

SERENA ZIMBARDO, TOMMASO LA MANTIA & PAOLA QUATRINI

SIMBIONTI RADICALI DI *ASTRAGALUS NEBRODENSIS* (GUSS.)
STROBL. (*Fabaceae*)

RIASSUNTO

Le leguminose spontanee mediterranee hanno un elevato potenziale nei processi di rinaturalizzazione di ecosistemi degradati o semiaridi poiché stabiliscono simbiosi radicali con batteri azotofissatori e funghi micorrizici i quali, agendo sinergicamente, avvantaggiano la pianta per la nutrizione e la resistenza agli stress. *Astragalus nebrodensis* è un arbusto perenne appartenente alla famiglia delle Fabaceae, endemico in Sicilia; i simbionti radicali di questa specie non sono noti. Gli obiettivi di questo studio sono stati: 1) l'analisi della diversità dei rizobi simbionti di *Astragalus nebrodensis*; 2) la valutazione dell'effetto dell'inoculo di rizobi da collezione e di funghi micorrizici commerciali sulla crescita delle piante in vivaio, su suolo naturale prelevato dall'areale della specie. Le analisi morfometriche e delle simbiosi radicali hanno mostrato che la maggiore nodulazione è avvenuta in assenza di inoculo e quindi ad opera di rizobi indigeni del suolo. I rizobi simbionti di *A. nebrodensis* sono stati isolati, identificati per la prima volta e affiliati al genere *Mesorhizobium* sp.. L'elevata frequenza di micorrizzazione ottenuta mediante l'inoculo con il fungo commerciale *Glomus intraradices* ha prodotto un incremento della sopravvivenza delle piante a scapito di una lieve depressione della crescita. L'effetto opposto è stato invece ottenuto in presenza di funghi micorrizici indigeni. I risultati di questo lavoro possono costituire una base di partenza per l'allestimento di impianti di propagazione di *A. nebrodensis* inoculato con simbionti benefici per il recupero di sistemi degradati e il consolidamento di suoli franosi.

Parole chiave: *Mesorhizobium*; funghi micorrizico-arbuscolari; recupero suoli degradati

SUMMARY

Root symbionts of Astragalus nebrodensis Guss. Strobl. Wild Mediterranean legumes have a high potential in the re-naturalization of degraded or semi-arid ecosystems as they establish root symbiosis with nitrogen-fixing bacteria and mycorrhizal fungi which synergically benefit plant nutrition and resistance to stress. *Astragalus nebrodensis* is a perennial shrub belonging to the Fabaceae, it is

endemic to Sicily and its root symbionts are unknown. The objective of this study are: 1) the analysis of the diversity of rhizobia of *Astragalus nebrodensis*; 2) the evaluation of the effects of inoculation of rhizobia and a commercial mycorrhizal fungus on the growth of plants in the nursery, using as a substrate the natural soil taken from the species areal. The morphometric analysis and the analysis of root symbiosis have shown that increased nodulation occurred in the absence of inoculum, i.e. by soil indigenous rhizobia. The rhizobia symbionts of *A. nebrodensis* were isolated and identified for the first time and affiliated to the genus *Mesorhizobium* sp. The high frequency of mycorrhization obtained by inoculating the commercial fungus *Glomus intraradices* increases plant survival at the expense of a slight depression of growth. The opposite effects were obtained with indigenous mycorrhizal fungi. The results of this work may provide a basis for the propagation of *A. nebrodensis* inoculated with beneficial symbionts, for the recovery of degraded ecosystems.

Key words: *Mesorhizobium*; arbuscular mycorrhizal fungi; soil rehabilitation

INTRODUZIONE

Il rischio di desertificazione (DIFFENBAUGH *et al.*, 2007) e di degrado degli ecosistemi è diffuso nelle regioni mediterranee, in particolare nel sud Italia ed in Sicilia, dove le scarse precipitazioni e attività umane, come lo sfruttamento intensivo del suolo, le pratiche agro-pastorali insostenibili e le attività estrattive, accrescono i processi di erosione e di desertificazione. L'introduzione di specie arbustive autoctone associate ai loro simbionti microbici (BASAGLIA *et al.*, 2006) è uno strumento biotecnologico utile al recupero degli ecosistemi desertificati mediterranei (REQUENA *et al.*, 2001; QUATRINI *et al.*, 2002, 2004; CARDINALE *et al.*, 2010). Le leguminose arbustive mediterranee, in particolare, hanno un elevato potenziale nei processi di rinaturalizzazione di ecosistemi caratterizzati da una bassa fertilità naturale, poiché esse stabiliscono simbiosi radicali con batteri azoto-fissatori e funghi micorrizici (QUATRINI *et al.*, 2002, 2003b; CARDINALE *et al.*, 2008, 2010). I rizobi sono batteri del suolo in grado di indurre nelle radici delle leguminose la formazione di noduli radicali nei quali avviene la fissazione dell'azoto atmosferico. Questa caratteristica conferisce alle Fabaceae nodulate proprietà pioniere e la capacità di aumentare il contenuto di azoto nel suolo, migliorando così lo stato nutrizionale delle altre piante non leguminose adiacenti o in successione (CARAVACA *et al.*, 2003). La simbiosi leguminosa-rizobio mostra in genere un elevato grado di specificità, basato sullo scambio di segnali chimici tra i due partner (DEBELLÈ *et al.*, 2001). Le leguminose arbustive mediterranee stabiliscono inoltre simbiosi vantaggiose con funghi micorrizici arbuscolari (AMF), che contribuiscono all'autosufficienza delle piante rispetto ai fabbisogni nutrizionali ed idrici, migliorando anche la tolleranza agli stress, il biocontrollo sui patogeni vegetali e la stabilità del suolo attraverso la loro rete ifale (CARAVACA *et al.*, 2003; RILLIG & MUMMEY, 2006; CHAUDHARY *et al.*,

2009). In suoli poveri di nutrienti entrambe le simbiosi benefiche agiscono sinergicamente, rappresentando un vantaggio selettivo per la pianta che diventa autonoma per la nutrizione (N, P, microelementi) e particolarmente resistente a stress idrici e patogeni radicali.

