

UNIVERSITA' DEL PIEMONTE ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE
TECNOLOGICA**

Corso di Laurea Magistrale in Biologia
Curriculum Agro-Ambientale

Tesi di Laurea

**ANALISI DEGLI EFFETTI DI FUNGHI MICORRIZICI
ARBUSCOLARI SULLO SVILUPPO DI PIANTE DI
OPUNTIA FICUS-INDICA PROPAGATE PER TALEA**

Relatore:

Prof. Guido Lingua

Candidato:

Camilla Marchi

Anno Accademico 2022/2023

PREFAZIONE	3
1. INTRODUZIONE	5
1.1. <i>Opuntia ficus-indica</i>	5
1.1.1. Morfologia cladodi, fiori e frutti	7
1.1.2. Metabolismo fotosintetico CAM	9
1.1.3. Spine e glochidi	11
1.1.5. Mucillagine	13
1.1.6. Apparato radicale	14
1.2. Funghi micorrizici	14
1.2.1. Funghi micorrizici arbuscolari (AMF)	16
1.2.2. Influenza dei AMF sullo sviluppo della pianta ospite	18
1.2.3. Influenza dei AMF sullo sviluppo di <i>Opuntia ficus-indica</i>	20
1.3. Scopo del lavoro	21
2. MATERIALI E METODI	22
2.1. Messa in vaso delle piante di controllo e micorrizzate	22
2.2. Monitoraggio crescita morfologica cladodi	24
2.3. Svaso, ultime misurazioni e prelievo materiale per successive analisi	25
2.4. Concentrazione dei pigmenti fotosintetici	27
2.5. Preparazione e colorazione delle radici per il calcolo dell'indice di micorrizzazione e arbuscolarizzazione	27
2.6. Calcolo dell'indice di micorrizzazione e arbuscolarizzazione	29
2.7. Analisi statistica	31
3. RISULTATI	32
3.1. Osservazioni generali sull'andamento di crescita	32
3.2. Biomassa iniziale	32
3.3. Micorrizzazione delle radici	33
3.4. Tratti morfologici della nuova biomassa	36
3.4.1. Nuovi getti	36
3.4.2. Cladodi	38
3.4.3. Fiori e frutti	40
3.4.4. Valori totali per pianta	41
3.5. Concentrazione dei pigmenti fotosintetici	46
3.6. Percentuale di acqua nella nuova biomassa totale	47
4. DISCUSSIONE	47
CONCLUSIONI	53
ALLEGATI	55
BIBLIOGRAFIA	59

PREFAZIONE

Il mio tirocinio si è svolto all'interno della struttura dell'Università del Piemonte Orientale e rientra in un progetto Internazionale finanziato dall'Unione Europea, il Programma PRIMA.

Il Programma PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean Area) è un'azione euro-mediterranea finanziata per l'Italia dal MUR avente lo scopo di consolidare un partenariato strutturato a lungo termine in materia di ricerca e innovazione nell'area mediterranea. L'obiettivo generale di PRIMA è prevedere soluzioni innovative comuni nel settore dell'approvvigionamento idrico e dei sistemi alimentari, migliorandone l'efficienza e contribuendo così a risolvere i problemi più gravi che attualmente si riscontrano nel settore dell'alimentazione, della salute, del benessere e della migrazione.



Nell'ambito del Programma PRIMA, il progetto “ProSmallAgriMed - Promoting soil fertility, yield and income in smallholder agriculture of semiarid and arid Mediterranean regions by management of beneficial soil microbiota, conservation agriculture and intercropping”, è volto alla messa a punto di sistemi agronomici basati sulla consociazione di colture, cioè la coltivazione contemporanea di diverse specie nello stesso sito, e sull'utilizzo di microrganismi benefici per le piante. L'obiettivo finale è di promuovere la fertilità del suolo e incrementare la

produttività, la qualità dei prodotti e la redditività, soprattutto per i piccoli proprietari terrieri di aree aride e semiaride del Mediterraneo.

Il partenariato internazionale è composto, oltre che dall'Università del Piemonte Orientale, da: Università di Palermo; Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA); Université Badji-Mokhtar Annaba (Algeria); ANVREDET/Projet PLANTAbiotek (Algeria); Tchimbo (Algeria); Supagro - Démarche intégrée pour l'obtention d'aliments de qualité (Francia); Supagro - Marchés, Organisations, Institutions et Stratégies d'Acteurs (MOISA); Qualiplante (Francia); Université Sidi Mohamed Ben Abdellah (Marocco) e Institut National Agronomique de Tunisie (Tunisia).¹

¹ <http://www.ricercainternazionale.miur.it/>

Ministero dell'università e della ricerca, Decreto n. 16307/2021 (GU Serie Generale n.295 del 13-12-2021)

1. INTRODUZIONE

1.1. *Opuntia ficus-indica*

Opuntia ficus-indica, più comunemente detto fico d'india, fico barbaresco (Lahsasni *et al.*, 2002) e nopal cactus, è una pianta succulenta angiosperma dicotiledone (El-Mustafa *et al.*, 2014) appartenente alla famiglia delle Cactaceae (El-Guezzane *et al.*, 2021), della quale ad oggi sono state identificate oltre 2000 specie diverse (Fonseca-Garcia *et al.*, 2016) (Fig. 1).

Il nome *Opuntia*, dato dal botanico francese Joseph Pitton de Tournefort (1656-1708) a un vasto gruppo di cactus tropicali, deriverebbe da Opus, una città situata nell'antico stato della Beocia, in Grecia (DeGraffe, 1896), dove Tournefort avrebbe trovato, nel 1700, una pianta spinosa che gli ricordava le *Opuntiae* americane (Abbas *et al.*, 2022).

Taxonomic Tree

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Caryophyllales

Family: Cactaceae

Genus: *Opuntia*

Species: *Opuntia ficus-indica*

Fig. 1: albero tassonomico dell'*Opuntia ficus-indica* (Bakewell-Stone, 2012)

I cactus, insieme alle agavi e ad altre xerofite, rappresentano le specie chiave negli ecosistemi aridi del continente americano (Fonseca-Garcia *et al.*, 2016).

Originaria del Messico e delle aree semi aride del Sud e Centro America (Shedbalkar *et al.*, 2010), *Opuntia ficus-indica* è stata nel tempo coltivata ed esportata all'estero per le sue grandi proprietà. Circa il 67% delle specie di *Opuntia* è stato addomesticato e viene coltivato in tutto il mondo, soprattutto per il consumo da parte dell'uomo dei suoi frutti (Davis *et al.*, 2019) (Fig. 2).



Fig. 2: campo di *Opuntia ficus-indica* (Inglese e Liguori, 2010)

O. ficus-indica (L.) Mill è la specie di cactus con il più alto grado di domesticazione e la maggiore importanza per l'agricoltura nelle regioni aride e semiaride del mondo intero (Peña-Valdivia *et al.*, 2012).

Oggigiorno è largamente diffusa in America Latina (in particolare Cile e Brasile) (Griffith, 2004), Africa del Nord e del Sud, Australia e bacino Mediterraneo. È proprio quest'ultimo a rappresentare il maggior produttore di piante di *Opuntia*, in particolar modo in Italia, Spagna, Marocco, Egitto e Israele (Kaur *et al.*, 2012). È di gran lunga il cactus con la maggiore importanza in ambito agricolo, dal momento che i suoi cladodi sono utilizzati come foraggio per gli animali e come alimento da parte dell'uomo, e i suoi frutti sono apprezzati in tutto il

mondo (Davis *et al.*, 2019). *O. ficus-indica* è da secoli coltivata e utilizzata in molti ambiti diversi: nella bioremediation di acque reflue (Vila *et al.*, 2003) e phytoremediation di inquinanti ambientali (Shedbalkar *et al.*, 2010); come foraggio per il bestiame; per creare recinzioni naturali tra i campi; per la produzione di un colorante rosso, ottenuto dall'insetto infestante *Dactylopius coccus* (Griffith, 2004); per prevenire l'erosione del suolo; come pianta ornamentale (Shedbalkar *et al.*, 2010); per il consumo alimentare dei cladodi e dei frutti, di cui l'Italia è il più importante produttore nel bacino Mediterraneo (Granata *et al.*, 2006).

Più recentemente, *O. ficus-indica* è stata ampiamente introdotta come parte di progetti forestali ed agroforestali in Paesi in via di sviluppo (Bakewell-Stone, 2012). Una pratica interessante è infatti quella di utilizzare piante di fico d'india in inter-cropping, poiché questo riduce il rischio di erosione del suolo e ne migliora le proprietà fisiche, limitando l'incidenza di malattie e infestazioni da parte di insetti parassiti, incrementa la stabilità del raccolto, la produttività per unità di area e di conseguenza aumenta il ritorno monetario per il produttore (De Silva *et al.*, 2022).

Mentre da un lato ciò ha portato ad un miglioramento dei mezzi di sussistenza, dall'altro ha anche causato problemi ambientali laddove la pianta è diventata invasiva (Bakewell-Stone, 2012). Il grande successo ecologico di *O. ficus-indica* e delle altre specie di *Opuntia* risiede nella loro abilità di conservare l'acqua grazie a particolari caratteristiche descritte di seguito.

1.1.1. *Morfologia cladodi, fiori e frutti*

L'*Opuntia* è un grande cactus segmentato a tronco in grado di raggiungere anche i 7 m di altezza. I cladodi, più comunemente detti pale, ovvero i singoli segmenti piatti che compongono il fusto, sono di colore verde scuro, mentre i cladodi terminali, più giovani, sono sempre di un verde brillante (Bakewell-Stone, 2012). Questi fusti modificati dalla forma appiattita e ovaliforme sono in grado di unirsi gli uni agli altri per formare delle ramificazioni. Un tratto morfologico distintivo dei cactus è la presenza di areole, ovvero l'organo dal quale si formano foglie, spine, gemme e fiori (Horibe, 2020). Queste gemme ascellari inserite nell'epidermide sono distribuite su tutta la superficie di un cladode con uno schema elicoidale (Bakewell-Stone, 2012). Dall'areola di un cladode madre si può generare un cladode figlio, processo che si ripete per ogni generazione (Horibe, 2020) (Fig. 3).

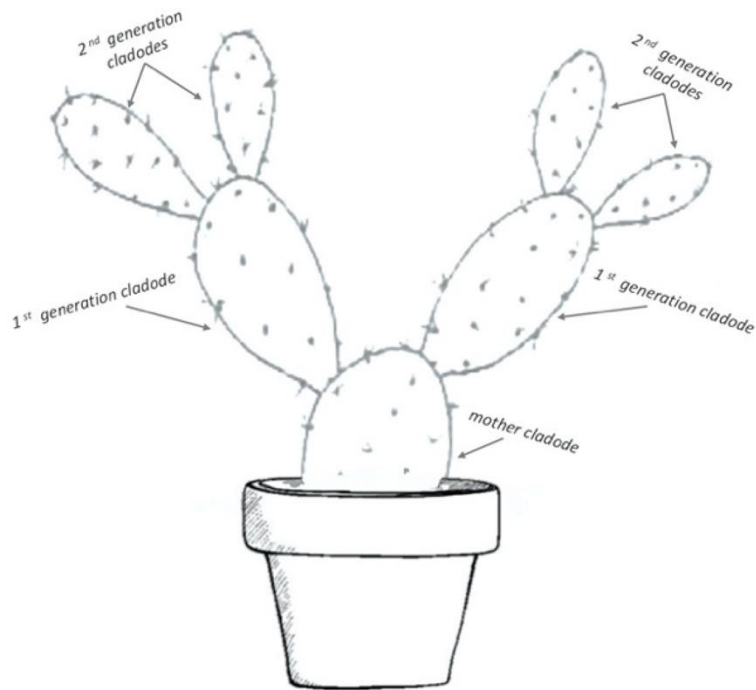


Fig 3: Schema di crescita dei cladodi in *Opuntia ficus-indica* (Hassan et al., 2020)

Così come molte specie di cactus, *O. ficus-indica* è una pianta succulenta e il suo fusto funziona come principale sistema fotosintetico. Per questa ragione vi è l'assenza di foglie, con l'eccezione di alcune foglie primitive ed effimere durante gli stadi giovanili della pianta (Horibe, 2020). I cladodi più vecchi diventano via via più legnosi e l'epidermide verde viene infine sostituita dalla corteccia (periderma). Questi fusti legnosi forniscono il sostegno necessario per dare origine alla forma tipica arbuscolare (Bakewell-Stone, 2012).

Anche una piccola sezione di un cladode può radicare e crescere purché siano presenti almeno due areole. Un frammento di cladode è in grado di sopravvivere per lunghi periodi anche in condizioni estreme, in attesa di umidità e condizioni favorevoli al suo attecchimento (Bakewell-Stone, 2012).

La succulenza è il risultato della presenza di numerosi e grandi vacuoli all'interno delle cellule. Questi sono con molta probabilità un prerequisito fondamentale per l'accumulo di acido malico durante la notte. L'aumento della succulenza tende a ridurre lo spazio di aria interno e di conseguenza anche la superficie delle cellule del mesofillo, contenenti cloroplasti, esposte direttamente a questa aria intracellulare. Questo tratto anatomico riduce l'assorbimento diretto di CO₂ atmosferica, ma migliora l'economia del carbonio durante la decarbossilazione nella

fotosintesi CAM, poiché l'efflusso netto della CO₂ dalla foglia è ridotto al minimo (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017).

Ogni pianta produce in genere frutti di qualità commerciale per 30-40 anni a partire dal terzo anno dopo aver piantato il cladode (Bakewell-Stone, 2012). Sono originati dai fiori, che si formano all'apice dei cladodi e che possono essere gialli o arancioni (Bakewell-Stone, 2012) (Fig. 4A).

Il frutto, che consiste in tre parti ben distinte (buccia, polpa e semi), ha forma cilindrica, è lungo in media tra i 5 e i 10 cm e ha un diametro di circa 4 – 9 cm (Fig. 4B). La polpa costituisce il 60-70% del peso totale del frutto e può contenere fino a 400 semi (Horibe, 2020). Viene consumato per lo più fresco (Medina *et al.*, 2006), ma lo si può trovare anche in una vasta varietà di cibi processati, come marmellate, sciropi, prodotti dolciari e liquori (Horibe, 2020).

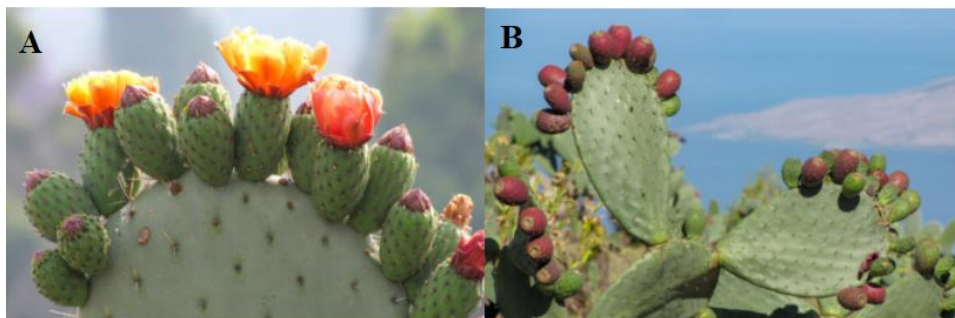


Fig. 4: A) fiori di *O. ficus-indica*; B) frutti di *O. ficus-indica* (Bakewell-Stone, 2012)

1.1.2. *Metabolismo fotosintetico CAM*

Così come le piante succulente appartenenti alla famiglia delle Crassulaceae, anche *Opuntia* utilizza il metabolismo acido delle Crassulacee (CAM) per la fotosintesi (Giraldo-Silva *et al.*, 2023).

Questa strategia biochimica, che consente di fissare l'anidride carbonica durante la notte e di evitare quindi la perdita di acqua durante il giorno, è probabilmente da considerare, insieme ad altri cambiamenti morfologici, come causa del successo di queste piante nelle regioni aride e semi-aride del mondo (Fonseca-Garcia *et al.*, 2016). Questo metabolismo, così come la fotosintesi C₄, rappresenta un'alternativa al pathway di base C₃ per l'assimilazione dell'anidride carbonica che spesso si può riscontrare nelle piante vascolari, specialmente in

quelle associate ai climi più caldi e agli ambienti nei quali vi è carenza di acqua (Winter *et al.*, 2022). Rispetto alle fotosintesi C_3 e C_4 , la fotosintesi CAM si basa sulla separazione temporale dei due metabolismi principali della fotosintesi che avvengono all'interno delle cellule del mesofillo a livello del clorenchima (Winter *et al.*, 2022) (Fig. 5).

Di notte, la CO_2 viene fissata e l'ossalacetato e il malato vengono accumulati nel citosol. Il malato viene in seguito spostato e conservato all'interno dei vacuoli delle cellule del clorenchima. Durante il giorno, la CO_2 è rilasciata e la Rubisco può agire nella stessa maniera che nel metabolismo C_3 , con l'unica eccezione che gli stomi sono chiusi per prevenire la fuoriuscita della CO_2 e del vapore acqueo. Tutto ciò risulta in un incredibile aumento dell'efficienza nell'uso dell'acqua disponibile (Scalisi *et al.*, 2015), riducendo significativamente il costo idrico del guadagno di CO_2 , consentendone l'assorbimento netto durante la notte, quando le forze motrici che causano la perdita di acqua attraverso la traspirazione sono basse (Winter *et al.*, 2008).

