



Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale: l'Europa investe nelle zone rurali



REGIONE del VENETO



# PROGETTO ENDOFLORVIT

FLORA SPONTANEA E MICROORGANISMI ENDOFITI NEL VIGNETO:  
SVILUPPO DI UN SISTEMA AGRICOLO CHE VALORIZZI E SALVAGUARDI  
LA BIODIVERSITÀ



PROSECCO SUPERIORE  
DAL 1876

**CONEGLIANO VALDOBBIADENE**  
PROSECCO SUPERIORE



# PROGETTO ENDOFLORVIT

FLORA SPONTANEA E MICROORGANISMI ENDOFITI NEL VIGNETO:  
SVILUPPO DI UN SISTEMA AGRICOLO CHE VALORIZZI  
E SALVAGUARDI LA BIODIVERSITÀ

## INDICE

<b>Premessa</b>	<b>pag. 5</b>
<b>Biodiversità vegetale nei vigneti in forte pendenza e prati aridi</b>	<b>pag. 6</b>
<b>Biodiversità e caratterizzazione della comunità batterica endofitica in glera</b>	<b>pag. 12</b>
<b>Studi in laboratorio sulla capacità di ricolonizzazione dei microrganismi endofiti della vite e sue risposte fisiologiche</b>	<b>pag. 20</b>
<b>Monitoraggio in vigneto di patologie della vite</b>	<b>pag. 26</b>

*Consorzio di Tutela Prosecco Conegliano Valdobbiadene*  
Dott. Filippo Taglietti

*Università degli Studi di Padova - Dipartimento di Biologia*

**Coordinamento:** Prof.ssa Michela Zottini

**Gruppo di ricerca: biodiversità vegetale nei vigneti**

Dott. Juri Nascimbene, Dott. Diego Ivan

**Gruppo di ricerca: studi in laboratorio sull'attività degli endofiti batterici in piante di Glera**

Prof.ssa Michela Zottini, Dott.ssa Elisabetta Barizza, Dott.ssa Sara Petrin

**Gruppo di ricerca: biodiversità e caratterizzazione della comunità endofitica batterica in Glera**

Prof.ssa Barbara Baldan, Dott. Enrico Baldan, Dott.ssa Alessandra Tondello,  
Dott.ssa Stefania Marcato

Dott. Sebastiano Nigris, Dott. Filippo Zanella

*CRA - Centro di Ricerca per la Viticoltura*

**Gruppo di ricerca: monitoraggio in vigneto di patologie della vite**

Dott.ssa Elisa Angelini, Dott.ssa Forte Vally, Dott.ssa Nadia Bertazzon,

Dott.ssa Luisa Filippin

*Università degli Studi di Trieste - Dipartimento di Scienze della Vita*

**Ideazione guida interattiva**

Prof. Pier Luigi Nimis, Dott. Juri Nascimbene

Si ringraziano le Aziende Agricole coinvolte nel progetto, AVEPA e la ditta Landlab

## PREMESSA

L'obiettivo generale del progetto ENDOFLORVIT è stato quello di sviluppare un modello di analisi della biodiversità vegetale e microbica dell'area DOCG del Conegliano Valdobbiadene e di accrescere le conoscenze che possano promuovere il connubio armonico tra la conservazione della biodiversità, utile per il mantenimento delle funzioni degli ecosistemi, e la produzione vitivinicola. In particolare, il progetto è stato articolato in modo tale da sviluppare tre principali aspetti:

- l'analisi della biodiversità vegetale dei vigneti in funzione delle caratteristiche del paesaggio e dell'intensità di gestione. Questa analisi è stata inoltre abbinata alla valutazione del potenziale ruolo dei vigneti nell'ospitare specie vegetali tipicamente associate ai prati aridi che rappresentano un habitat di interesse europeo per la conservazione della biodiversità, minacciato dall'espansione delle aree agricole;
- la caratterizzazione di batteri endofiti associati alla varietà *Glera*, largamente diffusa nella DOCG, abbinandola alla valutazione della loro efficacia nell'aumentare la resistenza della vite ai fattori ambientali e alle patologie;
- la valutazione di potenziali correlazioni tra le patologie oggi più pericolose, come la Flavescenza dorata, e la diversità biologica presente nei vigneti.

I risultati di questo progetto, riassunti in modo sintetico nei capitoli successivi, sono da una parte utili per attuare fin d'ora sperimentazioni di gestione a basso impatto e dall'altra forniscono spunti per avanzare ulteriormente in questa direzione con nuove iniziative progettuali.

La biodiversità vegetale, favorita da un paesaggio eterogeneo ricco di habitat semi-naturali, e la biodiversità microbica della vite sono due elementi che possono contribuire ad aumentare la resistenza e la capacità di reazione del sistema, fattori indispensabili per garantire la continuità della produzione a lungo termine in uno scenario caratterizzato da cambiamenti globali.

Pertanto, l'auspicio del progetto ENDOFLORVIT è quello di aver sviluppato conoscenze che abbiano una ricaduta applicativa nel sistema produttivo del DOCG del Conegliano Valdobbiadene, fornendo ai produttori un utile supporto ai loro continui sforzi per innovare i propri percorsi aziendali.

## **BIODIVERSITÀ VEGETALE NEI VIGNETI IN FORTE PENDENZA E PRATI ARIDI**

*Dott. Juri Nascimbene, dott. Diego Ivan*

Questa parte del progetto è stata focalizzata su due principali aspetti. Da una parte si è voluto verificare se la presenza di habitat semi-naturali nei dintorni dei vigneti possa incrementare il numero di specie vegetali presenti al loro interno. Dall'altra si è voluto valutare se i vigneti in forte pendenza possano fornire le condizioni idonee per le specie tipicamente associate ai prati aridi presenti nella zona che costituiscono degli habitat di importanza comunitaria per la biodiversità.

### **METODO**

#### *Area di studio e disegno di campionamento*

Lo studio è stato realizzato nell'area della DOCG Conegliano-Valdobbiadene (Fig. 1), a nord della provincia di Treviso, comprendente circa 6000 ettari di vigneto destinati alla produzione del Prosecco DOCG e dello Spumante Superiore DOCG. All'interno dell'area sono stati individuati 40 vigneti e 20 prati. I vigneti, tutti con pendenze superiori ai 30°, sono stati selezionati tenendo in considerazione la composizione paesaggistica in un raggio di 500 m dal punto focale.

Sono stati quindi selezionati 20 vigneti immersi in un paesaggio dominato da aree coltivate ed altri 20 in un paesaggio caratterizzato da una elevata presenza di habitat semi-naturali, quali boschi e prati aridi (Fig. 1).

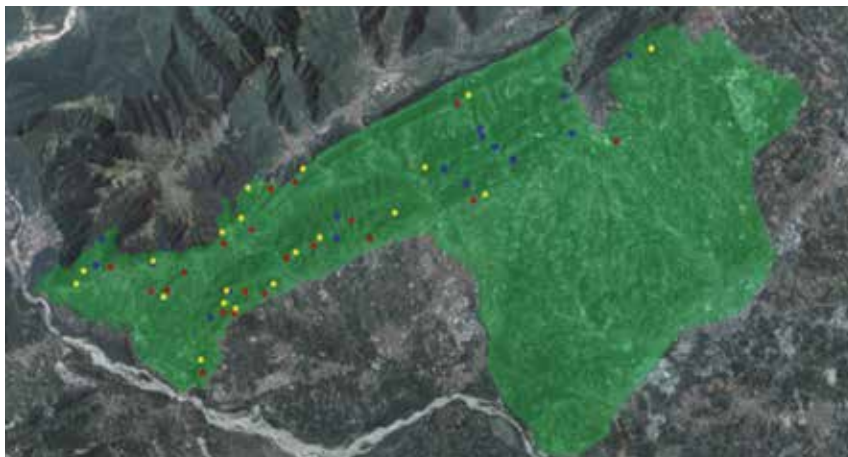


Figura 1: distribuzione dei siti di campionamento all'interno del DOCG Conegliano-Valdobbiadene (campitura verde). In rosso sono indicati i vigneti immersi in un paesaggio intensivo, in giallo quelli nel paesaggio estensivo e in blu i prati aridi.

Per quanto riguarda la gestione, in entrambe le tipologie vengono eseguiti tre tagli all'anno dell'erba e l'applicazione degli erbicidi avviene da 0 a 2 volte all'anno. La

selezione dei prati aridi è avvenuta individuandone 20 tra i pochi rimasti nell'area, sia naturali che semi-naturali. Tutti presentano pendenze superiori ai 30° con esposizioni e quote simili a quelle dei vigneti.

In ciascun vigneto e prato è stata annotata la presenza di tutte le specie vegetali all'interno di un transetto di 25 x 5 m posizionato al centro del sito e orientato in modo che il lato più lungo si trovasse parallelo alla linea di massima pendenza. La maggior parte delle specie sono state identificate in campo, ove possibile, diversamente sono stati raccolti dei campioni (circa 1200) successivamente essiccati, identificati e raccolti in un erbario.

