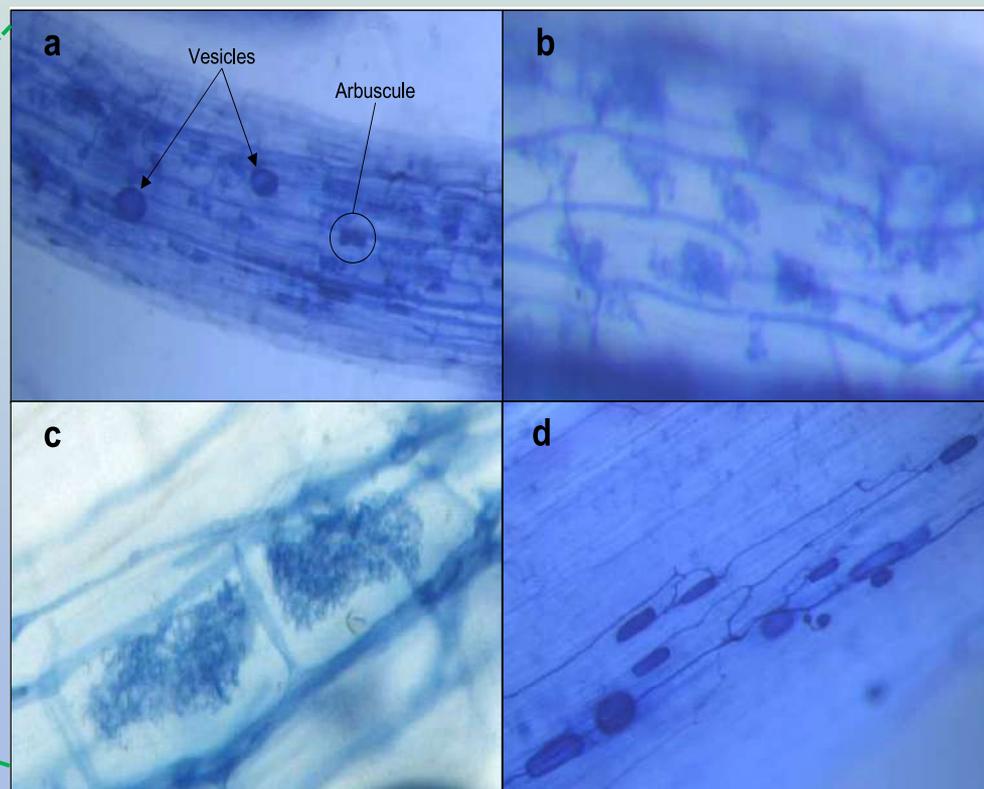
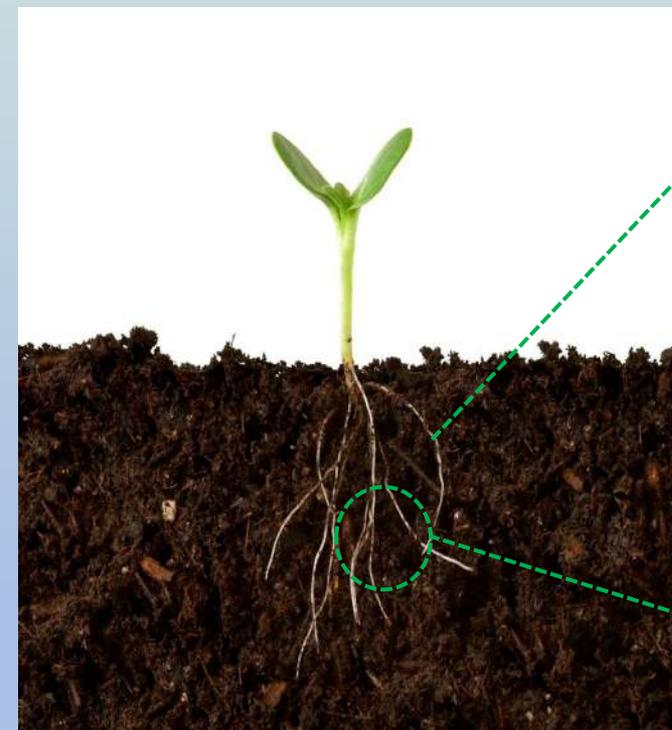
L'applicazione di inoculi a base di microorganismi chiave della fertilità del suolo, può aiutare ad indirizzare la gestione degli ambienti agricoli, anche a carattere pluriennale come i vigneti, verso pratiche agricole più sostenibili



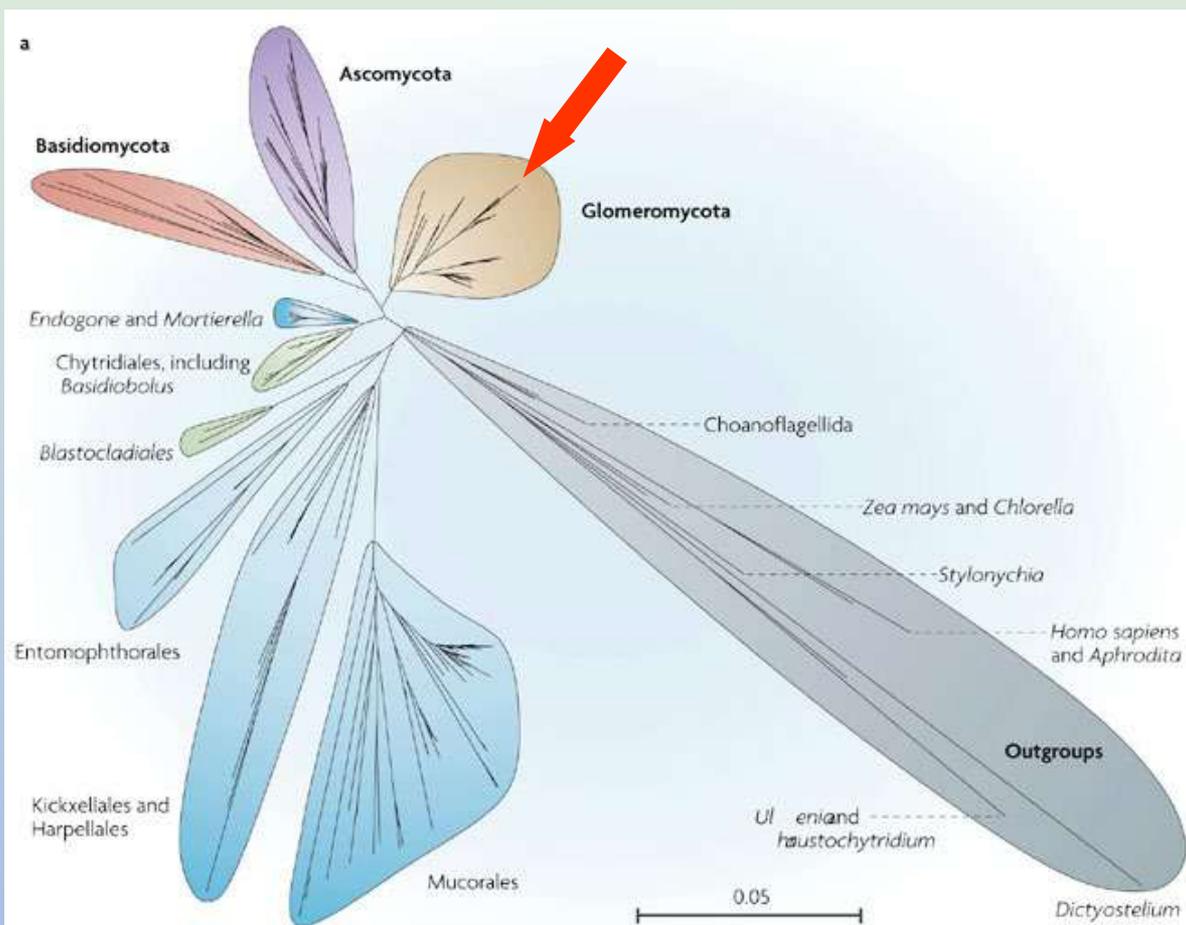
Tra questi organismi chiave rivestono un'importanza fondamentale i microorganismi che vivono in simbiosi all'interno delle radici delle piante :

i funghi micorrizici arbuscolari

I FUNGHI MICORRIZICI ARBUSCOLARI (AMF) (chi sono e che ruolo svolgono negli agro-ecosistemi)