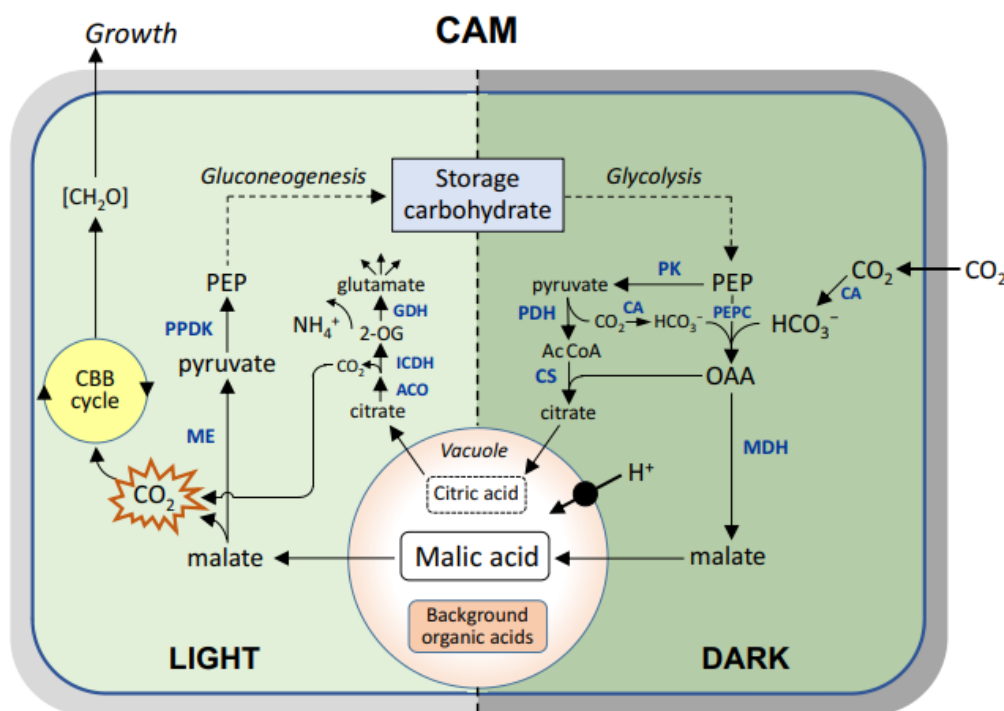


Fig 5: Schema del funzionamento della fotosintesi CAM. Durante la notte, gli stomi aperti permettono l'ingresso di CO_2 , che viene subito convertita in HCO_3^- dall'anidrasi carbonica. Questo viene trasformato in ossalacetato grazie all'azione dell'enzima fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPC) e dell'accettore a tre atomi di carbonio fosfoenolpiruvato (PEP) (derivante dalla scissione glicolitica dei carboidrati di riserva, quali amido e esosi).

L'ossalacetato viene quindi immediatamente ridotto a malato e trasportato all'interno del grande vacuolo centrale (qui rappresentato schematizzato, ma che nelle cellule di mesofillo mature può arrivare ad occupare fino al 90% del volume cellulare). Durante il giorno gli stomi possono rimanere chiusi per ridurre la perdita di acqua per traspirazione. L'acido malico accumulato durante la notte viene rilasciato dal vacuolo e decarbossilato nel citoplasma, con la formazione di CO₂ e PEP. La CO₂ si accumula ed entra nel ciclo di Calvin-Benson, mentre l'accettore a 3C viene riciclato grazie alla gluconogenesi. (Winter *et al.*, 2022)

1.1.3. Spine e glochidi

I cladodi più grandi di solito hanno poche spine di piccole dimensioni (massimo 2.5 cm) oppure ne sono completamente privi (Bakewell-Stone, 2012). I cladodi che ne possiedono presentano un sistema di spine che possono raggiungere anche molti cm di lunghezza. La loro superficie è ricoperta da uno strato di cuticola che la protegge dall'essiccamento. Durante la crescita del cladode, e di conseguenza delle spine, gli strati di cuticola si impilano e si posizionano in maniera circolare, provocando la formazione della tipica forma spinale, sottile all'apice e più larga alla base, vicino al cladode (Malainine *et al.*, 2002). Le spine hanno diverse funzioni: aiutano la dispersione zoocora; offrono una protezione meccanica contro gli erbivori; accumulano la nebbia e la foschia per assorbire l'acqua; riflettono la luce; riducono la perdita di acqua (Horibe, 2020).

Le areole possono presentare o meno spine, peli o setole, ma hanno sempre dei glochidi (Yasser Abbas *et al.*, 2022). È proprio grazie ai glochidi, minute spine setolose, che ricoprono non solo i cladodi ma anche i frutti, che le Cactaceae (e in particolar modo le *Opuntiae*) riescono a raccogliere la rugiada notturna. Nell'immagine seguente (Fig. 6), fotografata in uno studio del 2020 sulla microstruttura dei glochidi su piante di *Opuntia stricta*, sono ben visibili le strutture responsabili di questa capacità adattativa.

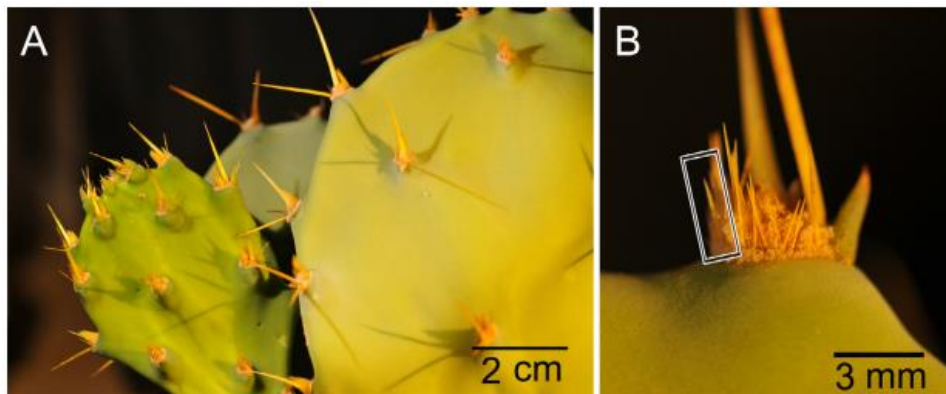


Fig 6: A) Fusto di *Opuntia stricta* avente areole con spine e glochidi; B) Ingrandimento di un'areola con spine e glochidi (un glochidio messo in evidenza dal rettangolo) (Masrahi, 2020)

La loro speciale microstruttura (costituita da una struttura gerarchica e una superficie anisotropa) permette alle gocce d'acqua di nucleare sulla punta della struttura conica del glochidio e sulle punte dei barbighi. Queste gocce iniziano quindi a muoversi verso il basso e unirsi in gocce più grandi. Queste, giunte ai tricomi alla base del glochidio, vengono infine assorbite (Masrahi, 2020). L'immagine che segue ne schematizza il meccanismo (Fig. 7).

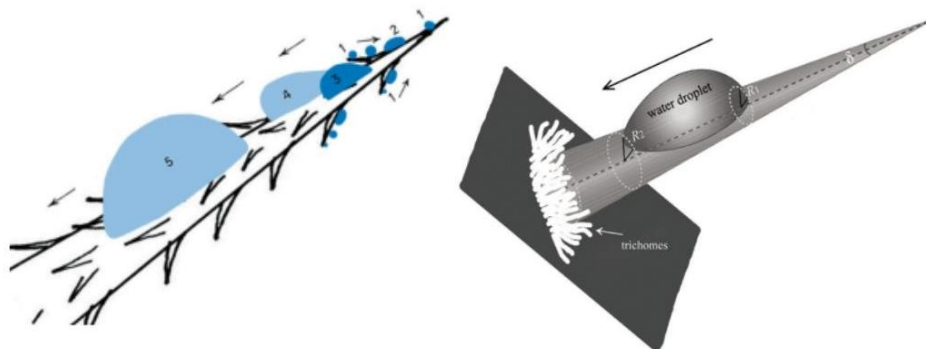


Fig 7: Effetto schematizzato dell'azione di un glochidio su gocce d'acqua (Masrahi, 2020)

1.1.4. Epidermide e cuticola

La maggior parte delle specie di cactus possiede uno strato di epidermide sul lato esterno del clorenchima. Questa epidermide è impermeabile, poiché ricoperta da uno strato di spessa cuticola cerosa, ed è spesso dotata di nervature, che permettono al fusto di espandersi e contrarsi durante l'immagazzinamento e l'utilizzo dell'acqua senza danneggiare i tessuti superficiali. Lo strato di cuticola può variare molto in spessore (Horibe, 2020) influenzando l'abilità di conservare l'acqua e di riflettere l'irradiazione solare, andando di conseguenza a regolare la temperatura del fusto (Nobel, 1999) e quindi la tolleranza della pianta agli ambienti più aridi.

L'epidermide contiene inoltre cristalli di forma e dimensioni diverse, risultato di un eccessivo accumulo di calcio nel suolo e della perdita di acqua per evaporazione. Questi cristalli, per lo più ossalati di calcio, sono fisiologicamente e osmoticamente inattivi, ma possono agire da barriera contro gli insetti, poiché rendono più difficoltosa la masticazione dei tessuti (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017).

1.1.5. *Mucillagine*

I fusti di *Opuntia* contengono una grande quantità di mucillagine, che costituisce approssimativamente il 14% del peso secco dei cladodi (Horibe, 2020). La mucillagine è un polisaccaride complesso, prodotto da cellule specializzate, localizzato sulla parete cellulare, in grado di formare una rete molecolare capace di raccogliere una grande quantità di acqua (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017). Diversi studi hanno dimostrato che i monomeri della catena polisaccaridica di mucillagine in *O. ficus-indica* siano L-arabinosio:D-xilosio in rapporto 2:1, L-ramnosio:galatturonicacidina in concentrazione equimolare e D-galattosio. Inoltre, la frazione di polisaccaridi idrosolubili con proprietà addensanti è costituita essenzialmente da pectine (circa il 50% della composizione della mucillagine) (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017), che in presenza di calcio formano gel (Horibe, 2020). La viscosità della mucillagine aumenta all'aumentare dell'età del cladode, e ciò è attribuibile al fatto che i livelli di calcio aumentano con l'avanzare dell'età della pianta, causando una maggiore formazione di gel da parte della pectina (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017).

Il ruolo fisiologico di questa molecola è quello di regolare sia il contenuto cellulare di acqua durante i periodi di siccità sia i flussi di calcio della pianta (Horibe, 2020). Queste

caratteristiche conferiscono alla pianta un'elevata resistenza alla siccità e alla ritenzione idrica nei tessuti.

1.1.6. *Apparato radicale*

I cactus hanno generalmente un apparato radicale poco profondo che si estende appena sotto la superficie del suolo. Ciò permette di assorbire anche quella poca acqua che occasionalmente inumidisce la superficie dei suoli aridi a seguito di piogge leggere (Horibe, 2020). La temperatura ideale per la crescita delle radici oscilla tra i 27 °C e i 30 °C, mentre basse temperature (-16 °C) possono danneggiare l'apparato radicale e la pianta intera (Jorge *et al.*, 2023). Grazie al sistema radicale poco profondo e formato da radici molto sottili (Fonseca-Garcia *et al.*, 2016), *Opuntia* ha la capacità di estrarre acqua anche dalla rugiada notturna che ricopre la parte superiore del suolo (Hassan *et al.*, 2020). L'allungamento laterale delle radici può essere indotto da pioggia o innaffiamento a seguito di un periodo di carenza d'acqua. Le radici così formate sono dette "rain roots", o più genericamente "radici effimere", dal momento che questa tipologia di radici tende ad avere vita breve. Le radici effimere sono in grado di formarsi in tempi molto brevi (in *O. ficus-indica* 24 ore dopo l'irrigazione) e sono importanti per un rapido aumento della superficie di assorbimento senza un eccessivo aumento di distanza per il trasporto dell'acqua (Dubrovsky e North, 2002).

Grazie a queste caratteristiche le piante di *O. ficus-indica* sono in grado di sopravvivere in aree dove le precipitazioni annue non superano i 200-300 mm (Inglese *et al.*, 2012), nonostante siano richiesti 350 – 500 mm per una crescita ottimale (Bakewell-Stone, 2012).

1.2. *Funghi micorrizici*

Il termine *micorriza* (dal greco "mycos", fungo, e "rhiza", radice) (Parniske, 2008) è stato coniato dal biologo tedesco Albert Bernhard Frank nel 1885, dopo aver osservato che il sistema radicale delle piante superiori era sempre avvolto da un intreccio ifale, per indicare l'associazione simbiotica tra le radici delle piante e i funghi (Frank, 1885).

La micorriza è una forma di simbiosi principalmente mutualistica, per cui i due organismi portano avanti il loro ciclo vitale vivendo a stretto contatto e traendo benefici reciproci. Si stima che circa il 90% delle piante effettuino spontaneamente questa associazione (Smith e Read,

1997) e che siano presenti nell'83% delle dicotiledoni, nel 79% delle monocotiledoni ed in tutte le gimnosperme (Wilcox, 1991).

Le micorrize vengono tradizionalmente classificate in base alle modalità di colonizzazione in: ectomicorrize, endoectomicorrize e endomicorrize (Fig. 8).

Le prime interessano principalmente basidiomiceti e qualche ascomicete e sono molto comuni tra le specie arboree delle foreste temperate (Bagyaraj, 2013), rappresentano meno del 5% delle associazioni micorriziche conosciute nelle piante vascolari ma sono ubiquitarie nelle Pinaceae (LePage *et al.*, 1997). In questa tipologia di simbiosi è possibile osservare un mantello fungino esterno che avvolge gli apici radicali della pianta. Le ife non penetrano mai all'interno delle cellule dell'ospite, ma si ramificano tra le cellule della corteccia radicale formando un intreccio intercellulare (Parniske, 2008). L'associazione micorrizica contribuisce all'assorbimento di sostanze nutritive dal suolo da parte della pianta, protegge le radici dall'invasione di agenti patogeni e decompone la materia organica (Bagyaraj, 2013).

Sulla base di dati molecolari è stato stimato che i funghi ectomicorrizici siano comparsi sulla Terra nel Cretaceo, circa 130 milioni di anni fa (Berbee e Taylor, 1993), mentre il primo fossile rinvenuto risale invece all'Eocene, dimostrando che questa tipologia di associazione era già ben consolidata almeno 50 milioni di anni fa (LePage *et al.*, 1997).

Le ectoendomicorrize rappresentano una forma intermedia tra le ectomicorrize e le endomicorrize.

Le endomicorrize sono decisamente le simbiosi più diffuse e antiche, dal momento che i primi fossili rinvenuti risalgono ad oltre 400 milioni di anni fa (Remy *et al.*, 1994). Tra le endomicorrize si distinguono: le Ericoidi, tra funghi ascomiceti che colonizzano piante appartenenti alle famiglie delle *Ericaceae*, *Empetraceae* e *Epacridaceae*; le micorrize della famiglia delle *Orchidaceae*, piante simbionti obbligate dal momento che in mancanza di infezione da parte del fungo i semi delle orchidee non riescono a sopravvivere; e infine le micorrize arbuscolari che sono le più rappresentative (Bagyaraj, 2013).

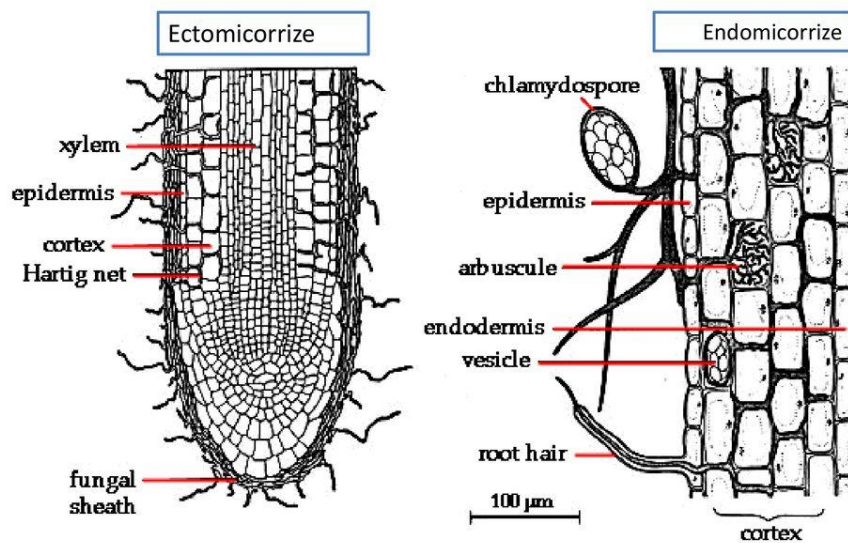


Fig. 8: Schema ectomicorrize e endomicorrize

1.2.1. Funghi micorrizici arbuscolari (AMF)

I funghi micorrizici arbuscolari (AMF) appartengono al phylum dei Glomeromycota e sono in grado di stabilire un'associazione simbiotica con più dell'80% delle specie vegetali conosciute (Jeffries *et al.*, 2003). Questo phylum è presente in quasi tutti i biomi terrestri in associazione con briofite, pteridofite, gimnosperme e angiosperme (Willis *et al.*, 2012). Sono quindi incluse la maggior parte delle colture agricole, delle specie arbuscolari e delle specie arboree di tutti gli ecosistemi, dal tropicale al temperato, dal desertico all'artico (Bagyaraj, 2013).

Nel suolo, i AMF producono delle grandi spore dalla parete spessa, chiamate clamidospore. Queste spore sono in grado di resistere e sopravvivere a condizioni avverse del suolo, in attesa di condizioni favorevoli alla loro germinazione. Al contatto con una radice, i tubi germinali formano una struttura chiamata appressorio che permette l'ingresso dell'ifa nella radice (Bagyaraj, 2013). Bisogna tenere presente che questo differenziamento morfogenetico è possibile solo in presenza di segnali specifici rilasciati dalle radici della pianta ospite (Logi *et al.*, 1998). Una volta all'interno della radice, l'ifa si ramificherà. Le strutture subcellulari che si formano all'interno delle cellule vegetali sono note come "arbuscoli" (dal latino "arbusculum", cespuglio), proprio a causa del loro aspetto a forma di alberello. L'arbuscolo è il sito principale per lo scambio nutritivo tra fungo e pianta (Parniske, 2008) e la sua formazione

inizia in tempi relativamente brevi, a partire da 48 ore dopo che le ife prendono contatto con le radici della pianta ospite (Giovannetti e Citerinesi, 1993). All'interno delle cellule corticali della radice, le ife possono dare origine anche a vescicole, strutture dalla parete molto sottile e dalle forme e dimensioni molto variabili, dentro le quali vi sono delle gocce d'olio. Queste vescicole fungono da organi di riserva per il fungo, qualora la pianta ospite non riuscisse ad apportare abbastanza risorse. È proprio la presenza di arbuscoli e vescicole il criterio per l'identificazione dei funghi micorrizici arbuscolari (Bagyaraj, 2013).

Esistono due tipi distinti di AMF, caratterizzati da modificazioni ifali intraradicali: il tipo Paris, in cui lo sviluppo ifale è esclusivamente intracellulare, formando spire nelle cellule corticali delle piante ospite, dette "coil", e il tipo Arum, in cui lo sviluppo ifale intraradicali è per lo più intercellulare con la formazione di arbuscoli. Tra le due tipologie esistono delle vie intermedie, caratterizzate da ife leggermente raggomitolate dalle quali si sviluppano arbuscoli (Fig. 9) (Willis *et al.*, 2013).