### ANALISI DEI DATI

L'effetto del paesaggio e della gestione sulla diversità vegetale nei vigneti sono stati valutati tenendo in considerazione il numero totale di specie ritrovate in ogni sito di campionamento. Al contempo sono stati considerati gli habitat seminaturali limitrofi (boschi e prati aridi) all'interno di aree circolari del raggio 50, 100, 250 e 500 m, al fine di valutarne l'influenza alle diverse distanze (Fig. 2). Per quanto riguarda la gestione è stato tenuto in considerazione solamente il numero di trattamenti erbicidi (diserbo), dal momento che il numero degli sfalci è pressoché costante all'interno del campione e che l'apporto di sostanze azotate, mediante le concimazioni, è praticamente trascurabile. Il confronto tra la diversità vegetale delle due tipologie di vigneto e i prati aridi è stato realizzato sia dal punto di vista del numero di specie presenti, sia dal punto di vista della composizione specifica e funzionale. La diversità funzionale è stata indagata mediante i tratti funzionali, ovvero le caratteristiche morfologiche (per esempio forma di crescita) e fenologiche (per esempio modalità di impollinazione, periodi di fioritura) che caratterizzano la risposta delle piante ai diversi fattori come ad esempio la gestione e le caratteristiche del paesaggio.



Figura 2: esempio di rappresentazione dei buffer circolari di raggio 50 m, 100 m, 250 m e 500 m utilizzati per stimare la composizione del paesaggio attorno al vigneto campionato.

## RISULTATI

### *Effetto del paesaggio e della gestione sulla diversità vegetale nei vigneti*

La presenza di habitat semi-naturali nel paesaggio ha un effetto positivo sul numero di specie vegetali presenti nei vigneti e questo, come ipotizzato, dipende dalla scala di analisi. In particolare l'effetto è maggiore a scale più piccole, probabilmente grazie al contatto diretto del bosco o del prato arido con il vigneto. In tale situazione, infatti, le specie presenti nell'habitat semi-naturale sono in grado di raggiungere facilmente i vigneti adiacenti incrementandone la ricchezza specifica. Al contrario, la lontananza dell'habitat semi-naturale unita alle eterogenee condizioni topografiche della zona e all'effetto barriera delle distese coltivate a vite sembra ostacolare la dispersione delle specie vegetali che, a differenza di altri organismi, hanno una mobilità limitata.

Appare dunque fondamentale il mantenimento e l'eventuale incremento degli habitat semi-naturali a diretto contatto con le colture al fine di conservare l'elevata ricchezza specifica dei vigneti in forte pendenza. Si può ipotizzare inoltre che quest'ultima, coadiuvata dalla presenza degli habitat semi-naturali e dal loro ruolo di sorgente, possa avere a sua volta un effetto positivo sulla presenza di insetti utili alle colture. Ne gioverebbero in tal caso sia il servizio ecosistemico di impollinazione sia quello di controllo biologico, limitando almeno in parte, gli interventi con pesticidi.

Tuttavia, l'effetto positivo del paesaggio semi-naturale viene alterato dalle pratiche locali di gestione. Sembra infatti che l'utilizzo di erbicidi due volte all'anno annulli l'influenza positiva dei vicini habitat semi-naturali (Fig. 3). Ciò è dovuto presumibilmente all'impoverimento della riserva di semi e alla selezione di specie resistenti al principio attivo contenuto nell'erbicida. Le specie più resistenti prenderebbero quindi il sopravvento contrastando l'ingresso delle specie provenienti dagli habitat semi-naturali adiacenti la cui competitività non è sufficiente a permetterne l'insediamento.

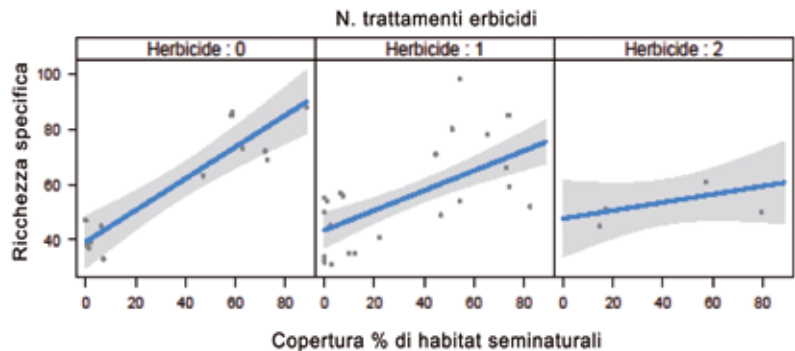


Figura 3: Grafico raffigurante l'effetto dell'interazione tra l'uso di erbicidi e la composizione del paesaggio (copertura percentuale di habitat seminaturali) sulla ricchezza specifica delle comunità vegetali dei vigneti. L'utilizzo di erbicidi varia da 0 a 2 volte l'anno.



**Confronto tra vigneti e prati aridi**

La prima significativa differenza tra le tre tipologie di sito è nel numero di specie (Fig. 4). Infatti, i vigneti confinanti con habitat semi-naturali presentano un maggior numero di specie rispetto alle altre due tipologie. Come detto sopra, questo fatto potrebbe essere determinato dal passaggio delle specie dagli habitat semi-naturali, ma in parte anche dalla pratica di taglio del cotico erboso. Il moderato disturbo generato dai soli tre tagli effettuati durante l'anno, unito all'utilizzo di attrezzatura poco invadenti come il decespugliatore, favorirebbe di fatto l'insediamento di specie di diversi stadi successionali e il conseguente incremento del numero di specie nella comunità.

La differenza nel numero di specie tra i tipi di sito si riflette anche a livello di composizione. Infatti la differenza tra le specie presenti nel prato arido e quelle dei vigneti, sia nel paesaggio intensivo sia in quello estensivo, è molto evidente. Tra le specie tipiche del prato arido troviamo ad esempio *Anthyllis vulneraria* (*Vulneraria comune*), *Artemisia alba* (*Erba regina*), *Bromus erectus* e *B. condensatus* (*Forasacco*), *Chrysopogon gryllus* (*Chersin*, *Trepo*), *Helianthemum nummularium* (*Eliantemo oscuro*), *Koeleria pyramidata* (*Palè alpino*), *Galium verum* e *G. lucidum* (*Caglio*), e diverse specie di orchidee tra cui *Anacamptis morio* (*Giglio caprino*), *Ophrys apifera* (*Fior d'api*), *Ophrys insectifera* (*Fior mosca*) e *Orchis mascula* (*Orchidea maschia*) (Fig. 5). Le specie presenti nei vigneti invece sono riconducibili ad ambienti più ruderali, nel caso di quelli nel paesaggio intensivo, o di prato stabile, nel caso di quelli nel paesaggio estensivo.

Le differenze composizionali trovano riscontro anche in differenze funzionali delle comunità. I siti di prato arido ad esempio si caratterizzano per un maggior numero di

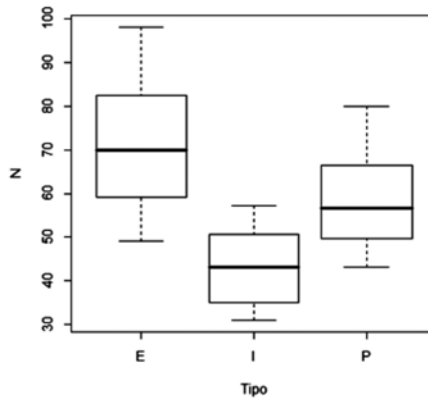


Figura 4: Grafico che raffigura il numero di specie nelle tre tipologie di habitat:  
 E = vigneti in paesaggio estensivo;  
 I = vigneti in paesaggio intensivo;  
 P = prati aridi.



Figura 5: *Anacamptis morio*, *Ophrys apifera*, *Ophrys insectifera* e *Orchis mascula*

specie stress-tolleranti e per una percentuale molto ridotta di specie annuali. Entrambi i dati sono indicativi della maggiore resistenza delle specie di prato arido a condizioni limitanti in cui acqua e nutrienti scarseggiano, ma il disturbo antropico è nullo o quasi. Al contrario le specie dei vigneti presentano adattamenti che permettono loro di sopravvivere in ambienti dove il disturbo ha intensità e frequenza più elevate come di fatto avviene in questi ambienti a causa della gestione.

Un altro elemento che indica una maggiore specializzazione delle comunità di prato arido è l'elevata percentuale di specie ad impollinazione entomofila *Teucrium montanum* (*Camedrio montano*), *Anacamptis pyramidalis* (*Orchidea piramide*), *Crepis froelichiana* (*Radichella rosa*). Anche questa caratteristica, frutto di un lungo adattamento delle specie, permette alle piante di limitare il dispendio di energie riducendo la produzione di polline. Al contrario, nei vigneti sono presenti molte specie autogame o ad impollinazione anemofila, strategie legate a situazioni di maggiore disturbo e condizioni abiotiche meno limitanti.

Nonostante le comunità di prato arido si avvicinino di più a quelle dei vigneti nel paesaggio estensivo rispetto a quelle nel paesaggio intensivo, le differenze composizionali e funzionali rimangono comunque significative. Anche nel caso in cui alcune specie di prato arido riescono ad entrare nei vigneti queste non sono in grado di riprodursi o lo fanno a tassi molto bassi. Questa situazione è ben esemplificata dal comportamento di alcune orchidee. Sebbene esse riescano a formare estese popolazioni ai bordi dei vigneti, non sono in grado di penetrarvi se non con pochi ed isolati individui. Infatti, a dispetto di un'elevata produzione di semi queste piante a causa dei tagli precoci o dell'impiego degli erbicidi non riescono a insediarsi all'interno dei vigneti e completare il loro ciclo vegetativo. Una situazione simile si può osservare anche per altre specie associate ai prati aridi il cui insediamento nei vigneti è ulteriormente limitato dall'effetto pacciamatura dovuto al mancato allontanamento dell'erba sfalciata.