I FUNGHI MICORRIZICI ARBUSCOLARI (MA) (chi sono e quale ruolo svolgono negli ecosistemi)



- Sono un gruppo di microrganismi benefici del suolo

- Presenti nei suoli della maggior parte degli ecosistemi terrestri

Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105:1413–1421

I FUNGHI MICORRIZICI ARBUSCOLARI (MA) (chi sono e quale ruolo svolgono negli ecosistemi)

I funghi MA formano simbiosi con circa l' 80% delle specie vegetali e con la quasi totalità delle piante agrarie.

Gerdemann (1968): 'E' più facile elencare le famiglie di piante in cui non si conosce siano presenti piuttosto che compilare una lista di famiglie in cui essi siano stati trovati'

Piante agrarie in cui si trovano simbiosi micorriziche



CEREALI

riso, mais, grano, orzo, avena,
segale, miglio



LEGUMI

soia, fagioli, lenticchie, piselli,
trifoglio, erba medica



ALBERI DA FRUTTO

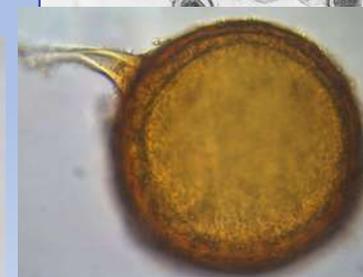
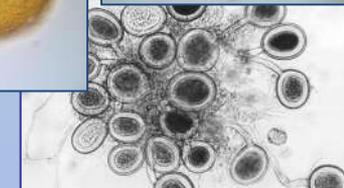
compresi vite e olivo

I FUNGHI MICORRIZICI ARBUSCOLARI (MA) (chi sono e quale ruolo svolgono negli ecosistemi)

BASSA SPECIFICITA' D'OSPITE

Una specie fungina può colonizzare specie di piante diverse e una stessa pianta può essere colonizzata da diverse specie fungine

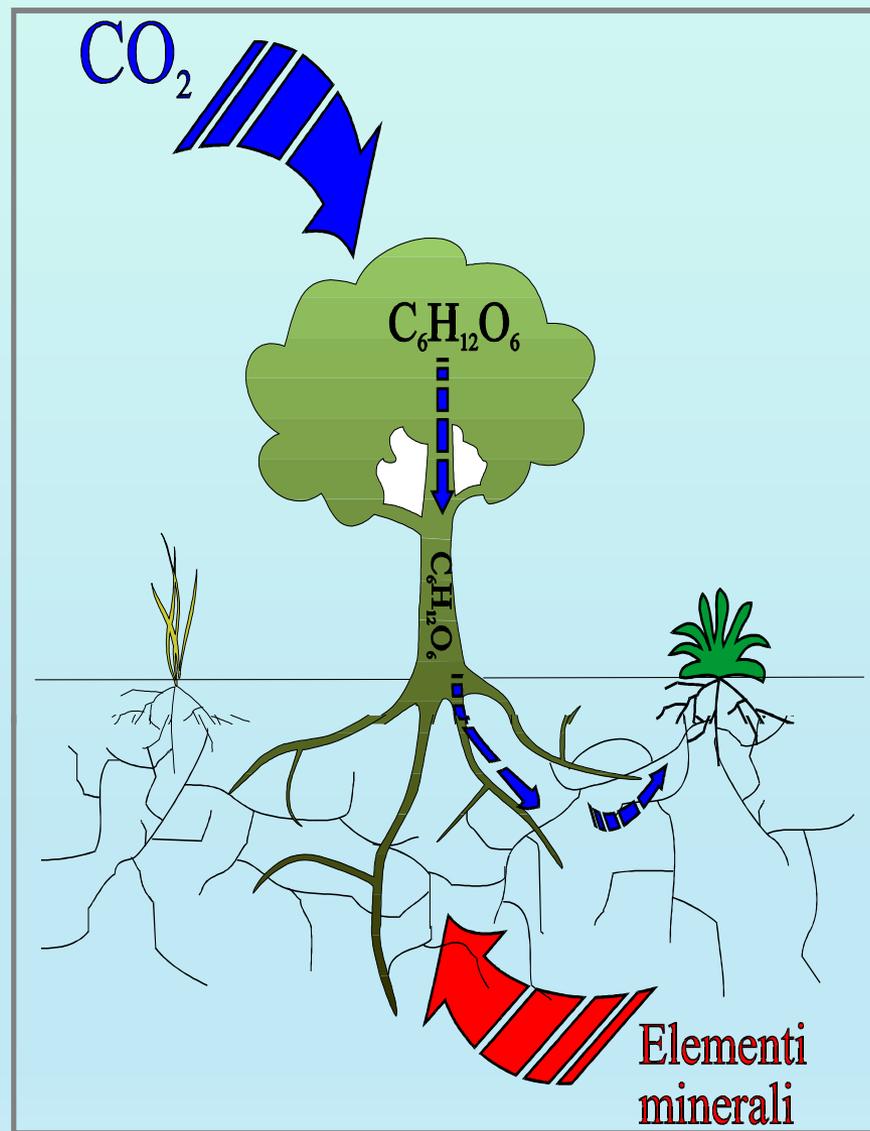
GLOMEROMYCOTA
≅ 350 specie



I FUNGHI MICORRIZICI ARBUSCOLARI (MA) (chi sono e quale ruolo svolgono negli ecosistemi)