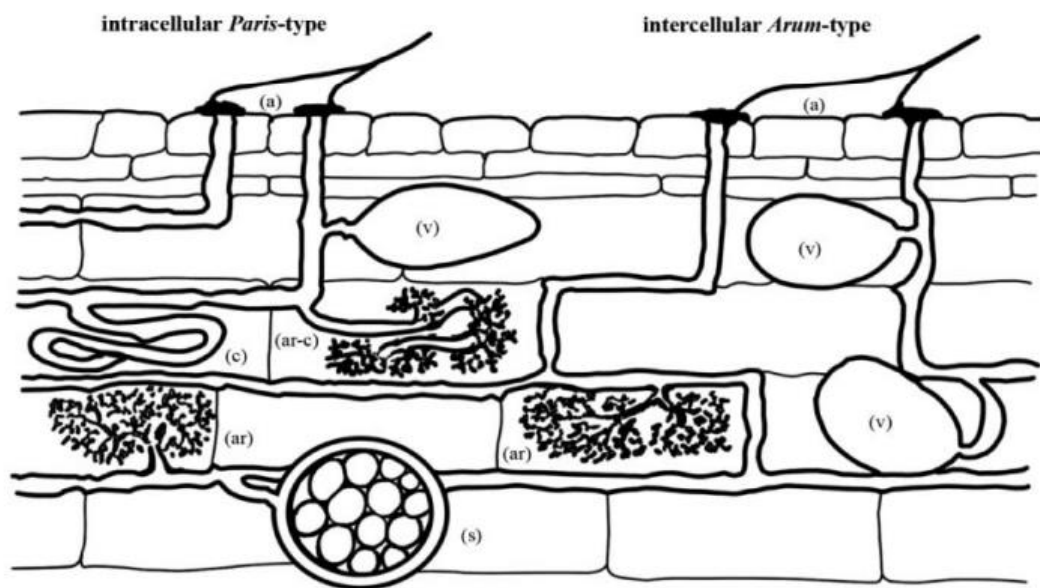


Fig. 9: Schema delle caratteristiche morfologiche dei AMF: (a) appressori; (ar) arbuscoli del tipo Arum; (ar-c) strutture intermedie coil-arbuscolari; (c) coil del tipo Paris, (s) spore intracellulari; (v) vescicole (Willis *et al.*, 2013)

I funghi AM colonizzano sia la pianta che il terreno. Nella rizosfera, questi funghi sviluppano una rete ifale molto vasta che funge da collegamento fondamentale tra il suolo, quindi tra la

riserva di sostanze nutritive, e la pianta (Plenchette *et al.*, 2005). Questa ampia rete ifale riesce ad espandersi ben oltre la superficie raggiunta dalle radici, creando una condizione molto spesso favorevole per la pianta. Inoltre modifica il modello di ramificazione e l'architettura della radice nelle primissime fasi della colonizzazione fungina per aumentare la superficie radicale complessiva (Saha *et al.*, 2014).

Sono innumerevoli i vantaggi che la pianta riceve da questo rapporto simbiotico: grazie all'apparato ifale l'assorbimento da parte della pianta di numerosi nutrienti, tra i quali l'azoto, lo zinco (Cui e Nobel, 1992) e primo fra tutti il fosforo (Gosling *et al.*, 2005) risulta aumentato; la conduttività idraulica delle radici aumenta, causando di conseguenza un aumento dell'*uptake* di acqua (Cui e Nobel, 1992); le ife esterne sono un agente stabilizzante nella formazione e mantenimento della struttura del suolo (Miller e Jastrow, 2000) e mantengono aggregate le particelle di terreno, influenzando positivamente la penetrazione dell'acqua e la stabilità del suolo (Giovannetti e Avio, 2002); le ife agiscono da bioprotettori contro patogeni e stress tossici (Jeffries, 2002) e mediano le risposte della pianta ai fattori di stress, come la siccità, la presenza di metalli pesanti e l'acidificazione del suolo, e permettono l'interazione con gli altri microrganismi del suolo (Finlay, 2004); il fungo produce ormoni della crescita (Remy *et al.*, 1994) cambiando, direttamente o indirettamente, il contenuto nutrizionale dei prodotti delle piante. In questo modo le micorrize possono diventare uno strumento efficace, sostenibile ed economico per aumentare la qualità degli alimenti (Xinhua e Kazuhide, 2007).

In cambio, la pianta fornisce ai AMF i fotosintati [fino al 20% del carbonio totale fissato durante la fotosintesi (Parniske, 2008)] sotto forma di carboidrati o lipidi (Cesaro *et al.*, 2020).

1.2.2. Influenza dei AMF sullo sviluppo della pianta ospite

La simbiosi tra i funghi micorrizici arbuscolari e le piante avviene nelle radici, ma può influenzare l'intera fisiologia dell'ospite (Bona *et al.*, 2016) sia a livello del sistema radicale sia nella parte aerea e quindi su foglie, fiori e frutti (Bona *et al.*, 2014). E' noto che i AMF possono influenzare numerosi aspetti della crescita dell'ospite, sia durante la fase vegetativa che quella riproduttiva (Lu e Koide, 1994).

I AMF aumentano l'assorbimento dei nutrienti, in particolar modo quello del fosforo e di alcuni micronutrienti, soprattutto in terreni dove la disponibilità di queste risorse è scarsa. Inoltre, l'infezione micorrizica può aumentare la conducibilità idrica delle radici e quindi aumentare

l'assorbimento di acqua dal terreno (Cui e Nobel, 1992). Ciò sembra essere dovuto all'aumento del fabbisogno idrico della pianta micorrizzata che, dovendo soddisfare anche il fabbisogno nutrizionale fungino, deve aumentare l'attività fotosintetica. Anch'essa infatti risulta essere stimolata dalla presenza di AMF (Wright *et al.*, 1998). L'infezione fungina può aumentare l'area fogliare totale (Lu e Koide, 1994) massimizzando l'area disponibile per l'assimilazione di CO₂ (Wright *et al.*, 1998).

Sono stati svolti numerosi studi per comprendere i diversi effetti che l'inoculazione di AMF può avere sulla pianta ospite. Possono influenzare le vie metaboliche secondarie, come la sintesi di oli essenziali nelle piante aromatiche o la produzione di metaboliti secondari nelle radici (Lingua *et al.*, 2013), aumentare l'attività fotosintetica e migliorare la qualità dei frutti (Bona *et al.*, 2014). E' noto che un'inoculazione di AMF è in grado di modificare e molto spesso migliorare la crescita delle piante, aumentando la loro resilienza in ambienti poveri di nutrienti e soggetti a siccità. La presenza del fungo micorrizico ha mostrato effetti positivi sulla crescita dei germogli, la massa secca totale, il diametro del collo radicale, la lunghezza radicale totale, il numero di foglie (Hailemariam *et al.*, 2017) e la loro area, nonché l'assimilazione per area fogliare. Più in generale si può quindi spesso parlare di un effetto positivo sulla crescita in biomassa della pianta ospite (Bhirane *et al.*, 2012).

Uno studio su piante di cencio molle (*Abutilon theophrasti* Medic.) ha mostrato come durante la fase riproduttiva l'infezione ha diminuito il tempo necessario per l'inizio della fioritura, aumentato la durata totale della fioritura, la percentuale di fiori che producono frutti e il numero di semi per frutto. I semi prodotti dalle piante micorrizzate erano anche più pesanti e contenevano più N e P (Lu e Koide, 1994).

In piante di fragola (*Fragaria x ananassa*) la presenza di AMF può aumentare la produzione di clorofille (Todeschini *et al.*, 2018), migliorare la resa e la qualità dei frutti, che risultano più grandi e più numerosi (Bona *et al.*, 2015), più ricchi di antociani (Lingua *et al.*, 2013) e con maggiori concentrazioni di rame, potassio e composti fenolici (Castellanos-Morales *et al.*, 2010).

In diverse piante ornamentali sono stati individuati cinque aspetti principali legati all'inoculazione di AMF e conseguenti vantaggi: 1) una migliore nutrizione delle piante, che porta a una riduzione dei costi di concimazione; 2) piante più sane, che richiedono un ridotto uso di pesticidi; 3) un migliore tasso di attecchimento e sopravvivenza al trapianto, che si traduce in una riduzione delle perdite di piante; 4) una crescita più rapida, che porta a un

accorciamento del ciclo di crescita delle colture; 5) un migliore sviluppo vegetativo e un'augmentata fioritura, che portano a un ottimo aspetto commerciale delle piante o una maggiore produzione di fiori recisi (Crişan *et al.*, 2017).

In piante di pomodoro è stato osservato un aumento di diametro delle radici (Cesaro *et al.*, 2020) e un effetto positivo sulla produzione di fiori e frutti, questi ultimi caratterizzati da una maggiore concentrazione di zuccheri, vitamine e acido citrico rispetto alle piante di controllo (Bona *et al.*, 2016).

I AMF hanno anche importanti effetti indiretti sulle piante, poiché sono in grado di alterarne alcuni tratti chiave per l'interazione con gli altri membri della comunità. Questi comprendono sia gli antagonisti, come gli erbivori, sia i mutualisti, come gli impollinatori, che giocano ruoli importanti in agricoltura. Gli insetti erbivori possono avere un profondo impatto sulla resa delle colture, consumando sia i tessuti in superficie sia quelli in profondità, e l'impollinazione degli insetti è necessaria per la produzione di molte colture di frutta e ortaggi. Se le comunità di AMF influiscono sui tratti delle piante che mediano queste interazioni, possono di conseguenza influenzare anche la resa delle colture (Barber *et al.*, 2013).

1.2.3. Influenza dei AMF sullo sviluppo di *Opuntia ficus-indica*

Nelle aree aride e semi-aride, le interazioni tra piante e microrganismi del suolo giocano un ruolo importante nell'indurre la resistenza allo stress da siccità (Birhane *et al.*, 2012) e la produttività delle piante ospiti. Tuttavia, gli studi a riguardo si sono concentrati principalmente sull'effetto dell'inoculazione di AMF su piante C₃ e C₄, mentre studi sul loro impatto su specie vegetali a metabolismo acido crassulaceo (CAM) sono ancora relativamente rari (Kebede *et al.*, 2023).

Molte specie di agave hanno mostrato di ricevere dalla micorrizzazione notevoli benefici per quanto riguarda aspetti nutrizionali, di crescita e di metabolismo. *A. maximiliana* in presenza di AMF ha mostrato un peso fresco fino a 10 volte superiore a quello delle piante di controllo, a causa delle dimensioni fino a 4 volte più grandi (Hernández-Cuevas *et al.*, 2023). In *A. maximiliana*, così come in *A. cupreata*, la micorrizzazione ha causato un aumento in altezza, area fogliare e numero di foglie (Montoya-Martinez *et al.*, 2019). È stato osservato anche un aumento significativo della biomassa secca totale (Trinidad-Cruz *et al.*, 2017), dell'attività

fotosintetica e un mesofillo più sviluppato rispetto alle piante di controllo prive di inoculo (Pimienta-Barrios *et al.*, 2009).

Risultati simili sono stati ottenuti anche da studi svolti su piante di *O. ficus-indica*. La colonizzazione di AMF in questa e altre specie è influenzata da diversi fattori, come l'altitudine, la stagione dell'anno, la qualità del suolo (Kebede *et al.*, 2023) e le sue proprietà fisico-chimiche, il clima, la posizione geografica e l'età della pianta ospite (Neffar *et al.*, 2022). Si è osservato che la crescita, sia della parte aerea che dell'apparato radicale, risulta stimolata dalla presenza del fungo e di conseguenza diversi aspetti morfologici risultano alterati (Kebede *et al.*, 2024). I cladodi appaiono più numerosi, caratterizzati da area, altezza e spessore maggiore rispetto ai cladodi delle piante non micorrizzate (Kebede *et al.*, 2023). La biomassa totale risulta quindi significativamente aumentata, così come la conduzione stomatica, la concentrazione di nutrienti ed enzimi antiossidanti (Lahbouki *et al.*, 2023), la resistenza allo stress idrico (Kebede *et al.*, 2023) e quella contro gli attacchi di insetti (Kebede *et al.*, 2024). In piante di *Opuntia* sotto stress idrico l'inoculazione con AMF ha diminuito in modo significativo la riduzione della crescita causata dalla siccità, aumentando principalmente l'apporto e l'assorbimento dei nutrienti (N, P, K) e la capacità fotosintetica, rafforzando il sistema antiossidante e favorendo l'accumulo di osmoliti (Lahbouki *et al.*, 2023).

1.3. Scopo del lavoro

Il lavoro svolto durante il mio tirocinio rappresenta un esperimento preliminare per testare l'effetto di funghi micorrizici su piante di fico d'India. I funghi utilizzati sono un mix fungino prodotto dall'Università del Piemonte Orientale con spore isolate nel territorio piemontese.

In funzione dei risultati ottenuti, saranno valutati i successivi passi della sperimentazione, anche da parte di altri enti di ricerca in altri Paesi aderenti al progetto. L'obiettivo sarà quello di isolare spore di funghi micorrizici indigeni dei suoli aridi e quindi adattati a quelle condizioni ambientali.

2. MATERIALI E METODI

Il disegno sperimentale ha previsto 32 piante di *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., 1768, delle quali 16 di controllo (C) e 16 micorrizzate (M), in coltura in sabbia di quarzo e terriccio in proporzione 2:1 in vasi da circa 10 L. I cladodi sono stati gentilmente forniti dalla Prof.ssa Giorgia Liguori dell'Università di Palermo.

2.1. Messa in vaso delle piante di controllo e micorrizzate

Nel mese di maggio è stata effettuata la messa in vaso dei 32 cladodi ricevuti dall'Università di Palermo.

Precedentemente, i cladodi sono stati misurati, con una bilancia elettronica e un righello, e sono stati registrati il peso fresco, la lunghezza e la larghezza di ciascun cladode. I cladodi sono stati numerati da 1 a 32 e sono stati distribuiti tra controlli (C) e micorrizzati (M) in modo da avere una biomassa di partenza paragonabile tra i due gruppi di piante (Tabella 1).

Tabella 1: Medie e errori standard delle misure di peso, lunghezza e larghezza dei cladodi selezionati per l'esperimento. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali nella colonna indicano differenze non statisticamente significative ($p \geq 0,05$)

	PESO FRESCO CLADODE (g)	LUNGHEZZA (cm)	LARGHEZZA (cm)
C	752,68 ± 52,08 a	35,19 ± 0,82 a	17,36 ± 0,36 a
M	752,07 ± 50,63 a	34,96 ± 1,21 a	17,81 ± 0,36 a

Si è poi proceduto con la messa in vaso. È stata utilizzata sabbia di quarzo di differente granulometria [spessa con diametro di 4-5 mm (4/5), 2-3 mm (2/3) e fine con diametro 0,6-1mm (fine)].

All'interno di due grandi vaschette di plastica precedentemente ben lavate è stata preparata la mistura di sabbia di quarzo con granulometria fine e terriccio universale VIGOR PLANT RADICOM, in proporzione 2:1. Il terriccio utilizzato presenta le seguenti caratteristiche:

- pH (H₂O) = 6,5 – 7,5
- Conducibilità elettrica (CE) = 0,35 – 0,45 dS/m

e ha la seguente composizione:

- Torbe calibrate 0 – 40 mm (65%)
- Humus di corteccia, ricco in elementi nutritivi utili per favorire un abbondante sviluppo dell'apparato radicale
- EcoFibra, che migliora la crescita delle radici e riduce l'eccessiva ritenzione idrica con una migliore distribuzione dell'acqua
- Fibra di cocco

I vasi in plastica da circa 10 L sono stati allestiti come mostrato nella figura seguente (Fig. 10)

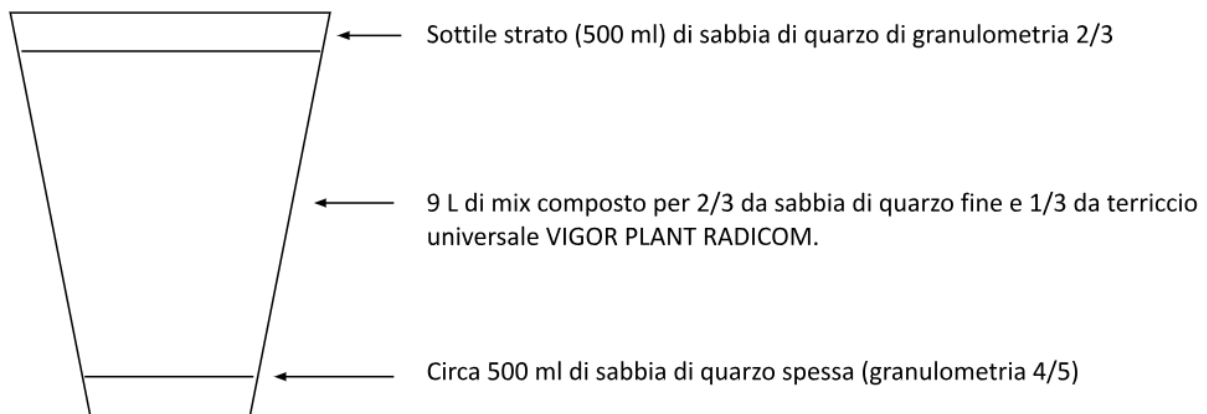


Fig. 10: Linee guida per l'allestimento dei vasi dei cladodi di controllo

Alla base dei vasi sono presenti dei grandi fori laterali e per evitare l'eccessiva fuoriuscita di materiale, questi sono stati parzialmente tappati con granelli di lapillo.

Per le piante micorrizzate (M) sono stati aggiunti 500 ml di inoculo fungino all'altezza della base del cladode. L'inoculo micorrizico utilizzato è stato propagato su piante di sorgo ed è composto da diverse specie di AMF (*Septoglomus viscosum*, *Rhizophagus intraradices*, *R. irregularis*, *R. aggregatum* e *Glomus* sp.).

Ogni pianta è stata bagnata con 450 ml di acqua del rubinetto distribuita uniformemente da entrambi i lati del cladode.

I 32 vasi sono stati posizionati, su due ripiani diversi per piante di controllo e piante micorrizzate all'interno della serra del Dipartimento DISIT (Fig. 11).



Fig. 11: Vasi con i cladodi all'interno della serra del Dipartimento DISIT il giorno della messa in vaso

2.2. Monitoraggio crescita morfologica cladodi

Dalla messa in vaso fino allo svaso, sono state prese le misurazioni delle caratteristiche morfologiche dei cladodi di nuova formazione che nel tempo si sono formati (Fig. 12).