Gli obiettivi di questo studio sono stati: 1) l'analisi della diversità dei rizobi simbionti di *Astragalus nebrodensis* (Guss.) Strobl, una Fabacea arbustiva endemica siciliana e 2) la valutazione dell'effetto dell'inoculo di rizobi isolati da altre leguminose siciliane e di un fungo micorrizico commerciale sulla crescita delle piante in vivaio. I risultati possono costituire una base di partenza per l'allestimento di impianti di propagazione di plantule inoculate con simbionti benefici per il recupero di sistemi degradati ed il consolidamento di suoli franosi montani.

MATERIALI E METODI

Specie studiata

Astragalus nebrodensis è un arbusto alto 50-70 cm, con portamento emisferico, foglie paripennate con rachide spinescente, ricoperte da una densa pelosità grigiasta e corolla giallo-biancastra. Si tratta di una specie pioniera endemica delle Madonie, con numerosi adattamenti tipici delle echinofite orofile del Mediterraneo (GUARINO *et al.*, 2006), che vive ad un'altitudine compresa tra 1200 e 2000 m s.l.m. (PIGNATTI, 1982). Si osserva di frequente su pendii franosi, nelle radure delle faggete o al di sopra del limite della vegetazione forestale, soprattutto su substrati derivanti dalla degradazione di quarzareniti. Di questa specie, sebbene, svolga un ruolo importante nella colonizzazione delle zone alto montane, non si conoscevano sino ad ora i simbionti azoto-fissatori.

Raccolta materiale e allestimento dell'impianto in vivaio

Il suolo utilizzato come substrato di crescita di *A. nebrodensis* è stato raccolto da un pendio franoso in località Vallone Madonna degli Angeli, presso il Parco delle Madonie dove la specie è presente con popolazioni rilevanti (BRULLO *et al.*, 2006). Il suolo, le cui caratteristiche chimico-fisiche sono riportate in tabella 1, è stato distribuito in fitocelle di plastica da 800 ml poste nel Vivaio di Piano Noce (Polizzi Generosa, PA) gestito dall'Azienda Foreste Demaniali della Regione Siciliana. I semi di *Astragalus nebrodensis* sono stati raccolti nello stesso sito, scarificati mediante immersione in acido solforico al 96% per 10 min, risciacquati abbondantemente in acqua fino a pH neutro e seminati nelle fitocelle. Sulla base del disegno

Tabella 1

Parametri chimico-fisici medi del suolo di Vallone degli Angeli utilizzato per la crescita in vivaio di A. nebrodensis

Parametro	Unità di misura	Valore
Umidità		0,61
Argilla	%	2,36
limo		5,91
Sabbia		91,73
pH _(H2O)	-	8,20
EC _(1:5)	dS m ⁻¹	0,26
CaCO ₃ ^{tot}	g kg ⁻¹	929,78
CaCO ₃ ^{att}	g kg ⁻¹	18,89
T.O.C.	g kg ⁻¹	15,29
N ^{tot}	g kg ⁻¹	0,76
P ₂ O ₅	ppm	0,09
CSC	cmol(+) kg ⁻¹	12,40

sperimentale descritto più avanti, alla semina è stata inoculata alle plantule una sospensione di spore del fungo AM *Glomus intraradices* (Mycorise ASP; Premier Tech Biotechnologies, Québec, Canada) nelle dosi consigliate dal produttore (circa 400 spore/pianta) e una miscela di otto ceppi di rizobi (Tab. 2) precedentemente isolati da leguminose arbustive siciliane e identificati (QUATRINI *et al.*, 2002; CARDINALE *et al.*, 2008). Il disegno sperimentale ha previsto quattro diversi trattamenti: doppio inoculo con fungo AM e miscela di rizobi (MR), singolo inoculo con miscela di rizobi (R), singolo inoculo con fungo AM (M), controllo non inoculato (NI). Ogni trattamento è stato ripetuto su circa 200 fitocelle, la semina è stata effettuata nel novembre 2008 e la crescita è stata seguita per circa 1 anno. Per gli inoculi

Tabella 2

Ceppi di rizobi della collezione RHIMEL utilizzati in miscela per inoculare A. nebrodensis

