

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti

Risorse Naturali Ambientali

Corso di laurea in Scienze Forestali ed Ambientali

Risposta di piante di *Corylus avellana* L.
al trattamento con l'antibiotico sulfadiazina

Relatore

Prof. Rossella Ghisi

Correlatori

Dott. Lucia Michelini

Dott. Franco Meggio

Laureando

Marco Lazzi

Matricola

n. 583672

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

La natura non fa nulla di inutile.

Aristotele

Riassunto	1
Abstract.....	3
1. Introduzione.....	5
1.1 Antibiotici.....	5
1.1.1 Generalità.....	5
1.1.2 Utilizzo degli antibiotici in zootecnia.....	6
1.1.3 Antibiotici nell'ambiente	7
1.1.4 I Sulfamidici e la sulfadiazina	14
1.2 Corylus avellana L. (nocciolo), struttura ed ecologia.....	18
1.2.1 Principali avversità biotiche del nocciolo.....	21
1.3 Funghi e simbiosi fungine (micorrize)	23
1.3.1 Funghi e batteri endofiti	24
1.3.2 <i>Tuber aestivum</i> (or <i>uncinatum</i>)	26
1.4 Indicatori fisiologici	27
1.4.1 Fotosintesi	27
1.4.2 Traspirazione.....	28
1.4.3 Fluorescenza.....	31
2. Obiettivi.....	34
3. Materiali e metodi.....	35
3.1 Disegno sperimentale	35
3.2 Metodo di coltura	35
3.3 Analisi del suolo	36
3.4 Analisi biometriche.....	37
3.5 Analisi della fotosintesi, scambi gassosi, fluorescenza	37
3.6 Analisi dei microorganismi endofiti	38
3.7 Analisi statistica	39
4. Risultati e discussione	40
4.1 Suolo	40
4.2 Analisi biometriche.....	42
4.5 Fotosintesi netta	52
4.3 Traspirazione, Conduttanza, WUE.....	54
4.4 Fluorescenza.....	59
4.5 Parametri fotosintetici riferiti all'area fogliare delle piante	62
4.5 Microorganismi endofiti	65
5. Conclusioni.....	67
6. Bibliografia.....	69

Riassunto

I medicinali utilizzati per curare gli animali da allevamento possono conservare la loro funzionalità anche quando sono liberati nell'ambiente.

L'uso delle deiezioni zootecniche come fertilizzanti è la via principale d'ingresso nell'ambiente di questi medicinali e, una volta liberati nell'ambiente, possono entrare in contatto con microorganismi, piante e animali presenti ed interagire con loro, ma le interazioni sono ancora poco note e studiate.

In questa tesi è stata studiata la risposta di piante di *Corylus avellana* L. a varie concentrazioni iniziali di sulfadiazina (SDZ).

Trenta piante di *Corylus avellana* L. sono state cresciute su suolo per 70 giorni, in ambiente controllato a concentrazioni di 0, 0.01, 0.1, 1, 10 e 100 ppm di SDZ somministrate in soluzione acquosa ad inizio trattamento.

Nessuna evidente differenza morfologica è stata riscontrata nella parte epigea delle piante a fine trattamento; tutte hanno dimostrato uno sviluppo paragonabile, inteso come crescita in lunghezza, numero di foglie e area fogliare.

La biomassa della parte ipogea a fine trattamento esibisce un andamento di tipo ormetico, con una crescita lievemente stimolata alle basse concentrazioni di SDZ ed inibita alle concentrazioni più alte. Un effetto negativo, inoltre, è stato osservato nella morfologia delle radici delle piante cresciute a più alto dosaggio, che mostrano ramificazioni secondarie e segni di sofferenza.

Le analisi degli scambi gassosi dimostrano che le concentrazioni più alte di SDZ inducono un generale abbassamento della velocità con cui avvengono sia la fotosintesi che la traspirazione, mentre quelli relativi alla fluorescenza delle clorofille, sembrano indicare che la fase luminosa della fotosintesi è meno influenzata della velocità di fissazione della CO₂, dalla presenza di SDZ nel terreno.

Alcuni studi hanno dimostrato che gli antibiotici possono influenzare le comunità microbiche presenti nel suolo; per questo motivo è stata analizzata la risposta degli endofiti del picciolo. Dosi basse di sulfamidici appaiono stimolare la traslocazione dei batteri verso le parti aeree della pianta, mentre dosi alte probabilmente rendono non praticabile tale strategia di rifugio.

Abstract

Medicinal products used to treat farm animals can retain their functionality even when they are released into the external environment.

The use of manure as fertilizer is the main route input into the environment of these medicines and, once released into the environment may come into contact with microorganisms, plants and animals and interact with them, however the interactions are still little known and studied.

In this study it was investigated the development of plants of *Corylus avellana* L., and the presence of microorganisms endophytes in the petiole, in response to various initial concentrations of sulfadiazine (SDZ).

Thirty plants of *Corylus avellana* L. were grown on soil for 70 days, in a controlled environment at concentrations of 0, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 ppm of SDZ administered in aqueous solution at the start of treatment.

No noticeable morphological difference was observed in aboveground part of the plants at the end of treatment; every treatment have shown a development comparable in term of growth in length, number of leaves and leaf area.

At the end of treatment, the root morphology was radically changed: 10 and 100 ppm treatments having root tips smaller and more branched than the control.

The analysis of gas exchange and fluorescence have, however, highlighted the symptoms of premature leaf aging induced by higher doses of SDZ (10 and 100 ppm), as all measurements showed a small reduction over time of the various processes analyzed. Data of Φ PSII and ETR show that the light phase of photosynthesis is less influenced by the rate of CO₂ fixation, by the presence of SDZ in the ground.

Some studies have shown that antibiotics can affect environmental microbial communities; therefore, we investigated the response of the endophyte in the petioles. Their numerical presence very varied between plants grown at low initial doses of SDZ and those grown at high initial doses. SDZ at low doses appear to stimulate the translocation of bacteria towards the aerial parts of the plant, while at high doses their toxicity probably render impracticable this strategy of refuge.

1. Introduzione

1.1 Antibiotici

1.1.1 Generalità

Si definisce antibiotico una sostanza di origine naturale prodotta da un microorganismo che ha la proprietà di inibire la crescita di batteri e altri microorganismi (Rizzoli-Larousse, 1989).

Il termine nell'uso comune attuale indica un farmaco, di origine naturale (*antibiotico in senso stretto*) o di sintesi (*chemioterapico*), in grado di rallentare o fermare la proliferazione dei batteri. Essi non hanno effetto contro i virus (a parte una possibile attività antivirale della rifampicina nei Poxvirus) e i parassiti, sui quali agiscono altri generi di chemioterapici.

Intuita da Pasteur e Joubert fin dal 1887, la nozione di antibiotico si è venuta a poco a poco precisando attraverso le osservazioni di Cantini (1885), Gosio (1896) e Fleming (1928). Quest'ultimo, avendo notato che colture di *Staphylococcus aureus* su cui si erano incidentalmente sviluppate colonie di muffe, identificate poi come appartenenti al genere *Penicilium*, presentavano fenomeni di lisi attorno a queste colonie, ed aveva intuito la possibilità di usare questi estratti di colture di *Penicilium* a scopo antibatterico. La sostanza filtrabile elaborata dalla muffa fu però isolata solo nel 1940 da Florey, Chain e collaboratori, che la chiamarono penicillina. Successivamente furono isolati antibiotici da colture di muffe (es. acido aspergilloso), alghe (es. clorellina), licheni (es. acido roccellico) ed altri ancora furono sintetizzati (es. cloramfenicolo) (Rizzoli-Larousse, 1989).

I batteri più sensibili all'azione degli antibiotici sono in linea di massima quelli Gram-positivi mentre i Gram-negativi e gli acidoresistenti (es. batteri della tubercolosi, della labbra) sono nettamente più resistenti. Gli antibiotici sono caratterizzati dall'azione specifica su un certo numero di organismi (spettro di attività) che può ridursi, nei confronti di un dato microorganismo, per una specie di assuefazione da parte di quest'ultimo (resistenza) (Rizzoli-Larousse, 1989).

Gli antibiotici si dividono in battericidi e batteriostatici: i primi causano la morte del batterio agendo sulle strutture vitali, gli altri inibiscono la moltiplicazione agendo su processi che possono essere temporaneamente bloccati.

I vari antibiotici possono inibire la sintesi della parete batterica (azione battericida), agire direttamente sulle membrane cellulari dei microorganismi alterandone la permeabilità, interferire con le funzioni delle sub-unità ribosomali causando l'inibizione della sintesi

proteica, interferire con il metabolismo degli acidi nucleici, interferire con vie metaboliche essenziali per i microorganismi.

1.1.2 Utilizzo degli antibiotici in zootecnia

Gli antibiotici nel settore veterinario, sin dagli anni 50, rappresentano un mezzo fondamentale per il controllo delle malattie infettive. La loro introduzione ha contribuito al miglioramento del benessere animale e rappresenta un mezzo importante per garantire lo standard delle produzioni di alimenti di origine animale (Min. Salute 2011).

Attualmente sono disponibili per gli animali numerose categorie di antimicrobici, con varie forme farmaceutiche e vie di somministrazione. Le diverse categorie disponibili comprendono, per citarne solo alcune, amminoglicosidi, cefalosporine, (fluoro)chinoloni, macrolidi, penicilline, amfenicoli, pleuromutiline, polipeptidi, ionofori, sulfamidici, tetracicline (Min. Salute 2011).

Nella medicina umana, gli antibiotici si posizionano al terzo posto tra i grandi gruppi farmacologici con oltre il 6% di tutte le prescrizioni. Nella medicina veterinaria circa il 70% di tutti i composti farmaceutici usati sono agenti antibiotici (Thiele-Bruhn, 2003).

Le principali classi di antibiotici usati in veterinaria sono (Thiele-Bruhn, 2003):

- Tetracicline (TCs): gruppo di antibiotici inibitori della sintesi proteica, efficaci contro i batteri Gram-positivi, Gram-negativi aerobi e anaerobi;
- Sulfamidici (SAs): relativamente insolubili in acqua. Sono caratterizzati da due diversi valori di pK_a che indicano la protonazione del gruppo ammino a pH 2-3, e la deprotonazione dell'altro azoto a pH 5-11;
- Aminoglicosidi: formati da un gruppo glicosidico ed uno amminico; tale struttura fornisce loro proprietà basiche, elevata solubilità in acqua e idrofilia, con conseguente bassa capacità di diffusione attraverso le membrane cellulari;
- β -lattami: l'effetto è direttamente connesso con l'anello del β -lattame, poiché questo anello è facilmente scindibile nelle soluzioni acide e basiche.

Gli antibiotici sono destinati ad agire efficacemente anche a concentrazioni basse e, nei casi di somministrazioni intra-corporali, ad essere espulsi dal corpo dopo brevi tempi di residenza e di conseguenza queste sostanze sono rilasciate nell'ambiente e in alcuni casi sono stati trovati i loro residui nell'ambiente.

Molti vengono parzialmente metabolizzati nel corpo prima di essere espulsi ma alcuni metaboliti prodotti possono essere riconvertiti nei loro composti di origine, anche se le

condizioni che guidano questa riconversione di molecole non sono ancora del tutto chiare (Jjemba, 2001).

L'uso di deiezioni zootecniche come fertilizzante è la via principale d'ingresso nell'ambiente degli antibiotici. Inoltre, questi residui possono essere lisciviati dal suolo attraverso l'acqua e raggiungere i vari corsi d'acqua sia di superficie che di falda (Thiele-Bruhn, 2003).

Ad esempio, sono state ritrovate concentrazioni di antibiotici sulla superficie e in profondità dei corsi d'acqua, nell'acqua potabile, nei sedimenti acquatici e nel suolo (Thiele-Bruhn, 2003).

Queste sostanze non sono molto differenti dagli altri composti chimici, come pesticidi ed erbicidi, che raggiungono il terreno, ma non sono mai stati sufficientemente studiati.

1.1.3 Antibiotici nell'ambiente

La maggior parte degli antibiotici veterinari sono espulsi dopo la terapia intracorporea o sono risciacquati con acqua se applicati sull'epidermide. Conseguentemente, gli antibiotici raggiungono i suoli agricoli direttamente attraverso il pascolo o con l'utilizzo dei letami come fertilizzanti. La percentuale di SAs e TCs che riescono a superare il tratto gastro-intestinale è tra il 40 e il 90% di quello ingerito (Thiele-Bruhn 2003).