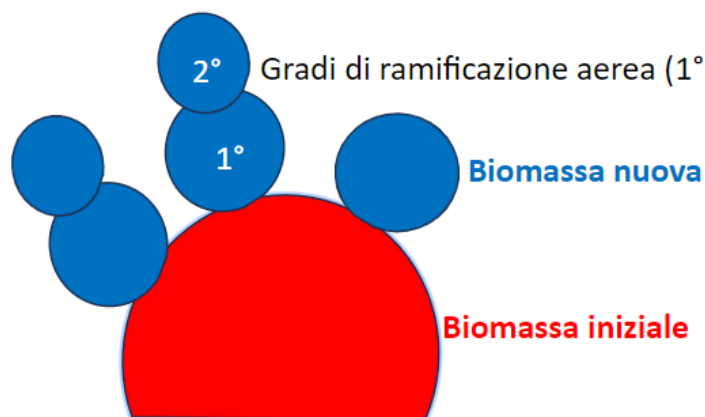


Fig. 12: Schema dello sviluppo di biomassa in piante di *Opuntia ficus-indica*

Le misure sono state effettuate dapprima due volte alla settimana (martedì e venerdì) e dal 18 agosto fino allo svaso del 5 ottobre solamente una volta a settimana (venerdì). Per le misure di lunghezza è stato usato un metro a nastro.

I parametri monitorati, riportati nella figura 13 sono:

- il diametro maggiore in cm (L)
- il diametro minore in cm (W)
- lo spessore, rilevato a circa metà altezza, in cm
- il diametro del collo in cm (D), dal 18 agosto fino allo svaso

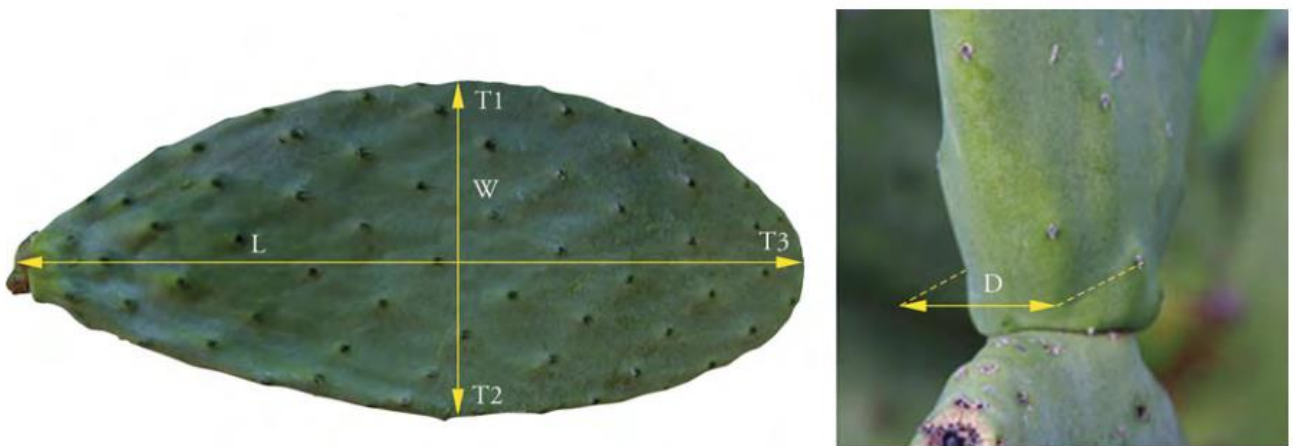


Fig. 13: Parametri biometrici monitorati (Contreras-Murillo et al., 2020)

2.3. Svaso, ultime misurazioni e prelievo materiale per successive analisi

Il 5 ottobre è avvenuto lo svaso (Fig. 14). Delle 32 piante, 4 controlli e 4 micorrizzate sono state lasciate nei vasi e in serra, per valutare la possibilità di mantenere le piante in serra anche nella stagione invernale.



Fig. 14: Vasi con i cladodi all'interno della serra del Dipartimento DISIT il giorno dello svaso

Le restanti 24 piante sono state estratte dalla terra. L'intero apparato radicale è stato prelevato, lavato accuratamente con acqua del rubinetto, asciugato e pesato a fresco. Una parte di apparato radicale, prelevata casualmente, è stata conservata in alcool al 70% all'interno di provette da 50 ml appositamente siglate e datate, per verificare lo stato di colonizzazione radicale da parte dei funghi micorrizici arbuscolari. La parte di apparato radicale restante è stata usata per misurare il peso secco, dopo aver messo le radici in stufa a 60°C per almeno una settimana. Con un taglierino sono stati separati tutti i cladodi figli dal cladode madre e per ognuno sono stati misurati i seguenti parametri:

- il diametro maggiore in cm (L)
- il diametro minore in cm (W)
- lo spessore (cm) nei tre punti indicati come T1, T2 e T3 nella figura 13, che permetteranno di ottenere una media dello spessore totale
- il diametro del collo in cm (D)
- il peso fresco in g
- il peso secco in g

Per ogni pianta è stato selezionato un cladode di prima generazione e ne è stato estratto un campione di circa 1x1 cm, per misurare la concentrazione dei pigmenti fotosintetici; questo campione è stato pesato e conservato in N,N-dimetilformammide (DMF) al buio. Del cladode da cui è stato prelevato il campione per le clorofille è stato quindi misurato il peso fresco

parziale. Tutto il materiale è stato tagliato in pezzi più piccoli e preparato per essere asciugato in stufa per almeno 15 giorni. Il peso secco è stato considerato valido solo quando due pesate dello stesso campione, fatte ad un giorno di distanza, presentavano lo stesso valore (senza perdite di peso dopo 24 ore).

2.4. Concentrazione dei pigmenti fotosintetici

Per il calcolo della concentrazione dei pigmenti fotosintetici sono stati analizzati i campioni prelevati dai cladodi di prima generazione, uno per ogni pianta. Questi campioni da circa 0,6 g l'uno sono stati messi ognuno in una provetta di vetro contenente 2 ml di N,N-dimetilformammide (DMF) al 100% e conservati a 4°C e al buio per almeno 7 giorni, per poter consentire l'estrazione completa dei pigmenti. Gli estratti sono stati poi analizzati con l'ausilio di uno spettrofotometro Cary 3500 Multicell UV-Vis (Agilent Technologies, Mulgrave, Australia) considerando tre diverse lunghezze d'onda di assorbimento: 480 (A₄₈₀) nm, 646.8 (A_{646.8}) nm e 663.8 (A_{663.8}) nm.

Le concentrazioni dei diversi pigmenti, espresse in [g/mg, sono state calcolate secondo le seguenti equazioni di Porra (2002) (per la clorofilla a e b) e Wellburn (1994) (per i carotenoidi):

- Clorofilla a = $12.00 \times A_{663.8} - 3.11 A_{646.8}$
- Clorofilla b = $20.78 \times A_{646.8} - 4.88 \times A_{663.8}$
- Carotenoidi = $(1000 \times A_{480} - 1.12 \times \text{Clorofilla a} - 34.07 \times \text{Clorofilla b}) / 245$

tenendo conto del peso fresco del campione di cladode, del volume di DMF e della diluizione.

2.5. Preparazione e colorazione delle radici per il calcolo dell'indice di micorrizzazione e arbuscolarizzazione

Dall'apparato radicale di ciascuna pianta sono stati prelevati almeno 70 pezzi lunghi 1 cm circa.

I pezzi di radice sono stati immersi in potassa (KOH al 10%) in provette da 10 ml di vetro. Queste sono state scaldate a bagnomaria a 60°C per circa 30 minuti.

Una volta raffreddate abbastanza da poter essere maneggiate, le provette sono state svuotate dalla potassa e i pezzi di radice sono stati sciacquati tre volte con acqua deionizzata.

Il banco da lavoro è allestito come illustrato nella seguente figura 15.



Fig. 15: Allestimento del banco da lavoro per la colorazione delle radici per l'indice di micorrizzazione

I pezzi di radice, dopo essere stati asciugati con carta assorbente, sono stati immersi in blu lattico (blu di metile all'1% in acido lattico) per circa 1 minuto. Dopo aver asciugato l'eccesso di colorante con carta assorbente, le radici sono state passate in un vetrino ad orologio contenente acido lattico e lasciate lì per circa 1 minuto. Asciugato l'eccesso, il passaggio in acido lattico è stato ripetuto altre due volte, nei restanti vetrini ad orologio.

Nella provetta di partenza, lavata e asciugata, sono stati inseriti i pezzi di radice colorati e sono stati interamente immersi in acido lattico. Sono stati lasciati in immersione per almeno un'ora. Il contenuto della provetta è stato quindi versato in un vetrino ad orologio, facendo attenzione a non lasciare nessun pezzo di radice nella provetta. Con l'aiuto di una pinzetta, sono stati sistemati 30 pezzi su un vetrino porta-oggetto, precedentemente siglato, come illustrato nella seguente immagine (Fig. 16):

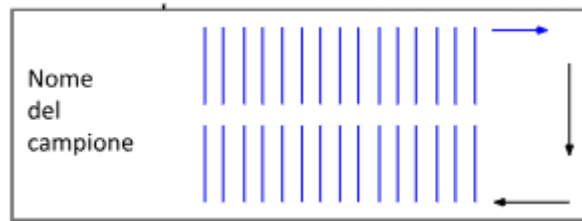


Fig 16: Linee guida per l'allestimento del vetrino per il calcolo dell'indice di micorrizzazione

Dopo aver messo tre gocce di acido lattico sul vetrino porta-oggetto, è stato appoggiato il vetrino copri-oggetto, facendo attenzione che non si formassero bolle d'aria. A questo punto si è schiacciato delicatamente il vetrino copri-oggetto in modo da rendere osservabili i pezzi di radice. L'eccesso di acido lattico è stato eliminato con carta assorbente per non sporcare il piano del microscopio.

Sono state processate le radici sia delle piante di controllo, sia di quelle micorrizzate. I vetrini sono stati osservati al microscopio ottico agli ingrandimenti 4X, 10X e 40X.

2.6. Calcolo dell'indice di micorrizzazione e arbuscolarizzazione

Gli indici di micorrizzazione, arbuscolarizzazione e vescicolarizzazione sono stati calcolati secondo il metodo riportato da Trouvelot et al., (1986) e riassunto di seguito.

Per ogni pezzo di radice analizzato, viene attribuita una classe (da 0 a 5) in base alla stima visiva, effettuata al microscopio, della percentuale di corteccia radicale occupata dalle ife del fungo micorrizico.

Classe:

- 0 assenza di infezione
- 1 tracce di infezione
- 2 meno del 10%
- 3 dall'11% al 50%
- 4 dal 51% al 90%
- 5 oltre il 90%

Contemporaneamente alla valutazione della percentuale di micorrizzazione viene valutata anche la percentuale di arbuscolarizzazione, tenendo in considerazione solamente la zona occupata dal fungo e non la radice intera. Ad ognuno dei 30 pezzi viene assegnata una delle seguenti classi:

- X non ci sono arbuscoli
- A pochi arbuscoli (10%)
- A arbuscoli mediamente abbondanti (50%)
- A arbuscoli molto abbondanti (100%)

Lo stesso procedimento è da eseguire per la valutazione della percentuale di vescicolarizzazione.

Una volta assegnate le classi a ogni radice di tutti i vetrini, si procede con il calcolo della frequenza di micorrizzazione:

$$F\% = 100 (N - n_0) / N$$

dove N è il numero di pezzi di radice leggibili totale analizzati

n_0 è il numero di pezzi di radice di classe 0

Questo valore riflette l'importanza della contaminazione.

L'indice di micorrizzazione viene calcolata applicando la seguente formula:

$$M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1) / N$$

dove n_1 , n_2 , n_3 , n_4 e n_5 sono i numeri di pezzi appartenenti rispettivamente alle classi 1, 2, 3, 4 e 5.

Per il calcolo del grado di arbuscolarizzazione si applica la seguente formula:

$$a\% = (100m_{\underline{\underline{A}}} + 50m_{\underline{A}} + 10mA) / 100$$

dove m_A , $\underline{m_A}$ e $\underline{\underline{m_A}}$ rappresentano le percentuali di micorrizzazione di una determinata classe di arbuscolarizzazione, ottenute mediante l'applicazione della formula:

$$m_A = (95n_{5A} + 70n_{4A} + 30n_{2A} + n_{1A}) \times F / M (n - n_0)$$

dove n_{5A} , ad esempio, è il numero di pezzi di classe di micorrizzazione 5 e di classe di arbuscolarizzazione A generico (A , \underline{A} e $\underline{\underline{A}}$ a seconda dei casi)

F e F%

M è M%

Una volta in possesso dei valori M% e a%, si può ottenere l'indice di arbuscolarizzazione:

$$A\% = a \times M / 100$$

dove a è A%

M è M%

L'intero procedimento per l'ottenimento di A% viene applicato per l'indice di vescicolarizzazione V%.

2.7. *Analisi statistica*

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'utilizzo del software R sui dati raccolti, al fine di verificare la presenza di differenze significative tra piante di controllo (C) e quelle micorrizzate (M). Allo scopo, in un primo momento i dati sono stati testati per la normalità (Shapiro-Wilk) e per l'omogeneità delle varianze (test di Levene). In base ai risultati ottenuti, sono stati successivamente effettuati test a una via, parametrici (ANOVA o t-test di Welch, nel caso di varianze rispettivamente omogenee o no) o non parametrici (Kruskal-Wallis o test di permutazione, nel caso di varianze rispettivamente omogenee o no). Le differenze sono risultate statisticamente significative per valori di $p \leq 0.05$. Le differenze significative sono

state indicate con: i) lettere diverse nei grafici ad istogramma e tabelle e ii) asterischi nei grafici a linee.

3. RISULTATI

3.1. Osservazioni generali sull'andamento di crescita

Durante i quattro mesi e mezzo di esperimento le 32 piante hanno generato nuovi getti. Delle 16 piante di controllo 10 hanno sviluppato solo cladodi, 3 sia cladodi che fiori e frutti e 3 solo fiori e frutti. Delle 16 micorrizzate, invece, 13 hanno sviluppato solo cladodi, 3 sia cladodi che fiori e frutti e nessuna solo fiori o frutti (Fig. 17).

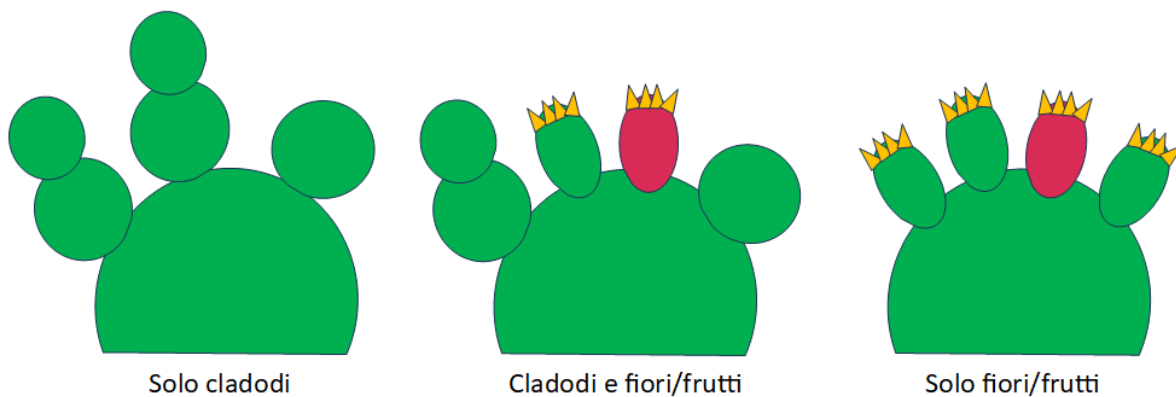


Fig. 17: Schema delle tre tipologie di piante di *Opuntia ficus-indica* osservate durante l'esperimento

Da un punto di vista di nuovi getti (senza distinzione tra cladodi e fiori/frutti) la micorrizzazione non ha suscitato differenze significative (Allegato A1). Nelle piante di controllo si sono sviluppati più fiori e frutti rispetto alle piante inoculate, differenza tuttavia non statisticamente significativa (Allegato A2). Nelle piante micorrizzate invece si è sviluppato un numero significativamente maggiore di cladodi rispetto alle piante di controllo (Allegato A3).

3.2. Biomassa iniziale

Relativamente alla biomassa iniziale, alla fine dell'esperimento non si osservavano differenze statisticamente significative tra micorrizzati e controlli in tutti i parametri analizzati (Tabella 2)

Tabella 2: Medie e relativi errori standard dei parametri della biomassa iniziale di *Opuntia ficus-indica* allo svaso (*T*: spessore cladode madre; *L*: lunghezza cladode madre; *W*: larghezza cladode madre; *D*: diametro al colletto del cladode madre). *C*=piante di controllo, *M*=piante micorrizzate. Lettere uguali nelle colonne indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$).

	<i>T (cm)</i>	<i>L (cm)</i>	<i>W (cm)</i>	<i>D (cm)</i>	<i>PF cladode (g)</i>
<i>C</i>	$1.653 \pm 0.061 a$	$37.758 \pm 1.142 a$	$19.242 \pm 0.974 a$	$3.667 \pm 0.101 a$	$1004.262 \pm 53.497 a$
<i>M</i>	$1.583 \pm 0.075 a$	$30.567 \pm 3.930 a$	$16.792 \pm 1.394 a$	$3.691 \pm 0.161 a$	$986.389 \pm 71.775 a$
	<i>PS cladode (g)</i>	<i>PS radici (g)</i>	<i>Grado di ramificazione</i>	<i>% acqua cladode</i>	<i>% acqua radici</i>
<i>C</i>	$66.178 \pm 4.101 a$	$6.062 \pm 0.384 a$	$1.417 \pm 0.149 a$	$93.382 \pm 0.253 a$	$62.848 \pm 2.087 a$
<i>M</i>	$62.411 \pm 4.571 a$	$6.226 \pm 0.243 a$	$1.883 \pm 0.112 a$	$93.656 \pm 0.127 a$	$60.345 \pm 4.503 a$

3.3. Micorrizzazione delle radici

Nelle immagini seguenti si riporta l'osservazione microscopica di alcuni schiacciati di radice per la valutazione della micorrizzazione. Le radici appaiono sottili e ricoperte di peli radicali molto lunghi e spessi (Fig. 18A e 18B). Anche nelle piante di controllo sono state riscontrate ife fungine (Fig.18C).