Isolato	Pianta di isolamento	Origine geografica	Riferimento Bibliografico
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SjGb2	<i>Spartium junceum</i>	Geraci Siculo (PA)	QUATRINI <i>et al.</i> , 2002
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SjCL30	<i>Spartium junceum</i>	Caltanissetta	CARDINALE <i>et al.</i> , 2008
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Sj9	<i>Spartium junceum</i>	Geraci Siculo (PA)	QUATRINI <i>et al.</i> , 2002
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CaStro2.2	<i>Cytisus aeolicus</i>	Stomboli (ME)	CARDINALE <i>et al.</i> , 2008
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Vcas27	<i>Cytisus aeolicus</i>	Vulcano (ME)	CARDINALE <i>et al.</i> , 2008
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CiE2	<i>Calicotome infesta</i>	Catania	CARDINALE <i>et al.</i> , 2008
<i>Bradyrhizobium</i> sp. CiEY	<i>Calicotome infesta</i>	Catania	CARDINALE <i>et al.</i> , 2008
<i>Bradyrhizobium</i> sp. GaPa1	<i>Genista aspalathoides</i>	Palermo	CARDINALE <i>et al.</i> , 2008

microbici i ceppi di rizobi sono stati fatti crescere in terreni di coltura YMB e TY (QUATRINI *et al.*, 2002) ed inoculati (200 µl di miscela per pianta) ad una concentrazione finale di circa 10^5 CFU/ml per pianta. Sono stati eseguiti due inoculi, uno alla germinazione delle plantule a 6 giorni dalla semina e uno dopo 14 giorni dalla semina. Le piantine sono rimaste all'aria aperta per tutto il periodo di crescita e irrigate al bisogno evitando gli eccessi.

Parametri di crescita e analisi delle simbiosi

Durante la crescita in vivaio sono stati rilevati mensilmente l'altezza e la proiezione della chioma delle piante. Il portamento policaule ha impedito il rilevamento del diametro al colletto. Dopo circa otto mesi alcune delle piante sono state sacrificate. I noduli sono stati separati dalle radici, contati e pesati. La percentuale di infezione AM è stata calcolata secondo un procedimento definito "+/- slide method" (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980), attraverso la colorazione con Trypan blue (KOSKE & GEMMA, 1989).

Isolamento e identificazione di rizobi da noduli di Astragalus nebrodensis

I noduli presenti sulle piante del trattamento NI sono stati sterilizzati superficialmente mediante immersione in etanolo e ipoclorito di sodio e sezionati per l'isolamento dei rizobi secondo il metodo descritto da SOMASEGARAN & HOBEN (1985). Dopo un primo screening al microscopio ottico e Colorazione di Gram, i presunti rizobi sono stati analizzati mediante analisi PCR-RFLP dello spaziatore intergenico trascritto (ITS) tra il gene 16S rRNA e il 23S rRNA (QUATRINI *et al.*, 2002). Per l'amplificazione della regione ITS sono stati utilizzati i primer ITSf/ITSReub (CARDINALE *et al.*, 2004), la miscela di reazione per l'amplificazioni con volume finale di 50 µl era composta da 0,2 mM di dNTPs, 0,3 mM di ogni primer, 2U di Taq DNA Polimerasi, 1 µl di DNA(50-100ng). Il programma termico utilizzato prevedeva le seguenti condizioni: 94°C per 5 min; 30 cicli di 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C; 72°C per 7 min. I prodotti di PCR sono stati visualizzati su un gel all'1,5% di agarosio. I poliformismi di lunghezza (RFLP) sono stati ottenuti dalla digestione con l'enzima di restrizione *TaqI*. Gli isolati con identici profili sono stati raggruppati nella stessa Unità Tassonomica Operativa (OTU). Un isolato rappresentante di ogni OTU è stato scelto per il sequenziamento del gene ribosomale 16S rRNA, utilizzando la coppia di primers universali rD1/fD1 (WEISBURG *et al.*, 1991) nelle condizioni precedentemente descritte. Le sequenze parziali così ottenute sono state allineate con sequenze note, disponibili nel Database Multimediale NCBI utilizzando l'algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Blast; ALTSCHUL *et al.*, 1997).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Identificazione dei rizobi simbiotici di A. nebrodensis

L'utilizzazione di un substrato naturale proveniente dall'habitat di *A. nebrodensis* ha consentito di mantenere condizioni il più possibile vicine a quelle praticate in vivaio e di avere informazioni sulla presenza e la qualità dei propaguli microbici naturali. Le piante di *A. nebrodensis* non inoculate (NI) hanno funzionato come piante "trappola" per i propaguli microbici del suolo, mostrando abbondante nodulazione e presenza di micorrize (Tab. 3). La presenza di queste simbiosi dimostra che il substrato, seppure privo di vegetazione, ha mantenuto un'elevata e diversificata popolazione microbica nella quale la specie di *A. nebrodensis* ha trovato i simbiotici batterici specifici e funghi AM infettivi. Dai noduli delle piante di *Astragalus nebrodensis* non inoculate (NI) sono stati ottenuti 11 isolati. Al fine di caratterizzare questi isolati si è proceduto all'amplificazione dello spazio intergenico (ITS) tra il gene 16S rRNA e il gene 23S rRNA che presenta polimorfismi di lunghezza e sequenza in grado di discriminare i rizobi a livello di genere e specie. Tutti i prodotti di amplificazione dell'ITS risultavano di ugual dimensioni (900 bp) e pertanto sono stati ulteriormente discriminati mediante analisi dei profili di restrizione, utilizzando l'enzima di restrizione *TaqI*. Gli 11 isolati hanno mostrato due diversi profili (Fig. 1). Un isolato scelto a caso tra quelli che presentavano il primo profilo ITS-RFLP e due del secondo profilo sono stati identificati mediante sequenziamento parziale del gene 16S rRNA e successivo confronto della sequenza con quelle del Database Multimediale NCBI. I tre isolati sono stati affiliati al genere *Mesorhizobium* (Tab. 4) con elevata identità con le specie *Mesorhizobium tianshanense* (TAN *et al.*, 1997) e *Mesorhizobium mediterraneum* (JARVIS *et al.*, 1997). Questi sono entrambi degli Alfa-proteobatteri, rispettivamente isolati per la prima volta da noduli di piante di *Pisum sativum* L. e di *Cicer arietinum* L. In particolare l'isolato An02.19 è risultato filogeneticamente correlato ad un batterio isolato da noduli di *Argyrolobium uniflorum* nella Tunisia arida (ZAKHIA *et al.*, 2004). Nel 1997 i rizobi simbiotici di diverse specie di *Astragalus* del Nord America e del Canada erano stati classificati come *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (LAGUERRE *et al.*, 1997) e recentemente simbiotici di numerose specie di *Astragalus* in Cina sono state classificati principalmente come *Mesorhizobium* spp e, in minor percentuale come *Ensifer* spp. e *Rhizobium gallicum* (CHEN *et al.*, 2013). Le altre specie di leguminose siciliane studiate fino ad oggi hanno mostrato maggiore affinità per i rizobi del genere *Bradyrhizobium* (QUATRINI *et al.*, 2002; CARDINALE *et al.*, 2008) che risulta comunque tra i simbiotici di specie di *Astragalus* del nord America (LAGUERRE *et al.*, 1997).