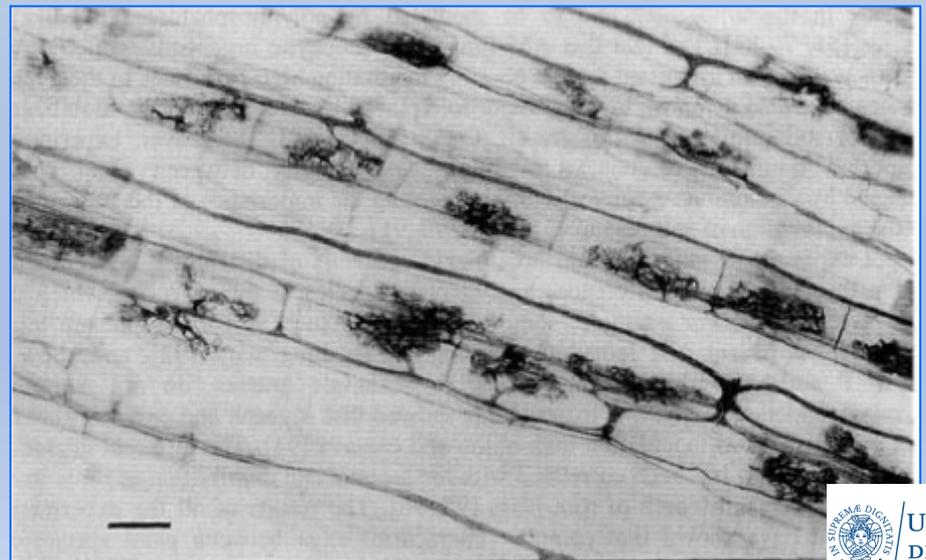
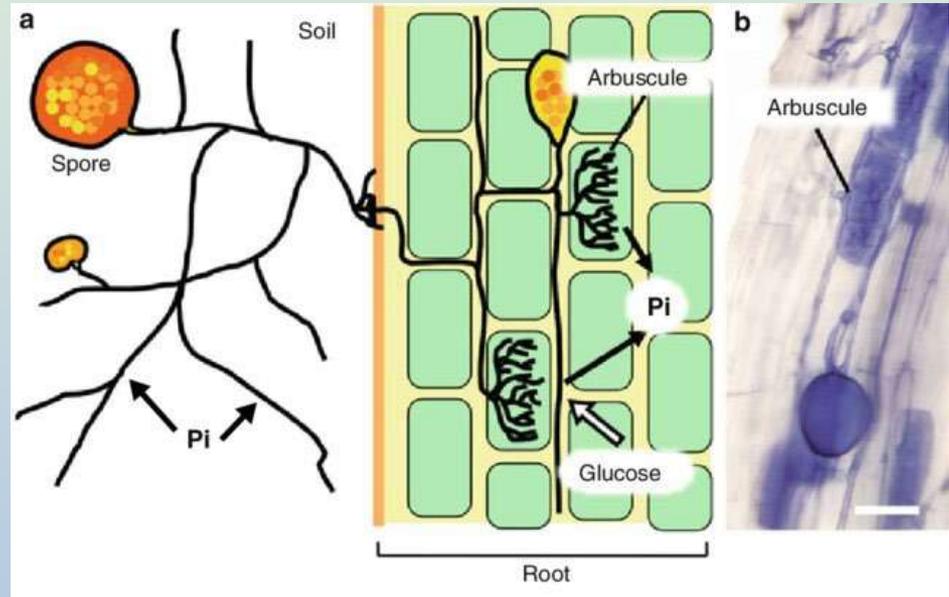
In questa simbiosi mutualistica

- ➔ La pianta trasferisce carboidrati ai funghi
- ➔ I funghi trasferiscono alla pianta elementi minerali (P, N, Cu, Zn, K e acqua) assorbiti dal suolo attraverso un'estesa rete ifale extraradicale



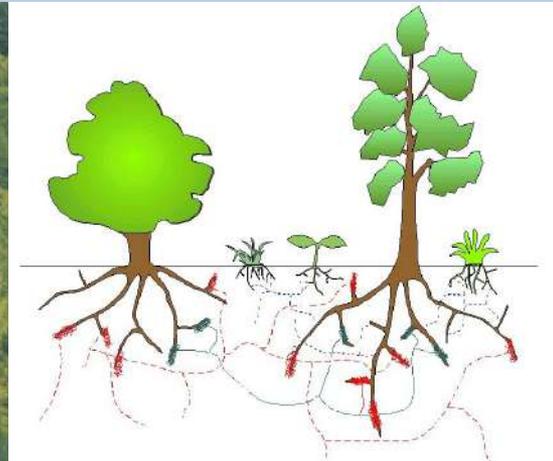
ARBUSCOLI

Struttura chiave della simbiosi



Il micelio extraradicale rappresenta la struttura chiave per l'assorbimento dei nutrienti minerali (P, N, Cu, Zn, K, Ca, S, acqua).

Connette piante diverse e ridistribuisce le risorse all'interno della comunità vegetale: è stato definito dalla rivista Nature "wood wide web"

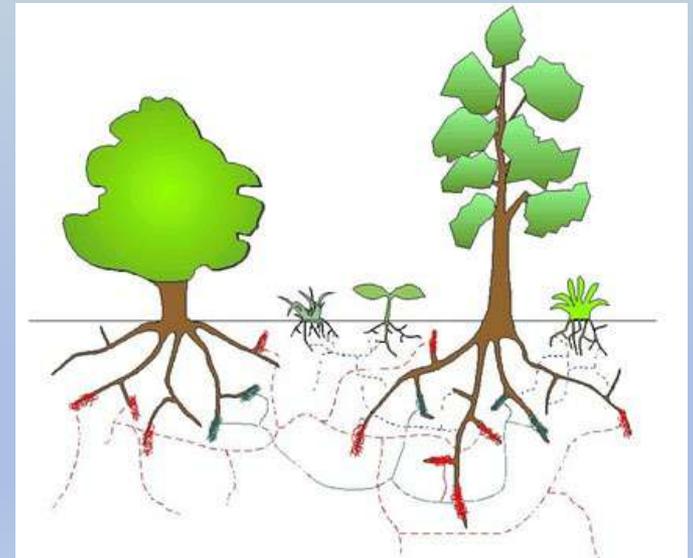


Lunghezza micelio: 3-10 metri per grammo di suolo





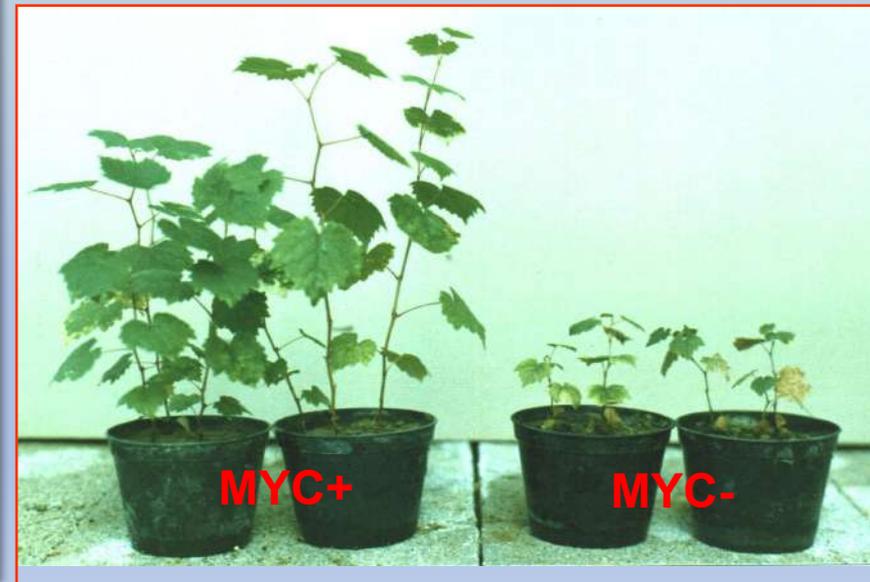
Nel vigneto, i funghi MA in simbiosi con le colture di copertura presenti nel suolo interfilare, possono ridistribuire le risorse e i benefici della micorrizazione anche alla vite, formando nuove reti, tramite le interconnessioni ifali