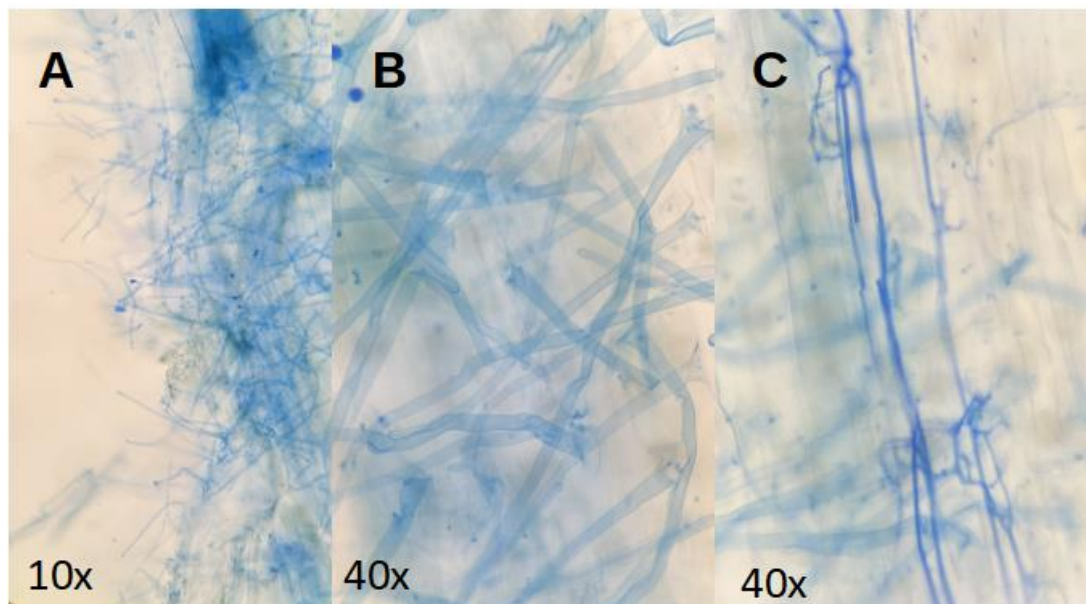


Fig. 18: Schiacciati radicali di campioni di controllo di Opuntia ficus-indica al microscopio ottico. A) peli radicali ingrandimento 10x; B) peli radicali ingrandimento 40x; C) ife fungine, ingrandimento 40x

Nelle piante micorrizzate, sono stati riscontrati ife, arbuscoli e coil (Fig. 19). I risultati della valutazione microscopica hanno mostrato una scarsa colonizzazione da parte del fungo (Tabella 3). Le piante micorrizzate sono risultate essere lievemente più colonizzate dei campioni di controllo, soprattutto nel caso degli arbuscoli, non mostrando tuttavia differenze significative in nessuno dei parametri analizzati.

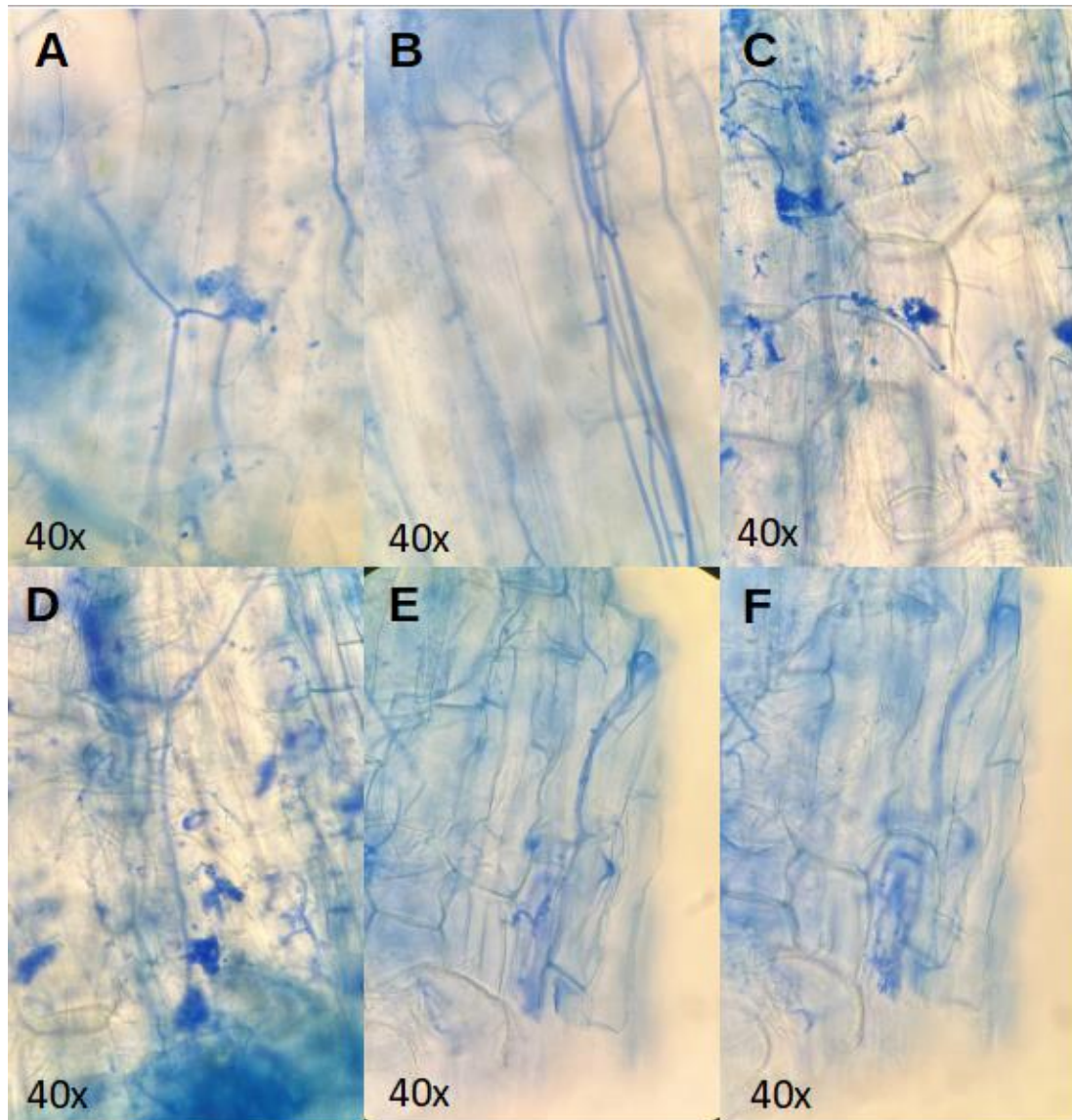


Fig. 19: Schiacciati radicali di campioni micorrizzati di Opuntia ficus-indica al microscopio ottico, ingrandimento 40x. A) arbuscolo; B) ife fungine; C) e D) ife e arbuscoli; E) e F) ifa formante coil a diversa messa a fuoco

Tabella 3: Medie e relativi errori standard delle misure dei parametri di frequenza di micorrizzazione (F%), indice di micorrizzazione (M%) e arbuscolarizzazione (A%) dei campioni di controllo e micorrizzati. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali nella colonna indicano differenze non statisticamente significative ($p \geq 0,05$)

	F%	M%	A%
C	43,8 ± 6,8 a	1,9 ± 0,3 a	0,03 ± 0,01 a
M	44,0 ± 10,5 a	1,9 ± 0,6 a	0,08 ± 0,04 a

3.4. Tratti morfologici della nuova biomassa

Dopo aver coltivato i cladodi madre in serra per circa cinque mesi abbiamo misurato e analizzato gli effetti principali dei funghi micorrizici arbuscolari sui tratti morfologici della biomassa di nuova formazione.

3.4.1. Nuovi getti

Mediamente ogni nuovo getto risultava essere significativamente più spesso nei controlli (Fig. 20), ma più lungo nei micorrizzati (Fig. 21). Anche la polpa dei frutti era in media significativamente maggiore nei controlli rispetto ai micorrizzati (Fig. 22). Per quanto riguarda gli altri parametri analizzati l'inoculo non ha suscitato differenze statisticamente significative tra controlli e micorrizzati (Tabella 4).

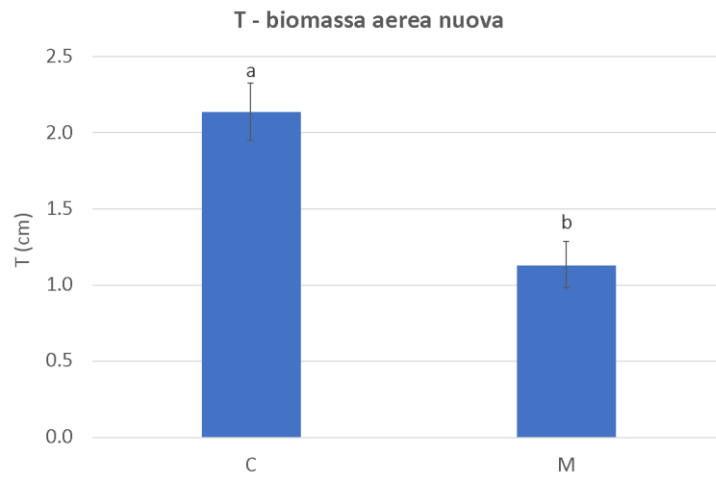


Fig. 20: Effetti di AMF sullo spessore medio dei nuovi getti in piante di *O. ficus-indica*. *C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$)*

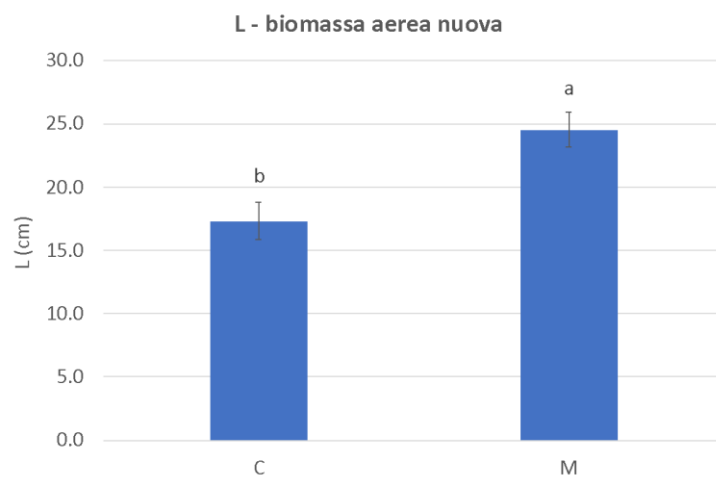


Fig. 21: Effetti di AMF sulla lunghezza media dei nuovi getti in piante di *O. ficus-indica*. *C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$)*

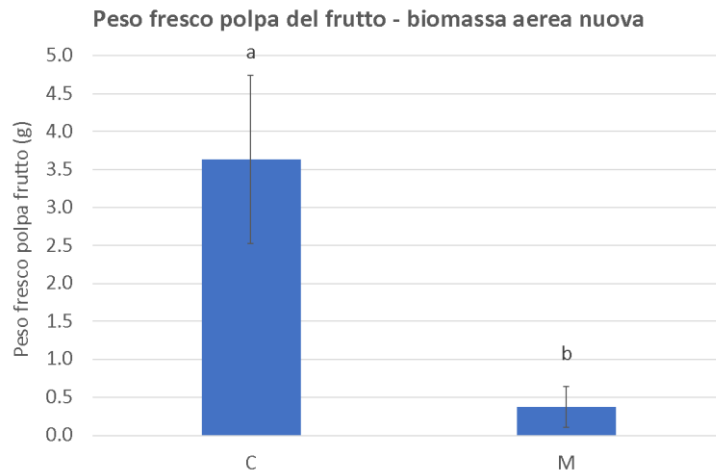


Fig. 22: Effetti di AMF sul peso fresco medio della polpa del frutto in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

Tabella 4: Medie e relativi errori standard dei parametri misurati sulla biomassa di nuova formazione in piante di *Opuntia ficus-indica*. (W: larghezza nuovo getto; D: diametro al colletto del nuovo getto; PF: peso fresco; PS: peso secco). C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali nelle colonne indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

	W (cm)	D (cm)	PF getto (g)	PS getto (g)	% acqua getto
C	6.009 ± 0.505 a	1.713 ± 0.064 a	107.994 ± 13.645 a	7.681 ± 0.738 a	91.651 ± 0.474 a
M	7.010 ± 0.503 a	1.748 ± 0.070 a	118.496 ± 13.789 a	7.493 ± 0.682 a	92.239 ± 0.349 a

3.4.2. Cladodi

Tenendo in considerazione solo i cladodi, i controlli avevano cladodi mediamente più spessi (Fig. 23) e di conseguenza questo dato risultava in un peso secco medio del cladode significativamente maggiore rispetto ai micorrizzati (Fig. 24). Per quanto riguarda gli altri parametri analizzati l'inoculo non ha suscitato differenze statisticamente significative tra controlli e micorrizzati (Tabella 5).

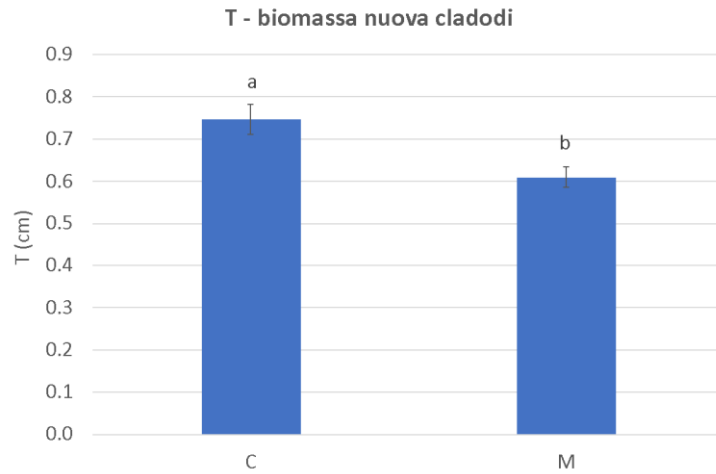


Fig. 23: Effetti di AMF sullo spessore medio dei cladodi in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

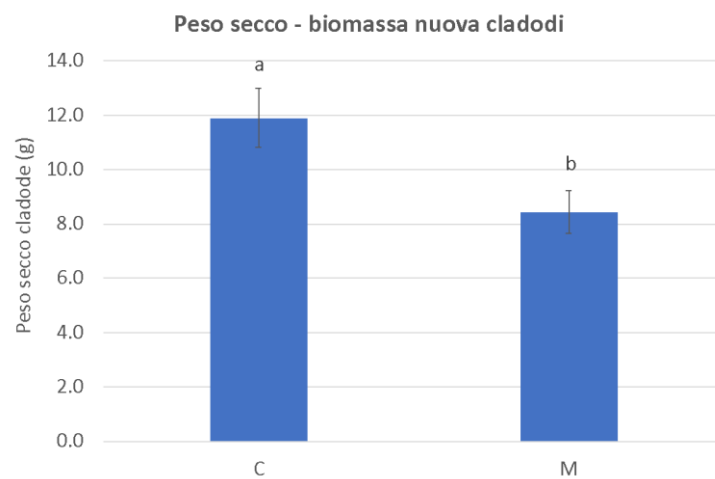


Fig. 24: Effetti di AMF sul peso secco medio dei cladodi in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

Tabella 5: Medie e relativi errori standard dei parametri misurati sui cladodi di nuova formazione in piante di *Opuntia ficus-indica*. (*L*: lunghezza cladode; *W*: larghezza cladode; *D*: diametro al colletto del cladode; *PF*: peso fresco). *C*=piante di controllo, *M*=piante micorrizzate. Lettere uguali nelle colonne indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

	<i>L (cm)</i>	<i>W (cm)</i>	<i>D (cm)</i>	<i>PF cladode (g)</i>	<i>% acqua cladode</i>
<i>C</i>	27,463 ± 1,709 a	9,353 ± 0,611 a	2,000 ± 0,103 a	183,391 ± 22,369 a	92,628 ± 0,469 a
<i>M</i>	28,332 ± 1,086 a	7,929 ± 0,542 a	1,850 ± 0,079 a	136,428 ± 16,180 a	92,336 ± 0,407 a

3.4.3. Fiori e frutti

Considerando solo le piante con fiori o frutti, non abbiamo osservato differenze significative nei valori medi tra piante di controllo e micorrizzate (Tabella 6). Anche se non in modo statisticamente significativo è stato osservato un maggiore peso fresco della polpa dei frutti nelle piante di controllo, che risultavano in generale più maturi (Fig. 25).

Tabella 5: Medie e relativi errori standard dei parametri misurati sui fiori/frutti di nuova formazione in piante di *Opuntia ficus-indica*. (*T*: spessore; *L*: lunghezza; *W*: larghezza; *D*: diametro al colletto, *PF*: peso fresco; *PS*: peso secco). *C*=piante di controllo, *M*=piante micorrizzate. Lettere uguali nelle colonne indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

	<i>T (cm)</i>	<i>L (cm)</i>	<i>W (cm)</i>	<i>D (cm)</i>
<i>C</i>	3,159 ± 0,086 a	9,958 ± 0,256 a	3,565 ± 0,124 a	1,504 ± 0,052 a
<i>M</i>	3,113 ± 0,153 a	10,150 ± 0,344 a	3,520 ± 0,198 a	1,360 ± 0,058 a
	<i>PF fiori/frutti (g)</i>	<i>PS fiori/frutti (g)</i>	<i>PF polpa frutti (g)</i>	<i>% acqua fiori/frutti</i>

<i>C</i>	$52,897 \pm 4,038 a$	$4,593 \pm 0,377 a$	$6,296 \pm 1,752 a$	$90,937 \pm 0,721 a$
<i>M</i>	$50,355 \pm 4,986 a$	$3,877 \pm 0,302 a$	$1,796 \pm 1,796 a$	$91,872 \pm 0,663 a$



Fig. 25: Sezione longitudinale di un frutto di una pianta di controllo di *O. ficus indica*

3.4.4. Valori totali per pianta

Andando a sommare tutta la nuova biomassa pianta per pianta, abbiamo ottenuto il valore totale di nuova biomassa per ogni pianta. E' risultato che le piante inoculate con AMF presentavano una biomassa aerea totale maggiore, sia a fresco che a secco (Figg. 26 e 27) mentre i controlli avevano un peso secco e fresco di fiori, frutti e polpa superiore ai micorrizzati (Figg. 28, 29, 30, 31 e 32). Si tratta tuttavia di differenze non statisticamente significative. Tenendo in considerazione i cladodi, invece, quelli delle piante micorrizzate possedevano un peso fresco totale significativamente maggiore rispetto ai controlli (Fig. 33). Anche il peso secco dei cladodi era superiore nelle piante micorrizzate, ma la differenza non era statisticamente significativa (Fig. 34).