Tabella 3

Effetto dell'inoculo con simbionti radicali (Funghi e Rizobi) sui parametri di crescita di *Astragalus nebrodensis*, a otto mesi dal trattamento. Le piante sono state inoculate con spore di *G. intraradices* e una miscela di otto ceppi di rizobi specifici descritti in Tab. 2. I controlli non inoculati hanno instaurato simbiosi con i microrganismi presenti nel suolo usato per allestire le colture

Nome	Trattamento	Inoculi		Tot. Noduli pianta ⁻¹ (N)	Peso fresco noduli (mg)	Freq. Micorr. (%)	Peso fresco radici (g)	Peso secco radici (g)	Peso fresco sereo (g)
		Fungo AM	Rizobio						
NI	controllo non inoculato	-	-	19±10,5	19±5,9	49±8,4	3,97±1,39	0,71±0,26	2,30±0,99
M	singolo inoculo	<i>G. intraradices</i>	-	11,3±4,3	4±1,5	89,7±3,2	0,78±0,46	0,24±0,06	0,51±0,30
R	singolo inoculo	-	Miscela ^a	16±4,6	10±2,1	65,3±2,7	3,01±0,34	0,49±0,07	1,70±0,17
MR	doppio inoculo	<i>G. intraradices</i>	Miscela	17,6±6,4	7±1,1	88,7±7,3	1,21±0,32	0,25±0,07	0,83±0,13

^aMiscela di otto isolati di rizobi: *Bradirhizobium* sp. SJGb2; *Bradirhizobium* sp. SJCL30; *Bradirhizobium* sp. SP9; *Bradyrhizobium* sp. CaStro2.2; *Bradyrhizobium* sp. Vcas27; *Bradyrhizobium* sp. CjET; *Bradyrhizobium* sp. CjEY; *Bradyrhizobium* sp. GaPa1

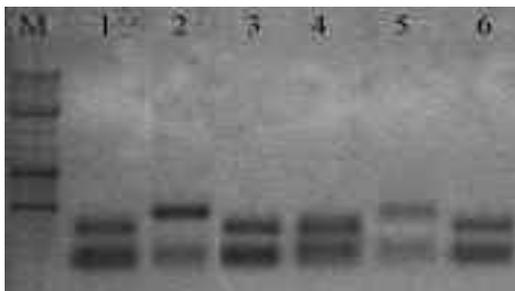


Fig. 1 — Analisi di restrizione (RFLP) degli spaziatori intergenici (ITS) degli isolati da noduli di *A. nebrodensis*. Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di restrizione con *TaqI* di alcuni degli isolati; M: DNA Ladder mix Marker; Corsie 1-9 isolati.

Tabella 4

Identificazione degli isolati da noduli di *A. nebrodensis*. Risultati dell'allineamento delle sequenze dell'rDNA 16S mediante analisi BLAST

Isolato	Lunghezza sequenza 16S (nt)	Migliore allineamento BLAST (Genbank n acc.)	Identità (%nt)
An02.14	1056	<i>Mesorhizobium tianshanense</i> strain SEMIA 3012 (FJ025121.1)	99%
An02.19	1017	<i>Mesorhizobium</i> sp. STM 398 (AY500256.1)	97%
An02.27	1195	<i>Mesorhizobium</i> sp. SH2851 (AY141983.1)	98%

Analisi delle simbiosi di Astragalus nebrodensis in vivaio

In mancanza di simbionti noti di *A. nebrodensis* alla fase di impianto, sono stati scelti dalla collezione di rizobi "RHIMEL" (RHIZobia from Mediterranean Legumes, Laboratorio di Microbiologia Ambientale ed Ecologia Microbica, Dipartimento STEBICEF, Palermo) otto ceppi di rizobi, genotipicamente diversi e con elevata efficienza (QUATRINI *et al.*, 2002; Cardinale *et al.*, 2008), da utilizzare come inoculo batterico su *Astragalus nebrodensis*.