## CONCLUSIONI

In generale, le differenze a livello composizionale e funzionale tra prati aridi e vigneti sono tali per cui risulta evidente che i vigneti gestiti secondo le attuali pratiche sono scarsamente idonei a rappresentare un habitat per comunità vegetali tipiche del prato arido. Le caratteristiche pedologiche, idriche ma soprattutto gestionali dei vigneti, anche se in prossimità di habitat semi-naturali, non ne consentono l'insediamento e la diffusione, pur non ostacolandone l'ingresso. Alla luce di questi risultati, il miglioramento della permeabilità ecologica tra i vigneti e i prati aridi sembra dunque una possibile soluzione per la conservazione di queste specie legate ad habitat di interesse comunitario. Questo obiettivo potrebbe essere raggiunto da una parte salvaguardando i pochi e frammentari siti di prato arido ancora presenti dell'area, dall'altra riducendo l'intensità di gestione nel controllo della cotica erbosa nei vigneti, ad esempio con l'eliminazione dell'impiego degli erbicidi, con sfalci ritardati e asportando l'erba sfalciata.

## GUIDA INTERATTIVA PER IL RICONOSCIMENTO DELLA FLORA DEL TERRITORIO DOCG CONEGLIANO-VALDOBBIADENE



Ulteriore obiettivo del progetto era quello di sviluppare strumenti che favorissero l'avvicinamento dei cittadini alla biodiversità del territorio, contribuendo alla sua valorizzazione. In questo contesto è stata realizzata una guida interattiva per il riconoscimento della flora del Conegliano-Valdobbiadene DOCG utilizzando una tecnologia originale sviluppata dal Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste, partner del progetto. Il principale strumento informatico su cui si è basata la realizzazione della guida interattiva è il software FRIDA (FRiendly IDentificAtion). Si tratta di un software che permette di generare guide per l'identificazione degli organismi a partire da un database morfo-anatomico di caratteri e da una lista di specie. Le guide prodotte usando FRIDA possono essere interconnesse ad altre risorse digitali, come archivi di immagini, database di informazioni ecologiche, note, descrizioni, ecc. Questa forte modularità permette di ottenere guide contestualizzate ad un determinato territorio, o a particolari esigenze.

La guida, intitolata "Guida alla flora dei vigneti del territorio DOCG Conegliano-Valdobbiadene" è consultabile online all'indirizzo [http://dbiodbs.units.it/corso/chiaivi\\_pub21?sc=660](http://dbiodbs.units.it/corso/chiaivi_pub21?sc=660) ed è possibile scaricarla ed utilizzarla off-line su iPhone e iPad, in una versione appositamente curata.

La guida include circa 450 specie comprensive sia degli ambienti di vigneto sia degli habitat semi-naturali (margini di bosco e prati aridi) attigui ad essi. Come specificato anche nel testo introduttivo della guida, non si tratta di un repertorio floristico esaustivo dell'area del Conegliano-Valdobbiadene DOCG, ma di una base rappresentativa delle principali specie vegetali che si possono incontrare nei vigneti e negli habitat semi-naturali ad essi attigui. In sintonia con le finalità del progetto Endoflorvit, lo scopo della guida è infatti quello di fornire uno strumento utile a conoscere e valorizzare la biodiversità vegetale sia in contesti tecnici, sia didattici e amatoriali. Per questo motivo le note standard di ogni specie sono state integrate con note personalizzate che descrivono l'ecologia e la distribuzione delle specie di ognuna di esse nell'area del Conegliano-Valdobbiadene DOCG. Infine, ogni scheda è corredata da un ampio repertorio fotografico messo a disposizione dal Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste che facilita e rende maggiormente gradevole l'utilizzo della guida.

## **BIODIVERSITÀ E CARATTERIZZAZIONE DELLA COMUNITÀ BATTERICA ENDOFITICA IN GLERA**

*Prof.ssa Barbara Baldan, dott. Enrico Baldan, dott.ssa Stefania Marcato*

### **INTRODUZIONE**

Le piante interagiscono con una grande varietà di microrganismi. Il caso maggiormente studiato negli ultimi trent'anni dal punto di vista biochimico, molecolare e genetico è l'interazione delle piante con i microrganismi patogeni. Di notevole importanza sono i meccanismi di riconoscimento da parte della pianta ospite che si basano sulla percezione di molecole microbiche o frammenti vegetali prodotti in presenza del patogeno stesso. Il successo dell'infezione dipende, invece, dall'evoluzione di strategie adottate per eludere le difese della pianta, come ad esempio l'attivazione della risposta sistemica indotta (Jones and Dangl, 2006). Anche per l'interazione mutualistica tra rizobi e leguminose molti aspetti sono stati chiariti. Lo scambio di segnali tra i partner e la riprogrammazione dell'espressione genica sono alla base dell'istaurarsi di una simbiosi altamente specifica, che porta alla formazione di noduli radicali, strutture specializzate per ospitare i microrganismi simbiotici, che in questa sede avviano la fissazione dell'azoto atmosferico (Oldroyd et al., 2009). Tra questi estremi esistono in natura simbiosi pianta-microrganismo in cui il rapporto tra i partner varia in un continuum tra commensalismo e mutualismo; esse si instaurano senza provocare segni di infezione, sintomi evidenti di malattia o la formazione di strutture macroscopiche. E' ampiamente dimostrato, infatti, che le piante in salute ospitano nei tessuti interni un insieme di funghi e batteri, chiamati endofiti, che esercitano un ruolo benefico o neutrale sulla fitness dell'ospite (Schulz and Boyle, 2006, van Overbeek et al., 2006, Bulgarelli et al., 2013). Il sottoinsieme di endofiti batterici e di rizobatteri che agiscono positivamente sulla crescita e la salute della pianta sono stati definiti PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria; Rizobatteri Promotori della Crescita delle Piante*) e PGPB (*Plant Growth Promoting Bacteria; Batteri Promotori della Crescita delle Piante*) e hanno suscitato notevole interesse per la possibilità di un loro utilizzo nelle



pratiche agronomiche (Bashan and Holguin, 1998, Sturz and Nowak, 2000). Gli endofiti sono, quindi, definiti come quei batteri che possono essere isolati dagli organi di una pianta accuratamente sterilizzati in superficie (Hallmann et al., 1997) e che non danno segni di infezione alla stessa. Oggi si ritiene che ogni pianta ospiti una comunità endofita (Rosenblueth e

Martínez-Romero, 2006, Ryan et al., 2008) ed è evidente che la diffusione di questo tipo di associazione sia il risultato di una lunga selezione positiva, che ha portato alla comparsa di strategie di mutuo vantaggio. L'attività della comunità batterica nel suo complesso influenza la struttura e la fisiologia dell'ospite durante la germinazione, lo sviluppo e la crescita, per cui si ritiene che sia determinante per il successo della pianta nello stabilirsi in un ecosistema (Hardoim et al., 2008). Gli endofiti traggono vantaggio dalla simbiosi in quanto si assicurano una nicchia ecologica ristretta, in cui trovano protezione dagli stress ambientali, e un costante apporto di nutrienti in presenza di un minor numero di competitori. I tessuti interni della pianta offrono ai batteri un habitat costante e protetto, tuttavia diversi fattori ambientali influenzano indirettamente le loro condizioni di crescita. La temperatura, la piovosità, la radiazione luminosa, la stagione hanno un effetto diretto sullo stato fisiologico dell'ospite e sui tipi di metaboliti che produce, da cui dipendono la comunicazione chimica con i batteri e la loro nutrizione durante le diverse fasi della colonizzazione (Hallmann et al., 1997). Per lo stesso motivo anche il genotipo della pianta e il suo stadio di sviluppo influiscono sulle interazioni con la comunità endofita.