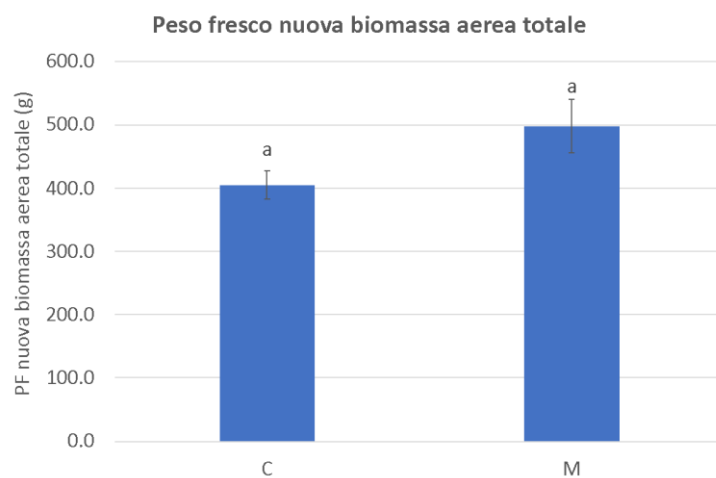


Fig. 26: Effetto di AMF sul peso fresco della nuova biomassa aerea totale in piante di O. ficus-indica. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

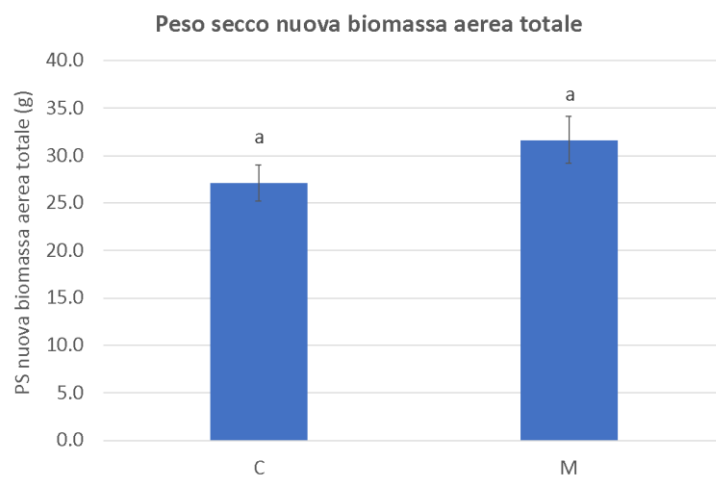


Fig. 27: Effetto di AMF sul peso secco della nuova biomassa aerea totale in piante di O. ficus-indica. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

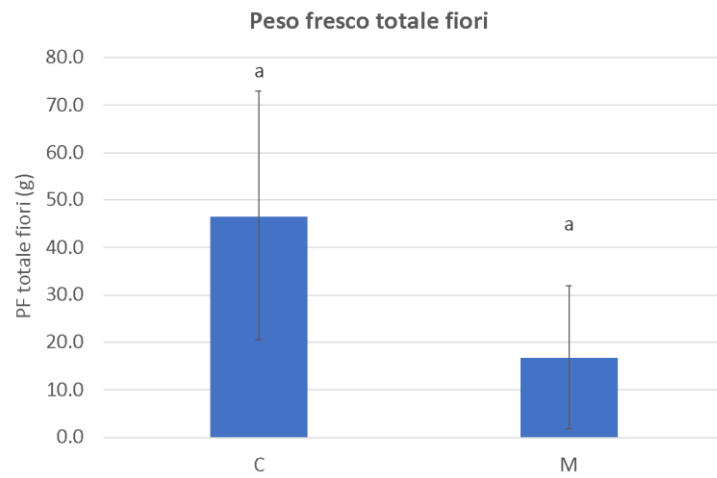


Fig. 28: Effetto di AMF sul peso fresco totale dei fiori in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

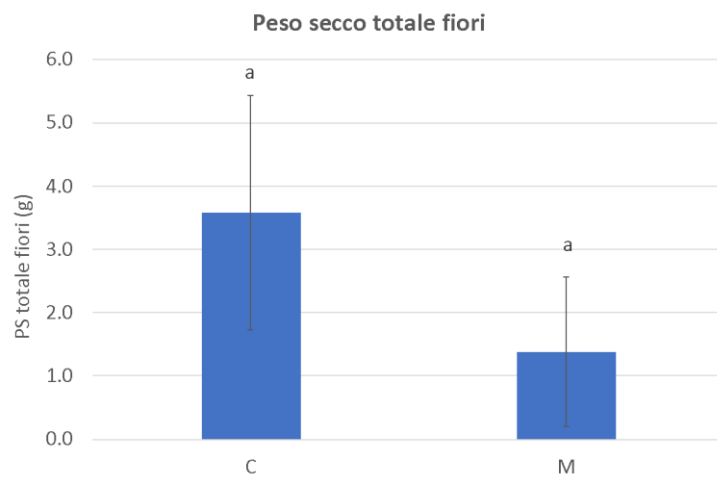


Fig. 29: Effetto di AMF sul peso secco totale dei fiori in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

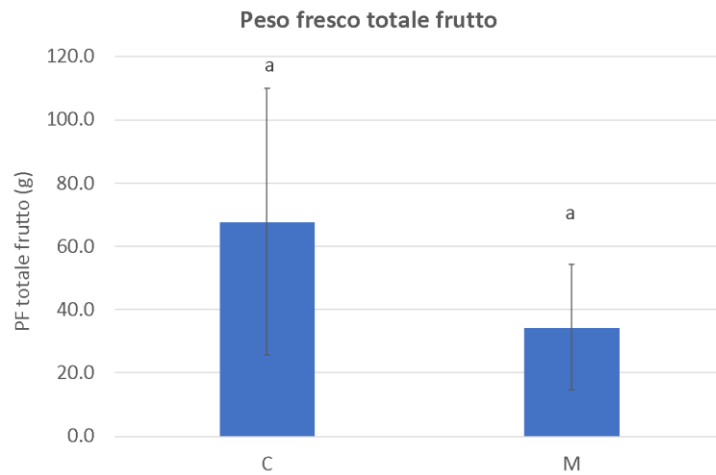


Fig. 30: Effetto di AMF sul peso fresco totale dei frutti in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

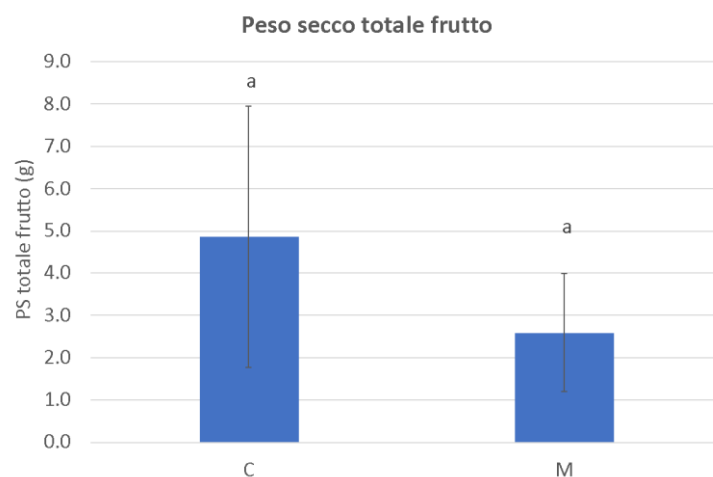


Fig. 31: Effetto di AMF sul peso secco totale dei frutti in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

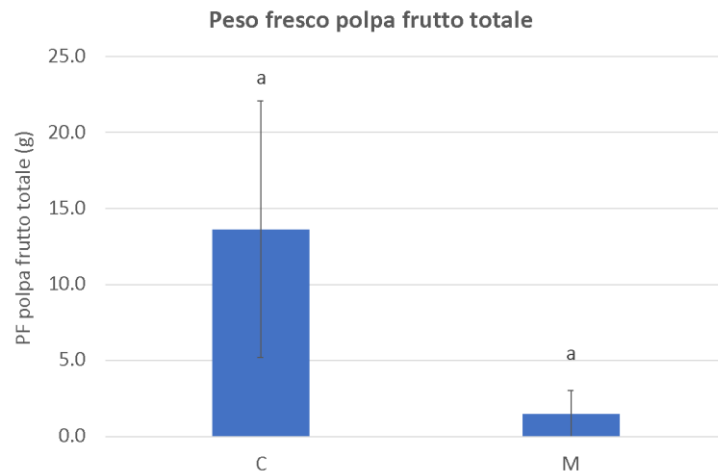


Fig. 32: Effetto di AMF sul peso fresco totale della polpa dei frutti in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

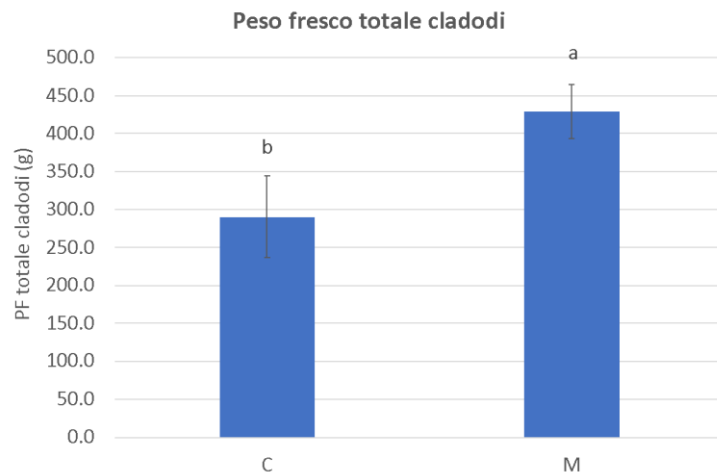


Fig. 33: Effetto di AMF sul peso fresco totale dei cladodi in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

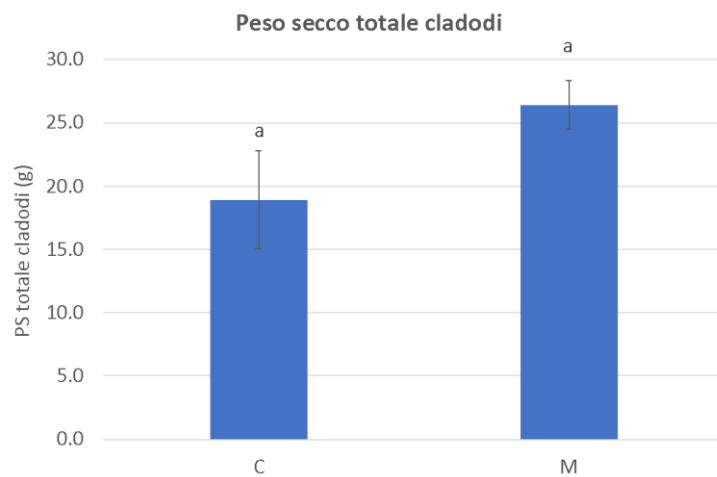


Fig. 34: Effetto di AMF sul peso secco totale dei cladodi in piante di *O. ficus-indica*. C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali indicano differenze non statisticamente significative ($p > 0,05$)

3.5. Concentrazione dei pigmenti fotosintetici

Il calcolo della concentrazione dei pigmenti fotosintetici nei cladodi di prima generazione ha mostrato un leggero aumento della concentrazione di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi nelle piante micorrizzate rispetto alle piante di controllo, differenze tuttavia non statisticamente significative (Tabella 3).

Tabella 3: Concentrazioni (medie \pm errori standard) dei pigmenti fotosintetici in piante di controllo e micorrizzate di O. ficus-indica. (Cha: clorofilla a; Chb: clorofilla b; CxC: carotenoidi; Cha/Chb: rapporto tra clorofilla a e clorofilla b). C=piante di controllo, M=piante micorrizzate. Lettere uguali nelle colonne indicano differenze non statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

	<i>Cha</i>	<i>Chb</i>	<i>CxC</i>	<i>Cha/Chb</i>
<i>C</i>	38,11 \pm 2,68 <i>a</i>	12,35 \pm 1,02 <i>a</i>	8,85 \pm 0,63 <i>a</i>	3,11 \pm 0,10 <i>a</i>
<i>M</i>	41,14 \pm 3,77 <i>a</i>	14,07 \pm 1,09 <i>a</i>	10,30 \pm 0,98 <i>a</i>	2,90 \pm 0,07 <i>a</i>

3.6. Percentuale di acqua nella nuova biomassa totale

La percentuale di acqua calcolata sul peso fresco è stata ottenuta applicando la formula:

$$\frac{\text{peso fresco} - \text{peso secco}}{\text{peso fresco}} \times 100$$

a ciascuna pianta, considerando separatamente i cladodi, i fiori e i frutti. È risultato che in tutta la biomassa aerea la percentuale di acqua era molto elevata, superiore al 90% (dati non mostrati), e non significativamente influenzata dalla presenza dei AMF.

4. DISCUSSIONE

Nelle regioni aride e semiaride del pianeta la crescente siccità e l'impovertimento dei suoli agricoli sono uno dei principali problemi, in grado di influenzare negativamente la crescita delle piante e portare ad una perdita del raccolto (Lahbouki *et al.*, 2023).

L'ipotesi di una consociazione di colture, cioè la coltivazione contemporanea di diverse specie nello stesso sito e soprattutto l'utilizzo di microrganismi benefici per le piante potrebbe promuovere la fertilità del suolo e incrementare la produttività, la qualità dei prodotti e la redditività. L'*Opuntia ficus-indica* (fico d'India) potrebbe rappresentare un buon candidato per l'inter-cropping con altre specie vegetali alimentari, quali cereali e leguminose.

A questo scopo è stato studiato l'effetto che un inoculo di funghi, in grado di allacciare una simbiosi mutualistica con le radici delle piante, ha sulla crescita e sullo sviluppo del fico d'India.

O. ficus-indica è una specie in grado di sviluppare relazioni endomicorriziche con funghi micorrizici arbuscolari che coinvolgono diverse strutture (spore, ife, arbuscoli, vescicole, etc.) durante tutte le stagioni dell'anno (Neffar *et al.*, 2022), sia in habitat naturale che in serra (Montiel e Olivares, 1998). Originaria del Messico e ampiamente diffusa in regioni aride e tipicamente povere (Shedbalkar *et al.*, 2010), deve mantenere sempre un alto tasso di micorrizzazione per garantire le migliori prestazioni fisiologiche, in particolare durante le stagioni caratterizzate da condizioni climatiche rigide, come l'estate (Neffar *et al.*, 2015). In genere, le piante perenni tipiche delle zone desertiche possiedono un sistema radicale composto da radici spesse e poco ramificate e tendono ad essere più micorrizzate delle specie annuali, caratterizzate invece da radici più sottili e molto ramificate (Pimienta-Barrios *et al.*, 2002). Questo perché le piante perenni, a crescita più lenta, saranno sicuramente soggette a molti episodi di siccità, durante i quali la simbiosi può avere un ruolo fondamentale per la sopravvivenza della pianta (Collier *et al.*, 2003).

In questo esperimento, dopo poco meno di cinque mesi dalla micorrizzazione, le radici delle piante inoculate con il mix fungino hanno mostrato un indice di micorrizzazione e di arbuscolarizzazione leggermente maggiore di quello delle piante di controllo. Tuttavia, si tratta di indici molto bassi se confrontati con quelli ottenuti su altre specie vegetali, e non statisticamente significativi. Uno studio di Copetta *et al.* (2020) su piante di melone ha

osservato dopo lo stesso lasso di tempo una micorrizzazione di circa il 10%, accompagnato da un'arbuscolarizzazione di circa il 6%, dati molto superiori rispetto a quelli osservati in questo studio. Inoltre, la presente sperimentazione è stata condotta utilizzando terriccio non sterile e quindi la presenza di funghi risultava essere molto probabile. La bassa interazione tra radice e fungo riscontrata in questo esperimento, condotto in vaso, è coerente con quanto precedentemente osservato da Cui e Nobel (1992). Nel loro studio, piante di *O. ficus-indica* coltivate in serra e inoculate con AMF hanno mostrato una bassa infezione delle radici laterali. Ciò può essere spiegato dall'elevata quantità di peli radicali presenti, molto lunghi e spessi. Questa caratteristica, tipica di molte specie di cactus, è un adattamento allo stress da siccità, per aumentare l'area di assorbimento di acqua e nutrienti (Dubrovsky e North, 2002). Inoltre, la simbiosi tra pianta e AMF promuove la loro formazione e crescita influenzando la sintesi e l'accumulo di auxina (Lahbouki *et al.*, 2023), ormone che, insieme all'etilene, è un regolatore positivo dello sviluppo di peli radicali (Pitts *et al.*, 1998). Tuttavia la prolifica formazione di radici può portare a una bassa infezione per *O. ficus-indica*, come è stato riportato anche per altre specie (Brundrett, 1991). Nonostante la bassa micorrizzazione abbiamo comunque osservato un effetto dell'inoculo. Sebbene non ci fossero differenze statisticamente significative, nei micorrizzati abbiamo trovato più facilmente arbuscoli rispetto ai controlli. Ciò può essere un indice del fatto che probabilmente vi era una simbiosi più attiva nelle piante dove abbiamo inserito l'inoculo, rispetto alle piante di controllo dove vi erano solamente i funghi presenti nel terriccio utilizzato.

Diversi studi hanno invece ottenuto degli alti livelli di micorrizzazione con *O. ficus-indica*. Kebede *et al.* (2023) hanno ottenuto indici di micorrizzazione e arbuscolarizzazione molto superiori a quelli ottenuti nel nostro esperimento (rispettivamente 67% e 33% circa) in piante sottoposte a stress idrico. Nello studio di Neffar *et al.* (2022) si è osservato il mutare della colonizzazione radicale durante tutto l'anno. Il picco di frequenza è stato ottenuto in estate (F% = 92%), dato non influenzato significativamente dal cambio di stagione, mentre M% è risultato più basso, mai superiore al 24%. Va tuttavia sottolineato che questi studi sono stati condotti in pieno campo e quindi in condizioni meno limitanti rispetto a quanto avviene nel presente studio, che è stato condotto in vaso e in serra..

Le differenze osservate tra i diversi gradi di micorrizzazione possono essere spiegati da diversi fattori, quali le condizioni e la durata degli esperimenti, l'origine dell'inoculo, le specie di AMF impiegate e la loro affinità con la pianta ospite (Neffar *et al.*, 2022). Hetrick e Bloom (1986)

hanno studiato l'influenza di diverse specie di piante sulla produzione di spore fungine e sulla colonizzazione delle radici. Tra le piante da loro analizzate vi sono la calendula (*Calendula officinalis*), il trifoglio (*Trifolium pratense*), il sorgo (*Sorghum vulgare*), il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) e l'asparago (*Asparagus officinalis*). Dai loro risultati si può evincere che potrebbero esserci diversi livelli di affinità tra pianta ospite e fungo, indipendentemente dalla quantità di spore inoculate.