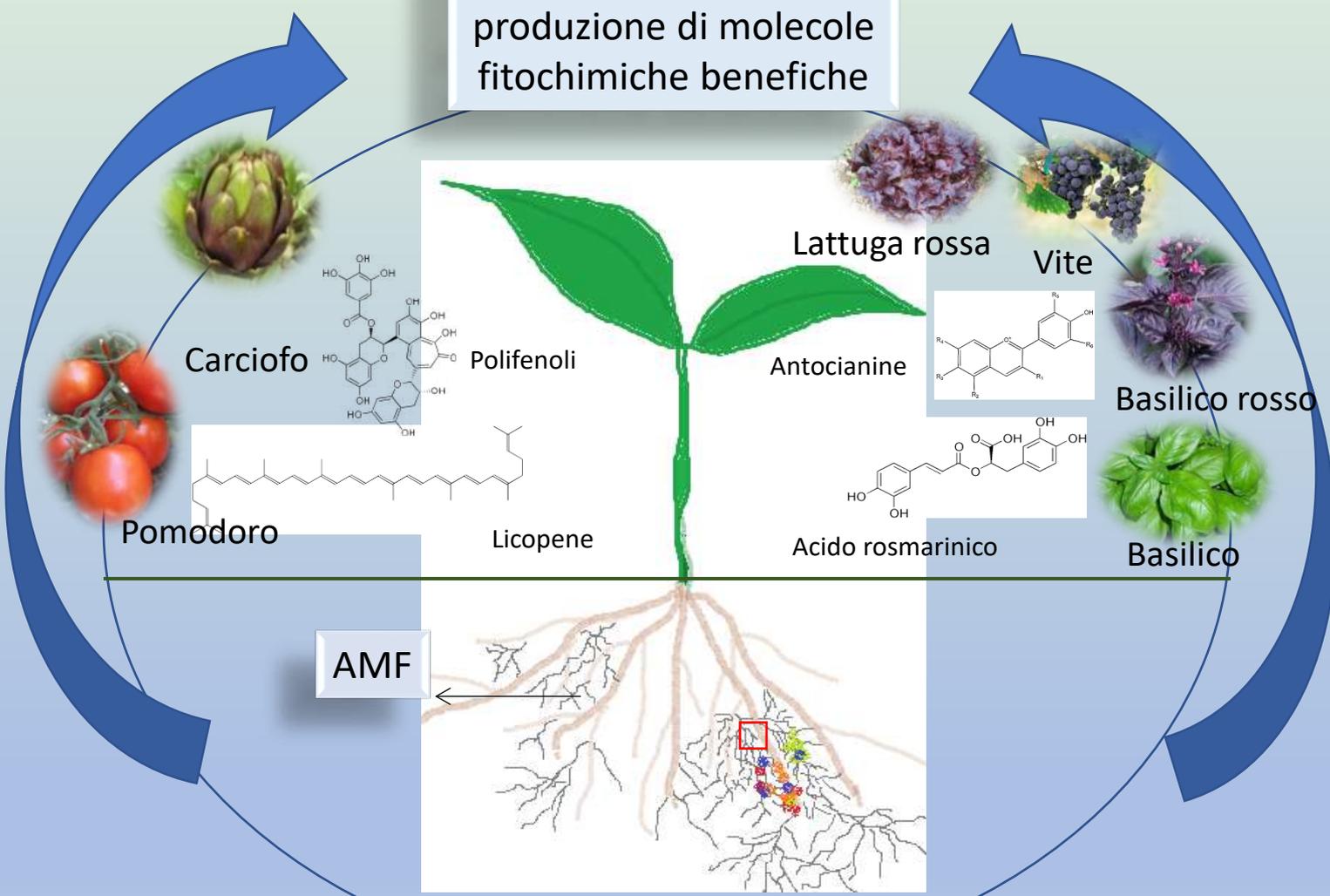
Vantaggi della simbiosi micorrizica arbuscolare



- Maggiore assorbimento di nutrienti che si traduce in maggiore crescita della pianta
- Tolleranza a stress biotici e abiotici
- Produzione di sostanze fitochimiche benefiche



Piante con aumentata
produzione di molecole
fitochimiche benefiche



ALLA RADICE DEI PRODOTTI VEGETALI DI
QUALITA'

+87% VOCs
in piante
micorrizate di vite



Produzione di VOCs

benzaldeide

Vocs

Vocs



Vite



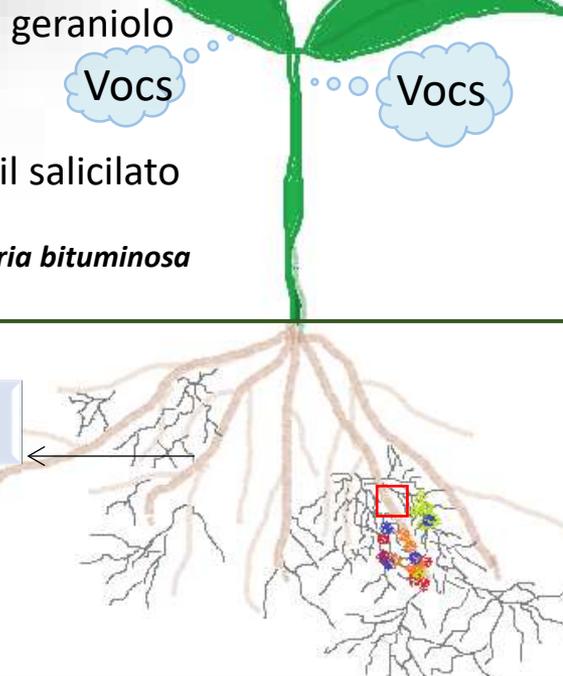
Basilico



Bituminaria bituminosa



Artemisia umbelliformis



AMF

VOCs responsabili della comunicazione delle piante con
l'ambiente circostante (funzioni di difesa da patogeni,
stress idrico, termotolleranza, fotoprotezione)

SCOPO DEL PROGETTO MiSalVi

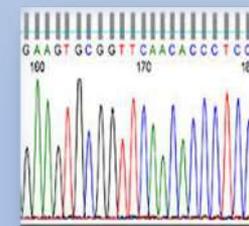
Verificare l'efficacia di una strategia che preveda di inoculare in vigneto funghi micorrizici mediante piante donatrici (cover crops) per incrementare le prestazioni delle viti in termini di qualità dell'uva e del vino da essa ottenuto.

Gestione dei funghi micorrizici e salute del suolo nei vigneti

Partner 4: Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Agro-ambientali (DISAAA-a) dell'Università di Pisa (UNIPi)

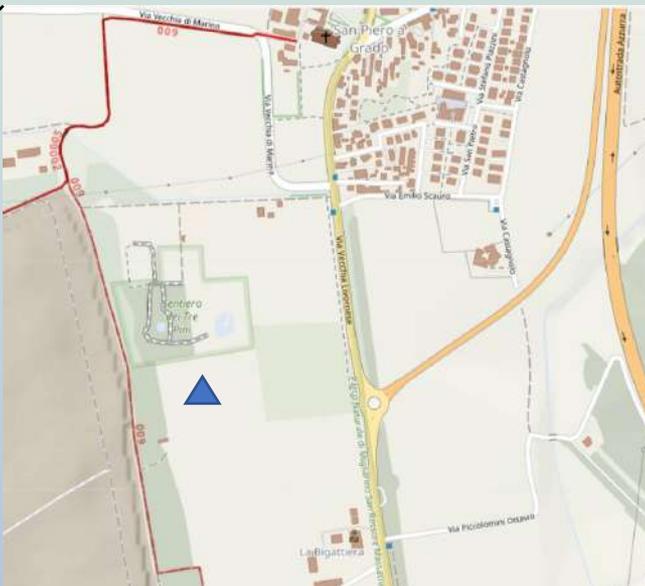
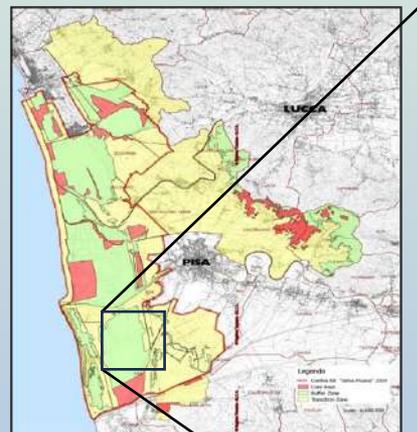