La micorrizzazione è stata effettuata con inoculo commerciale di elevata qualità e purezza. Raggiunti gli otto mesi di crescita, tre piantine di ogni trattamento sono state sacrificate e portate in laboratorio per le analisi dei parametri di crescita e simbiotici. I valori medi ottenuti da queste analisi sono riportati in Tabella 3. Indipendentemente dal trattamento, tutte le piante sono risultate nodulate e colonizzate da funghi AM. Non sorprende che le piantine non inoculate (NI) si presentassero nodulate poiché sono state seminate su un terreno naturale dove *A. nebrodensis* è pre-

sente e quindi presumibilmente lo sono anche i suoi simbionti; è invece alquanto sorprendente che le piante NI avessero noduli più numerosi e più grandi a dimostrare che i rizobi autoctoni sono stati più infettivi ed efficienti di quelli inoculati (Tab. 3). La miscela di *Bradyrhizobium* sp. inoculata potrebbe aver limitato la nodulazione dei ceppi autoctoni di *Mesorhizobium* competendo con essi. Non si può escludere tuttavia che in alcuni dei noduli delle piantine inoculate fossero presenti i mesorizobi autoctoni, dal momento che ogni nodulo di una pianta è il risultato di un evento di infezione indipendente. L'inoculo artificiale in questo caso non ha sortito effetto se non forse negativo a dimostrazione della necessità di inoculare simbionti specifici.

È stata inoltre verificata la presenza e l'entità dell'infezione micorrizica ed espressa come frequenza di colonizzazione micorrizica-arbuscolare, cioè lunghezza delle porzioni radicali infette rispetto alla lunghezza totale. L'infezione micorrizica in percentuale è oscillata dal 49% del trattamento NI (non inoculate) all'89% per il trattamento M (solo fungo AM) (Tab. 3); la presenza della simbiosi nelle piante non inoculate è da attribuire alla presenza di propaguli di funghi micorrizici indigeni del substrato utilizzato, proveniente dalla zona del Vallone Madonna degli Angeli. Tuttavia la maggior percentuale di micorrizzazione delle piante inoculate con il fungo *Glomus intraradices* suggerisce che i propaguli naturali siano presenti in minor quantità o comunque siano meno infettivi. La minore infettività comunque non coincide necessariamente con una minore efficacia. Una nodulazione elevata ed una ridotta percentuale di radici micorrizzate da funghi autoctoni spiegherebbero il maggiore peso degli apparati aerei e radicali delle piante NI e R rispetto a quelle MR ed M (Tab. 3).

Sopravvivenza

Dopo 6 mesi di crescita in vivaio, la percentuale di sopravvivenza media tra le piante di *Astragalus nebrodensis* è risultata $\geq 80\%$, mentre l'ultimo rilevamento in vivaio effettuato dopo 12 mesi dalla semina (Fig. 2) ha rivelato una diminuzione generale della sopravvivenza. Le piante del trattamento MR ed M, con rispettivamente l'88 e l'89% di frequenza di micorrizzazione (Tab. 3), hanno infatti raggiunto il 95% di sopravvivenza; solo il 41% di quelle del trattamento NI, scarsamente micorrizzate è sopravvissuto. I dati mettono in evidenza la forte correlazione esistente tra la frequenza micorrizica (Tab. 3) e la sopravvivenza (Fig. 2) (BASAGLIA *et al.*, 2006). Non è stata indagata l'identità dei funghi micorrizici presenti nelle radici e non è quindi possibile distinguere l'effetto dell'intensità di infezione dall'effetto specifico dei funghi. Si presume comunque che l'inoculo commerciale (sulle piante M e MR) abbia avuto

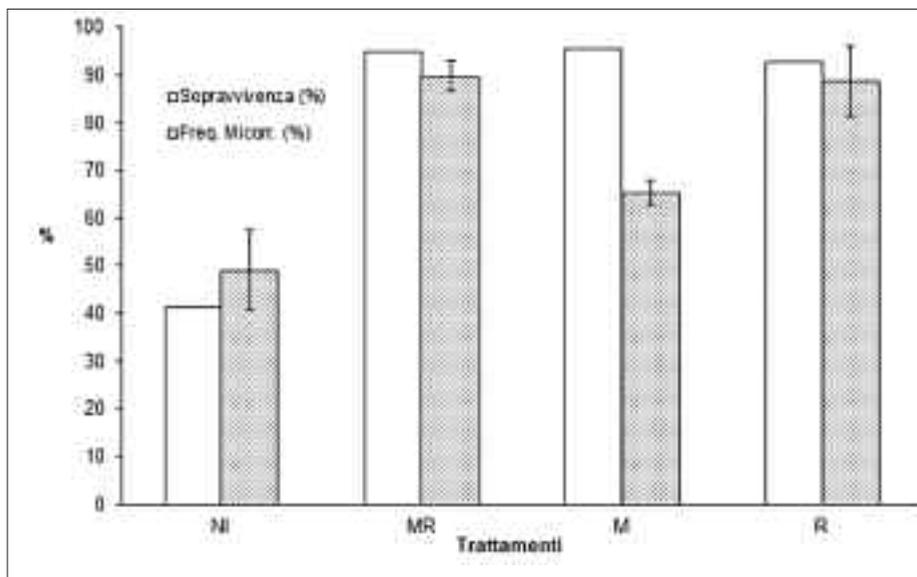


Fig. 2 — Frequenza micorrizica e sopravvivenza delle piantine di *Astragalus nebrodensis* sottoposte a diversi trattamenti di inoculo con simbionti al termine della crescita in vivaio (i trattamenti sono descritti in tabella 3).

il sopravvento sui funghi indigeni (NI, R) vista la più elevata infettività e che quindi *G. intraradices* abbia una specifica influenza positiva sulla sopravvivenza di *Astragalus nebrodensis*.