È stato osservato che anche la disponibilità di acqua nel terreno influisce molto sulla colonizzazione delle radici e i risultati maggiori si ottengono quando questa è intorno al 30% (Kebede *et al.*, 2023; Lahbouki *et al.*, 2023). In piante di *Boswellia* un'irrigazione con acqua pulsata ha migliorato le prestazioni delle piante micorrizzate rispetto all'irrigazione regolare, effetto che si è rafforzato nel tempo (Birhane *et al.*, 2012). Questo contrasto evidenzia il ruolo essenziale della simbiosi micorrizica in caso di disponibilità idrica imprevedibile, tipica delle zone di maggior diffusione delle Cactaceae.

I bassi livelli di colonizzazione potrebbero inoltre dipendere dalla disponibilità di nutrienti nel terreno. Basse quantità di P e N nel suolo inducono nella pianta uno stato fisiologico favorevole per la simbiosi con AMF e, di conseguenza, un'alta disponibilità degli stessi elementi influisce negativamente sulla sua formazione (Bonneau *et al.*, 2013). Durante le prime fasi la crescita è solitamente esponenziale, per cui le piante fanno riferimento alla micorrizzazione per integrare il loro fabbisogno nutrizionale (Neffar *et al.*, 2015). Il terriccio utilizzato in questo studio è di tipo nutritivo completo. Durante il corso dell'esperimento non sono stati aggiunti nutrienti, ma non si può escludere che la disponibilità iniziale di P e N non abbia influito sulla colonizzazione.

L'impatto della colonizzazione AM è stato valutato confrontando vari aspetti delle piante micorrizzate (M) e non micorrizzate (C). Nel presente esperimento non sono state osservate molte differenze significative tra piante micorrizzate e piante di controllo per quanto riguarda la crescita in biomassa. Relativamente ai nuovi getti, i micorrizzati presentavano un numero significativamente superiore di cladodi rispetto ai controlli. In questi ultimi, i nuovi getti risultavano in media significativamente più spessi e meno lunghi rispetto ai micorrizzati. Ciò è spiegabile dal fatto che nei controlli si sono sviluppati più fiori rispetto alle piante inoculate, dove al contrario vi erano significativamente più cladodi. Inoltre, i frutti nelle piante di controllo avevano raggiunto uno stato di maturazione superiore rispetto a quelli delle piante micorrizzate, risultando in un peso fresco della polpa del frutto significativamente maggiore.

Una comunicazione orale con l'Università di Palermo ha confermato l'osservazione di risultati simili in una sperimentazione effettuata con le stesse modalità su cladodi madre di stessa origine di questo esperimento. Generalmente, le piante iniziano la crescita riproduttiva dopo un certo periodo di crescita vegetativa, segnando quindi l'inizio della fioritura. Si tratta di un passaggio fondamentale per lo sviluppo della pianta, di norma regolato autonomamente o da fattori ambientali (Wada e Takeno, 2010). È noto però che la fioritura può essere indotta anche dallo stress. In questo caso può essere considerata l'ultima adattabilità allo stress, perché la fioritura porta alla riproduzione che garantisce il successo della generazione successiva e la sopravvivenza della specie (Takeno, 2016). Non tutti i tipi di stress sono in grado di indurre una maggiore produzione di fiori (Wada e Takeno, 2010), ma questi includono un'intensità luminosa o una temperatura troppo alta o troppo bassa, la luce UV, una cattiva nutrizione, la carenza di azoto, la siccità, scarso ossigeno, l'affollamento, la rimozione delle radici e una stimolazione meccanica (Wada e Takeno, 2010; Takeno, 2016). In questo esperimento abbiamo osservato una fioritura maggiore nelle piante di controllo; sebbene la differenza non fosse statisticamente significativa, potrebbe però essere indice di una maggiore sensibilità delle piante di controllo, rispetto alle piante inoculate con il mix fungino, alle condizioni di stress che possono essersi verificate all'interno della serra (picchi di elevate temperature e/o illuminazione). Pertanto la presenza di AMF potrebbe avere in qualche modo protetto la pianta ospite da uno stress potenzialmente dannoso.

Tenendo conto solo dei cladodi abbiamo osservato come in media il cladode fosse più spesso, e di conseguenza più pesante, nelle piante di controllo. Tuttavia, nei micorrizzati ve ne era un numero superiore portando ad avere una biomassa totale dei cladodi maggiore, anche se non in maniera statisticamente significativa, rispetto ai controlli.

L'ipotesi che, in presenza di AMF, i cladodi mostrino una biomassa superiore rispetto ai cladodi senza AMF sembra essere supportata dalla nostra esperienza. Diversi studi precedenti hanno osservato come l'inoculazione con AMF possa portare ad un aumento nella produzione di biomassa nella pianta ospite attraverso l'incremento della crescita, del diametro e della lunghezza delle radici e del numero e dell'area delle foglie (Birhane *et al.*, 2012; Hailemariam *et al.*, 2017; Baslam *et al.*, 2012). In altri studi su *Opuntia ficus-indica* si è osservato che la crescita, sia della parte aerea che dell'apparato radicale, risulta stimolata dalla presenza del fungo e di conseguenza diversi aspetti morfologici risultano alterati (Kebede *et al.*, 2024). I cladodi di nuova formazione appaiono più numerosi, caratterizzati da area, altezza e spessore

maggiore rispetto ai cladodi delle piante non micorrizzate (Kebede *et al.*, 2023). La biomassa totale risulta quindi significativamente aumentata, così come la conduzione stomatica, la concentrazione di nutrienti ed enzimi antiossidanti (Lahbouki *et al.*, 2023), la resistenza allo stress idrico (Kebede *et al.*, 2023) e quella contro gli attacchi di insetti (Kebede *et al.*, 2024). Va tuttavia sottolineato che alcuni di questi studi sono stati condotti in pieno campo e quindi in condizioni meno limitanti rispetto a quanto avviene nel presente studio, condotto invece in vaso e in serra.

La carenza di acqua può portare ad una diminuzione dei parametri di crescita, nelle piante C₃ e C₄ così come nei cactus, dove il fenomeno potrebbe essere attribuito alla riduzione della capacità fotosintetica causata dall'eccessivo stress idrico (Lahbouki *et al.*, 2023). I cactus sono altamente adattati agli ambienti xerici, grazie a modifiche fisiologiche come il metabolismo acido delle crassulacee (CAM) e adattamenti morfologici. Questi ultimi colpiscono in particolare il fusto, al cui interno vi è un esteso parenchima acquifero (Torres-Silva *et al.*, 2020). Grazie a questa caratteristica, *O. ficus-indica* è in grado di mantenere un contenuto di acqua intorno all'80% - 90%, con il picco durante la primavera e l'estate, stagioni in cui vi è un'elevata umidità relativa (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017). Ciò è coerente con quanto osservato in questo studio. Il contenuto di acqua all'interno dei cladodi è risultato essere molto alto (intorno al 90%) e simile tra campioni di controllo e micorrizzati. In piante C₃ e C₄, la presenza di AMF può causare un aumento significativo del contenuto di acqua relativo (RWC) all'interno delle foglie (Chandrasekaran *et al.*, 2019), ma essendo il fico d'India una pianta avente di base un'elevata quantità di acqua al suo interno, è possibile che la colonizzazione da parte del fungo non sia stata in grado di suscitare cambiamenti significativi.

Sono numerose le molecole fotosintetiche e fotoprotettive all'interno della foglia. Esse comprendono clorofille, carotenoidi, antocianine, xantofille, e sono ben posizionate all'interno dell'organismo per permettere loro un'ottimale assorbimento della luce a determinate lunghezze d'onda (Gamon e Surfus, 1999). Le clorofille, pigmenti fotosintetici costituiti da un anello porfirinico contenente al suo interno uno ione magnesio, sono ampiamente distribuiti nel mondo naturale (Huang *et al.*, 2008). La clorofilla è il pigmento fotorecettore responsabile della prima fase della trasformazione dell'energia solare in energia chimica. Si trova all'interno dei cloroplasti, associata a lipidi e lipoproteine (Olivares-Pérez *et al.*, 2012) e sono distinguibili due grandi categorie, clorofilla a e clorofilla b. Queste sono indispensabili per l'assorbimento della luce solare e la fotosintesi, dal momento che la clorofilla a è responsabile della

conversione della luce fotosintetica del fotosistema I e II (700 e 680 nm rispettivamente) in energia, sotto forma di ATP e NADP + H₂, indispensabile per il corretto funzionamento del metabolismo del carbonio e la crescita della pianta. La clorofilla b invece è un pigmento accessorio con un ruolo nel trasporto elettronico lineare e non solo (Sulistiono *et al.*, 2023). Alti livelli di clorofille nelle foglie nelle prime fasi di sviluppo della pianta sono quindi essenziali perché stimolano la fotosintesi e la crescita (Sulistiono *et al.*, 2023). Spesso queste due molecole sono presenti in un rapporto 3:1 e possiedono un grande numero di derivati. Uno di questi è per esempio la feofitina, derivato della clorofilla a e riconosciuto come uno dei più forti antiossidanti naturali (Huang *et al.*, 2008). I carotenoidi invece sono un gruppo di pigmenti presenti sia nel mondo animale che in quello vegetale. Possiedono una forte azione antiossidante e quindi sono in grado di proteggere l'organismo in cui si trovano dallo stress ossidativo (Sandmann, 2014). Tutte queste molecole possiedono una struttura molecolare unica. Seppur in alcuni casi essa sia molto simile, anche la più piccola differenza permette alle diverse molecole di assorbire l'energia luminosa a lunghezze d'onda differenti. Pertanto, attraverso una misura allo spettrofotometro è possibile distinguere una molecola da un'altra in base al suo spettro (Abbot, 1999). In uno dei carboni dell'anello porfirinico la clorofilla a ha un gruppo metile (-CH₃), mentre la clorofilla b ha un gruppo formile (-CHO). Nelle piante superiori la clorofilla più abbondante è quella di tipo a (Olivares-Pérez *et al.*, 2012). La clorofilla è l'elemento che conferisce l'aspetto verde a *O. ficus-indica*. Il colore verde delle foglie e dei frutti immaturi è dovuto alla clorofilla a (verde-bluastro) e alla clorofilla b (giallo-verde) in un rapporto di 3:1 (Olivares-Pérez *et al.*, 2012). In questo esperimento il contenuto di clorofilla a, b e carotenoidi è risultato lievemente maggiore nelle piante inoculate rispetto ai controlli. Nonostante questi risultati non siano statisticamente significativi, sono concordi con quanto riportato da studi precedenti su diverse piante C₃ e C₄ (Chandrasekaran *et al.*, 2019). È stato osservato che la presenza di AMF ha permesso una produzione maggiore di clorofille nelle foglie, risultando quindi in maggiori fotosintesi e biomassa, in piante di canna da zucchero (Sulistiono *et al.*, 2017) e mais (Mathur *et al.*, 2018). L'inoculazione di AMF ha aumentato significativamente il contenuto di clorofilla a e b anche in tre diverse cultivar di noce moscata (Sulistiono *et al.*, 2023). Risultati simili sono stati ottenuti su piante di lattuga, dove la presenza del fungo ha migliorato la crescita ed aumentato i livelli dei principali carotenoidi, clorofille e tocoferoli nelle foglie (Baslam *et al.*, 2013). È noto che si possa riscontrare una diminuzione nelle concentrazioni di clorofille e carotenoidi in piante sotto stress (Sheng *et al.*, 2008).

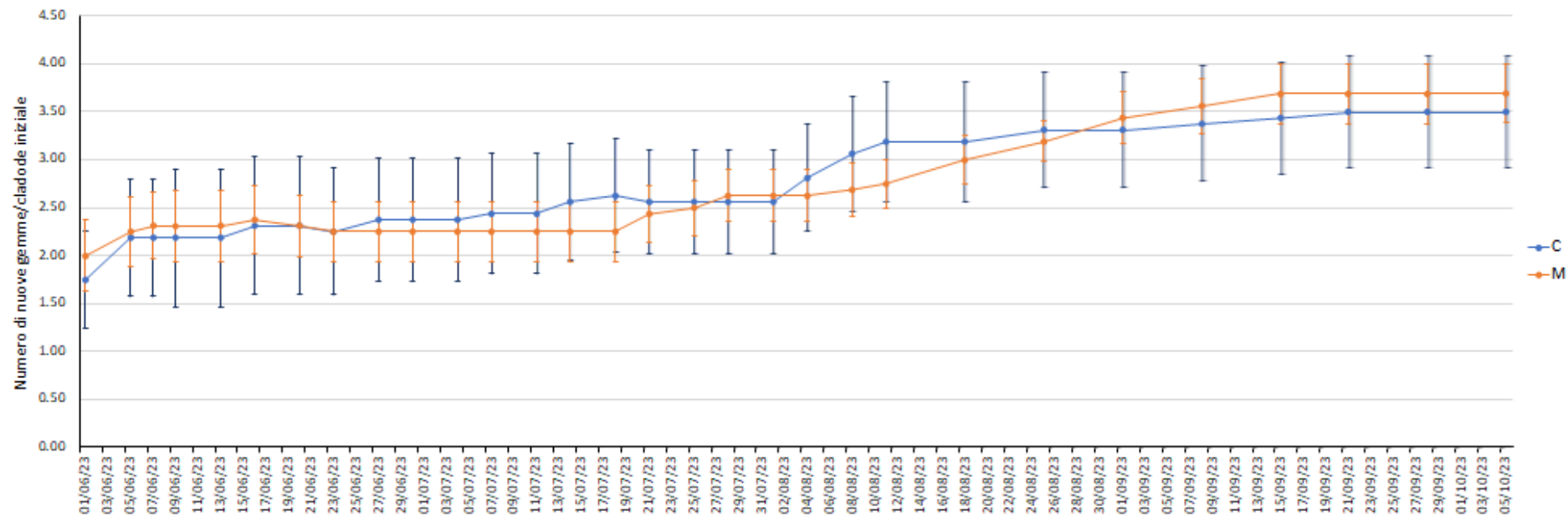
Pertanto è possibile che nel presente esperimento le piante di *O. ficus-indica* non siano state sottoposte a condizioni stressanti e non abbiano quindi mostrato sintomi da stress per quanto riguarda il loro regolare metabolismo fotosintetico.

CONCLUSIONI

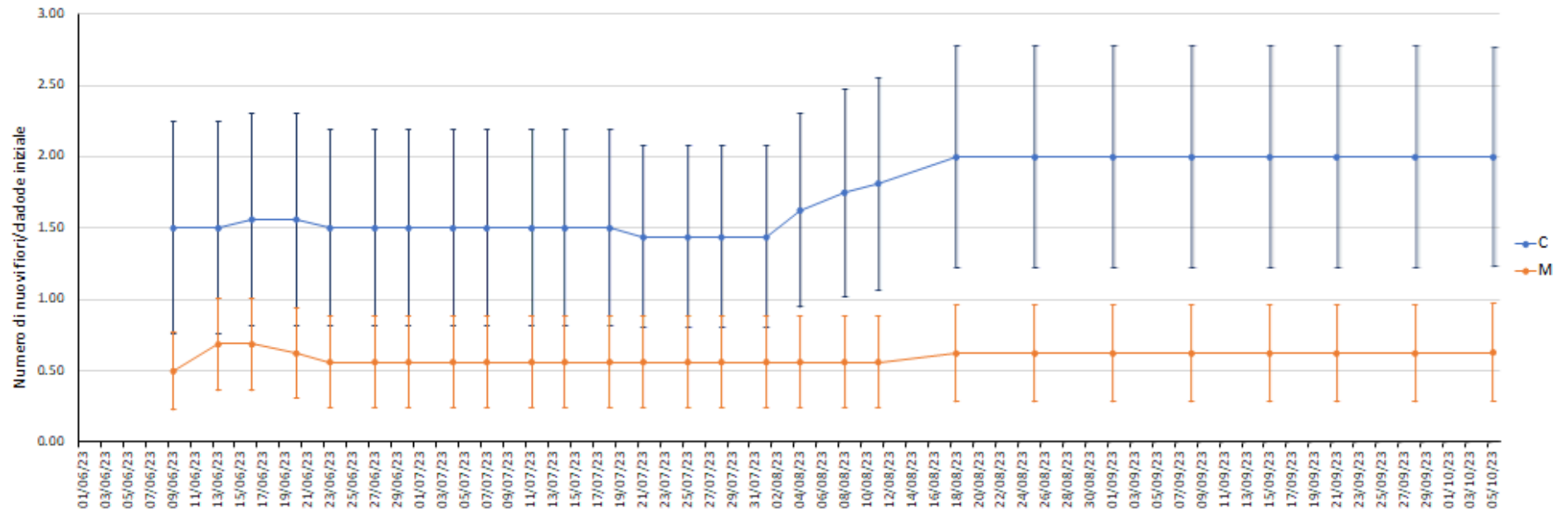
Il presente esperimento rappresenta uno studio preliminare per testare l'effetto di funghi micorrizici su piante di fico d'India. L'inoculazione di AMF non ha suscitato molte differenze significative, ma è stata comunque osservata una maggiore produzione di cladodi nelle piante micorrizzate. Il progetto "ProSmallAgriMed", di cui questo studio fa parte, è volto alla messa a punto di sistemi agronomici basati sulla consociazione di colture, cioè la coltivazione contemporanea di diverse specie nello stesso sito, e sull'utilizzo di microrganismi benefici per le piante. Pertanto, una maggiore produzione di biomassa non può che essere un vantaggio, dal momento che piante di *Opuntia* con cladodi più numerosi e più grandi possono riparare le altre colture, con le quali sono in inter-cropping, da condizioni atmosferiche avverse, quali la troppa luce solare o il vento. Anche nel caso in cui lo scopo ultimo fosse la produzione di foraggio, una maggiore biomassa non può che essere positiva.

La letteratura precedente riporta un maggior effetto della colonizzazione quando questa viene effettuata in campo aperto, dove le condizioni per la simbiosi tra pianta e fungo sono più favorevoli rispetto a quelle in vaso e in serra. Inoltre, in questo studio è stato utilizzato un inoculo fungino isolato nel territorio piemontese. Pertanto, si aspettano risultati migliori rispetto a quelli ottenuti in questo studio nel momento in cui la sperimentazione venga fatta in campo aperto con spore di funghi micorrizici indigeni dei suoli aridi e quindi in grado di resistere a quelle condizioni ambientali.