- 1 Preparazione di un inoculo micorrizico autoctono toscano
- 2 Caratterizzazione molecolare del microbiota fungino micorrizico dell'inoculo
- 3 Monitoraggio dell'attività dei funghi MA in campioni di suolo mediante saggio biologico MIP



CONSORZIO MICORRIZICO AUTOCTONO TOSCANO

Parcella 22 San Piero ▲



Sito all' interno
della Riserva
della Biosfera
UNESCO

**Selve Costiere
di Toscana**

Parco regionale Migliarino San
Rossore Massaciuccoli

CiRAA - Centro di Ricerche
Agro-Ambientali "Enrico Avanzi"

La comunità fungina micorrizica dell'area da cui è
stato fatto il prelievo è stata
caratterizzata
morfologicamente, molecolarmente e funzionalmente

**Hot spot di funghi micorrizici
arbuscolari**

Biol Fertil Soils (2015) 51:151-166

Densità di spore AMF e ricchezza e composizione percentuale in specie
da 206 a 366 spore per 100 g

30 specie, di cui prevalenti
(>5%)
Glomeraceae

<i>Funneliformis geosporus</i>	24.4%
<i>Funneliformis mosseae</i>	10.5%
<i>Septoglomus constrictum</i>	8.4%
<i>Dominikia aurea</i>	7.0%
<i>Glomus badium</i>	5.9%

presenti inoltre

Archaeosporales: *Ambispora granatensis*, *Archaeospora trappei*;

Paraglomerales: *Paraglomus occultum*;

Entrophosporales: *Entrophospora etunicata*, *Entrophospora lutea*, *Claroideoglomus claroidea*, *Entrophospora infrequens*;

Gigasporales: *Cetraspora pellucida*, *Gigaspora gigantea*, *Gigaspora margarita*, *Racocetra fulgida*, *Scutellospora calospora*;

Diversisporales: *Acaulospora longula*, *Diversispora versiformis* ;

Glomeraceae: *Glomus macrocarpum*, *Funneliformis coronatus*, *Oehlia diaphana*,
Rhizoglomus intraradices, *Rhizoglomus irregulare*, *Rhizoglomus invermaium* ;

1-PREPARAZIONE DELL'INOCULO MICORRIZIZICO

RIPRODUZIONE ON
FARM
del consorzio micorrizico

Prelievo in
situ



Preparazione
inoculo



Controllo di
qualità

CARATTERIZZAZIONE
MOLECOLARE



Distribuzione in
campo

Ca. 300 g inoculo Unipi per ogni
parcella (sia Sugame sia Palagio)

2-CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'INOCULO MICORRIZICO



Estrazione di DNA dall'inoculo micorrizico

DNeasy® PowerSoil Pro Kit® (QIAGEN Group, Germantown, MD)

Amplificazione della regione V3-V4 del 18S rDNA

Primers AML1 e AML2
(Lee et al., 2008)

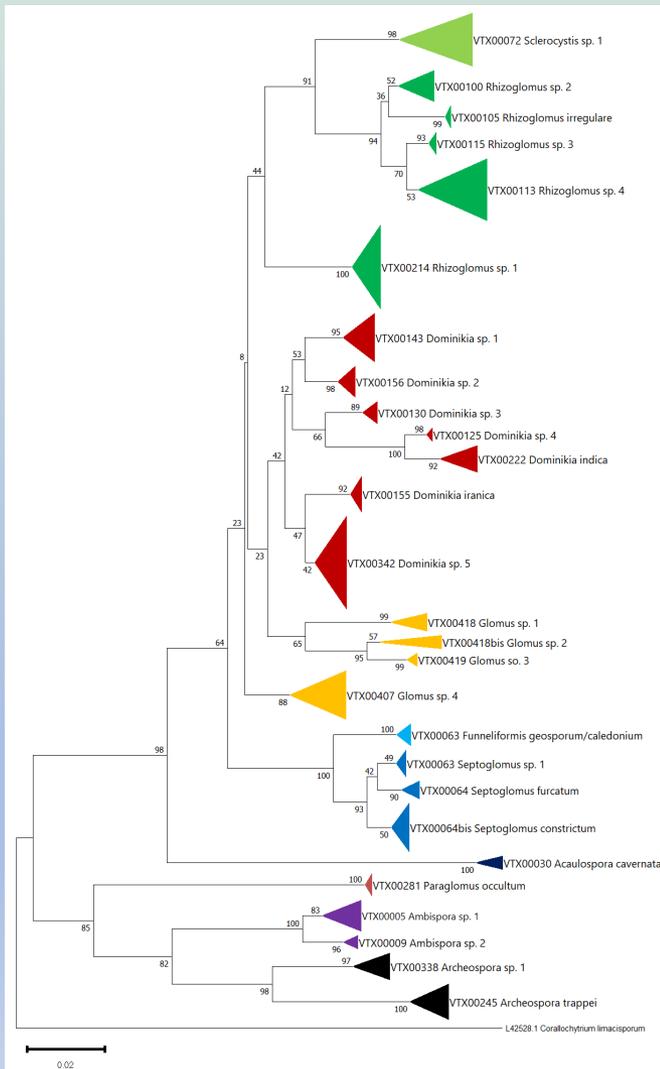
Sequenziamento degli ampliconi 18S tramite piattaforma Illumina MiSeq