Effetto delle simbiosi sui parametri morfometrici e sulla crescita delle piante

Dai dati ottenuti dalla misurazione dell'altezza e dalla proiezione della chioma, risulta che le piante di *Astragalus nebrodensis* inoculate solo con la miscela di rizobi di collezione (R) ed i controlli non inoculati (NI) hanno mostrato una maggiore crescita in altezza, mentre le meno sviluppate sono risultate le piante in cui è stato inoculato solo *Glomus intraradices* (M). Anche la proiezione della chioma misurata nei diversi tempi ha mostrato lo stesso andamento (Fig. 3). L'effetto deprimente sulla crescita dei semenzali dei funghi AM è stato già descritto per diverse specie (QUATRINI *et al.*, 2003a) ed è da attribuire ad un costo di carbonio sostenuto dalla pianta, sotto forma di fotosintetati inviati alle radici micorrizzate. Al contrario, come già visto, esiste una forte correlazione positiva tra la frequenza micorrizica e la sopravvivenza delle piantine (BASAGLIA *et al.*, 2006) sia quando la micorrizzazione è dovuta all'inoculo commerciale sia quando è derivata

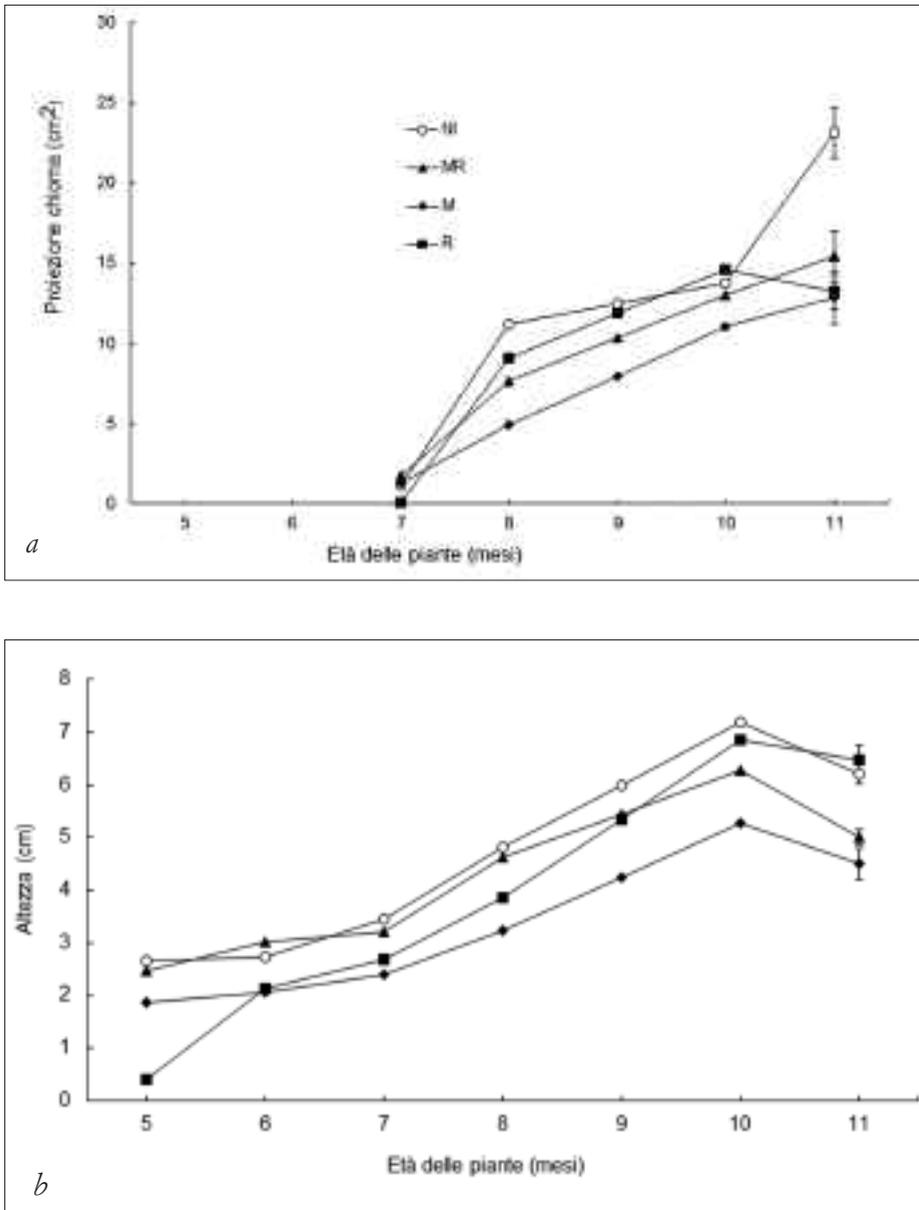


Fig.3 — Crescita delle piante di *Astragalus nebrodensis* in vivaio. A) proiezione della chioma, B) altezza delle piante, sottoposte ai diversi trattamenti di: inoculo micorrizico più rizobi (MR), solo fungo micorrizico *G. intraradices* (M), solo inoculo con miscela di rizobi (R), senza inoculo (NI). Nell'ultimo rilievo sono riportati gli errori standard (ES) delle medie. I ceppi di rizobi inoculati sono descritti in tabella 2.

da funghi AM indigeni del substrato. Sembra quindi che non sia possibile massimizzare la crescita e la sopravvivenza di *A. nebrodensis* contemporaneamente, almeno in queste condizioni. Tuttavia molti fattori interagiscono nella simbiosi tripartita leguminosa-rizobio-fungo AM ed i suoi effetti benefici dipendono anche dalla specifica combinazione fungo-batterio utilizzata (REQUENA *et al.*, 1997). Ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio l'interazione e per identificare i funghi AM simbionti di *A. nebrodensis* più benefici.