Le principali vie d'ingresso di questi farmaci impiegati in zootecnia nell'ambiente sono (Sukul and Spiteller, 2006):

- attraverso i sedimenti degli impianti di acquacoltura dopo la somministrazione di antibiotici nel cibo;
- attraverso l'applicazione di fertilizzante sul terreno che hanno origine dal letame degli animali trattati;

La degradazione fotochimica è considerata una delle principali vie di degradazione abiotica dei SAs. Essa dà luogo alla degradazione di molti antibiotici, che può avvenire attraverso la luce diretta o con la formazione di specie con elettroni spaiati ($^1\text{O}_2$), radicale ossidrilico ($\cdot\text{OH}$) e altre specie reattive formate nell'acqua sotto la luce del sole (Sukul and Spiteller, 2006).

In riferimento alla luce solare diretta, i composti che non assorbono i raggi UV al di sopra dei 290nm non si rompono direttamente con i meccanismi di fotochimici poiché lo strato di ozono assorbe tutta la radiazione solare al di sotto dei 290 nm (Sukul and Spiteller, 2006).

Le sostanze uniche possono assorbire molta irradianza solare nella regione UV e possono agire come iniziatore dei processi di degradazione di queste sostanze che non subiscono direttamente la fotolisi (Sukul and Spiteller, 2006).

La fotodegradazione in acqua di ogni composto diminuisce con la profondità, mentre, nel suolo, il processo interessa una piccola porzione di molecole, poiché agisce solo sulla superficie del terreno; una parte degli antibiotici penetra nei pori del terreno e riceve protezione dai raggi solari, specialmente in presenza di acqua allo stato liquido (Sukul and Spiteller, 2006).

Un altro fattore abiotico importante di degradazione dei SAs è l'idrolisi acida, che ha come prodotti finali un acido sulfanilico e il rispettivo derivato amminico (Sukul and Spiteller, 2006).

A. Acque e suolo

Gli antibiotici sono largamente usati nelle aziende suinicole, soprattutto nei periodi degli svezzamenti, per prevenire lo scoppio di malattie respiratorie. Ciò può portare alla presenza di grosse concentrazioni di antibiotici nelle feci e nelle urine degli animali (Migliore et al., 2009).

Ad esempio le TCs, usate nei pasti medici e somministrate in concentrazioni intorno ai mg/kg, a causa della loro farmacocinetica e stabilità sono ritrovate in concentrazioni dell'ordine di vari ppm nel letame del bestiame, anche dopo l'appropriato periodo di stoccaggio (Migliore et al., 2009).

La minima concentrazione di inibizione dei SAs per *Escherichia coli* è di solito al di sotto di 1 mg/kg. I SAs, utilizzati in acquacoltura, in agricoltura come erbicidi, in zootecnia come misura preventiva e nei trattamenti di infezioni nelle vie urinarie e respiratorie umane, sono stati ritrovati nell'ambiente a concentrazioni tra 0.13 e 1.9 µg/l (Sukul and Spiteller, 2006).

Molti SAs sono stati ritrovati nei suoli agricoli dopo la fertilizzazione con liquami di origine animale. Sono state individuate concentrazioni massime di 11 µg/kg di sulfametazina, e circa 1 µg/kg per sulfadiazina, sulfamerezina e sulfametazolo (Sukul and Spiteller, 2006).

Dai terreni agricoli, l'acqua raggiunge la falda sotterranea per percolazione e, le acque superficiali per ruscellamento. In questo modo l'acqua trasporta gli antibiotici contaminando sia le acque superficiali e che le sotterranee. La presenza di sulfametazina ad una concentrazione di 0.24 µg/l nelle acque sotterranee a circa 1.4 m al di sotto della superficie di terreni fertilizzati con liquame animale, ha dimostrato la lisciviazione del farmaco dalla superficie al sottosuolo (Sukul and Spiteller, 2006). In Inghilterra, è stata riscontrata le

presenza di SAs e TCs nelle acque fluviali. È stata riscontrata una concentrazione media di 1 µg/l, una concentrazione che riduce l'attività microbica nei biotest (Thiele-Bruhn, 2003).

La mobilità e la porzione biodisponibile di antibiotici è influenzata dall'assorbimento del terreno che ne determina la distribuzione e il trasferimento tra le fasi. L'assorbimento della maggior parte degli antibiotici non è soltanto caratterizzato dalle loro proprietà idrorepellenti, ma intervengono altri meccanismi quali lo scambio ionico, il legame cationico e il legame idrogeno. Pertanto, la mobilità è influenzata dalla quantità, dalla composizione e dalla struttura dei colloidi del terreno (Sukul and Spiteller, 2006).

L'assorbimento degli antibiotici farmaceutici è principalmente influenzato dal pH del suolo, dalla sostanza organica e dai minerali del suolo; inoltre, è stato dimostrato che anche la diffusione attraverso i pori del terreno contribuisce all'assorbimento. L'assorbimento di numerosi SAs è più forte nei terreni argillosi che in quelli sabbiosi (Thiele-Bruhn, 2003).

L'assorbimento e la fissazione degli antibiotici è fortemente regolata dalla proprietà di numerosi composti ionizzatori presenti nel terreno, in relazione al pH del terreno. Il coefficiente di assorbimento (K_d) dei SAs aumenta da <1 a 30 quando il pH del suolo passa da 8 a 4. Questo è relazionato alla ionizzazione dei sulfamidici anfoterici (Thiele-Bruhn, 2003).

La porzione estraibile dal suolo di sulfadiazina diminuisce rapidamente in funzione del tempo, come dimostrato in un esperimento con tempi di incubazione di 30 giorni circa. I SAs hanno un alto potenziale di assorbimento da parte del suolo e dai costituenti del letame, mentre le vie di trasformazione, quali assorbimento nella biomassa microbica o mineralizzazione, interessano circa il 2% della quantità iniziale di sulfadiazina (Hammesfahr et al., 2008).

B. Piante

Una volta che il letame è applicato ai suoli agrari, le colture sono esposte all'antibiotico per un periodo di tempo che varia da qualche giorno a qualche mese in relazione al tipo di antibiotico, alla dose e alle interazioni con il suolo e i fattori ambientali (Dolliver et al., 2007).

La maggior parte delle ricerche effettuate, sulla fitotossicità degli antibiotici, hanno mostrato una significativa riduzione delle radici, nella lunghezza dello stelo e nella lunghezza delle foglie in *Panicum miliaceum* L., *Pisum sativum* L. e *Hordeum vulgare* L.; questa fitotossicità è stata attribuita all'effetto di bioaccumulo di questa sostanza all'interno delle piante (Dolliver et al., 2007).

L'assorbimento degli antibiotici e i loro effetti sulle piante varia molto nelle varie ricerche perché dipende dall'antibiotico usato e dalla specie vegetale.

Le piante possono prelevare l'acqua contaminata dalla falda, e perdite nelle discariche o negli impianti di trattamento delle acque che riversano nei corsi di acqua possono esporre la vegetazione a questi prodotti se le acque vengono utilizzate per l'irrigazione (Jjemba, 2001).

Concentrazioni di 300 mg/l di sulfadimetossina riducono significativamente la crescita di *Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L., *Rumex acetosella* L. e *Zea mays* L. cresciute in vitro. Questa ridotta crescita è stata attribuita al bioaccumulo della sulfadimetossina nelle radici e nelle foglie. Il bioaccumulo è maggiore nei suoli con meno humus, suggerendo che in concentrazioni di humus maggiori, una parte dei composti può essere adsorbita dalla sostanza organica e quindi sottrarla all'assorbimento da parte delle piante (Jjemba, 2001).

Piante di *Phaseolus vulgaris* L. cresciute con ossitetracicline e clorotetracicline mostrano una riduzione degli internodi, del peso fresco e dell'assorbimento di Ca, K e Mg. Al contrario varietà di *Triticum* L. hanno dimostrato un aumento della crescita in presenza di clorotetracicline e ossitetracicline, mentre le piante di *Zea mays* L. non hanno risentito di nessun effetto anzi l'assorbimento di Ca, K e Mg è stato maggiore in presenza di questi antibiotici (Jjemba, 2001).

In un altro studio è stato valutato l'assorbimento di sulfametazina in *Zea mays* L., *Lactuca sativa* L. e *Solanum tuberosum* L. concimate con letame contenente l'antibiotico alle concentrazioni di 0, 50 e 100 µg/l. Dopo 45 giorni di crescita in tutte e tre le culture è stata riscontrata la presenza di sulfametazina a concentrazioni variabili tra 0.1 a 1.2 mg/kg di peso secco, con i dosaggi maggiori in *Zea mays* L. e *Lactuca sativa* L. Inoltre è stata riscontrata una corrispondenza tra concentrazione di crescita e concentrazione nei tessuti. Nello stesso esperimento è stata misurata anche la concentrazione di sulfametazina all'interno dei tessuti dei tuberi di patata raccolti dalle piante esposte a più alte concentrazioni di antibiotico. Dall'analisi è emerso che la concentrazione più alta (4.0 mg/kg) si trovava nelle radici, mentre la buccia della patata ha mostrato una concentrazione di circa 1.5 mg/kg e nella polpa 0.5 mg/kg. Nel suolo, invece, è stata riscontrata una concentrazione di 2.4 e 3.6 mg/kg nei terreni trattati con 50 e 100 mg di sulfametazina (Dolliver et al., 2007).

In un altro esperimento, alcune piante di *Zea mays* L. sono state sottoposte a crescita in presenza di 5 mg di ossitetraciclina e 8 mg di clorotetraciclina, ed altre a concentrazioni di 3 mg e 1 mg rispettivamente. Dopo 45 giorni di crescita all'aperto non sono state riscontrate concentrazioni apprezzabili di tetracicline nel terreno e nelle piante (radici, fusto, foglie) ma entrambi i lotti sperimentali hanno mostrato la stessa crescita bifasica corrispondente ad una curva dose/effetto ormetica (Migliore et al., 2009).

In un ulteriore studio è stata testata la tolleranza di *Salix fragilis* L. a diverse concentrazioni di sulfadimetossina. Le concentrazioni di esposizione erano 0, 0.5, 1 e 2 mM, corrispondenti rispettivamente a 0, 155, 310 e 620 mg/l, per più di un mese. Dopo 25 giorni di crescita è stata constatata una riduzione nella quantità di elettroni trasportati nella fotosintesi e una diminuzione nella fotosintesi netta nella concentrazione più alta di antibiotico. Inoltre sono state riscontrate alterazioni nella morfologia radicale, ma anche un elevato potenziale di bioaccumulo di sulfadimetossina nelle radici di *Salix fragilis* L. (Michelini et al., 2012). Studi eseguiti con concentrazioni più basse di sulfadimetossina (0.01-10 mg/L di soluzione nutritiva) hanno, invece, dimostrato una relazione dose/effetto di tipo ormetico sulla crescita delle radici di salice (Toscano, 2011).

In un altro esperimento è stata analizzata la presenza e la distribuzione nella pianta dei più tipici antibiotici ad uso veterinario in piante di ravenello, colza, sedano e coriandolo distribuite in varie zone della Cina in presenza di sulfametazolo, sulfadossina, tetracicline, provenienti da diverse zone della Cina (Hu X. Et al., 2010). I risultati non mostrano una sostanziale differenza geografica nell'accumulo nelle piante e nella ripartizione degli antibiotici tra suolo e letame. Gli antibiotici si muovono prevalentemente insieme all'acqua e grazie all'assorbimento passivo da parte delle piante. Le concentrazioni maggiori di antibiotici sono state trovate all'interno delle foglie e la più bassa nelle radici, rappresentando una sorta di accumulo biologico. I residui di antibiotici in tutti gli esempi hanno mostrato una concentrazione maggiore in inverno che in estate (Hu X. et al., 2010).