Analisi bioinformatica e analisi dei dati



QIIME2

2-CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'INOCULO MICORRIZIZICO



Sclerocystis

Rhizoglossum

Dominikia

Glomus

Funneliformis

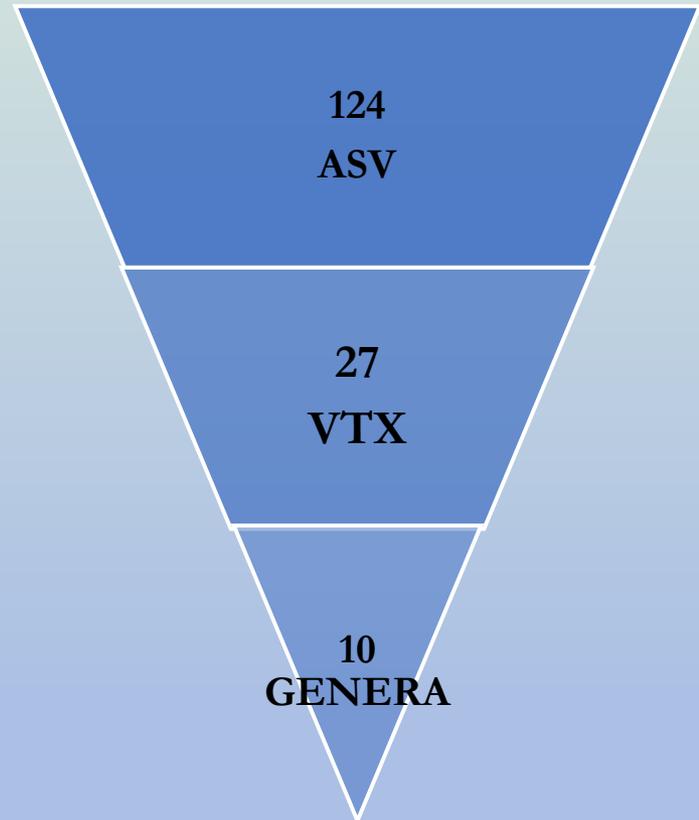
Septoglossum

Acaulospora

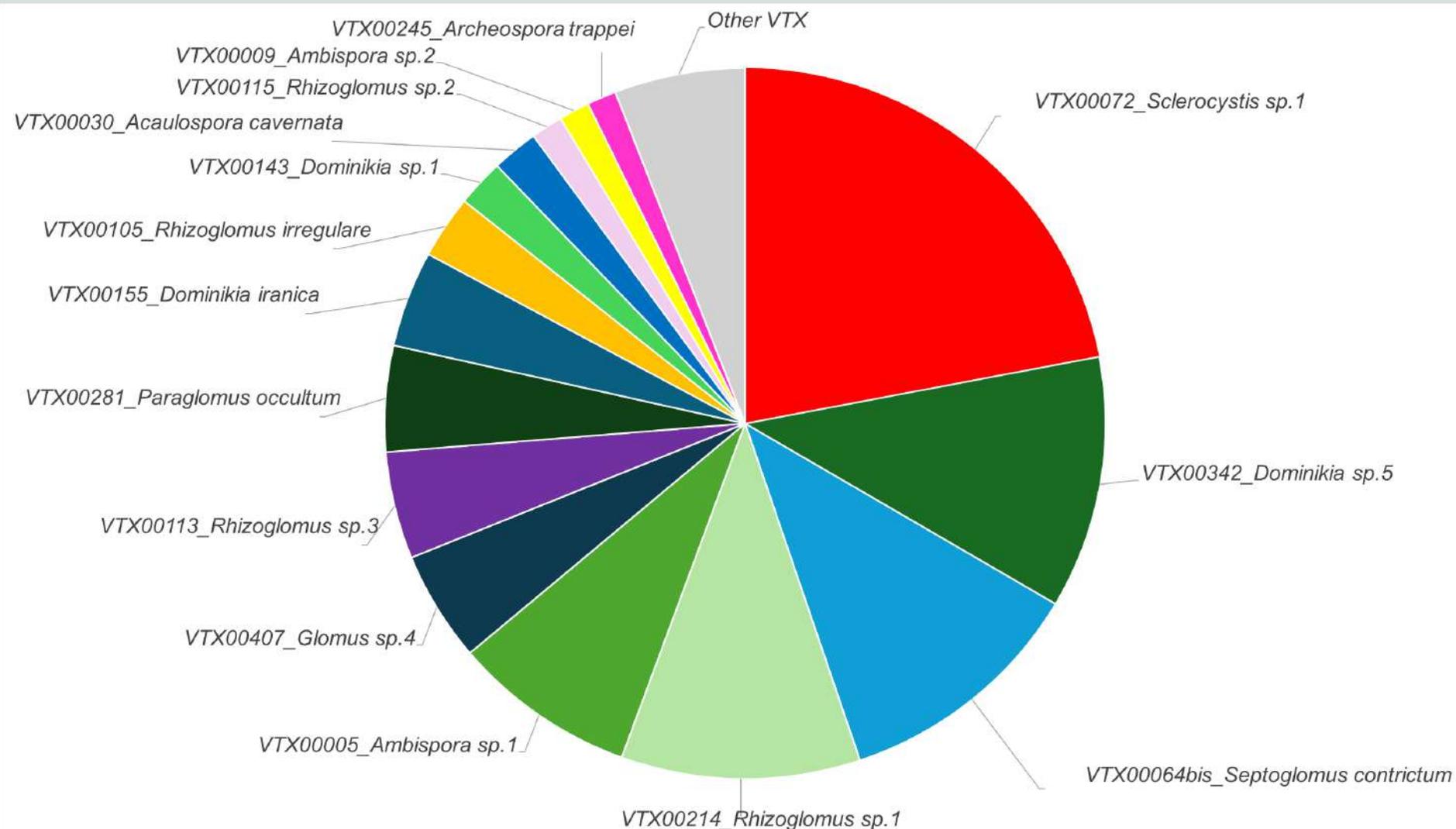
Paraglossum

Ambispora

Archeospora



2-CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'INOCULO MICORRIZIZICO



2-CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELL'INOCULO MICORRIZICO

Virtual taxa (VTX)	Accession number	Blastn identity	% identity
VTX00143_Dominikia sp.1	LN906526	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, clone M44-3	100%
VTX00156_Dominikia sp.2	OP894328	Uncultured <i>Glomus</i> clone ASV_212 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
VTX00130_Dominikia sp.3	OP894185	Uncultured <i>Glomus</i> clone ASV_68 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
VTX00125_Dominikia sp.4	FR848037	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, clone 6-22, isolate from non-infected host plant root	100%
VTX00222_Dominikia indica	KM368785	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone A416 18S ribosomal RNA gene, partial	100%
VTX00342_Dominikia sp.5	KM368401	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone A32 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
VTX00155_Dominikia iranica	LT856645	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, clone L22/3-14	100%
VTX00418_Glomus sp.1	OP894209	Uncultured <i>Glomus</i> clone ASV_93 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99,56%
VTX00418bis_Glomus sp.2	KM368728	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone A359 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%
VTX00419_Glomus sp.3	OP894208	Uncultured <i>Glomus</i> clone ASV_92 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
VTX00214_Rhizoglomus sp.1	OP894245	Uncultured <i>Rhizophagus</i> clone ASV_129 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
VTX00407_Glomus sp.4	H6972866	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, isolate Borracho cay, clone BO1-20	100%
VTX00065_Funneliformis geosporum/caledonim	LT856655	Uncultured <i>Funneliformis</i> partial 18S rRNA gene, clone L22/2-11	100%
VTX00063_Septoglomus sp.1	LT856664	Uncultured <i>Septoglomus</i> partial 18S rRNA gene, clone O22/2-34	100%
VTX00064_Septoglomus furcatum	JX683156	<i>Septoglomus</i> sp. JB-2012a strain SSU-7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99,11%
VTX00064bis_Septoglomus constrictum	OP894355	Uncultured <i>Septoglomus</i> clone ASV_240 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99,11%
VTX00072_Sclerocystis sp.1	HF913525	Uncultured <i>Glomus</i> partial 18S rRNA gene, isolate NCB_30	99,78%
VTX00105_Rhizoglomus irregulare	MF687344	<i>Rhizophagus irregularis</i> isolate SR3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99,78%
VTX00100_Rhizoglomus intraradices	LN906515	Uncultured <i>Rhizophagus</i> partial 18S rRNA gene, clone P27-5	100%
VTX00115_Rhizoglomus sp.2	MH052537	Uncultured <i>Glomeromycotina</i> clone K1085_4_Soldados 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
VTX00113_Rhizoglomus sp.3	MG835539	Uncultured <i>Rhizophagus</i> clone Pm31 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
VTX00030_Acaulospora cavernata	LN906549	Uncultured <i>Acaulospora</i> partial 18S rRNA gene, clone V58-9	100%
VTX00281_Paraglomus occultum	LT856680	Uncultured <i>Paraglomus</i> partial 18S rRNA gene, clone P22/3-40	100%
VTX00005_Ambispora sp.1	MH629178	Uncultured <i>Ambispora</i> clone 1UW-WLS2-34 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99,78%
VTX00009_Ambispora sp.2	KC708375	Uncultured <i>Glomeromycota</i> clone A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	99,55%
VTX00338_Archeospora sp.1	MG829600	<i>Glomeromycotina</i> sp. voucher WR895_B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99,11%
VTX00245_Archeospora trappei	OP894171	Uncultured <i>Archaeospora</i> clone ASV_53 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99,11%