La gestione dei nutrienti, dell'acqua e il controllo delle malattie che colpiscono le coltivazioni costituiscono le pratiche di base per ottimizzare la resa di un sistema agrario. L'utilizzo degli endofiti in questo contesto permette di sfruttare i caratteri che apportano benefici alla pianta durante l'associazione. La gestione della microflora nelle piante coltivate è stata proposta come una valida alternativa alle tradizionali pratiche di fertilizzazione e di trattamento con pesticidi e sta ricevendo un interesse crescente dato che si tratta di una soluzione ecosostenibile, efficace e meno costosa. Dagli anni '70 il problema dello sfruttamento della fertilità del suolo è stato affrontato soprattutto tramite un abbondante uso di fertilizzanti chimici: questi composti restituiscono al terreno la componente minerale essenziale per la nutrizione delle piante ed aumentano la resa delle colture, tuttavia il loro dilavamento provoca estesi problemi ambientali, quali l'inquinamento delle acque e l'eutrofizzazione degli ecosistemi acquatici, inoltre con essi vengono introdotti nel terreno metalli pesanti derivati dal processo di produzione. E' noto che i fertilizzanti minerali provocano l'impovertimento della componente biologica del suolo, altrettanto importante per il mantenimento della sua fertilità e struttura (Welbaum et al. 2004). L'impiego di formulazioni a base di batteri permetterebbe di migliorare lo stato nutritivo delle coltivazioni senza provocare un effetto nocivo sull'ecosistema, inoltre permetterebbe di stimolare la crescita della pianta in risposta a specifiche condizioni di stress (Vessey, 2003, Berg, 2009). I metodi biologici, in fase di sviluppo, prevedono l'inoculo in pianta di un singolo ceppo batterico o di un consorzio, cioè una selezione di ceppi con le proprietà necessarie per la permanenza nell'ospite e un insieme di attività biologiche che nel complesso abbiano un impatto positivo sulla resa, la salute e la resistenza agli stress della specie coltivata. Gli endofiti sono stati presi in considerazione per lo sviluppo di pratiche di agricoltura sostenibile più recentemente rispetto ai rizobi e ai rizobatteri, ma è opinione condivisa che la loro azione si basi in larga misura su meccanismi simili (Glick, 2012). I PGPB possono agire come biofertilizzanti grazie a caratteri che stimolano in modo diretto la crescita della pianta:

si tratta principalmente di attività che facilitano l'assorbimento dei nutrienti minerali da parte della pianta, oppure ne modulano il bilancio ormonale e, di conseguenza, influiscono positivamente sullo sviluppo degli organi vegetali e sulla tolleranza agli stress ambientali (Vessey, 2003). Una seconda classe di attività dei PGPB apporta dei benefici in modo indiretto sulla produttività delle piante coltivate, in quanto permette di limitare l'insorgere di malattie. E' stata dimostrata, infatti, la produzione di una grande varietà di metaboliti secondari in grado di contrastare la crescita di microrganismi patogeni, oppure i PGPB possono sollecitare le difese sistemiche della pianta, inducendo uno stato in cui essa risulta predisposta a contrastare un ampio spettro di infezioni (Compant et al., 2005). I PGPB possono proteggere la pianta dall'infezione da parte di microrganismi dannosi ed un meccanismo fondamentale consiste nella competizione per i nutrienti e le nicchie. Questa modalità è propria di batteri benefici che hanno evoluto spiccate capacità nell'occupare i siti di colonizzazione dell'ospite, formare biofilm e sfruttare i nutrienti disponibili.

## RISULTATI

Il progetto, in collaborazione con il Consorzio per la Tutela del Prosecco Conegliano Valdobbiadene D.O.C.G., si focalizza sull'isolamento e la caratterizzazione di batteri endofiti coltivabili presenti in *Vitis vinifera cv. Glera*, con lo scopo di identificare le popolazioni di endofiti all'interno di diversi vigneti della zona del Conegliano-Valdobbiadene D.O.C.G. e di definire i meccanismi alla base dell'interazione benefica endofita-pianta. Queste conoscenze sono fondamentali per valutare le potenzialità più interessanti dal punto di vista agronomico e per la selezione accurata di un gruppo di ceppi con attività complementari che nel complesso abbiano un impatto positivo sulla crescita, la salute e la resistenza agli stress dell'ospite. La ricerca, svolta presso i laboratori dell'Università di Padova, si è incentrata sulla frazione coltivabile della comunità endofita, in quanto l'obiettivo a lungo termine del progetto prevede di sviluppare una formulazione per trattare le talee di vite al momento dell'innesto, che permetterebbe di mitigare l'infezione da parte di importanti patogeni di vite e di stimolare la crescita e la radicazione delle giovani piante, anche in condizioni di stress ambientale. Le fasi già concluse del presente progetto di ricerca sono consistite nell'isolamento di ceppi endofiti coltivabili a partire da organi vegetativi (foglie, fusti, radici) di piante di *Glera*, opportunamente sterilizzati in superficie. Per la realizzazione del progetto sono state prese in considerazione piante appartenenti a differenti vigneti, siti nell'area di Conegliano-Valdobbiadene.

Da una prima serie di campionamenti effettuati all'interno di sei differenti vigneti situati nella zona, sono stati isolati 377 ceppi batterici che sono stati caratterizzati su base morfologica mentre una classificazione preliminare è stata fatta mediante un'analisi bio-molecolare, utilizzando un protocollo ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) seguito da sequenziamento dei 16S rDNA (Baldan et al., 2014).

I risultati ottenuti dall'analisi ARDRA hanno permesso di identificare i microorganismi e, utilizzando il software BioNumerics®, di creare alberi filogenetici; di seguito è riportata una figura riassuntiva delle attribuzioni tassonomiche dei ceppi batterici endofiti ritrovati nei diversi tessuti di vite (Fig. 1). Dalle analisi delle sequenze è

emerso che circa il 55% della popolazione è composta da isolati appartenenti al genere *Bacillus*, che risulta essere il più numeroso. Altri generi riscontrati dal sequenziamento sono *Microbacterium*, *Variovorax*, *Micrococcus*, *Actinomycetes*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Mesorizhobium*.

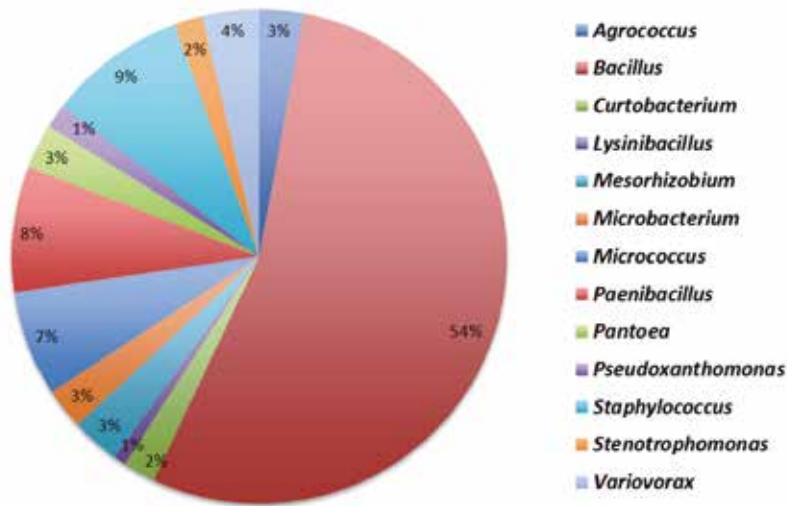


Figura 1: attribuzioni tassonomiche dei ceppi batterici endofiti isolati dai diversi tessuti di vite.

I 377 ceppi batterici coltivabili, una volta identificati tassonomicamente, sono stati saggiati in vitro per alcune attività metaboliche note per la loro importanza nella promozione della crescita della pianta (note come “PGP activities”), in particolare sono state saggiate la capacità di produrre ammoniaca, solubilizzare il fosfato, secernere siderofori, sintetizzare fito-ormoni come l’IAA (Acido Indolo Acetico) e produrre enzimi in grado di digerire la parete vegetale. Lo scopo di tali saggi è quello di accumulare quante più informazioni possibili per arrivare ad una selezione accurata e approfondita di alcuni ceppi che dimostrino caratteristiche biochimiche e molecolari interessanti per l’interazione endofiti-pianta. Dalle analisi biochimiche è risultato, infatti, che 124 ceppi sono positivi al test di solubilizzazione del fosfato e 147 risultano positivi a quello per la produzione di ammoniaca; 144 ceppi secernono siderofori e 142 sono in grado di degradare la cellulosa; infine 16 ceppi sono in grado di produrre IAA (Tab. 1). E’ interessante rilevare che molti dei ceppi studiati posseggono più di una attività PGP ma solamente il ceppo GL83 appartenente al genere *Pantoea* è risultato positivo a tutti i test biochimici (Tab. 2).

E’ ampiamente dimostrato che gli endofiti possiedono capacità di promozione della crescita aumentando la biodisponibilità di nutrienti minerali, azoto e producendo fitormoni. La valutazione delle capacità di promozione della crescita è quindi un passo fondamentale per la selezione di batteri endofiti da utilizzare

in una prospettiva di sviluppo per una viticoltura eco-sostenibile. Per una prima analisi della capacità di promozione della crescita è stato messo a punto un sistema in vitro semplificato che utilizzasse la pianta modello *Arabidopsis thaliana*. Questo ha permesso anche la realizzazione di una estensiva e robusta analisi statistica basata sul gran numero di repliche che si possono ottenere.