Il potenziale impatto di sei antibiotici (clorotetracicline, tetracicline, tilosina, sulfametazolo, sulfametazina e trimetoprim) è stato testato sulla crescita di alcune piante (*Oryza sativa* L., *Cucumis sativus* L. e *Cichorium endivia* L.) e nel suolo. I test di germinabilità hanno dimostrato che gli antibiotici possono incidere negativamente sulla germinabilità dei semi, ma l'effetto varia a seconda dell'antibiotico e della specie vegetale utilizzata. *Cichorium e.* è stata la specie più sensibile ai 6 antibiotici utilizzati anche se con una certa variabilità di risposta. TCs e SAs hanno dimostrato un maggiore effetto negativo sulla germinabilità, mentre tilosina e trimetoprim sono stati gli antibiotici con minore effetto. Nei test sulla crescita delle piante solo i SAs (sulfametazolo e sulfametazina) hanno influenzato fortemente la crescita di *Oryza s.* nel suolo mentre nessun cambiamento importante è stato notato nei trattamenti con gli altri antibiotici. Questo è in contrasto con i test di germinabilità che hanno mostrato un effetto inibitorio, sia egli SAs che delle TCs. *Cucumis s.* è stato meno sensibile di *Oryza s.* agli antibiotici (Liu et al., 2008).

C. Microorganismi

In uno studio sulla respirazione microbica in presenza di 6 antibiotici (clorotetraciclina, tetraciclina, tilosina, sulfametazolo, sulfametazina e trimetoprim), è stata riscontrata una dipendenza effetto-tempo di esposizione. Il recupero e l'aumento della respirazione microbica può essere attribuita alla diminuzione della frazione di antibiotico biodisponibile, e a un adattamento o resistenza dei microorganismi.

Sulfametazolo, sulfametazina e trimetoprim hanno un effetto temporale sulla respirazione microbica, mentre tetraciclina, clorotetraciclina e tilosina hanno mostrato degli effetti più lievi. Questa differenza può essere spiegata con il differente assorbimento degli antibiotici da parte del suolo e la chelazione con i metalli presenti, che gioca un ruolo importante in presenza di tetraciclina e la tilosina (Liu et al., 2008).

La risposta dei microorganismi del suolo è stata testata con l'applicazione di letame contaminato da sulfadiazina (SDZ) in un esperimento di incubazione di 57 giorni. I risultati hanno mostrato chiaramente una modifica nella struttura e nell'attività microbica del suolo nel breve periodo di 8 settimane. Inoltre, gli effetti sono differenti se si utilizza letame fresco o letame stoccato 6 mesi prima. Questa differenza è attribuita alla differente frazione di SDZ biodisponibile, alla differenza di comunità microbiche inoculate (adattamento, resistenza) con il letame incubato e alla differenza di disponibilità di nutrienti del substrato ai microorganismi (Hammesfahr et al., 2010).

Una singola applicazione di SDZ, in combinazione con il letame, guida la struttura della comunità batterica verso un cambiamento. Questo cambiamento aumenta all'aumentare della concentrazione iniziale di SDZ somministrata, ma gradualmente diminuisce e la differenza più significativa è riscontrata in base al tipo di terreno utilizzato. Inoltre, la SDZ esibisce un effetto prolungato nel tempo verso le comunità microbiche, anche se in contrasto con la cinetica della SDZ nel suolo.

Infatti, prolungate e ripetute applicazioni di letame, come avviene nelle pratiche agricole attuali, attuano dei sistemi di adattamento delle comunità batteriche e/o possono intensificare gli effetti sulla struttura delle comunità (Hammesfahr et al., 2008).

I residui dei composti farmaceutici possono provocare resistenza nei batteri sia direttamente che indirettamente. Questi microorganismi resistenti possono influenzare la normale comunità microbica del suolo e le funzioni del suolo, ed inoltre possono entrare nella catena alimentare degli animali e degli umani. (Thiele-Bruhn 2003)

La resistenza agli antibiotici è la capacità di un microorganismo di resistere all'azione di un antibiotico. Quando ciò è dovuto alla natura del microorganismo stesso questa si chiama

resistenza intrinseca. In tal caso il microorganismo in questione non è mai stato sensibile a un particolare antimicrobico. In altri casi, ceppi batterici che in precedenza erano sensibili a un particolare antimicrobico sviluppano resistenza nei sui confronti. Si tratta della cosiddetta resistenza acquisita. Microbi che sono resistenti a un tipo di antibiotico possono ancora essere sensibili ad altri tipi (Min. Salute, 2011).

Lo sviluppo di resistenza acquisita avviene attraverso “la selezione naturale”. Dal momento che i batteri possono riprodursi molto rapidamente e in relazione all’enorme numero di microorganismi presenti nell’ambiente, lo sviluppo della resistenza microbica può verificarsi in tempi relativamente brevi.

L’antibiotico-resistenza acquisita può svilupparsi con due modalità (Min. Salute, 2011): in un caso spontaneamente da una mutazione casuale del materiale genetico del microorganismo che lo rende resistente ad un certo tipo di antibiotico, nell’altro attraverso l’acquisizione di geni di resistenza direttamente da altri microbi. Il batterio che trasmette il gene di resistenza può non essere di per sé un agente patogeno. Quindi, un organismo non patogeno può sviluppare la resistenza e poi passarla a uno patogeno. Ciò è particolarmente importante nei batteri.

La resistenza agli antibiotici dei microorganismi del suolo non è solo provocata dall’input di antibiotico nell’ambiente, ma i batteri resistenti possono essere direttamente inseriti nell’ambiente attraverso i liquami usati per fertilizzare il terreno. Un alto numero di specie resistenti a numerosi antibiotici sono stati ritrovati negli escrementi di maiali in allevamenti di Olanda e Svezia. (Thiele-Bruhn, 2003)

La resistenza alle sostanze antimicrobiche non si sviluppa soltanto nei confronti di molecole di antibiotici, ma anche nei confronti di altre categorie di sostanze chimiche, come ad esempio disinfettanti (es. sali quaternari di ammonio) e composti di metalli, utilizzati nell’alimentazione degli animali da reddito come condizionatori della flora microbica e promotori di crescita, come ad esempio es. Solfato di rame, Ossido di Zinco (Min. Salute, 2011).

I batteri patogeni resistenti non necessariamente provocano gravi malattie rispetto a quelli più sensibili ma la patologia diventa più difficile da trattare, in quanto risulterà efficace una ridotta gamma di farmaci antimicrobici e ciò può dar luogo a un decorso più lungo o a maggiore gravità della malattia (Min. Salute, 2011).

D. Mammiferi

Nei mammiferi, il metabolismo degli antibiotici è bifasica. Con l'aiuto di monossigenasi, reductasi e idrolasi, la maggior parte degli antibiotici subisce la prima trasformazione. In seguito le molecole diventano a carattere più idrofilico dopo una coniugazione covalente, perdendo la loro attività biologica e diventano più facilmente eliminabili attraverso le urine e le feci.

Le vie metaboliche della sulfadiazina sono state studiate in un esperimento sui ratti. È stata somministrata un'unica dose orale di 30 mg/kg di SDZ, marcata radioattivamente, e l'87% e il 15% della radioattività è stata trovata rispettivamente nelle urine e nelle feci. La SDZ e N⁴-acetilsulfadiazina rappresentavano il 56% e il 19%, rispettivamente, della radiazione nelle urine nelle prime 24 ore dopo la somministrazione (Sukul and Spittler, 2006).

1.1.4 I Sulfamidici e la sulfadiazina

I sulfamidici (SAs) (Fig. 1.1) sono una classe di antibiotici di sintesi. Strutturalmente derivano tutti dall'ammide dell'acido solfanilico o p-amminobenzenzolfonico, detta sulfanilammide, in cui di solito uno degli idrogeni del gruppo amminico legato allo zolfo è sostituito con un residuo organico di diversa struttura. Per estensione, il termine sulfamidico designa anche sostanze antibiotiche in cui il gruppo sulfamidico SO₂NH₂ è stato sostituito con un gruppo solfone, solfossido, tiosolfone, ecc. (Rizzoli-Larousse, 1989).

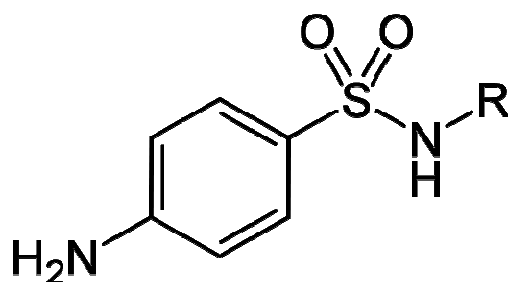


Figura 1.1 Struttura chimica di un generale sulfamidico

L'origine dell'impiego terapeutico dei SAs risale alla constatazione dell'azione antistreptococcica della solfocrisoidina, da parte di Domagk nel 1935. Tale composto libera nell'organismo la sulfanilamide, di cui si poterono dimostrare le proprietà batteriostatiche. Le ricerche farmacologiche successive hanno portato alla preparazione di un gran numero di sulfamidici, ognuno dotato di una particolare attività antimicrobica, che può essere più o

meno protratta nel tempo, anche perché alcuni ceppi microbici sono capaci di sviluppare una certa resistenza (Rizzoli-Larousse, 1989).

Nella Figura 1.2 è schematizzato il processo di formazione della sulfonamide a partire dall'acetanilide.

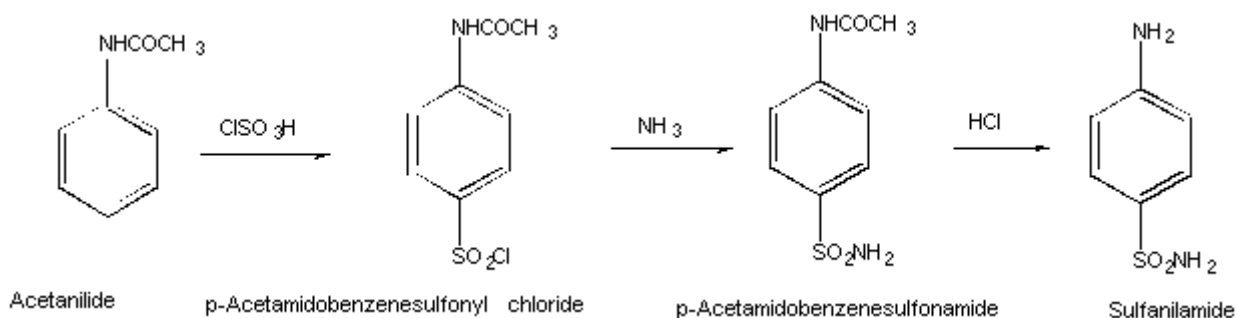


Figura 1.2 Schema della produzione di Sulfanilamide a partire dall'acetanilide

SAs con diverse caratteristiche fisiche, chimiche, farmacologiche e antibatteriche sono prodotti unendo dei sostituenti al gruppo ammidico (R-SO₂-NH-R) del nucleo sulfanilamidico. Nella tabella seguente (Tab. 1.1) sono riportati il nome comune e scientifico di alcuni SAs.

Essi tendono ad essere molto più solubili a pH alcalino che non acido. Per la maggior parte sono preparati come sali di sodio, potendo quindi essere utilizzati per somministrazioni (Katzung, 2006).

Essi generalmente presentano due pK_a relative alla protonazione del gruppo aminico a pH 2-3 e alla deprotonazione a pH 5-11 del gruppo amidico (Sukul and Spitteller, 2006).

Nome comune	Nome chimico
Sulfammide	p-amminobenzen sulfonammide
Sulfadiazina	p-amminobenzen sulfonammidopirimidina
Sulfametazina	p-amminobenzen sulfonammidometilpirimidina
Sulfatiazolo	p-amminobenzen sulfonammidotiazolo

Tabella 1.1 I principali sulfamidici (Rizzoli-Larousse, 1989)

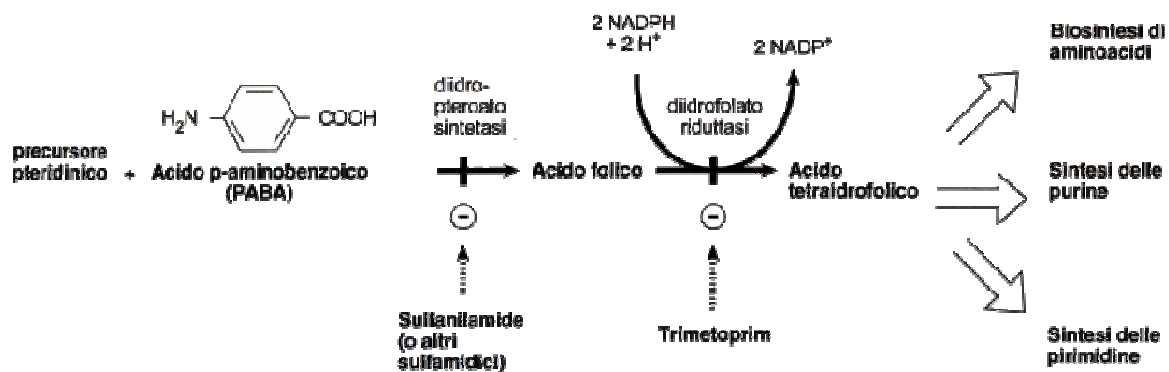


Figura 1.3 Schema della conversione dell'Acido p-aminobenzoico (PABA) in metaboliti

I SAs agiscono attivamente come inibitori della diidropterato sintetasi (DHPS) che catalizza la conversione dell'acido p-aminobenzoico (PABA) in diidropterato (AHHDM), un precursore della sintesi dei folati (Fig. 1.3). L'acido tetraidrofólico (THF) è coinvolto nella via biosintetica dei nucleotidi che sono elementi essenziali nella formazione del DNA e RNA. Il risultato è l'inibizione della sintesi degli acidi nucleici e di conseguenza delle proteine (Baran et al., 2011).