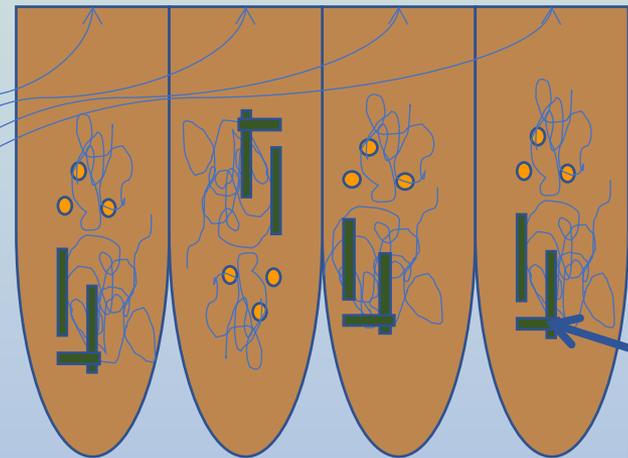
3-MONITORAGGIO DEL MIP DEI SUOLI

E' stato eseguito un biosaggio per valutare l'attività dei propaguli dei funghi MA dei vigneti attraverso il saggio MIP (mycorrhizal inoculum potential)

Il suolo prelevato dai diversi trattamenti (inoc. Pisa, inoc. comm., non inoc., controllo) nelle due aziende Sugame e Palagio (a **marzo 2023 (T0)** e a **Settembre 2023 (T1)** e a **Settembre 2024 (T2)**) è stato trasferito in tubi da 50 ml

Nei tubi sono stati seminati semi di *Chicorium intybus*

Le piante germinate sono state fatte crescere per 28 giorni in camera di crescita



Propaguli di funghi MA

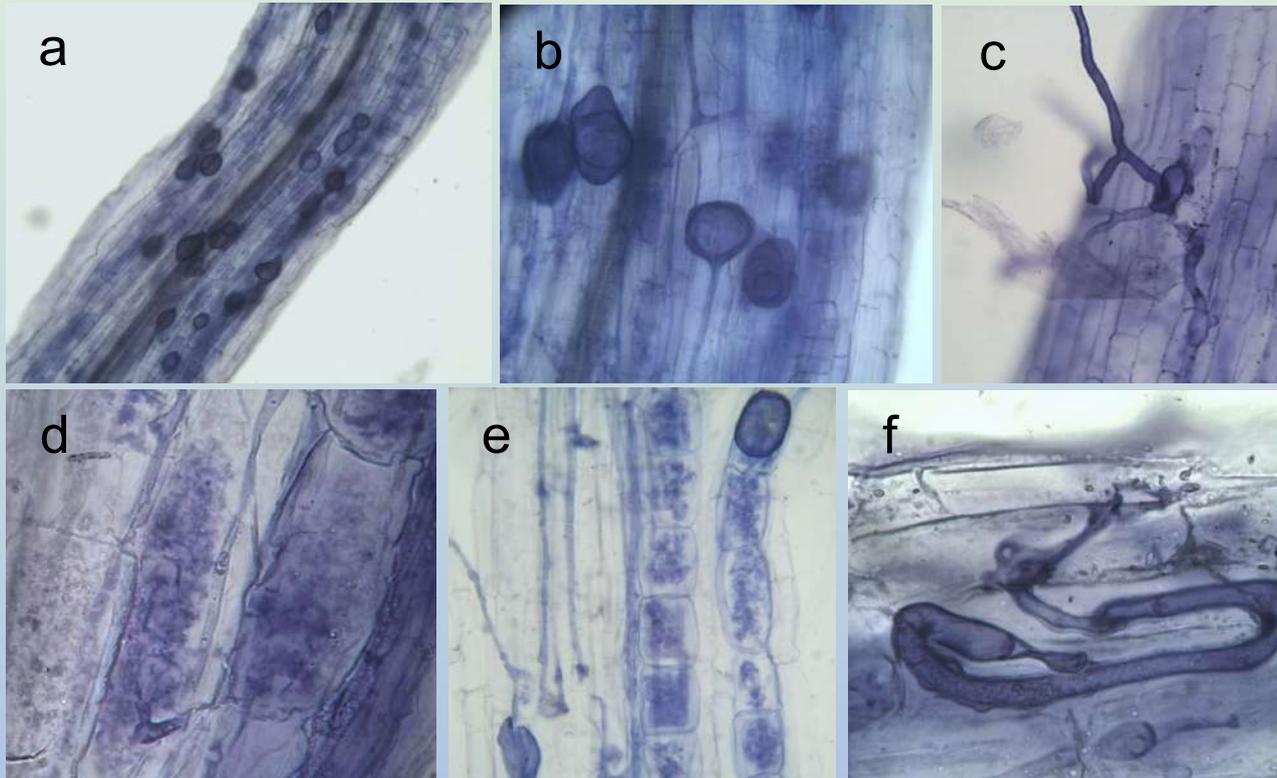


3-MONITORAGGIO DEL MIP DEI SUOLI



La percentuale di colonizzazione dei funghi MA nelle radici delle piante test è stata misurata dopo 28 giorni di crescita