Test biochimico		Classe di appartenenza					Totale
		<i>Actinobacteri</i>	<i>Alfaproteobacteri</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Betaproteobacteri</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	
Fosfato	solubilizzatori	15	4	90	6	9	124
	non-solubilizzatori	40	8	182	14	9	253
	<b>totale</b>	<b>55</b>	<b>12</b>	<b>272</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>377</b>
	% solubilizzatori	27%	33%	33%	30%	50%	33%
Ammonio	produttori	19	3	108	9	8	147
	non-produttori	36	9	164	11	10	230
	<b>totale</b>	<b>55</b>	<b>12</b>	<b>272</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>377</b>
	% produttori	35%	25%	40%	45%	44%	39%
IAA	produttori	2	0	12	1	1	16
	non-produttori	53	12	260	19	17	361
	<b>totale</b>	<b>55</b>	<b>12</b>	<b>272</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>377</b>
	% produttori	4%	0%	4%	5%	6%	4%
CMC	solubilizzatori	9	0	62	4	7	82
	non-solubilizzatori	46	12	210	16	11	295
	<b>totale</b>	<b>55</b>	<b>12</b>	<b>272</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>377</b>
	% solubilizzatori	16%	0%	23%	20%	39%	22%
Siderofori	produttori	17	2	114	5	6	144
	non-produttori	38	10	158	15	12	233
	<b>totale</b>	<b>55</b>	<b>12</b>	<b>272</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>377</b>
	% produttori	31%	17%	42%	25%	33%	38%

Tabella 1: test biochimici effettuati per i 377 ceppi endofiti e relativi risultati divisi per classe di appartenenza

Ceppo	Fosfato	Ammonio	IAA	Siderofori	CMC	Tassonomia
GL 13	-	-	+	+	-	<i>Agrococcus baldri</i>
GL 24	-	-	+	-	+	<i>Paenibacillus sp.</i>
GL 74	-	+	-	-	-	<i>Micrococcus</i>
GL 83	+	+	+	+	+	<i>Pantoea agglomerans</i>
GL 89	-	-	-	-	+	<i>Microbacterium flavum</i>
GL168	+	+	-	-	+	<i>Micrococcus</i>
GL169	+	+	-	-	-	<i>Bacillus sp.</i>
GL174	-	+	-	-	-	<i>Bacillus licheniformis</i>
GL186	+	+	-	-	-	<i>Bacillus herbersteinensis</i>
GL287	+	+	+	+	-	<b>not sequenced</b>
GL412	+	+	-	+	-	<i>Bacillus sp.</i>
GL452	+	+	-	+	-	<i>Bacillus sp.</i>

Tabella 2: ceppi selezionati dopo le analisi condotte

I parametri considerati per la valutazione degli effetti degli endofiti riguardano la lunghezza della radice, il diametro, la superficie totale della radice e la formazione di peli radicali. L'analisi statistica Cluster analysis "mclust" (Fraley and Raftery, 1998) ha permesso di suddividere i ceppi batterici in sei gruppi a seconda del tipo di risposta indotta in *Arabidopsis thaliana*: rispetto al controllo (nessun inoculo) e al controllo



positivo (presenza di auxina esogena a concentrazione nota), due gruppi inducono un forte accorciamento della radice e un aumento del numero di peli radicali, due gruppi provocano un significativo allungamento della radice e due gruppi stimolano la formazione di radici con misure intermedie simili al controllo negativo. Le informazioni, ricavate da questo esperimento e incrociate con gli altri esperimenti descritti, permetteranno di selezionare i possibili candidati per l'applicazione in campo. E' ampiamente dimostrato che gli endofiti batterici mediano le interazioni biotiche tra la pianta e altri microrganismi attraverso la competizione per i nutrienti, attraverso la sintesi di molecole antibiotiche, oppure attraverso l'elicitazione di difese sistemiche vegetali, al fine di proteggere la pianta ospite esercitando così un'azione di biocontrollo. La ricerca di geni che codificano per enzimi delle vie biosintetiche di sostanze con capacità antifungine ha dimostrato che alcuni dei ceppi in studio posseggono i geni per produrre surfactina e fengicina, appartenenti ad una famiglia di molecole utili nella lotta contro i patogeni. Le capacità di biocontrollo sono state comunque valutate come grado di inibizione, da parte dei batteri, della crescita in vitro di funghi fitopatogeni. Le analisi effettuate, ponendo in co-coltura ognuno dei ceppi batterici scelti con i singoli funghi patogeni scelti, hanno dimostrato che otto dei ceppi endofitici saggati provocano una forte inibizione della crescita di tutti e quattro i funghi, come si può osservare dalla figura 2 a titolo esemplificativo. Sulla base di tutte le informazioni raccolte, attraverso i test biochimici e fisiologici incrociati con i dati molecolari, sono stati selezionati 12 ceppi promettenti dal punto di vista della promozione della crescita e/o della attività di biocontrollo. Il loro genoma è stato completamente sequenziato: l'assemblaggio dei genomi batterici, la ricerca e l'annotazione delle regioni codificanti e la costruzione di un *database* delle vie metaboliche potenzialmente attive permetterà di individuare quali potrebbero essere responsabili di effetti di promozione della crescita o di biocontrollo. La comprensione dei meccanismi, il controllo della composizione delle comunità microbiche che colonizzano la vite sono alla base di potenziali innovative applicazioni ecocompatibili in sostituzione/ affiancamento delle attuali pratiche agronomiche che vedono l'ampio utilizzo di sostanze chimiche molto dannose per l'ambiente nella gestione dei vigneti.

Un importante aspetto per una comprensione sempre più completa del sistema vite-microorganismo è lo studio della frazione microbica totale presente. Questa parte del progetto, non ancora conclusa, ha previsto la scelta di 21 vigneti della zona Conegliano-Valdobbiadene, utilizzati anche nell'analisi floristica, allo scopo di studiarne la biodiversità microbica attraverso un'analisi metagenomica. Sono state quindi prelevate alcune foglie da cinque piante per ciascun vigneto. Dalle foglie, accuratamente sterilizzate in superficie, è stato estratto il DNA batterico totale mediante un protocollo messo a punto nel laboratorio di "Biologia Cellulare delle Piante" dell'Università di Padova; il DNA, così estratto, è stato poi accuratamente preparato, amplificato e purificato (in collaborazione con il CRIBI dell'Università di Padova) per poter essere sequenziato attraverso moderne tecniche di NGS (Next Generation Sequencing): ION TORRENT PROTON, con cui è possibile ottenere migliaia di sequenze contemporaneamente. Una volta ottenute le sequenze batteriche e analizzate mediante software biostatistici in grado

di gestire la mole di dati, sarà possibile valutare la biodiversità microbica associata alle differenti aree analizzate in relazione al tipo di gestione del vigneto e alla biodiversità floristica rilevata.

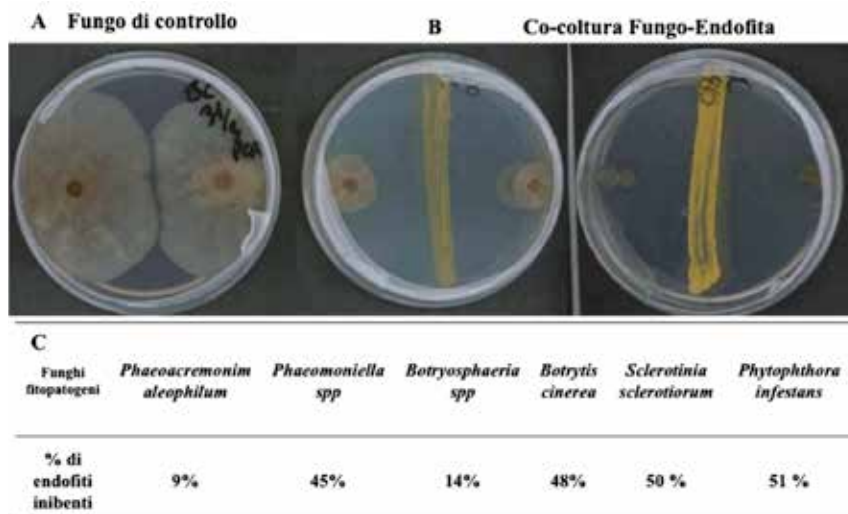


Figura 2: test di inibizione tramite co-coltura di funghi e batteri; A) controllo positivo del saggio con cui verifica della crescita fungina in assenza del batterio da saggiare; B) esempi di co-coltura in cui entrambi i batteri saggiati inibiscono la crescita del micelio; C) tabella riassuntiva in cui si mostra la percentuale dei ceppi endofiti che inibiscono la crescita del 90% per ogni fungo saggiato.

## BIBLIOGRAFIA

- Baldan E, Nigris S, Populin F, Zottini M, Squartini A, Baldan B**, 2014. Identification of culturable bacterial endophyte community isolated from tissues of *Vitis vinifera* "Glera". *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Società Botanica Italiana* **148**(3), 508-516.
- Bashan Y and Holguin G**, 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 1125-1228.
- Berg G**, 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **84**, 11-18.
- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E and Schulze-Lefert P**, 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 807-838.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Ait Barka E.**, 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(4), 1685-1693.
- Fraley C and Raftery A E**, 1998. How Many Clusters? Which Clustering Method? Answers Via Model-Based Cluster Analysis. *The Computer Journal* **41**(8), 578-588.
- Glick B**, 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica* **2012**, Article ID 963401.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W F, Kloepper J W**, 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **43**(10), 895-914.
- Hardoim P R, van Overbeek L S, Elsas J D**, 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* **16**(10), 463-71.
- Jones J D, Dangl J L**, 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Oldroyd G E D, Harrison M J and Paszkowski U**, 2009. Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science* **324**, 753-754.
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E**, 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**(8), 827-837.
- Ryan R P, Germaine K, Franks A, Ryan D J, Dowling D N**, 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* **278**(1), 1-9.
- Schulz B and Boyle C**, 2006. What are Endophytes? *Soil Biology* **9**, 1-13.
- Sturz A V, Nowak J**, 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* **15**, 183-190.
- Van Overbeek L S, van Vuurde J, D. van Elsas J**, 2006. Application of Molecular Fingerprinting Techniques to Explore the Diversity of Bacterial Endophytic Communities. *Soil Biology* **9**, 337-354.
- Vessey J K**, 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**(2), 571-586.
- Welbaum G E, Sturz A V, Dong Z, Nowak J**, 2004. Managing Soil Microorganisms to Improve Productivity of Agro-Ecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**(2), 175-193.