I SAs, inoltre, inibiscono la permeabilità della membrana cellulare batterica all'acido glutammico, che è un altro elemento essenziale nella sintesi dell'acido folico (Baran et al., 2011).

Essi non hanno solo effetto sui batteri ma possono avere effetti ancora sconosciuti sui organismi che non sono il loro target di azione, come alghe unicellulari, invertebrati, pesci e piante; salendo lungo i livelli trofici ambientali gli organismi sono esposti a differenti concentrazioni di SAs (Bialk-Bielinska et al, 2011).

Gli animali, uomo compreso, necessitano di acido folico preformato e quindi sfruttano quello presente negli alimenti non essendo in grado di sintetizzarlo *de novo* a partire da precursori più semplici. Diversi microorganismi batterici sono viceversa incapaci di assorbire l'acido folico dal mezzo in cui crescono (poiché non possiedono meccanismi di trasporto attivo in grado di fare attraversare all'acido folico la parete cellulare) mentre sono provvisti di sistemi enzimatici in grado di biosintetizzarlo. Microorganismi che, come i mammiferi, utilizzano acido folico preformato, sono invece meno sensibili all'azione dei SAs.

I gruppi amminico e sulfonamidico devono trovarsi in posizione 1,4 tra loro e il gruppo amminico libero da sostituenti è essenziale per l'attività dei SAs.

I SAs sono composti solidi, scarsamente solubili in acqua, solubili sia in acidi minerali che in alcali con formazione di sali a carico della funzione amminica e sulfonamidica, rispettivamente.

Negli animali, la principale sede di assorbimento è l'intestino tenue, ma una certa quota è già assorbita a livello gastrico; vengono metabolizzati prevalentemente attraverso reazioni di acetilazione e di glicuronazione dell'azoto, con formazione di prodotti inattivi.

Ad eccezione dei SAs intestinali che sono eliminati attraverso le feci, gli altri sono escreti prevalentemente attraverso le urine. La frazione acetilata di alcuni dei SAs più vecchi tende a precipitare nelle vie urinarie (cristalluria), provocando complicazioni a loro carico.

I SAs, inibiscono batteri Gram-positivi e negativi, *Nocardia*, *Chlamydia*, *Trachomantis* e alcuni protozoi. Al contrario, può capitare che altri microorganismi, come *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* non sono inibiti. Stranamente, le *Rickettsiae* non sono inibite dai sulfonamidici, ma anzi la loro crescita è stimolata (Katzung, 2006)

I SAs sono largamente utilizzati in zootecnia per prevenire e curare le malattie degli animali e, fino a poco tempo fa in Italia, per aumentare l'efficienza della conversione del cibo.

Grazie al loro basso costo unito all'ampio spettro di azione contro i microorganismi patogeni, i SAs sono adeguati alle cure di routine nel trattamento di bestiame. La loro somministrazione avviene oralmente in caso di infezioni batteriche in suini, bovini e pollame.

I SAs mostrano un spettro antibatterico larghissimo, che include molti batteri e protozoi. Tuttavia la comparsa di ceppi resistenti e l'introduzione di altri antibiotici ne hanno ampiamente limitato l'uso.

Resistenza ai SAs può verificarsi o in conseguenza a mutazioni che causano sovrapproduzione di PABA, o con la produzione di un enzima sintetizzante l'acido folico che ha una bassa affinità per i sulfonamidici, o una perdita di permeabilità ai sulfonamidici. (Katzung, 2006)

La *Sulfadiazina* (SDZ) (4-Amino-N-2-pirimidinil-benzensulfonamide) (Fig. 1.4) è un derivato diazinico della sulfanilamide e viene usata nel trattamento di numerose infezioni batteriche causate da *Escherichia coli*, da *Neisseria* e streptococchi.

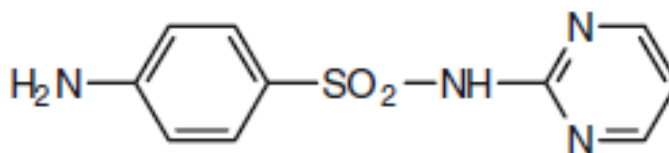


Figura 1.4 Struttura chimica della sulfadiazina (Sukul and Spitteller, 2006)

La SDZ è largamente utilizzata negli allevamenti suini. Essa viene rilasciata dagli animali trattati con le deiezioni e solo il 4% resta all'interno dei corpi dei suini curati. L'applicazione di letame contaminato in suoli agrari ha portato ad una contaminazione da antibiotico sino a 90 µg/kg estraibili. (Hammesfahr, 2010).

1.2 Corylus avellana L. (nocciolo), struttura ed ecologia

Botanicamente il *Corylus avellana* L. (nocciolo) appartiene all'ordine delle *Fagales* e alla famiglia delle *Betulaceae*, alla quale appartengono altre specie forestali e ornamentali suddivise in due sezioni: le *Betuleae* (*Betula*, *Alnus*) e le *Coryleae* (*Corylus*, *Carpinus*, *Ostrya*).

Le specie più importanti sono *C. avellana* (il nocciolo comune), *C. maxima* (il nocciolo gigante) e *Colubrina* (il nocciolo turco).

Il nocciolo (Fig. 1.5 e 1.6) è un arbusto caducifoglio e generalmente non supera i 5-6 metri, raramente può diventare un albero di 20 m di altezza. Ha un portamento arbustivo con numerosi fusti eretti, ramificati sin dalla base. La chioma è allargata, fitta e ampia con diametro massimo di 4 metri. Si presenta piuttosto irregolare o smembrata in varie fronde (Proietti Zolla, 2006).



Figura 1.5 Arbusto di *Corylus avellana* L. (nocciolo)

Dalla ceppaia e dalle radici nascono germogli che danno origine a nuovi fusti e nuove piante sino a formare delle vere e proprie macchie. Si tratta infatti di una pianta con elevata attitudine ad emettere polloni (Proietti Zolla, 2006).

Il legno è di colore bianco-rossastro, senza variazioni intense di colore, con anelli di accrescimento annuale regolari e poco appariscenti.

Il tronco ha corteccia liscia e compatta, solo leggermente screpolata. Il suo colore è il grigio, che può tendere al bruno o al rosso; è tipica e riconoscibile: sulla superficie infatti sono

presenti numerose cellule dalla forma di lenti, attraversate da una fessura, molto evidenti al tatto (Proietti Zolla, 2006).

I rami sono flessibili e hanno un andamento eretto, con corteccia sottile di color dal verde al brunastro ramato, liscia e lucida, ornata di numerose lenticelle chiare e orizzontali (Proietti Zolla, 2006).

Le foglie sono disposte sui rami in modo alterno e hanno una forma quasi rotonda, con apice appuntito e margine dentato. Tale dentatura è sinuosa alla base della foglia, mentre diventa regolare verso l'apice con una superficie fogliare superiore pelosa, color verde scuro; quella inferiore si presenta coperta da fine peluria, più chiara di quella superiore e vellutata (Proietti Zolla, 2006).

Le gemme hanno forma ovoidale con l'apice schiacciato, disposte in modo alterno e protette da spesse perule (Proietti Zolla, 2006).

Il nocciolo è una specie monoica e diclina, cioè ha sulla stessa pianta i fiori femminili e maschili, i quali hanno periodi di maturazione e sviluppo differenti. I fiori sono precoci e riuniti in inflorescenze unisessuali che si sviluppano molto prima delle foglie, da gennaio ad aprile.



Figura 1.6 Illustrazione nocciolo (Wilhem O., 1885)

Quelli maschili sono visibili sin dal periodo invernale, sono sprovvisti di involucro e sono riuniti in spighe giallastre e pendenti lunghi 2-8 cm. Con la fioritura, che avviene a fine

inverno (da gennaio a marzo), prima della fogliazione, essi assumono un colore giallo dorato allungandosi sino ad oltre 10 cm (Proietti Zolla, 2006).

I fiori femminili sono singoli o in piccoli gruppi di 2-4, assomigliano a minuscole gemme con un ciuffetto rossastro all'apice; sono disposti sugli stessi rami dei fiori maschili, riuniti e racchiusi da brattee verdastre, poco visibili, dalle quali spuntano gli stami filiformi e rossi che ricevono il polline dei fiori maschili. Il polline si diffonde con il vento a fine inverno-primavera, ma la fecondazione avverrà solo successivamente con la formazione completa dell'ovario.

Il frutto (nocciola) è un achenio racchiuso da due brattee che formano un involucri fogliaceo, carnoso alla base, aperto e sfrangiato all'estremità (Proietti Zolla, 2006).

L'achenio è composto da un guscio esterno legnoso, di forma ovale globosa lungo 1,5-3 cm, contenente il seme vero e proprio, la nocciola, edule, riuniti in gruppi di 1-4. La maturazione avviene a fine estate o in settembre in relazione all'altitudine e al clima (Proietti Zolla, 2006).

L'apparato radicale si estende oltre la proiezione della chioma e si sviluppa in profondità, in prevalenza nei primi 50 cm, in funzione della natura del terreno, una sorta di maglia di radici piuttosto grande. Le radici nel nocciolo hanno una grande capacità di produrre polloni e se riescono a svilupparsi, possono essere separati dalla pianta madre per dare vita a nuovi individui.

Pur non essendo una pianta longeva, è molto diffusa per le sue caratteristiche rustiche. Si adatta infatti ai terreni più diversi, avendo come unica necessità la presenza di sali minerali. Il substrato sul quale vegeta meglio e fornisce le migliori produzioni è quello permeabile, fertile, con pH da 5.5 a 7.8, con contenuto in calcare attivo inferiore all'8%.

Il nocciolo è una pianta molto comune dalla zona mediterranea a quella appenninica, dove si spinge fino a 1200 m. Preferisce le regioni con inverni miti ed umidi ed estati fresche. Per questo motivo la maggior parte della produzione è localizzata vicino ad ampi corsi di acqua a medie latitudini.

Partecipa alla costituzione di boschi misti di latifoglie, prestandosi bene anche alla colonizzazione di suoli denudati e franosi. Viene spesso utilizzato su terre vergini, o per consolidare scarpate e luoghi soggetti a dissesto idrogeologico, a scopo paesaggistico-ambientale per la creazione di siepi e macchie, ma più spesso è coltivato a nocciolati per la produzione del frutto, del quale si utilizza il seme per consumo alimentare e per l'industria dolciaria ed oleifera.

Il nocciolo è sensibile alla carenza idrica, che influisce negativamente sull'attività fotosintetica e sull'efficienza fogliare, sulla crescita nei primi anni e sulla produttività. Lo stress idrico provoca una depressione più o meno accentuata di traspirazione e attività fotosintetica ed un abbassamento del potenziale idrico fogliare, in particolare nelle ore centrali della giornata.

Il nocciolo necessita di terreni esposti al sole oppure in semi ombra, meglio se con luce filtrata dai rami di altre piante. L'esposizione al vento non provoca grossi disagi, in quanto il suo legno è resistente ed elastico.

E' una pianta resistente al freddo ma le gelate tardive possono danneggiare lo sviluppo, stesso problema riscontrato in caso di siccità.

1.2.1 Principali avversità biotiche del nocciolo

Il nocciolo viene considerato una pianta rustica che non necessita di particolari cure, cosicché i coltivatori si limitano a pochi interventi di tipo agronomico-culturale.