CONCLUSIONI

L'utilizzo di specie di leguminose arbustive autoctone inoculate con specifici rizobi e funghi AM, risulta vantaggiosa nei programmi di recupero o di rinaturalizzazione degli ecosistemi degradati, in cui queste si comportano come specie pioniere capaci di colonizzare i terreni desertificati ed inospitali spesso privi di nutrienti, grazie alla capacità dei rizobi di fissare l'azoto atmosferico (REQUENA *et al.*, 2001; QUATRINI *et al.*, 2003b, 2004; CARDINALE *et al.*, 2010). Possono altresì svolgere un ruolo importante negli interventi di forestazione precedendo la messa a dimora degli alberi contribuendo a migliorare la capacità del suolo a ospitare le specie arboree (CORONA *et al.*, 2009). Inoltre l'utilizzo di specie arbustive (o erbacee) autoctone rende superfluo l'utilizzo di specie arboree "miglioratrici" come i pini, per sostituire i quali con specie autoctone si rendono necessari lunghi e costosi periodi di intervento (LA MANTIA & PASTA, 2001), senza che ciò vada a scapito della conservazione della diversità (LA MANTIA *et al.*, 2012).

Astragalus nebrodensis è un prezioso endemismo siculo di particolare interesse naturalistico, di cui non si conoscevano, sino ad oggi, i simbionti radicali azotofissatori. L'isolamento e l'identificazione dei rizobi simbionti di *A. nebrodensis* è qui riportata per la prima volta e questi isolati vanno ad arricchire la collezione Rhimel (RHizobia from MEditerranean Legumes del Dipartimento STEBICEF). Questi simbionti possono essere impiegati nel migliorare l'utilizzo di *A. nebrodensis* in interventi di rinaturalizzazione o in suoli franosi nell'area dove la specie è diffusa anche attraverso la semina diretta e il contemporaneo inoculo con i batteri. In questo lavoro è stato utilizzato un inoculo fungino commerciale particolarmente adatto a climi aridi. Sebbene i funghi AM siano cosmopoliti, è opportuno che anche i simbionti fungini vengano isolati localmente evitando quindi di introdurre funghi non autoctoni in eventuali progetti di propagazione.

Sarebbe auspicabile che studi analoghi venissero condotti su rizobi e

funghi AM di altre leguminose, in modo da disporre, per ogni fascia altitudinale e per i diversi substrati, di inoculi appropriati.

Ringraziamenti — Il lavoro è stato condotto nell'ambito di una convenzione tra l'Azienda Regionale delle Foreste Demaniali della Regione Siciliana e il Centro Interdipartimentale di Biotecnologie applicate (CIBA) dell'Università degli Studi di Palermo. Si ringrazia in particolare A. Catania ed il personale del Vivaio Piano Noce di Polizzi (PA) per la collaborazione. Un sentito ringraziamento ai due revisori che hanno consentito con i loro suggerimenti di migliorare questo articolo.

BIBLIOGRAFIA

- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHAFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W. & LIPMAN D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- BASAGLIA M., BAZZICALUPO, BENUZZI M., BONFANTE P., BRUSETTI L., CASELLA S., DAFFONCHIO D., GIOVANETTI M., IACCARINO M., LORITO M., MENGONI A., NUTI M.P., PATRIARCA E.J., PEROTTO S., PINTON R., SQUARTINI A., SALAMINI F., SCALA F., VARANINI Z. & WOO S., 2006. Microrganismi benefici per le piante. *Idelson-Gnocchi*, Napoli, pp.208.
- BRULLO S., CORMACI A., GIUSSO DEL GALDO G., GUARINO R., MINISSALE P., SIRACUSA G. & SPAMPINATO G., 2006. A syntaxonomical survey of the Sicilian dwarf shrub vegetation belonging to the class *Rumici-Astragaletea siculi*. *Ann. Botanica*, 5 (n.s.): 103-149.
- CARAVACA F., BAREA J.M., PALENZUELA J., FIGUEROA D., ALGUACIL M.M. & ROLDÁN A., 2003. Establishment of shrub species in a degraded semi-arid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.*, 22: 103-111.
- CARDINALE M., BRUSETTI L., LANZA A., ORLANDO S., DAFFONCHIO D., PUGLIA A.M. & QUATRINI P., 2010. Rehabilitation of Mediterranean anthropogenic soils using symbiotic wild legume shrubs: plant establishment and impact on the soil bacterial community structure. *Appl. Soil Ecol.*, 46: 1-8.
- CARDINALE M., BRUSETTI L., QUATRINI P., BORIN S., PUGLIA A.M., RIZZI A., ZANARDINI E., SORLINI C., CORSELLI C. & DAFFONCHIO D., 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(10): 6147-56.
- CARDINALE M., LANZA A., BONNI M.L., MARSALA S., PUGLIA A.M. & QUATRINI P., 2008 Diversity of rhizobia nodulating wild shrubs of Sicily and some neighbouring Islands. *Arch. Microbiol.*, 190: 461-470
- CHAUDHARY V.B., BOWKER M.A., O'DELL T.E., GRACE J.B., REDMAN A.E., RILLIG M.C. & JOHNSON N.C., 2009. Untangling the biological contributions to soil stability in semi-arid shrublands. *Ecol. Appl.*, 19 (1): 110-22.
- CHEN W., SUN L., LU J., BI L., WANG E. & WEI G., 2013. Diverse nodule bacteria were associated with *Astragalus* species in arid region of northwestern China. *J. Basic. Microbiol.*, Oct 1. doi: 10.1002/jobm.201300209. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24115208.
- CORONA P., FERRARI B., IOVINO F., LA MANTIA T. & BARBATI A., 2009. Rimboschimenti e lotta alla desertificazione in Italia. *Aracne Ed.*, Roma, 281 pp.
- DEBELLE F., MOULIN L., MANGIN B., DENARIE J. & BOIVIN C., 2001. Nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochim. Pol.*, 48: 359-365.
- DIFFENBAUGH N.S., PAL J.S., GIORGI F. & GAO X., 2007. Heat stress intensification in the Mediterranean climate change hotspot. *Geophys. Res. Lett.*, 34, L11706, doi:10.1029/2007GL030000.