## **STUDI IN LABORATORIO SULLA CAPACITA' DI RICOLONIZZAZIONE DEI MICRORGANISMI ENDOFITI DELLA VITE E SUE RISPOSTE FISIOLOGICHE**

*Prof.ssa Michela Zottini, dott. Elisabetta Barizza, dott.ssa Alessandra Tondello, dott.ssa Sara Petrin*

### **INTRODUZIONE**

Successivamente alla caratterizzazione molecolare e funzionale dei ceppi batterici endofiti isolati in *Glera*, è stato affrontato uno studio per valutare in vite le attività di tali microrganismi. A tale scopo si è scelto un approccio che impiega l'uso di piante di *Glera* coltivate in laboratorio in vitro e in coltura idroponica. Un approccio di questo tipo ha permesso di capire diversi aspetti del fenomeno di interazione pianta-microrganismo, che sarebbero stati di più difficile comprensione se si fosse affrontato uno studio direttamente in campo. L'interazione pianta-microrganismi è infatti un processo molto complesso che viene influenzato da fattori ambientali e fisiologici che risulterebbero non controllabili in campo e perciò richiederebbero numerose repliche sperimentali distribuite su diversi anni di studio. L'approccio in campo, necessario per testare l'effettiva efficacia dei microrganismi nella modulazione della fisiologia della pianta nel suo ambiente, rappresenterà quindi la fase finale di rigorose sperimentazioni effettuate in laboratorio dove è possibile mantenere sotto controllo tutte le condizioni ambientali. L'acquisizione di dati ottenuti con un rigoroso metodo scientifico in laboratorio consentirà di definire in modo più sistematico le successive prove in campo che porteranno ai risultati definitivi.

### **METODO**

Nel nostro approccio sperimentale sono state utilizzate piante di *Glera* coltivate in vitro e in coltura idroponica, che forniscono un ulteriore vantaggio che è



quello dei tempi di sperimentazione che si riducono a pochi mesi rispetto agli anni invece necessari per uno studio in campo. Le piante utilizzate in questo lavoro sono state propagate *in vitro* ed è stato rilevato che sono prive al loro interno di batteri endofiti coltivabili. Sono quindi lo strumento ideale per

lo studio degli effetti indotti dalla ricolonizzazione da parte degli endofiti oggetto di studio.

## RISULTATI

### *Esperimenti di localizzazione dei batteri fluorescenti*

In una prima fase della sperimentazione è stato messo a punto un protocollo di “batterizzazione” delle piante *in vitro* utilizzando diversi tipi di talee, concentrazione di batteri endofiti da re-inoculare e condizioni di crescita delle piante stesse. Si è giunti all’identificazione delle talee apicali come il miglior sistema per il re-inoculo e che mostra una percentuale di sopravvivenza e radicazione superiore rispetto agli altri sistemi.

Al fine di poter valutare la capacità infettante dei microrganismi e le modalità e i tempi di infezione degli stessi sono stati generati batteri fluorescenti. Tali batteri sono poi stati inoculati nelle talee e osservati a diversi tempi dall’inoculo con il microscopio confocale che ha permesso di definire i siti di colonizzazione all’interno della pianta nei diversi organi. Con l’utilizzo di batteri fluorescenti è stato anche possibile procedere ad una valutazione quantitativa dei batteri endofiti presenti all’interno dei tessuti vegetali. Durante gli esperimenti di titolazione sono state inoltre considerate piante di controllo per valutare la presenza eventuale di batteri coltivabili residenti. Le piastre ottenute da queste piante non hanno mostrato colonie.

L’analisi al microscopio confocale ha permesso di visualizzare i microrganismi all’interno di radici e fusti, localizzati sia all’interno dei fasci di conduzione che negli spazi inter-cellulari (Fig. 1).

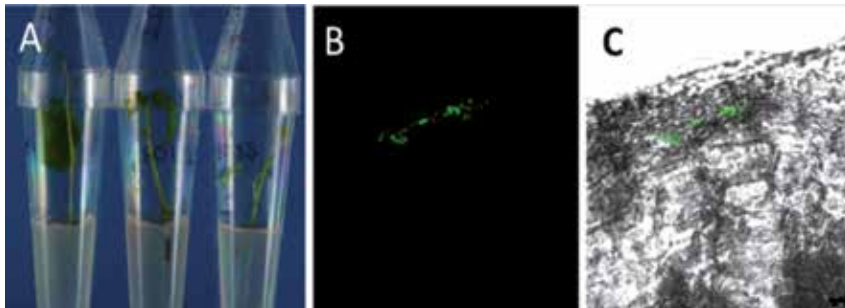


Figura 1: A) talee di vite inoculate in laboratorio con ceppi endofiti fluorescenti. B e C) immagini al microscopio confocale degli endofiti (in verde, B) all’interno dei tessuti del fusto di talee di vite (in visibile, C).

E’ stato inoltre possibile definire una curva di titolazione degli endofiti valutando la loro presenza e vitalità all’interno delle piante a diversi tempi (20, 30, 45, 52, 60 giorni) dall’inoculo. In questa serie di esperimenti non abbiamo mai riscontrato che i batteri inoculati potessero indurre alcun sintomo di malattia.

**Parametri di crescita delle piante inoculate con batteri endofiti**

Con lo scopo di valutare l'effetto dei ceppi batterici endofiti sulla fisiologia della pianta, sono stati determinati diversi parametri di crescita e attività di piante inoculate confrontate con piante non inoculate. Gli esperimenti preliminari sono stati effettuati utilizzando due ceppi batterici, *Bacillus licheniformis* e *Pantoea agglomerans*, selezionati in base alle loro caratteristiche metaboliche che risultavano di rilevante interesse dal punto di vista applicativo.

L'effetto sulla promozione della crescita è stato valutato misurando parametri quali la lunghezza del tralcio, il peso fresco e il peso secco delle piante, la lunghezza dell'apparato radicale e il diametro del fusto. I risultati sono riassunti in Tab. 1.

Pianta	Diametro fusto (mm)	Lunghezza radici (cm)	Peso fresco (g)	Percentuale radicazione
<b>Controllo</b>	1,7 +/- 0,2	19,5 +/- 2,6	3,7 +/- 0,7	71,0 +/- 17,0
<b>83</b>	1,6 +/- 0,3	19,6 +/- 2,4	2,8 +/- 1,3	52,4 +/- 19,6
<b>174</b>	1,7 +/- 0,3	22,2 +/- 4,4	3,5 +/- 1,3	59,4 +/- 30,3

Tabella 1: misurazione di parametri di crescita in piante non inoculate (controllo) e piante inoculate con i batteri endofiti *Pantoea agglomerans* (83) o *Bacillus subtilis* (174), dopo 8 settimane dall'inoculo.

Si è osservato che, in genere, le piante batterizzate con *Pantoea agglomerans* sono più piccole e hanno una biomassa inferiore rispetto al controllo, ma il loro tasso di crescita dopo le 2 settimane di adattamento risulta essere più elevato rispetto al controllo (Fig. 2).

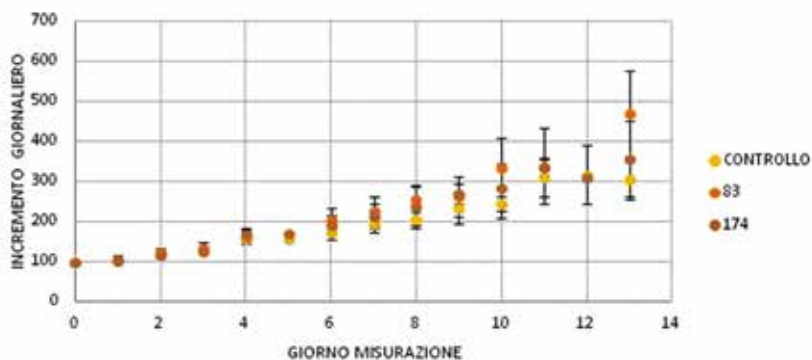


Figura 2: incremento di crescita del tralcio in piante non inoculate (CTR) e piante inoculate con i batteri endofiti *Pantoea agglomerans* (83) o *Bacillus subtilis* (174).

I risultati ottenuti per le piante inoculate con *Bacillus licheniformis* non mostrano differenze statisticamente significative con il controllo per quanto riguarda peso fresco e diametro, mentre c'è un effetto sull'allungamento delle radici (Tab. 1). La funzionalità fisiologica delle piante inoculate è stata valutata determinando parametri che definiscono l'efficienza fotosintetica, mediante l'uso di un analizzatore di immagini fluorescenti "PAM-Imaging". L'emissione di fluorescenza della clorofilla è infatti una tecnica molto utilizzata per lo studio dell'efficienza fotosintetica di una pianta: vi è infatti una forte relazione tra parametri di fluorescenza e lo stato fisiologico di una pianta. Le analisi effettuate hanno evidenziato una maggiore efficienza fotosintetica nelle piante batterizzate rispetto a quelle di controllo.