Principali malattie ed eziologia fungina (Proietti Zolla, 2006):

- *Mal dello stacco*: che causa lesioni e deperimenti alle parti legnose dovute al fungo *Cytospora corylicola* Sacc. Queste alterazioni rendono il cilindro legnoso più vulnerabile all'azione del vento creando una spaccatura trasversale del fusto.
- *Gleosporiosi*: disseccamenti dei rametti di nocciolo causati dal fungo *Gloeosporium coryli* Desm. I sintomi si evidenziano alla ripresa vegetativa quando le squame esterne delle gemme infette risultano del tutto o in parte imbrunite. Le gemme infette possono morire ancora chiuse e l'infezione si propaga spesso anche al nodo portando a morte tutto il rametto.
- *Mal bianco delle foglie di nocciolo*: dovuto al fungo *Phyllactinia guttata* Lev. Le foglie infette ingialliscono e cadono prematuramente.
- *Marciume delle radici*: causate dai funghi *Armillaria mellea* (Vahl.) e *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. Le piante colpite presentano una vegetazione stentata, clorosi fogliare ed un deperimento più o meno rapido, fino all'avvizzimento dell'intera pianta. A livello delle radici si nota una fitta rete di micelio del fungo di colore bianco. I cordoni rizomorfi possono diffondersi alle altre piante.

Tra le malattie dovute a batteri le più importanti sono (Proietti Zolla, 2006):

- Batteriosi dovuta a *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* che attacca i frutti e le gemme ma anche rami e foglie. Il batterio produce aree brune sulle foglie e sulla cupola dei frutti ed aree necrotiche sui rami dalle quali esce un essudato.
- Moria del nocciolo : La malattia si presenta con una serie di manifestazioni caratteristiche che si evidenziano a partire dalla primavera. Si nota dapprima l'indebolimento di una sola branca con le foglie che virano verso il verde sempre più pallido fino ad appassire. In una sola settimana la branca va incontro a morte e il tutto avviene così rapidamente che foglie e frutti rimangono attaccati ad essa. Lungo le branche sono inoltre presenti delle macchie brune che segnalano zone di tessuto legnoso idropiche. Il marciume si estende successivamente al resto della pianta e anche se l'anno successivo si differenziano nuovi polloni, questi disseccano nel giro di qualche anno. L'infezione dovrebbe avvenire in autunno quando la caduta delle foglie lascia degli spazi aperti attraverso le ferite fogliari.

Tra i parassiti animali più dannosi per il nocciolo ricordiamo (Proietti Zolla, 2006):

- L'acaro eriofide *Phytoptus avellanae* Nal. che attacca le gemme del nocciolo;
- Gli afidi infestanti polloni, giovani germogli e foglie quali il *Corylobium avellanae* e il *Myzocallis coryli*;
- Il balanino *Curculio nucum*, che è l'insetto più dannoso per il nocciolo in Europa e in Asia, le cui larve infestano il frutto;
- La cerambice *Oberea linearis* che scava gallerie nel legno della pianta;
- Le cicaline, la cui infestazione provoca tipici schiarimenti sulle foglie;
- Diverse specie di cimici quali: *Gonocercus acuteangulatus*, la cimice verde *Nezara viridula* e *Palomena prasina*, ecc., le quali provocano infestazioni sulle giovani nocciole impedendo lo sviluppo del seme;
- Lo scolitide *Anisandrus dispar* F. La femmina di questo insetto scava delle gallerie sull'asse longitudinale del tronco in cui depone le uova. Oltre al danno diretto vi è anche una dannosità indiretta dovuta all'apertura di ferite nella pianta ed alla trasmissione passiva di agenti patogeni che possono favorire l'insorgere di malattie.
- Il coleottero *Xyleborinus saxeseni* Ratz. che attacca numerose specie arboree ma si riproduce solo su piante deperite o morte per altre cause.
- I lepidotteri defogliatori le cui larve possono provocare danni al fogliame.

1.3 Funghi e simbiosi fungine (micorrize)

Per micorriza si intende un particolare tipo di associazione simbiotica tra un fungo ed una pianta superiore, localizzata nell'ambito dell'apparato radicale del simbionte vegetale, e che si estende, per mezzo delle ife fungine o di strutture più complesse come le rizomorfe, nella rizosfera e nel terreno circostante (Fig.1.7 e Fig. 1.8).

Queste simbiosi sono, nella maggior parte dei casi, di tipo mutualistico, per cui i due organismi portano avanti il loro ciclo vitale vivendo a stretto contatto e traendo benefici reciproci.

Oltre alle micorrize, altri esempi di simbiosi mutualistiche si hanno nei licheni (alghe e funghi), nei coralli (alghe e celenterati) e nelle associazioni tra rizobi e leguminose.

Nella maggior parte dei tipi di micorrize gli scambi nutrizionali consistono sostanzialmente nel movimento di carbonio organico dalla pianta verso il fungo e, nel senso opposto, di sostanze nutritive (come P, N, Zn e Cu) verso la pianta.

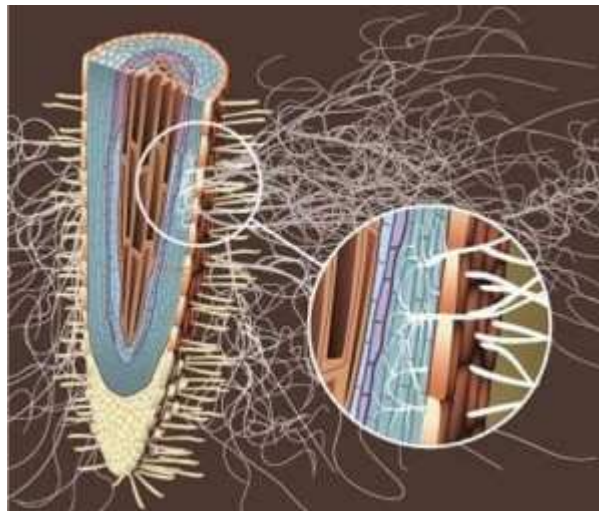


Figura 1.7 Disegno di un'associazione simbiotica tra un apice radicale e un fungo



Figura 1.8 Foto di un'associazione simbiotica tra un apice radicale e un fungo

La funzionalità dipende, dunque, dal trasferimento di carbonio organico derivato dalla fotosintesi dalla pianta alle varie strutture fungine e dalla capacità dei simbionti fungini di captare le sostanze nutritive disponibili in forma inorganica e/o organica nel terreno e di cederle alla pianta attraverso le interfacce simbiotiche.

Ma l'importanza delle micorrize non si riduce soltanto all'assorbimento di acqua e nutrienti dal terreno. Le piante micorrizzate si presentano più competitive e più tolleranti nei confronti degli stress ambientali rispetto alle piante non micorrizzate: il fungo agisce come riserva di acqua e nutrienti, protegge gli apici radicali da parassiti, favorisce l'aumento di batteri utili (alcuni funghi sono simbionti con batteri) apporta benefici non nutrizionali con la produzione di composti esclusivi del fungo.

Inizialmente il fungo è attratto chimicamente dagli essudati radicali nel terreno ed individuato l'apice radicale inizia la sua colonizzazione. La colonizzazione inizia dalla superficie esterna dell'apice che viene avvolto con un rivestimento detto mantello o micoclona; successivamente il fungo produce dei regolatori di crescita che inibiscono la produzione dei peli radicali e inducono l'eventuale ramificazione laterale dell'apice. Contemporaneamente le ife gradualmente si insinuano fra le cellule radicali fino a raggiungere le cellule epidermiche del reticolo di Hartig. I nutrienti vengono immagazzinati a questo livello e vengono prelevati gradualmente dalla pianta.

Gli effetti benefici risultano amplificati quando la micoclona emana cistidi, ife o rizomorfe che, utilizzati come prolungamenti del sistema radicale, aumentando considerevolmente il volume del terreno esplorato (micorrizosfera).

1.3.1 Funghi e batteri endofiti

Vengono comunemente considerati endofiti tutti quei microorganismi, soprattutto funghi e batteri, che stabiliscono un rapporto di endobiosi con le piante.

Per quanto riguarda più da vicino i funghi endofiti, la loro presenza è stata accertata in tutti gli organi: radici, fusto, rami e foglie, sia di angiosperme che di gimnosperme (Deriu, 2009).

Gli endofiti possono colonizzare i tessuti dell'ospite per una parte o per tutta la durata del loro ciclo biologico senza causare sintomi visibili di malattia. In base a questa definizione rientrano tra gli endofiti, i microorganismi mutualisti e commensali che colonizzano le piante in maniera asintomatica, ma non sono esclusi quei microorganismi che al variare delle condizioni fisiologiche dell'ospite possono assumere un comportamento patogenetico (Deriu, 2009).

Gli endofiti possono colonizzare i tessuti delle piante in maniera localizzata e sistemica, sia inter che intracellulare. Inoltre, possono manifestare una specificità d'organo e/o di tessuto come risultato del loro adattamento a differenti condizioni fisiologiche nelle piante e, pertanto, colonizzare solo le foglie o gli aghi, o le radici, o adattarsi a crescere nella corteccia (Deriu, 2009).

La colonizzazione endofitica dei tessuti epigei (in particolare foglie e germogli) è differente da quella delle radici. A tal riguardo, molte ricerche hanno evidenziato che la colonizzazione dei germogli può essere intracellulare e confinata a singole cellule o intercellulare localizzata; mentre la colonizzazione endofitica delle radici avviene generalmente in maniera estensiva sia intra che intercellularmente (Deriu, 2009).

I metaboliti prodotti dagli endofiti possono influenzare la fisiologia delle piante ospiti, migliorandone lo sviluppo vegetativo, la tolleranza agli stress abiotici e l'adattamento a condizioni di aridità. Diversi endofiti producono fitormoni che favoriscono un maggior sviluppo dell'ospite, altri accumulano nella pianta alcaloidi, metaboliti tossici, insetticidi biologici e micotossine di varia natura che influenzano la fisiologia dell'ospite conferendo resistenza, di volta in volta, a stress abiotici (quali terreni salini, bassi pH, metalli pesanti, ecc.) o ad attacchi di funghi e batteri fitopatogeni (Deriu, 2009).

I batteri fitopatogeni sono eterotrofi, di solito a forma di bastoncino, misuranti 0.6-3.5 μm di lunghezza e 0.5-1 μm di larghezza. In ambiente naturale si presentano singoli o aggregati in corte catenelle o in gruppi caratteristici (es. a stella, ad Y, a V) e se sono mobili nuotano per mezzo di lunghi filamenti, detti flagelli. L'intervallo termico ottimale di crescita è compreso tra 25 e 30 °C. Per moltiplicarsi necessitano di un'adeguata nutrizione minerale ed organica, che in natura trovano vivendo in associazione con le piante nella rizosfera, nella fillosfera o al loro interno.

Associati alle piante, i batteri possono essere epifiti o endofiti. Allo stato epifita vivono nel film liquido dove si accumulano gli essudati delle piante, nella rizosfera e nella fillosfera. Allo stato endofita colonizzano gli spazi intercellulari dei tessuti e/o gli elementi conduttori (tracheidi e vasi) dello xilema (habitat apoplastico).

I batteri non sono in grado di superare attivamente (per azione meccanica od enzimatica) le pareti cutinizzate, suberificate e/o lignificate dei tessuti tegumentali. Il passaggio ad endofiti è sempre passivo ed ha luogo in punti dove le barriere sono naturalmente od occasionalmente interrotte, di norma in presenza di acqua stagnante. Poche ore dopo la penetrazione, i batteri iniziano a moltiplicarsi ed a colonizzare i tessuti solo se hanno la capacità di prevenire, evitare o superare le reazioni di difesa messe in atto dalla pianta.

Divenuti endofiti possono avere attitudini biotrofiche o necrotrofiche; quelli biotrofici riescono a convivere temporaneamente con le cellule vegetali senza arrecare danni irreversibili, si nutrono di soluti apoplastici resi disponibili dalle cellule vegetali sotto l'effetto dei fattori di virulenza; quelli necrotrofici, invece, uccidono le cellule vegetali servendosi di propri enzimi degradativi extracellulari e si nutrono di soluti resi liberi dalla degradazione dei polimeri delle pareti vegetali.

1.3.2 Tuber aestivum (or uncinatum)

Il *Tuber aestivum*, come molti altri funghi è un simbiote che vive in associazione nutrizionali con alberi ed arbusti. Sede della simbiosi sono gli innumerevoli apici radicali della pianta ospite, deputati alla funzione di assorbimento di acqua e sali minerali.