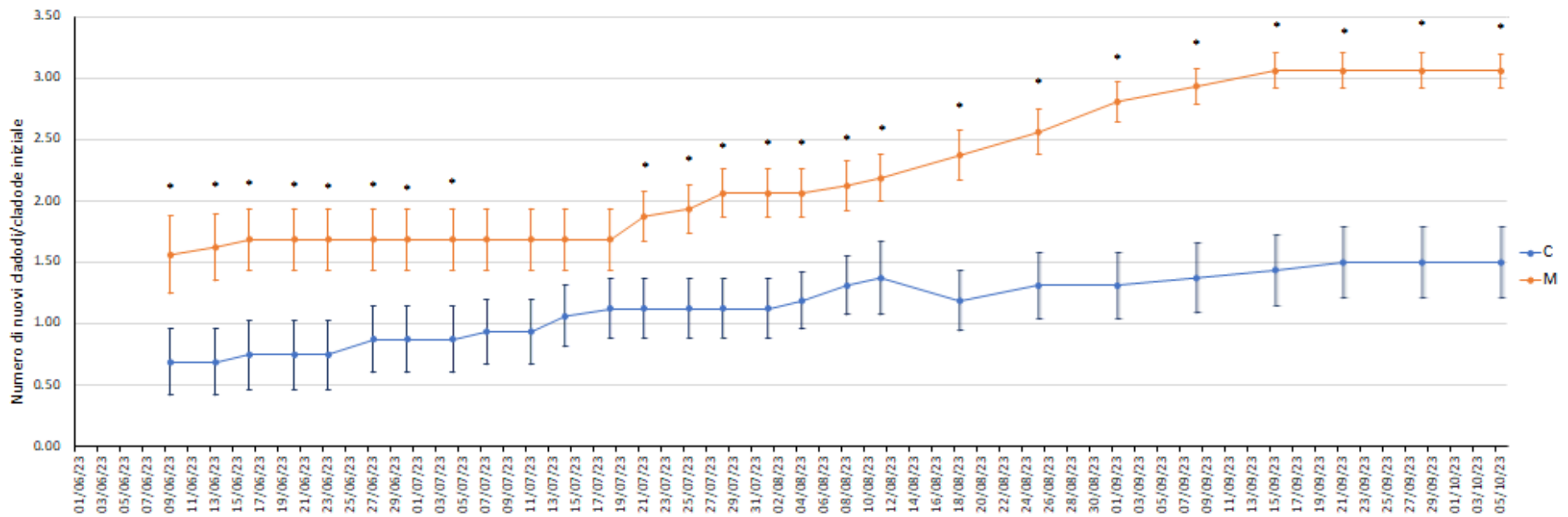
ALLEGATI



Allegato A1: Andamento del numero di nuovi getti per cladode madre delle 32 piante di *O. ficus-indica*



Allegato A2: Andamento del numero di nuovi fiori per cladode madre delle 32 piante di *O. ficus-indica*



Allegato A3: Andamento del numero di nuovi cladodi per cladode madre nelle 36 piante di *O. ficus-indica*. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$)

BIBLIOGRAFIA

Abbas, E. Y., Ezzat, M. I., El Hefnawy, H. M., Abdel-Sattar, E. (2022). An overview and update on the chemical composition and potential health benefits of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. *Journal of Food Biochemistry*, 46(11), e14310.

Abbott, J. A. (1999). Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest biology and technology*, 15(3), 207-225.

Bagyaraj, D. J. (2014). Mycorrhizal fungi. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 80(2), 415-428.

Bakewell-Stone, P. (2012). *Opuntia ficus-indica* (prickly pear). *Forest*.

Baslam, M., Esteban, R., García-Plazaola, J. I., Goicoechea, N. (2013). Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) for inducing the accumulation of major carotenoids, chlorophylls and tocopherol in green and red leaf lettuces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 3119-3128.

Baslam, M., Erice, G., Goicoechea, N. (2012). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and atmospheric CO₂ concentration on the biomass production and partitioning in the forage legume alfalfa. *Symbiosis*, 58, 171-181.

Berbee, M. L., Taylor, J. W. (2010). Dating the molecular clock in fungi—how close are we?. *Fungal Biology Reviews*, 24(1-2), 1-16.

Birhane, E., Sterck, F. J., Fetene, M., Bongers, F., Kuyper, T. W. (2012). Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia*, 169, 895-904.

Bona, E., Cantamessa, S., Massa, N., Manassero, P., Marsano, F., Copetta, A., ...Berta, G. (2017). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. *Mycorrhiza*, 27, 1-11.

Bona, E., Lingua, G., Manassero, P., Cantamessa, S., Marsano, F., Todeschini, V., ... Berta, G. (2015). AM fungi and PGP pseudomonads increase flowering, fruit production, and vitamin content in strawberry grown at low nitrogen and phosphorus levels. *Mycorrhiza*, 25, 181-193.

Brundrett, M. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. In *Advances in ecological research* (Vol. 21, pp. 171-313). Academic Press.

Cesaro, P., Massa, N., Cantamessa, S., Todeschini, V., Bona, E., Berta, G., ... Lingua, G. (2020). Tomato responses to *Funneliformis mosseae* during the early stages of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, 30, 601-610.

Chandrasekaran, M., Chanratana, M., Kim, K., Seshadri, S., Sa, T. (2019). Impact of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthesis, water status, and gas exchange of plants under salt stress—a meta-analysis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 457.

Collier, S. C., Yarnes, C. T., Herman, R. P. (2003). Mycorrhizal dependency of Chihuahuan Desert plants is influenced by life history strategy and root morphology. *Journal of Arid Environments*, 55(2), 223-229.

Contreras-Murillo, S., de-los-Cobos-Silva, S., Mora-Gutierrez, R. A., Lara-Velazquez, P., Gutierrez-Andrade, M. A., Rincon-Garcia, E. A. (2020). Measurement of cladodes of *Opuntia spp.* in three-dimensional photographs. *Agrociensa*, 54(2), 177-194.

Crişan, I., Vidican, R., Stoian, V. (2017). Utilization of arbuscular mycorrhizae in the cultivation of ornamental plants. *Research Journal of Agricultural Science*, 49(4), 392-397.

Davis, S. C., Simpson, J., Gil-Vega, K. D. C., Niechayev, N. A., Tongerlo, E. V., Castano, N. H., ..., Búrquez, A. (2019). Undervalued potential of crassulacean acid metabolism for current and future agricultural production. *Journal of Experimental Botany*, 70(22), 6521-6537.

DeGraffe, B. L. (1896). *Opuntia vulgaris*, Mill. *American Journal of Pharmacy (1835-1907)*, 169.

da Silva, T. G., Jardim, A. M., Diniz, W. J. D. S., de Souza, L. S., Araújo Júnior, G. D. N., da Silva, G. Í., ..., de Moraes, J. E. (2022). Profitability of using irrigation in forage cactus-sorghum intercropping for farmers in semi-arid environment. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 27, 132-139.

Dubrovsky, J. G., North, G. B. (2002). Root structure and function. *Cacti: Biology and Uses*. University of California Press, Berkeley, CA, 41-56.

El-Guezzane, C., El-Moudden, H., Harhar, H., Chahboun, N., Tabyaoui, M., Zarrouk, A. (2021). A comparative study of the antioxidant activity of two Moroccan prickly pear cultivars collected in different regions. *Chemical Data Collections*, 31, 100637.

El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M. H. S., ..., Cherkaoui-Malki, M. (2014). Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*, 19(9), 14879-14901.

Finlay, R. D. (2004). Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, 18(2), 91-96.

Fonseca-García, C., Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. G., Partida-Martínez, L. P. (2016). The cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in microbiology*, 7, 150.

Frank, B. (1885). *Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze.*

Gamon, J. A., Surfus, J. S. (1999). Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *The New Phytologist*, 143(1), 105-117.

Giovannetti, M., Avio, L. (2002). Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. In *Applied mycology and biotechnology* (Vol. 2, pp. 275-310). Elsevier.

Giovannetti, M., Citernesi, A. S. (1993). Time-course of appressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 97(9), 1140-1142.

Giraldo-Silva, L., Ferreira, B., Rosa, E., Dias, A. C. (2023). *Opuntia ficus-indica* Fruit: a systematic review of its phytochemicals and pharmacological activities. *Plants*, 12(3), 543.

Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G., Bending, G. D. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, ecosystems & environment*, 113(1-4), 17-35.

Granata, G., Paltrinieri, S., Botti, S., Bertaccini, A. (2006). Aetiology of *Opuntia ficus-indica* malformations and stunting disease. *Annals of Applied Biology*, 149(3), 317-325.

Hailemariam, M., Birhane, E., Gebresamuel, G., Gebrekiros, A., Desta, Y., Alemayehu, A., ... Norgrove, L. (2018). Arbuscular mycorrhiza effects on *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. growth under varying soil water and phosphorus levels in Northern Ethiopia. *Agroforestry systems*, 92, 485-498.

He, X., Nara, K. (2007). Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition?. *Trends in Plant Science*, 12(8), 331-333.

Hernández-Cuevas, L. V., Salinas-Escobar, L. A., Segura-Castruita, M. Á., Palmeros-Suárez, P. A., Gómez-Leyva, J. F. (2023). Physiological Responses of *Agave maximiliana* to

Inoculation with Autochthonous and Allochthonous Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plants*, 12(3), 535.

Hetrick, B. A. D., Bloom, J. (1986). The influence of host plant on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia*, 78(1), 32-36.

Horibe, T. (2021). Cactus as crop plant—physiological features, uses and cultivation. *Environmental Control in Biology*, 59(1), 1-12.

Huang, S. C., Hung, C. F., Wu, W. B., Chen, B. H. (2008). Determination of chlorophylls and their derivatives in *Gynostemma pentaphyllum* Makino by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(1), 105-112.

Inglese, P., Inglese, G., Liguori, G. (2012). Fruit productivity and carbon gain of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. trees. *Israel Journal of Plant Sciences*, 60(3), 283-289.

Jorge, A. O., Costa, A. S., Oliveira, M. B. P. (2023). Adapting to Climate Change with *Opuntia*. *Plants*, 12(16), 2907.

Kaur, M., Kaur, A., Sharma, R. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus-indica*: a review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(7), 15-18.

Kebede, T. G., Birhane, E., Ayimut, K. M., Egziabher, Y. G. (2023). Arbuscular mycorrhizal fungi improve biomass, photosynthesis, and water use efficiency of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller under different water levels. *Journal of Arid Land*, 15(8), 975-988.

Kebede, T. G., Birhane, E., Ayimut, K. M., Egziabher, Y. G., Belay, T. (2024). Arbuscular mycorrhizal fungi-induced resistance in *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller plant against cochineal insects under various soil water levels. *Arthropod-Plant Interactions*, 1-12.

Lahbouki, S., Fernando, A. L., Rodrigues, C., Ben-Laouane, R., Ait-El-Mokhtar, M., Outzourhit, A., Meddich, A. (2023). Effects of Humic Substances and Mycorrhizal Fungi on

Drought-Stressed Cactus: Focus on Growth, Physiology, and Biochemistry. *Plants*, 12(24), 4156.

Lahsasni, S., Kouhila, M., Mahrouz, M., Kechaou, N. (2002). Experimental study and modelling of adsorption and desorption isotherms of prickly pear peel (*Opuntia ficus-indica*). *Journal of food engineering*, 55(3), 201-207.

Lepage, B. A., Currah, R. S., Stockey, R. A., Rothwell, G. W. (1997). Fossil ectomycorrhizae from the Middle Eocene. *American journal of botany*, 84(3), 410-412.

Lingua, G., Bona, E., Manassero, P., Marsano, F., Todeschini, V., Cantamessa, S., ...Berta, G. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads increases anthocyanin concentration in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa* var. Selva) in conditions of reduced fertilization. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 16207-16225.

Logi, C., Sbrana, C., Giovannetti, M. (1998). Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3473-3479.

Lu, X., Koide, R. T. (1994). The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. *New Phytologist*, 128(2), 211-218.

Malainine, M. E., Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, R., Vignon, M. R. (2003). Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydrate Polymers*, 51(1), 77-83.

Mathur, S., Sharma, M. P., Jajoo, A. (2018). Improved photosynthetic efficacy of maize (*Zea mays*) plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 149-154.

Medina, E. D., Rodríguez, E. R., Romero, C. D. (2007). Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus-indica* fruits. *Food chemistry*, 103(1), 38-45.

Miller, R. M., Jastrow, J. D. (2000). Mycorrhizal fungi influence soil structure. *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, 3-18.

Montiel Salero, D., Olivares Orozco, J. L. (1998). Presencia de la micorriza vesiculo arbuscular en cuatro cultivares de nopal (*Opuntia* spp) en Huichapan, Hidalgo.

Montoya-Martínez, A. C., Rincón-Enríquez, G., Lobit, P., López-Pérez, L., Quiñones-Aguilar, E. E. (2019). Native arbuscular mycorrhizal fungi from the rhizosphere of *Agave cupreata* and their effect on *Agave tequilana* growth. *Revista fitotecnia mexicana*, 42(4), 429-438.

Neffar, S., Beddiar, A., Menasria, T., & Chenchouni, H. (2022). Planting prickly pears as a sustainable alternative and restoration tool for rehabilitating degraded soils in dry steppe rangelands. *Arabian Journal of Geosciences*, 15(3), 287.

Neffar, S., Beddiar, A., Chenchouni, H. (2015). Effects of soil chemical properties and seasonality on mycorrhizal status of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) planted in hot arid steppe rangelands. *Sains Malaysiana*, 44(5), 671-680.

Nobel, P. S. (1999). Physicochemical & environmental plant physiology. *Academic press*.

Peña-Valdivia, C. B., Trejo, C., Arroyo-Peña, V. B., Sanchez Urdaneta, A. B., Balois Morales, R. (2012). Diversity of unavailable polysaccharides and dietary fiber in domesticated nopalito and cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Chemistry & Biodiversity*, 9(8), 1599-1610.

Pimienta-Barrios, E., Zañudo-Hernández, J., López-Alcocer, E. (2009). Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Acta botánica mexicana*, (89), 63-78.

Pimienta-Barrios, E., Pimienta-Barrios, E., Salas-Galván, M. E., Zañudo-Hernandez, J., Nobel, P. S. (2002). Growth and reproductive characteristics of the columnar cactus *Stenocereus*

queretaroensis and their relationships with environmental factors and colonization by arbuscular mycorrhizae. *Tree Physiology*, 22(9), 667-674.

Pitts, R. J., Cernac, A., Estelle, M. (1998). Auxin and ethylene promote root hair elongation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 16(5), 553-560.

Plenchette, C., Clermont-Dauphin, C., Meynard, J. M., Fortin, J. A. (2005). Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science*, 85(1), 31-40.

Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis research*, 73, 149-156.

Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 11841-11843.

Saha, R., Mondal, B., Naskar, B. (2014). AMF Inoculation Changes, the Root Development Pattern of Plants at Early Stage of Colonization. *International Journal of Bioresource Science*, 1(1), 43-47.

Sandmann, G. (2015). Carotenoids of biotechnological importance. *Biotechnology of isoprenoids*, 449-467.

Scalisi, A., Morandi, B., Inglese, P., Bianco, R. L. (2016). Cladode growth dynamics in *Opuntia ficus-indica* under drought. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 158-167.

Shedbalkar, U. U., Adki, V. S., Jadhav, J. P., Bapat, V. A. (2010). Opuntia and other cacti: applications and biotechnological insights. *Tropical Plant Biology*, 3, 136-150.

Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18, 287-296.

Sipango, N., Ravhuhali, K. E., Sebola, N. A., Hawu, O., Mabelebele, M., Mokoboki, H. K., Moyo, B. (2022). Prickly pear (*Opuntia* spp.) as an invasive species and a potential fodder resource for ruminant animals. *Sustainability*, 14(7), 3719.

Smith, S. E., Read, D. J. (2010). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press.

Stambouli-Essassi, S., Harrabi, R., Bouzid, S., Harzallah-Skhiri, F. (2015). Evaluation of the efficiency of *Opuntia ficus-indica* cladode cuttings for vegetative multiplication. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 521-527.

Sulistiono, W., Aji, H. B., Handoko, S., Lase, J. A., Suryanti, S., Apriyana, Y., Rizal, M. (2023). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on early growth, root colonization, and chlorophyll content of North Maluku nutmeg cultivars. *Open Agriculture*, 8(1), 20220215.

Sulistiono, W., Yudono, P. (2017). Early-arbuscular mycorrhizal fungi-application improved physiological performances of sugarcane seedling and further growth in the dry land. *Journal of Agricultural Science (Toronto)*, 9(4), 95-108.

Takeo, K. (2016). Stress-induced flowering: the third category of flowering response. *Journal of Experimental Botany*, 67(17), 4925-4934.

Todeschini, V., AitLahmidi, N., Mazzucco, E., Marsano, F., Gosetti, F., Robotti, E., ... Lingua, G. (2018). Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatilome. *Frontiers in plant science*, 9, 1611.

Torres-Silva, G., Matos, E. M., Correia, L. F., Fortini, E. A., Soares, W. S., Batista, D. S., ... Otoni, W. C. (2020). Anatomy, flow cytometry, and X-ray tomography reveal tissue

organization and ploidy distribution in long-term in vitro cultures of Melocactus species. *Frontiers in plant science*, 11, 1314.

Trinidad-Cruz, J. R., Quiñones-Aguilar, E. E., Rincón-Enríquez, G., López-Pérez, L., Hernández-Cuevas, L. V. (2017). Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(2), 151-169.

Trouvelot, A., Kough, J. L., Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Estimation of vesicular arbuscular mycorrhizal infection levels. Research for methods having a functional significance. In *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae= Aspects physiologiques et genetiques des mycorrhizes: proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, 1-5 July 1985*. Paris: Institut national de le recherche agronomique, c1986..

Ventura-Aguilar, R. I., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S., Rivera-Cabrera, F. (2017). Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(15), 5065-5073.

Vilà, M., Burriel, J. A., Pino, J., Chamizo, J., Llach, E., Porterias, M., Vives, M. (2003). Association between *Opuntia* species invasion and changes in land-cover in the Mediterranean region. *Global Change Biology*, 9(8), 1234-1239.

Wada, K. C., Takeno, K. (2010). Stress-induced flowering. *Plant signaling & behavior*, 5(8), 944-947.

Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.

Wilcox, H. E. (1991). Mycorrhizae. *Plant roots: the hidden half*.

Willis, A., Rodrigues, B. F., Harris, P. J. (2013). The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(1), 1-20.

Winter, K., Garcia, M., Holtum, J. A. (2008). On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoë*, and *Opuntia*. *Journal of experimental botany*, 59(7), 1829-1840.

Winter, K., Smith, J. A. C. (2022). CAM photosynthesis: the acid test. *New Phytologist*, 233(2), 599-609.

Wright, D. P., Scholes, J. D., Read, D. J. (1998). Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, cell & environment*, 21(2), 209-216.