### **Risposta allo stress**

Uno dei principali vantaggi che si prospettano dall'uso degli endofiti è quello di essere impiegati per migliorare le risposte di difesa che la pianta attiva se sottoposta a stress di diverso tipo. A questo proposito abbiamo allestito una serie di esperimenti volti a valutare la risposta delle piante di vite allo stress idrico (indotto da PEG6000) mettendo a confronto piante di controllo non inoculate e piante inoculate con i due ceppi batterici di interesse (Fig. 3).

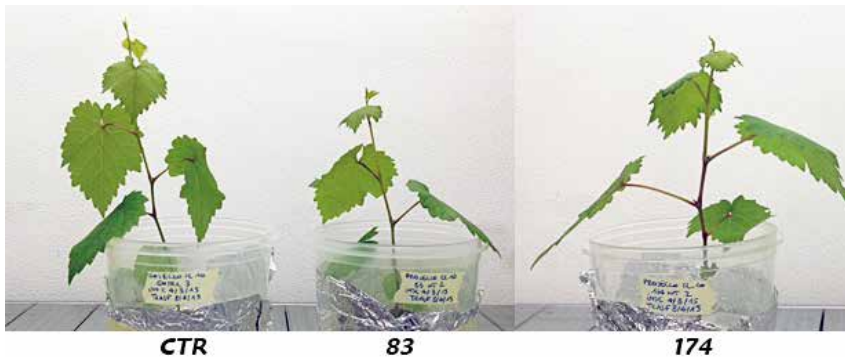


Figura 3: piante di Glera in coltura idroponica sottoposte a stress idrico con PEG 6000. A sinistra pianta priva di endofiti sottoposta a stress idrico con i sintomi di epinastia; al centro e a sinistra piante inoculate con *Pantoea agglomerans* (83) e con *Bacillus subtilis* (174).

Un primo parametro valutato per definire la resistenza a questo tipo di stress è la misura del contenuto relativo di acqua (Relative Water Content, RWC). Si è osservato che nelle foglie più giovani, i valori di RWC sono minori in condizioni di stress rispetto alle condizioni di controllo nelle piante non inoculate, mentre si mantengono abbastanza costanti nelle piante inoculate. (Fig. 4).

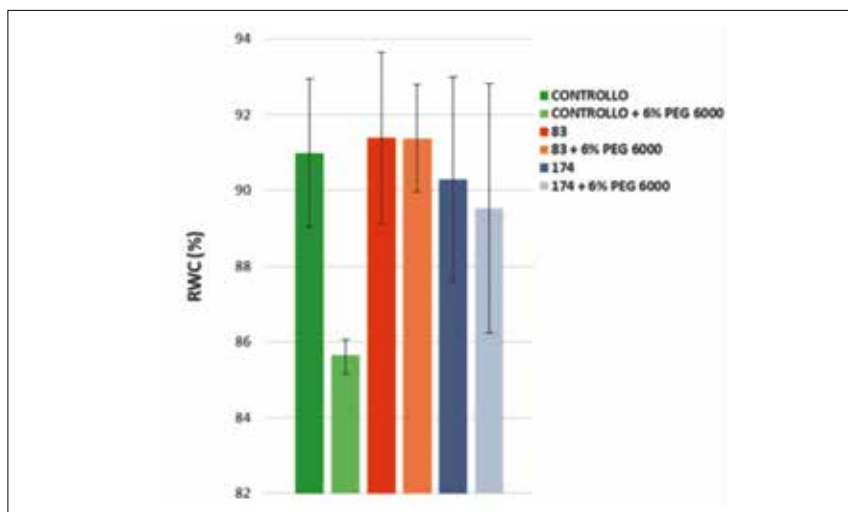


Figura 4: percentuale relativa di contenuto di acqua (RWC) in foglie giovani di piante non inoculate (controllo) e piante inoculate con *Pantoea agglomerans* (83) e con *Bacillus subtilis* (174), in condizioni normali e in condizioni di stress idrico con PEG 6000.

Tale risultato supporta l'idea che questi endofiti, con un meccanismo ancora non investigato, possano conferire alla pianta che li ospita una maggiore resistenza allo stress idrico.

L'emissione di fluorescenza, anche in questo caso, è uno strumento utile per studiare la risposta della pianta. I fattori di stress, infatti, inducono cambiamenti del metabolismo fotosintetico variando significativamente la cinetica di emissione della fluorescenza delle piante. In condizioni di stress l'apparato fotosintetico non è in grado di utilizzare tutta l'energia derivante dalla luce, ciò può portare alla rapida distruzione dei fotosistemi ed essere letale per le piante. Le piante hanno evoluto diversi sistemi per garantire la dissipazione dell'energia di eccitazione, quando questa diviene eccessiva. Il quenching non fotochimico (Non-Photochemical Quenching, NPQ), è un meccanismo che permette di smorzare (quenching) gli stati eccitati di singoletto della clorofilla, evitando che vengano trasferiti al centro di reazione, attuando un meccanismo di dissipazione dell'energia sotto forma di calore. L'analisi dei parametri di efficienza fotosintetica e di quenching non fotochimico delle foglie di vite hanno evidenziato delle differenze nella risposta a stress idrico da parte di piante batterizzate e piante di controllo. In particolare le piante batterizzate con *Pantoea agglomerans* sono in grado di attivare efficacemente il quenching non fotochimico (Fig. 5).

Da questi risultati possiamo affermare che la batterizzazione con *Pantoea agglomerans* può presentare iniziali problemi di fitotossicità (difficoltà nella radicazione delle talee), ma una volta stabilita l'interazione endofitica la pianta ne trae vantaggio



con un aumento dell'efficienza fotosintetica. L'effetto del *Bacillus licheniformis* non è molto evidente nei parametri che valutano la promozione della crescita, e, per quanto riguarda i parametri di efficienza fotosintetica, non si osserva alcuna induzione di NPQ come nelle piante inoculate con *Pantoea agglomerans*.

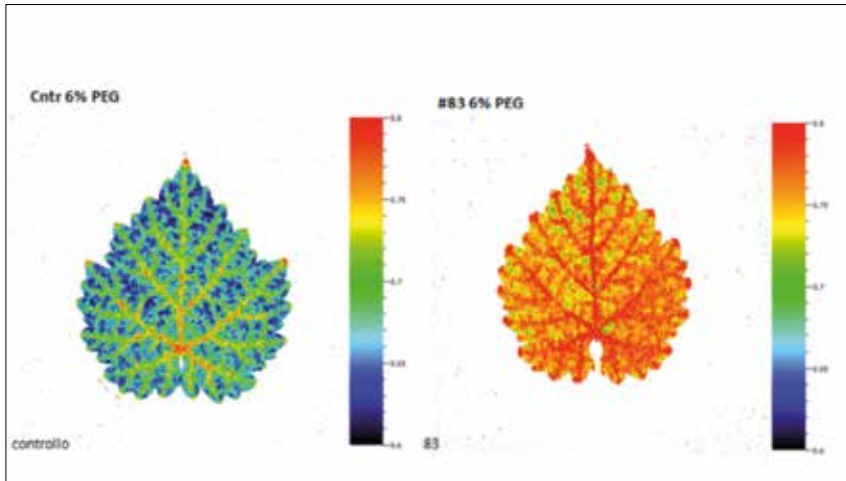


Figura 5 : emissione di fluorescenza di una foglia di controllo (a sinistra) e di una foglia di pianta inoculata con i batteri endofiti (a destra) sottoposte a stress idrico. Il colore rosso indica una maggiore efficienza fotosintetica.

## MONITORAGGIO IN VIGNETO DI PATOLOGIE DELLA VITE

*dott.ssa Elisa Angelini, dott.ssa Vally Forte, dott.ssa Nadia Bertazzon, dott.ssa Luisa Filippin*

Lo scopo di questa parte del progetto era di valutare le correlazioni fra l'incidenza di alcune patologie in vigneto e la componente quanti-qualitativa della biodiversità floristica dei vigneti.

Per raggiungere tale obiettivo è stato effettuato innanzitutto un monitoraggio visivo ceppo per ceppo della sintomatologia delle seguenti malattie: giallumi della vite (Flavescenza dorata e Legno nero), esca e virosi del Pinot grigio, una nuova malattia emergente nelle nostre zone viticole; sono state inoltre segnate le viti sostituite o morte, che sono un indice dello stato sanitario generale del vigneto. Quando necessario, il monitoraggio visuale è stato seguito dal saggio molecolare PCR, per confermare la diagnosi di campo ed individuare con maggior precisione l'agente patogeno presente. Sono stati ispezionati 11 vigneti nei 2 anni, 2013 e 2014, già oggetto di studio nel progetto; le osservazioni sono state eseguite su circa 1000 viti per vigneto, e lo stato sanitario è stato registrato e riportato su mappa.

### *Giallumi della vite*

Sono malattie causate da fitoplasmi e trasmesse in vigneto da insetti vettori, le cicaline.

In Europa sono presenti due giallumi:

- la Flavescenza dorata, più aggressiva, malattia di quarantena epidemica, trasmessa da vite a vite da *Scaphoideus titanus*. È diffusa in tutto il Nord e in parte del Centro Italia. In Europa è soggetta a legislazione molto rigida, per cui sono obbligatori i trattamenti contro il vettore e l'estirpo dei ceppi infetti nelle zone focolaio.
- il Legno nero, meno aggressiva, endemica in Europa, trasmessa a vite da piante spontanee (specialmente ortica e convolvolo) tramite il vettore *Hyalesthes obsoletus*. La malattia è diffusa in tutte le aree viticole italiane.