- GIOVANNETTI M. & MOSSE B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infections in roots. *New Phytol.*, 84: 489-500.
- GUARINO R., GIUSSO DEL GALDO G. & PIGNATTI S., 2006. The Mediterranean dwarf shrubs: origin and adaptive radiation. *Ann. Bot.*, Roma, n. s., 5 (2005): 93-101.
- JARVIS, B. D. W., VAN BERKUM, P., CHEN, W. X., NOUR, S. M., FERNANDEZ, M. P., CLEYET-MAREL, J. C. & GILLIS, M., 1997. Transfer of *Rhizobium buakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 895-898.
- KOSKE R.E. & GEMMA J.N., 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.*, 92 (4): 486-488.
- LAGUERRE G., VAN BERKUM P., AMARGER N., PRÉVOST D., 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (12):4748-4758.
- LA MANTIA T. & PASTA S., 2001. La rinaturalizzazione dei rimboschimenti: proposte metodologiche e ipotesi di intervento nella Riserva Naturale "Grotta di Santa Ninfa". *Naturalista sicil.*, 25 (Suppl.): 299-323.
- LA MANTIA T., MESSANA G., BILLECI V., DIMARCA A., DEL SIGNORE B., LEANZA M., LIVRERI CONSOLE S., MARAVENTANO G., NICOLINI G., PRAZZI E., QUATRINI P., SANGUEDOLCE F., SORRENTINO G. & PASTA S., 2012. Combining ecological engineering and plant conservation on a Mediterranean islet. *iForest*, 5: 296-305.
- PIGNATTI S., 1982. Flora d'Italia, *Edagricole*, Bologna.
- QUATRINI P., CARDINALE M., CARUSO E., SORRENTINO I. & LA MANTIA T., 2004. Le leguminose arbustive della macchia mediterranea per la rinaturalizzazione delle discariche. *Italus Hortus e Notiziario SOI di Ortoflorofruitticoltura*, 11: 79-83.
- QUATRINI P., GENTILE F., CARIMI F., DE PASQUALE F. & PUGLIA A.M., 2003a. Effect of native arbuscular mycorrhizal fungi and *Glomus mosseae* on acclimatisation and development of micropropagated *Citrus limon* (L.) Burm. *J. Hort. Sc. & Biotechn.*, 78 (1): 39-45.
- QUATRINI P., SCAGLIONE G., CARDINALE M., CARADONNA F. & PUGLIA A.M. 2002. *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub Spanish Broom (*Spartium junceum* L.). *J. appl. Microbiol.*, 92 (1): 13-21.
- QUATRINI P., SCAGLIONE G., INCANNELLA G., BADALUCCO L., PUGLIA A.M. & LA MANTIA T., 2003b. Microbial inoculants on woody legume to recover a municipal landfill site. *Water Air and soil Pollution*, Focus 3 - Special Issue: 189-199.
- REQUENA N., JIMENEZ I., TORO M. & BAREA J. M., 1997. Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in Mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytol.*, 136: 667-677.
- REQUENA N., PÉREZ-SOLIS E., AZCÓN-AGUILAR C., JEFFRIES P. & BAREA J.M., 2001. Management of plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystem. *Appl. Environ. Microb.*, 67: 495-498.
- RILLIG M.C. & MUMMEY D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.*, 171: 41-53.
- SOMASEGARAN P. & HOBEN H.J., 1985. Methods in Legume-*Rhizobium* Technology NifTAL and Mircen, University of Hawaii. *US Agency for International Development*, Honolulu, Hawaii.
- TAN Z.Y., XU X.D., WANG E.T., GAO J.L., MARTINEZ-ROMERO E. & CHEN W.X., 1997. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47 (3):874-879.
- WEISBURG W., BARNS S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173: 697-703.

ZAKHIA F., JEDER H., DOMERGUE O., WILLEMS A., CLEYET-MAREL J.C., GILLIS M., DREYFUS B. & DE LAJUDIE P., 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Syst. appl. Microbiol.*, 27 (3): 380-395.

Indirizzo degli Autori — S. ZIMBARDO, P. QUATRINI, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Viale delle Scienze Ed.16 - 90128 Palermo (I); T. LA MANTIA, Dipartimento Scienze agrarie e forestali, Viale delle Scienze Ed. 4 - 90128 Palermo (I); autore corrispondente: P. Quatrini, email: paola.quatrini@unipa.it