Si associa con nocciolo (*Corylus avellana*), farnia (*Quercus robur*), carpino bianco (*Carpinus betulus*), tiglio (*Tilia spp.*) e sulle stazioni più asciutte ed esposte con roverella (*Quercus pubescens*) e carpino nero (*Ostrya carpinifolia*).

1.4 Indicatori fisiologici

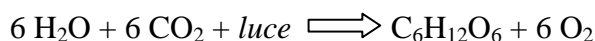
La principale funzione delle foglie è quella di intercettare la radiazione solare e convertirla in energia chimica attraverso una serie di processi che portano alla fissazione del carbonio.

1.4.1 Fotosintesi

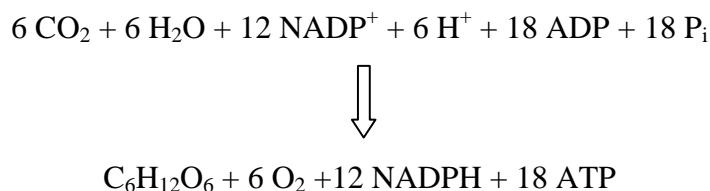
Le piante sono organismi *autotrofi* che sintetizzano la propria biomassa carboniosa autonomamente. La fotosintesi è un processo chimico con il quale le piante e altri organismi producono sostanze organiche a partire dall'anidride carbonica.

Nelle piante i processi fotosintetici avvengono nel cloroplasto, un organello subcellulare specializzato presente nelle foglie. Essi si trovano principalmente nelle cellule del mesofillo, hanno forma ellissoidale con una lunghezza di circa 5 μm , e sono delimitati da una doppia membrana di rivestimento che racchiude una matrice acquosa (*stroma*) e le membrane interne fotosintetiche (*tilacoidi*).

La fotosintesi è il processo di conversione dell'energia radiante in energia chimica. Durante la fotosintesi la luce solare permette di convertire sei molecole di CO_2 e sei molecole di H_2O in una molecola di glucosio ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e O_2 . La fotosintesi ossigenica utilizza acqua (H_2O) come donatore di elettroni e CO_2 come accettore secondo la reazione complessiva:



Tale processo è costituito da due fasi, classicamente definite *fase luminosa* e *fase oscura*, per distinguere le reazioni in base alla loro dipendenza dalla luce. Nella fase luminosa l'energia solare viene trasformata in energia chimica (NADPH e ATP), e nella fase oscura l'ATP e l'NADPH così formati vengono utilizzati nella fase oscura per organizzare e ridurre la CO_2 in zuccheri, secondo la reazione complessiva:



Nello stroma avvengono le reazioni della fase oscura ed in esso sono localizzati gli enzimi necessari, in particolare la ribulosio bisfosfato carbossilasi-ossidasi (Rubisco), l'enzima responsabile della fissazione di CO_2 atmosferica in composti organici.

1.4.2 Traspirazione

L'acqua gioca un ruolo cruciale nella vita di qualsiasi pianta. I motivi per i quali la pianta necessita di acqua sono diversi ed abbracciano fenomeni chimici, biochimici e fisici.

Nella fotosintesi clorofilliana l'acqua e la CO₂ sono le molecole inorganiche che servono per la formazione del glucosio, è presente nel citoplasma, serve per le reazioni biochimiche ad esempio di idratazione sia perché gli enzimi lavorano, per la maggior parte, in soluzione acquosa. L'acqua ha tre funzioni fisiche principali nella pianta: raffreddamento della foglia, trasporto dei nutrienti ed idratazione.

Le piante hanno sviluppato un apparato radicale estremamente ramificato ed esteso per estrarre acqua dal suolo, un percorso fra apparato radicale e foglie all'interno dello xilema, una cuticola idrofoba che riveste la superficie delle foglie per ridurre l'evaporazione e microscopiche aperture nella foglia (gli stomi) per permettere gli scambi gassosi con l'esterno.

Le cellule del mesofillo fogliare sono in contatto diretto con l'atmosfera tramite un esteso sistema di spazi aeriferi intercellulari. L'acqua evapora da una sottile pellicola che avvolge questi spazi aeriferi e man mano che l'acqua viene persa genera una forza motrice per il trasporto xilematico dell'acqua che viene trascinata attraverso gli interstizi della parete cellulare. L'acqua si muove grazie a potenziali idrici sempre più negativi, attraverso il suolo, le radici, il fusto, la foglia ed infine l'atmosfera.

La traspirazione consiste nell'evaporazione dell'acqua a livello dell'interfaccia acqua-aria dei tessuti vegetali e nella diffusione di molecole di acqua attraverso gli stomi dagli spazi intercellulari all'esterno. E' influenzata da fattori ambientali abiotici quali temperatura, umidità relativa, velocità del vento e radiazione solare.

Gli effetti della traspirazione sulle piante sono molteplici: le soluzioni diluite degli elementi che, assorbite dalle radici, sono portate alle parti superiori delle piante, vengono, mediante la traspirazione, concentrate e rese atte ad essere utilizzate nei processi; inoltre l'evaporazione di acqua per parte delle foglie determina una maggiore concentrazione molecolare dei succhi cellulari, così che, per osmosi, altra acqua o altre soluzioni diluitissime possono essere assorbite dalle radici e portate alle foglie per sopperire nuovo nutrimento ai tessuti assimilatori; infine l'evaporazione di una notevole massa di acqua richiede una notevole quantità di energia, la quale è assorbita dalle foglie colpite dalle radiazioni solari; ne risulta così una regolazione della temperatura delle foglie, la quale non si eleva mai al di sopra dei limiti compatibili colla normale funzionalità cellulare, anche sotto la sferza di radiazioni intense.

Per impedire l'eccessiva traspirazione la foglia è ricoperta dalla cuticola, uno strato ceroso altamente impermeabile che garantisce una ridottissima perdita di vapore acqueo. Lo strato ceroso è interrotto dagli stomi che sono dei piccoli pori più o meno uniformemente distribuiti lungo la superficie fogliare (Fig. 1.11). La perdita dell'acqua dalla foglia dipende dal gradiente di concentrazione del vapore acqueo dagli spazi aeriferi fogliari all'area esterna e dalla resistenza alla diffusione nella via che porta all'area esterna.

Come detto, la fotosintesi avviene nel cloroplasto, un organulo cellulare delimitato da una doppia membrana biologica, ma la CO_2 non riesce ad oltrepassare le membrane del cloroplasto direttamente in forma gassosa ma necessita di essere disciolta in acqua (HCO_3^-). A livello dello stoma la presenza del vapore acqueo traspirato rende possibile l'ingresso dell'anidride carbonica in forma disciolta.

Le piante non hanno sviluppato alcuna membrana capace di esercitare una permeabilità selettiva alla CO_2 ed al vapore acqueo. Gli stomi e la regolazione stomatica, rappresentano la soluzione, che le piante hanno sviluppato per catturare la CO_2 , evitando la disidratazione. Essi controllano, oltre al flusso di vapore d'acqua dalla camera sottostomatica all'atmosfera, il flusso di CO_2 verso l'apparato fotosintetico.

Ogni stoma è formato da due cellule a forma di mezzaluna (Fig. 1.12), dette cellule di guardia, che possono modificare la propria forma e dimensione per chiudere o aprire lo stoma. Quando esse accumulano ioni potassio, rendono l'ambiente interno della cellula ipertonico rispetto all'esterno e provocano il passaggio dell'acqua nella cellula secondo un meccanismo di osmosi. La cellula diventa turgida e di conseguenza l'apertura dello stoma aumenta.

Gli stomi mostrano un vasto *range* di risposta a molte variabili, sia interne che esterne alla pianta: generalmente si aprono alla luce e si chiudono al buio, mostrando una risposta all'intensità della luce, si aprono quando c'è abbondanza di acqua nel terreno, tendono a chiudersi se l'aria è troppo secca o ad aprirsi se diminuisce la concentrazione di CO_2 nell'atmosfera.

La conduttanza stomatica è un numero espresso in $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ed indica la quantità di anidride carbonica che sta entrando, o di vapore acqueo che sta uscendo attraverso gli stomi di una foglia. È l'inverso della resistenza stomatica ed è sotto il controllo della foglia attraverso le cellule di guardia dello stoma. I principali fattori ambientali che influenzano la conduttanza stomatica sono la temperatura delle foglie, la differenza di pressione di vapore tra la foglia e l'aria e la concentrazione ambientale di CO_2 .

La resistenza stomatica (R_s) è l'ultimo fattore che controlla il flusso idrico nel continuum suolo-pianta-atmosfera ed è regolata dalle cellule di guardia che circondano la rima stomatica.

Quando il flusso traspiratorio è elevato, una delle risposte che la pianta può mettere in atto nel breve periodo è la regolazione della chiusura stomatica, che provoca un innalzamento di R_s .

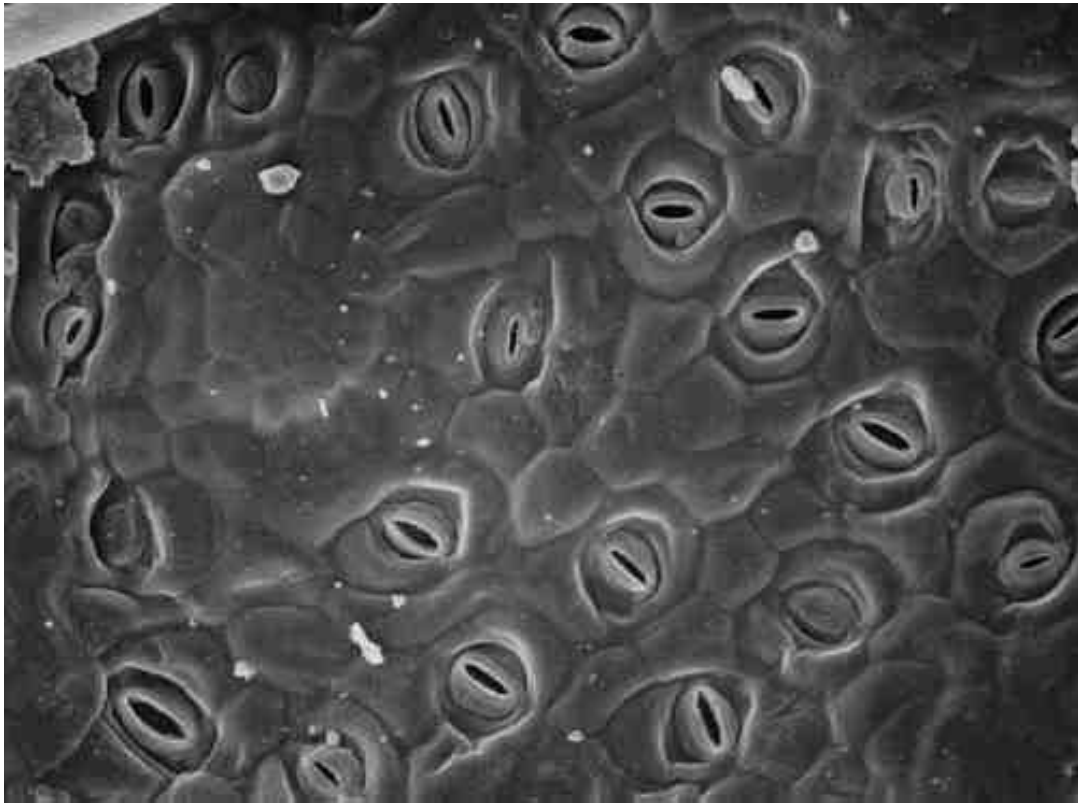


Figura 1.11 Fotografia al microscopio degli stomi fogliari

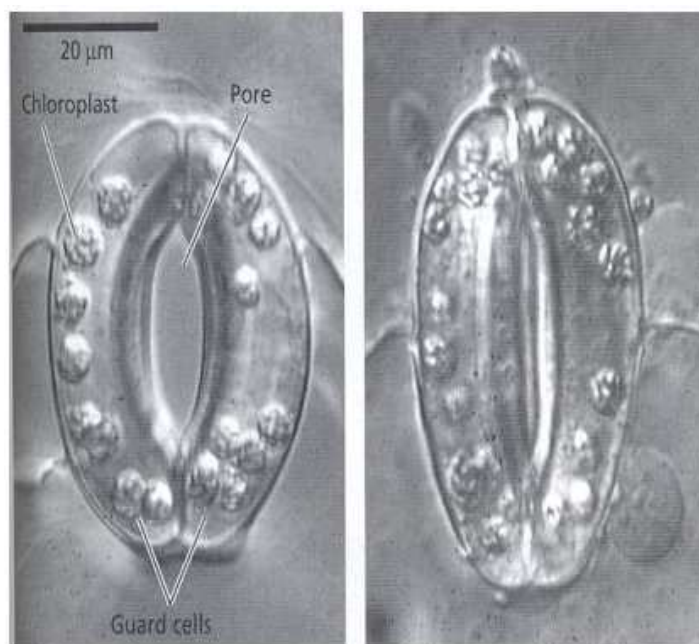


Figura 1.12 – Fotografia al microscopio di uno stoma fogliare

La *Water Use efficiency* (WUE) è definita come il rapporto tra la crescita della coltura e la quantità di acqua utilizzata. Il WUE non ha caratteri dimensionale, è un indicatore che descrive la percentuale di biomassa accumulata, espressa come moli di anidride carbonica assimilata rispetto alle moli di acqua perse con la traspirazione, utilizzando come scala temporale sia quella immediata, giornaliera o stagionale. (Sinclair et al., 1984)

La riduzione della disponibilità d'acqua nel suolo produce una risposta di adattamento da parte delle piante, attraverso una parziale chiusura degli stomi. In questo modo, l'acqua può essere conservata ma solo a spese di un ridotto guadagno di carbonio. Quando la disponibilità di acqua è elevata, la foglia aumenta la conduttanza stomatica, e la fotosintesi aumenta verso un massimo fissato dalle limitazioni biochimiche, mentre il tasso di traspirazione fogliare aumenta in modo approssimativamente lineare con la conduttanza.