I sintomi delle due patologie sono indistinguibili in campo, ma i vettori sono diversi, e di conseguenza anche le strategie di lotta. Pure gli agenti causali sono due fitoplasmi filogeneticamente differenti, distinguibili solo con metodi molecolari di tipo PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Ambedue questi giallumi causano gravi danni ai viticoltori, che includono la diminuzione della qualità e quantità delle produzioni, e spesso anche il deperimento e la morte delle piante infette.

### *Esca*

È una malattia causata da un complesso di funghi vascolari, di cui i più importanti sono *Phaeoacremonium chlamydospora*, *Phaeoacremonium* spp. e *Fomitiporia mediterranea*. I sintomi più gravi sono a livello dei tessuti vascolari, sotto forma di alterazioni, imbrunimenti e carie. I sintomi fogliari (classiche le tigrature delle foglie) compaiono solo saltuariamente. Esiste anche una forma acuta, caratterizzata dal repentino disseccamento di parte o di tutta la pianta, spesso seguito dalla morte. La malattia è diffusa in tutta la penisola italiana, con differenze marcate nell'incidenza fra vigneti giovani e vigneti più vecchi, dove possono essere infette anche il 100% delle piante.

### *Virosi del Pinot grigio*

È una nuova malattia scoperta nel 2003 in Nord Italia (Trentino Alto Adige e Friuli Venezia Giulia), da pochi anni presente in Veneto, ed in attiva diffusione. Colpisce solo alcune varietà, fra cui la *Glera*. Non si conosce ancora il vettore, mentre l'agente eziologico sembra essere un virus, chiamato GPGV (*Grapevine Pinot gris virus*). I danni comportano una diminuzione della produzione nei ceppi sintomatici, spesso associata a deperimento progressivo della vite. Dati recenti suggeriscono una bassa incidenza attuale della malattia in vigneto in Veneto (inferiore in media all'1%), ma in alcuni vigneti si sono osservate più del 10% di piante infette.



Foto 1: sintomi di Flavescenza dorata su vite, varietà *Glera*.



Foto 2: sintomi i fogliari di esca, con le classiche tigrature.



Foto 3: sintomi della virosi del Pinot grigio su varietà *Glera*.

## RISULTATI DEL MONITORAGGIO

L'incidenza dei giallumi della vite è variata fra lo 0 ed il 5%, in dipendenza del vigneto esaminato (grafico 1). In media, i sintomi erano presenti su meno dell'1% delle viti osservate, sia nel 2013 che nel 2014, senza significative variazioni imputabili all'annata. In alcuni vigneti la situazione è peggiorata nel 2014 (Az. 1, 2, 5, 7, 11), in altre invece si è assistito ad un miglioramento (Az. 6, 8, 10), indotto sia dall'espianto sia dal risanamento delle viti sintomatiche. La malattia prevalente è il Legno nero, presente in quasi tutte le aziende sia nel 2013 che nel 2014, mentre la Flavescenza dorata è stata diagnosticata in 3 aziende nel 2013 (Az. 1, 6, 8) e nel 2014 (Az. 1, 5, 11). Nel vigneto più infetto nel 2014 (Az. 1) si è osservata un'incidenza della malattia decisamente maggiore verso uno dei bordi (grafico 2). E' questa una situazione che si può talvolta notare in campo, in particolare quando la fonte di inoculo della malattia viene dall'esterno (es. portinnesto selvatico presente ai bordi), ma che può anche dipendere da altri fattori ambientali ed ecologici.

L'incidenza dei sintomi fogliari di esca, invece, che sembrava trascurabile nel 2013 in tutti i vigneti osservati, è stata significativamente maggiore nel 2014 in alcune Aziende (2, 9, 10, 11), mentre nelle altre si è attestata intorno ai valori dell'anno precedente, cioè fra il 2 ed il 3% in media (grafico 3). Questa situazione fitosanitaria peculiare è stata riportata per il 2014 da molti altri Autori in varie aree italiane.

La virosi del Pinot grigio è stata trovata solo in 3 vigneti: 6 viti sintomatiche nell'Azienda 1, 1 vite sintomatica nelle Aziende 4 e 7. Questi risultati si allineano con i dati raccolti nel corso di un monitoraggio più ampio nella DOCG Prosecco eseguito nel 2013 e 2014. Il monitoraggio delle viti morte e sostituite con barbatelle mostra una situazione complessiva dei due anni alquanto eterogenea nei diversi vigneti, con valori da 1 a 22%, in dipendenza del vigneto (grafico 4).

Per quanto è stato possibile rilevare in questo biennio di studio, sono emerse alcune indicazioni che sembrano suggerire una certa correlazione fra la presenza di alcune situazioni fitosanitarie e la biodiversità floristica nel vigneto. In particolare, sono stati osservati fenomeni di guarigioni spontanee da giallume, soprattutto Legno nero, solo in alcuni vigneti dotati di maggiore biodiversità; d'altro canto, però, sempre negli stessi vigneti c'è tendenzialmente una maggior incidenza della malattia. Per quanto riguarda l'esca, invece, sembra esserci un'indicazione di una maggiore diffusione della patologia nei vigneti con minore biodiversità. Considerando infine la percentuale di viti morte e sostituite, non è stato possibile notare alcuna differenza. Queste considerazioni sono però solo indicative, in quanto il numero di vigneti osservati non è sufficiente per ottenere dei dati statisticamente validi. Sarebbe quindi interessante approfondire la tematica, specialmente in relazione al nuovo indirizzo europeo verso la sostenibilità ambientale nel senso più ampio.

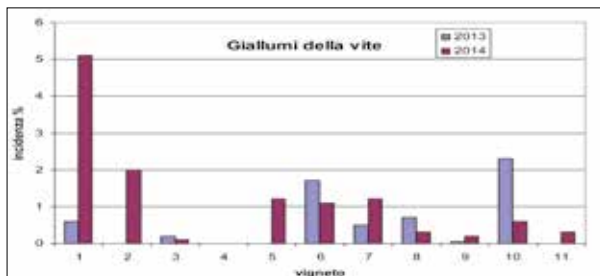


Grafico 1. Incidenza dei giallumi della vite nel 2013 e 2014 nei vigneti oggetto di monitoraggio.

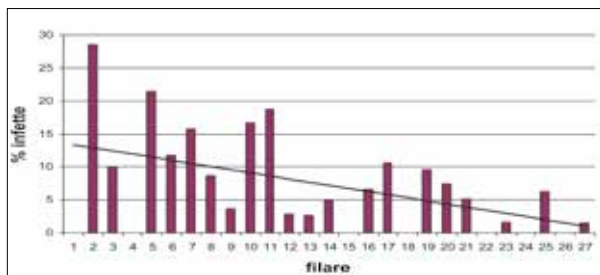


Grafico 2. Incidenza delle piante infette da giallume della vite in relazione al filare nell'Azienda 1.

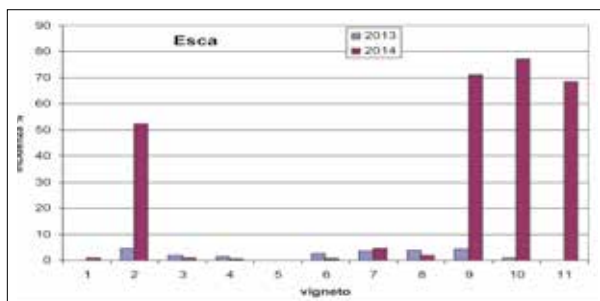


Grafico 3. Incidenza dei sintomi fogliari della malattia dell'esca della vite nel 2013 e 2014 nei vigneti oggetto di monitoraggio.

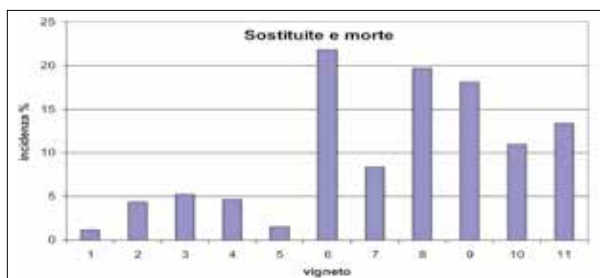


Grafico 4. Incidenza di piante morte e sostituite nei vigneti oggetto di monitoraggio. I dati sono complessivi per il biennio 2013-2014.



PROSECCO SUPERIORE  
DAL 1876

# CONEGLIANO VALDOBBIADENE PROSECCO SUPERIORE

---

Partner:



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI DI TRIESTE



CONSORZIO DI TUTELA DEL VINO  
CONEGLIANO VALDOBBIADENE  
PROSECCO SUPERIORE DOCG

[info@prosecco.it](mailto:info@prosecco.it) [www.prosecco.it](http://www.prosecco.it)

---

Design: Caseley Giovana





PROSECCO SUPERIORE  
DAL 1876

[www.prosecco.it](http://www.prosecco.it)

Supplemento a Cuneo Valdobbiadene n. 1.15 - Anno 17 - Reg. Tribunale di Treviso n. 1081 del 25.01.1999