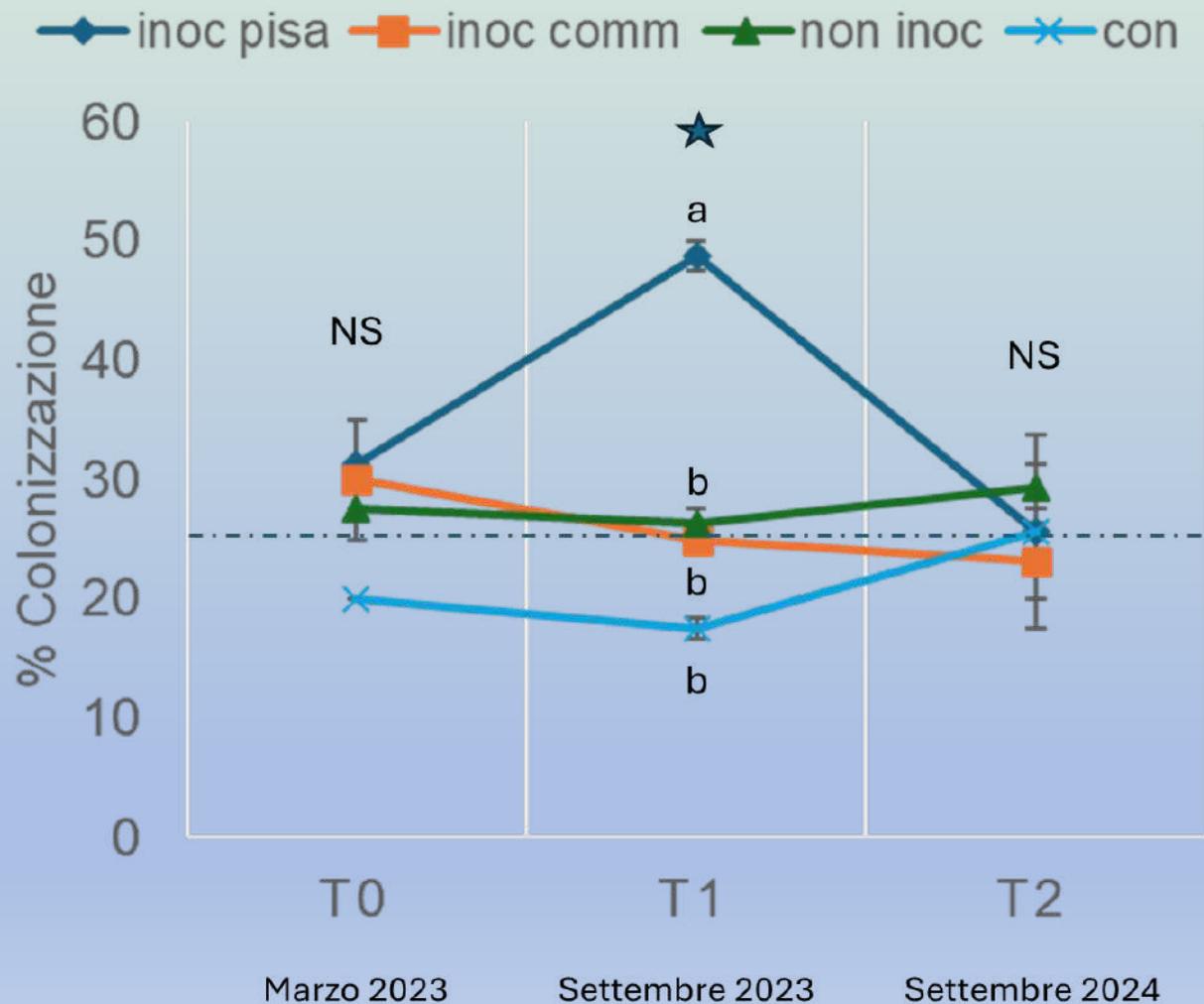
3-MONITORAGGIO DEL MIP DEI SUOLI



Fotografie al microscopio ottico delle strutture fungine osservate nelle radici di cicoria del saggio MIP. (a) Presenza di vescicole e colonizzazione intraradicale; (b) particolare di vescicole; (c, f) appressori con coil ifale; (d, e) arbuscoli

3-MONITORAGGIO DEL MIP DEI SUOLI

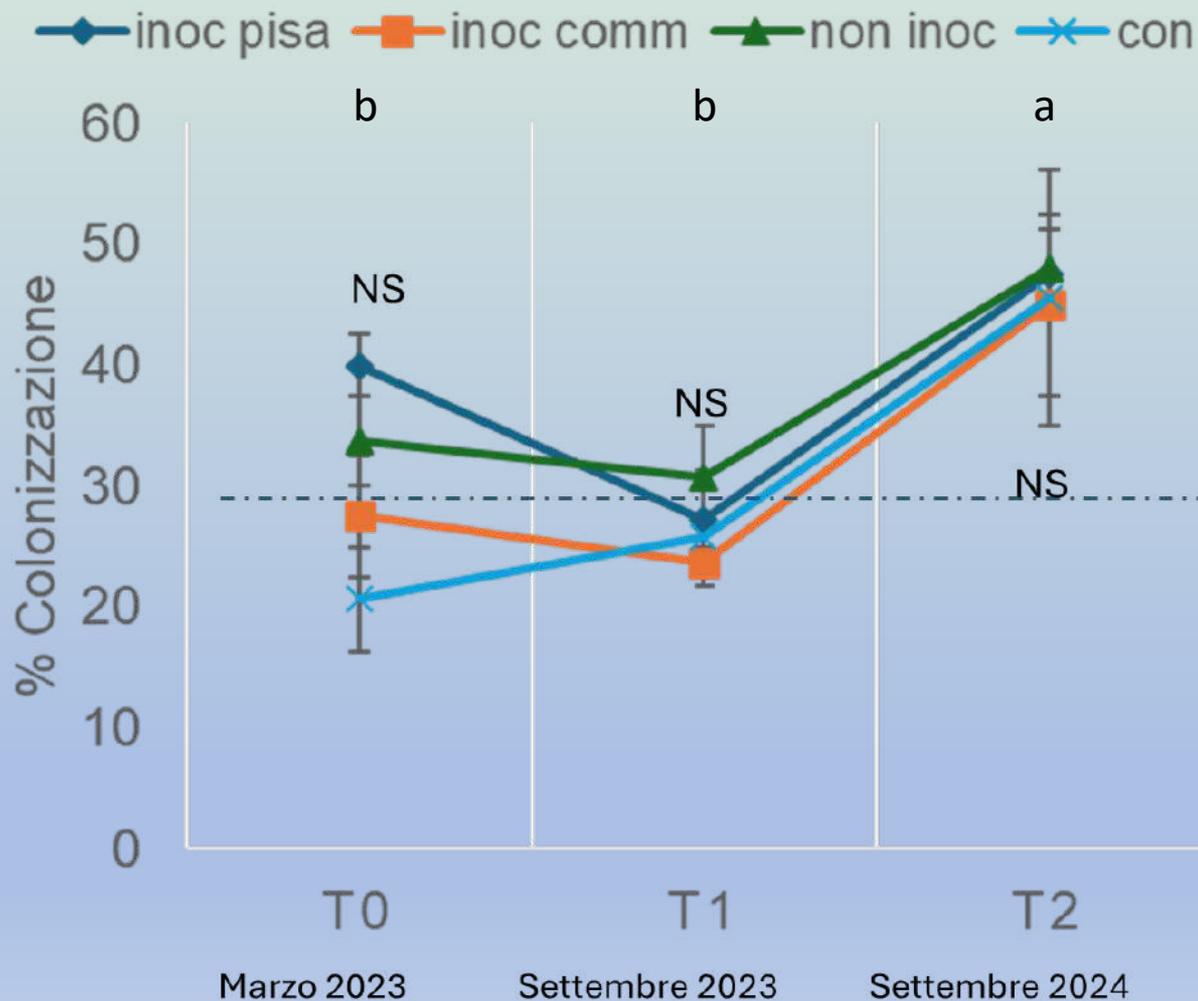
Palagio



	p (same)
Trattamento:	0,001975
Tempo:	0,3716
Interaction:	0,009335

3-MONITORAGGIO DEL MIP DEI SUOLI

Sugame



	p (same)
Trattamento:	0,2043
Tempo:	0,000257
Interaction:	0,6283

CONCLUSIONE

- I funghi micorrizici arbuscolari sono una potenziale risorsa per la fertilità del suolo dei vigneti e per la produttività e la qualità delle vigne
- L'effetto dell'inoculo sullo stato micorrizico del suolo è stato rilevato solo per il consorzio autoctono toscano nell'azienda Il Palagio nell'anno della distribuzione in campo
- In tale Azienda inoculare ogni anno potrebbe essere utile per aumentarne la fertilità del suolo

Gruppo Microbiologia UNIPI



Alessandra
Turrini



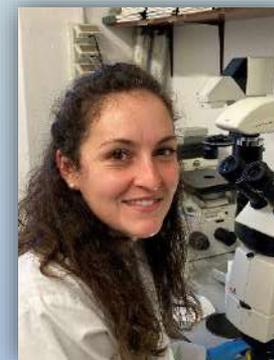
Monica
Agnolucci



Luciano Avio



Manuela
Giovannetti



Arianna
Grassi



Irene
Pagliarani

Grazie per l'attenzione!