Di conseguenza, la quantità di carbonio acquisita, per unità di acqua persa (WUE), diminuisce all'aumentare della conduttanza stomatica. Così, per una data capacità fotosintetica, il regolamento di apertura degli stomi controlla l'efficienza d'uso dell'acqua.

1.4.3 Fluorescenza

La fluorescenza è uno dei due processi radiativi con cui si può verificare il rilassamento di una molecola eccitata, l'altro è la fosforescenza. La distinzione tra i due processi è fatta in base al tempo di vita della radiazione: nella fluorescenza la luminescenza cessa subito dopo aver eliminato la radiazione eccitante, mentre nella fosforescenza la radiazione continua ad essere emessa, almeno per un breve lasso di tempo, anche dopo aver eliminato la sorgente eccitante. Nei pigmenti fotosintetici lo stato di eccitazione dura molto poco e i pigmenti tornano velocemente allo stato fondamentale restituendo l'energia precedentemente assorbita.

L'energia luminosa assorbita dalle molecole di clorofilla presenti in una foglia può essere usata nella fotosintesi (reazioni fotochimiche), dissipata come calore o riemessa sotto forma di fluorescenza. Questi tre processi sono in competizione tra loro, così che qualsiasi aumento dell'efficienza di uno di essi causerà una diminuzione degli altri due. Di conseguenza, misurare la resa della fluorescenza della clorofilla fornisce informazioni sulle variazioni dell'efficienza delle reazioni fotochimiche e della dissipazione come calore.

Le variazioni di fluorescenza della clorofilla sono dovute alla variazione degli accettori di elettroni nella catena di reazioni fotosintetiche, a valle del PSII, probabilmente a livello del plastoquinone QA. Una volta che il PSII assorbe la luce ed il QA ha accettato un elettrone, esso non è più in grado di accettarne un altro fino a quando non lo ha trasferito nel successivo trasportatore di elettroni (QB). Durante questo periodo, il centro di reazione è definito

“chiuso”. La presenza di una parte di centri di reazioni nello stato “chiuso” causa la riduzione dell’efficienza delle reazioni fotochimica e quindi l’aumento della fluorescenza.

Quando una foglia è trasferita dal buio alla luce, i centri di reazione del PSII si chiudono progressivamente. Questo causa l’aumento della fluorescenza della clorofilla. In seguito a questo evento, comunque, il livello di fluorescenza comincia solitamente a diminuire nuovamente, in un tempo di pochi minuti. Questo fenomeno, chiamato estinzione della fluorescenza (*fluorescence quenching*) si può spiegare in due modi.

Innanzitutto avviene un aumento del tasso a cui gli elettroni sono trasportati fuori dal PSII; questo è dovuto principalmente all’attivazione indotta dalla luce degli enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio e all’apertura degli stomi. Questa estinzione è chiamata estinzione fotochimica (*photochemical quenching, qP*). Allo stesso tempo, avviene un aumento dell’efficienza con cui l’energia è convertita in calore; quest’ultimo processo è definito estinzione non–fotochimica (*NPQ*).

In una tipica pianta, le variazioni che avvengono a causa di questi due processi durano circa 15–20 min, prima che si raggiunga lo stato costante di fluorescenza (*Ft*). Al fine di avere dati affidabili sull’efficienza fotosintetica di una pianta, è necessario essere in grado di distinguere i contributi dell’estinzione fotochimica e non–fotochimica.

Un metodo è quello di utilizzare la tecnica del “raddoppiamento della luce”, che permette l’annullamento dell’estinzione fotochimica. Con questo approccio, la pianta viene sottoposta a un flash di luce di breve durata e di alta intensità, il cui effetto è quello di chiudere temporaneamente tutti i centri di reazione del PSII. Il flash saturante è talmente breve da non influire significativamente sulla fotosintesi. Durante il flash, la fluorescenza raggiunge un valore equivalente a quello che potrebbe essere ottenuto in assenza di estinzione fotochimica, la fluorescenza massima (*Fm*). Il confronto di questo valore con lo stato costante della fluorescenza alla luce (*Ft*) e al valore di fluorescenza in assenza di luce attinica (fotosintetica) (*Fo*) fornisce informazioni sull’efficienza dell’estinzione fotochimica e sull’efficienza del PSII.

Quando una foglia adattata al buio, viene colpita da un flash saturante la fluorescenza sale dal valore dello stato fondamentale (*Fo*) al suo valore massimo (*Fm*). In queste condizioni, QA, il primo accettore di elettroni del PSII, è completamente ridotto. Questo consente di determinare l’efficienza quantica massima della fotochimica primaria del fotosistema II (PSII).

Una successiva applicazione di illuminazione costante determina un aumento transitorio di resa di fluorescenza. Ciò è dovuto a una fase lag prima che cominci la fissazione del

carbonio. Mentre il trasporto di elettroni comincia nel giro di pochi millisecondi dopo l'illuminazione, alcuni enzimi della fissazione del carbonio hanno bisogno della luce per essere attivati. Di conseguenza, una frazione sostanziale di QA (accettore di elettroni primario dopo il PSII) è ridotta durante i primi secondi di illuminazione e la resa in fluorescenza aumenta. In seguito, all'instaurarsi dei processi di dissipazione termica e fotochimica, la resa in fluorescenza diminuisce e raggiunge un valore di stato stazionario (F_t). Con l'applicazione di un secondo flash di luce saturante in presenza di luce attinica, il massimo di fluorescenza ottenuto (F_m') è più basso di quello osservato al buio (F_m). Poiché in F_m' , QA è di nuovo completamente ridotto, la differenza tra F_m' e F_t riflette la parte fotochimica del quenching di fluorescenza, e la differenza tra F_m e F_m' riflette il quenching di fluorescenza dovuto a dissipazioni termiche.

L'efficienza del PSII (Φ_{PSII}) indica la porzione di energia luminosa assorbita dalle clorofille del PSII realmente usata per le reazioni fotochimiche e non dissipata in modi non utili alla fotosintesi. E' calcolabile con la formula: $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$

IL trasporto fotosintetico di elettroni (ETR) permette di valutare la velocità di trasporto degli elettroni fotosintetici ed è molto variabile anche all'interno della stessa foglia. Si calcola nel seguente modo: $ETR = 0.5 * RESA * PAR * 0.84 \mu eq m^{-2} s^{-1}$, dove RESA equivale al rapporto tra $(F_m' - F_o) / F_m'$, PAR (radiazione fotosinteticamente attiva) e 0.84 rappresenta il valore ottimale di assorbimento di fotoni da parte di una foglia (stima).

2. Obiettivi

Precedenti ricerche hanno dimostrato che piante di *Salix fragilis* L. trattate con il sulfamidico sulfadimetossina a concentrazione variabile (0.01-10 mg/L di soluzione nutritiva) esibiscono una relazione dose/effetto di tipo ormetico nella crescita delle radici.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare la risposta di piante di *Corylus avellana* L. micorrizzate con *Tuber aestivum* Vittad. a concentrazioni iniziali variabili del sulfamidico sulfadiazina (SDZ). Questo lavoro è inserito in un progetto più ampio dove gli effetti della SDZ saranno studiati anche sulle simbiosi fungine radicali e sulle comunità batteriche del suolo.

L'antibiotico SDZ è largamente utilizzato in zootecnia per prevenire e curare le malattie degli animali; l'applicazione di letame contaminato in suoli agrari mette a diretto contatto questa sostanza con le piante coltivate.

Il *Corylus avellana* L. è presente in tutto l'arco alpino italiano, anche se con maggior frequenza sulle Alpi orientali, coltivato dall'uomo in siepi o piccoli raggruppamenti ripariali per ottenere frasca, noccioli e legacci. Molti degli studi riscontrati in letteratura hanno utilizzato piante annuali per testare gli effetti di molti antibiotici, mentre il *Corylus avellana* L. è una pianta pluriennale.

Allo scopo di studiare gli effetti del trattamento con SDZ sono state eseguite indagini morfometriche a livello dell'apparato epigeo per l'intera durata dell'esperimento (70 giorni), mentre gli effetti sugli apici radicali sono stati indagati con un'analisi visiva a fine trattamento.

Sono state, inoltre, valutati alcuni indicatori fisiologici. In particolare sono stati misurati gli scambi gassosi e la fluorescenza delle clorofille per tutte le tesi di trattamento, in quattro intervalli regolari di tempo negli ultimi giorni di trattamento.

Un'ulteriore indagine è stata effettuata per ricercare eventuali interazioni tra il sulfamidico e i microorganismi endofiti fogliari. A questo proposito la presenza numerica dei microorganismi endofiti è stata determinata attraverso protocolli di crescita su piastre per PCA per tutte le piante sottoposte al trattamento, con il successivo conteggio delle colonie cresciute.

3. Materiali e metodi

3.1 Disegno sperimentale

Gli effetti della sulfadiazina (SDZ) sono stati studiati su piante di *Corylus avellana* L. micorrizzate con *Tuber aestivum* Vittad. e cresciute in cella climatica per circa 70 giorni.

Trenta piante di nocciolo sono state divise in sei gruppi da 5 repliche, in base alla concentrazione di SDZ somministrata ad inizio trattamento. Per 5 gruppi le concentrazioni di SDZ di trattamento sono state 0.01, 0.1, 1, 10 e 100 ppm somministrate ad inizio trattamento in soluzione acquosa; un gruppo è stato adibito a controllo, cioè senza l'aggiunta iniziale di SDZ.

Con lo scopo di analizzare la risposta della pianta all'esposizione al principio attivo, sono stati rilevati alcuni dati biometrici di tutte le piante (lunghezza della pianta, numero di gemme e foglie) per tutta la durata del trattamento. Inoltre, sono stati confrontati altri parametri, come la presenza di endofiti nei piccioli del nocciolo, la fotosintesi netta, la traspirazione, la conduttanza, l'efficienza nell'uso dell'acqua (WUE), il rendimento quantico effettivo del PSII (Φ PSII) ed il trasporto fotosintetico di elettroni (ETR) per tutte le tesi di trattamento.

A fine trattamento è stata testata la presenza o assenza di microorganismi endofiti a livello fogliare per tutte le piante utilizzate nel trattamento.

3.2 Metodo di coltura

Per il trattamento sono state utilizzate trenta talee di *Corylus avellana* L. coetanee, di 2 anni, indicativamente tutte omogenee per struttura (numero di gemme e dimensioni).

Le piante sono state cresciute in un ambiente controllato per 70 giorni, in una cella climatica, dove la temperatura era impostata a 25 ± 1 °C, l'umidità relativa media a 60%, l'intensità luminosa media è stata di $340 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, le ore di luce erano 12 e quelle di buio erano 12 ore.

Ciascuna pianta è stata irrigata con 100 ml di acqua ogni 4 giorni circa, e, per evitare il ristagno d'acqua e la perdita di SDZ, ogni pianta è stata cresciuta in un sistema di doppi vasi. Il più interno, forato alla base e a forma di tronco di cono, di materiale inerte nei confronti dei sulfamidici, (PE), e di dimensioni di 6x9x13 cm, è stato inserito in un vaso cilindrico non forato più grande avente un diametro di 20 cm e un'altezza di 20 cm. In questo modo l'acqua raccolta nel secondo vaso di ciascuna pianta è stata versata nuovamente nel medesimo terreno fino a raggiungere una umidità uniforme nel terreno.

3.3 *Analisi del suolo*

Per la determinazione della granulometria sono stati prelevati 6 campioni di terreno da 3 diversi vasi (due per vaso) scelti in modo casuale ed essiccati all'aria ed analizzati con un granulometro laser (Hydro-2000G, Malvern institute).

I campioni sono stati pestati con l'ausilio di un mortaio al fine di rompere meccanicamente gli aggregati di maggiori dimensioni ed, infine vagliati con un setaccio di maglie di 2 mm.

Per le analisi strumentali sono stati prelevati 0.3 g di terreno da ogni campione e disciolti in acqua deionizzata con l'aggiunta di esametafosfato di sodio ($(\text{NaPO}_3)_6$), e carbonato di sodio (Na_2CO_3), aggiungendo acqua deionizzata fino a 25ml. Le soluzioni così ottenute sono state poste in agitazione per 24 h e 60 rpm.

Per migliorare la separazione dei colloidi, prima dell'analisi granulometrica, 3 soluzioni, una di ogni vaso, sono state sottoposte ad un trattamento con gli ultrasuoni (15000 rpm per 5 min).

La tecnica sfrutta il fenomeno della diffrazione di fraunhofer di un'onda elettromagnetica monocromatica sul contorno delle particelle in sospensione, secondo il quale, quando un raggio di luce monocromatico interagisce con una particella, sospesa in un liquido inerte e di dimensioni superiori a quelle della lunghezza d'onda della radiazione incidente, viene diffratto di un angolo la cui ampiezza è funzione delle dimensioni della particella colpita: più piccola è la particella, più ampio è l'angolo di diffrazione.

La quantità di carbonio (C), idrogeno (H) e azoto (N) nel suolo sono state determinate con l'utilizzo di un analizzatore elementare (Vario MACRO, Macro Elemental Analyzer, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germania).

Il funzionamento di questo strumento prevede una combustione rapida e completa del campione all'interno di una fornace, alla temperatura di 950 °C in eccesso di ossigeno. I prodotti della combustione sono fatti passare attraverso una seconda fornace da 850 °C per un'ulteriore ossidazione e rimozione del particolato; sono poi raccolti in un contenitore ed inviati ai rivelatori ad assorbimento infrarosso per la misura della CO_2 e del H_2O ; infatti il carbonio è misurato sotto forma di CO_2 e l'idrogeno sotto forma di H_2O .

Invece, un'aliquota dei gas di combustione, è stata trasferita in un flusso di elio e fatta passare attraverso un catalizzatore di rame caldo per la rimozione dell'ossigeno e la conversione degli NO_x ad azoto elementare N_2 ed attraverso altri filtri per la rimozione dell'anidride carbonica e dell'acqua. Infine un rivelatore a termocoducibilità è usato per determinare il contenuto di azoto.

Per quest'analisi sono stati utilizzati 3 campioni di suolo prelevati da vasi scelti casualmente e lasciati essiccare all'aria; in seguito è stato pestato con l'ausilio di un mortaio al fine di rompere meccanicamente gli aggregati di maggiori dimensioni, ed infine setacciato con maglie di 5mm.

3.4 Analisi biometriche

Per tutta la durata del trattamento sono state effettuate le misure biometriche per ciascuna pianta, ad intervalli giornalieri regolari. Sono state rilevate nel tempo: la lunghezza della pianta, il numero di foglie, il numero di gemme e la lunghezza della ramificazione nata dalla gemma apicale.

Al termine dei 70 giorni sono state rilevati per ciascuna pianta il peso totale di radici e foglie, e l'area fogliare totale.

Per la misura dell'area fogliare totale delle varie piante è stato usato il software IMAGEJ, un programma opensource di analisi d'immagine.

Le foglie di ogni pianta sono state disposte su fogli bianchi, fotografate ed elaborate dal Software. Dopo opportune elaborazioni grafiche è stato possibile la determinazione dell'area fogliare (Fig. 3.1).

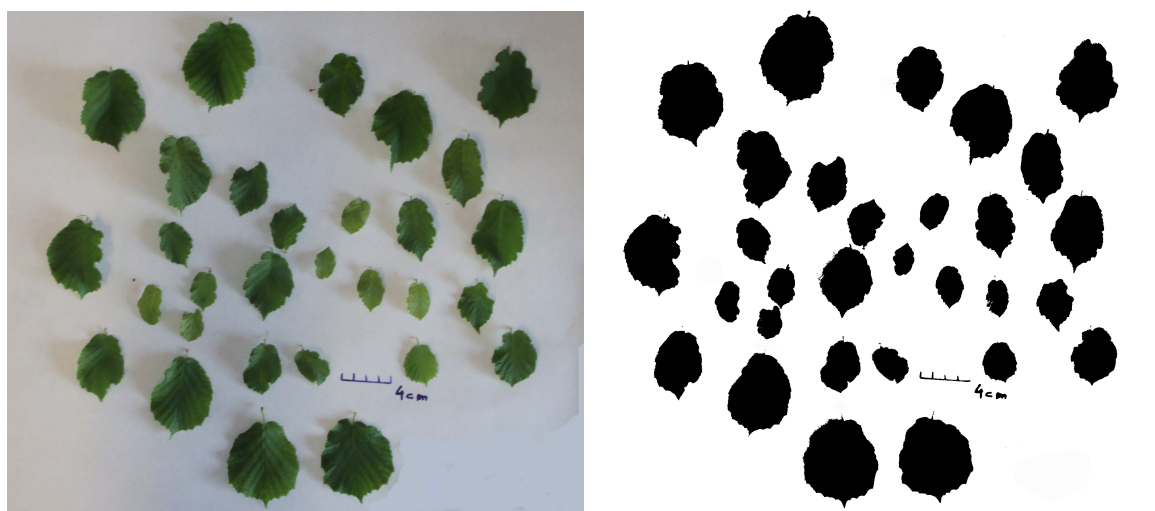


Figura 3.1 Modifica grafica per il calcolo dell'area fogliare

3.5 Analisi della fotosintesi, scambi gassosi, fluorescenza

Le misure sono state effettuate utilizzando un *infrared gas analyzer* LiCor LI-6400 XT-system, mediante l'ausilio di una cuvetta circolare di 2 cm² e impostando i parametri ambientali all'interno della cella in modo da uguagliare quelli della camera di crescita in cui sono state condotte le misure (400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 300 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura dell'aria

25.0 °C, umidità relativa 60-65%). Le misure sono state eseguite nelle ultime 4 settimane ad intervalli giornalieri regolari (giornate 43, 50, 57 e 64).

Si tratta di un sistema dotato di una cuvetta di 2 cm² dove inserire la foglia, isolata dall'ambiente circostante, in cui un flusso costante e controllato passa attraverso la camera. Lo strumento confronta l'aria in ingresso e quella in uscita, rilevando le modifiche nelle concentrazione atmosferica di acqua e anidride carbonica.

Sono state selezionate tre piante per ogni tesi di trattamento, sulle quali mediare i dati, e per ogni pianta è stata selezionata la prima foglia espansa dalla gemma apicale per avere foglie mature all'inizio delle misurazioni. Le foglie selezionate sono state marcate attraverso un filo di cotone colorato legato intorno al picciolo (Fig. 3.2) per poterne seguire meglio l'evoluzione nel tempo.



Figura 3.2 Foglia di nocciolo marcata per le analisi di fotosintesi, fluorescenza e scambi gassosi

3.6 Analisi dei microorganismi endofiti

Per verificare la presenza di endofiti a livello dei piccioli fogliari è stato utilizzato un protocollo che garantisce la sterilizzazione della superficie esterna di questa struttura, senza intaccare le popolazioni degli organismi che vivono all'interno.

A fine esperimento, da ogni pianta è stato asportata una foglia tra quelle ceschiate dalla gemma apicale ed asportato il picciolo. I piccioli sono stati immersi in etanolo al 95% per 20

secondi, trattati con ipoclorito di sodio (NaClO) per 3 minuti e, infine, immersi in acqua demineralizzata sterile, per un totale di sette risciacqui di 1 minuto ciascuno.

Per verificare che la superficie esterna dei piccioli fosse libera da microorganismi, dopo i lavaggi con acqua demineralizzata sterile, i piccioli sono stati strisciati su piastre PCA (Plate Count Agar) utilizzando pinze sterilizzate su fiamma libera. Dopo una settimana di incubazione si è accertato che in nessuna piastra si fossero sviluppate colonie di microorganismi, dato necessario per confermare la sterilità della superficie esterna del picciolo.

I piccioli sterilizzati sono stati posti su una piastra Petri sterile, tagliati in piccoli pezzi, trasferiti in eppendorf sterili contenenti 80 µl di soluzione fisiologica (NaCl 0.85%) e pestati meccanicamente con l'aiuto di un pestello sterilizzato, per favorire il passaggio in sospensione acquosa dei microorganismi presenti all'interno.

Della sospensione ottenuta, aliquote da 10 µl sono state piastrate su PCA e lasciati riposare a temperatura ambiente e al buio; dopo sette giorni sono state contate le colonie di microorganismi sviluppatesi su ciascuna piastra (Fig 3.3).



Figura 3.3 Piastre per PCA con colonie di endofiti

3.7 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state svolte attraverso l'utilizzo del software open source R (R Development Core Team, 2008).

Il confronto delle medie tra più di 2 gruppi di campioni è stato effettuato mediante l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test HSD per effettuare la comparazione fra i gruppi. Ai campioni che presentavano differenze significative ($p \leq 0.05$) sono state associate lettere diverse

4. Risultati e discussione

4.1 Suolo

La tessitura del suolo indica la sua composizione percentuale in particelle di sabbia, limo e argilla. Ad essa sono correlate direttamente e indirettamente importanti proprietà dei suoli, quali la permeabilità all'aria e all'acqua, la plasticità e la capacità di trattenere l'acqua.

Vengono distinte 3 classi granulometriche in base al diametro delle particelle: *argilla* (250-500 μm), *limo* (500-1000 μm) e *sabbia* (1000-2000 μm).

Nelle Figure seguenti è indicata la distribuzione percentuale delle particelle dei campioni normali (Fig. 4.1 A) e di quelli sottoposti ad ultrasuoni (Fig. 4.1 B) utilizzati nell'esperimento. Mentre nella tabella 4.1 sono riportati i risultati in percentuale della composizione granulometrica di entrambe.

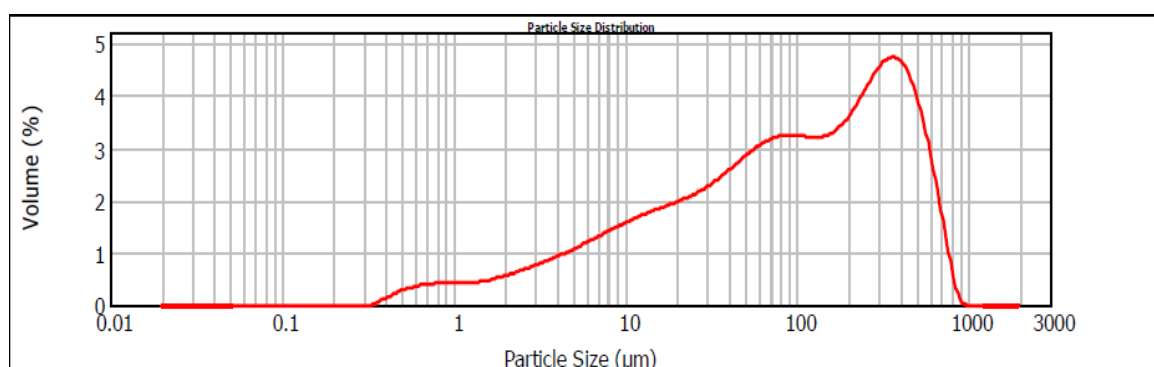


Figura 4.1 A Distribuzione percentuale delle dimensioni delle particelle del suolo tal quale

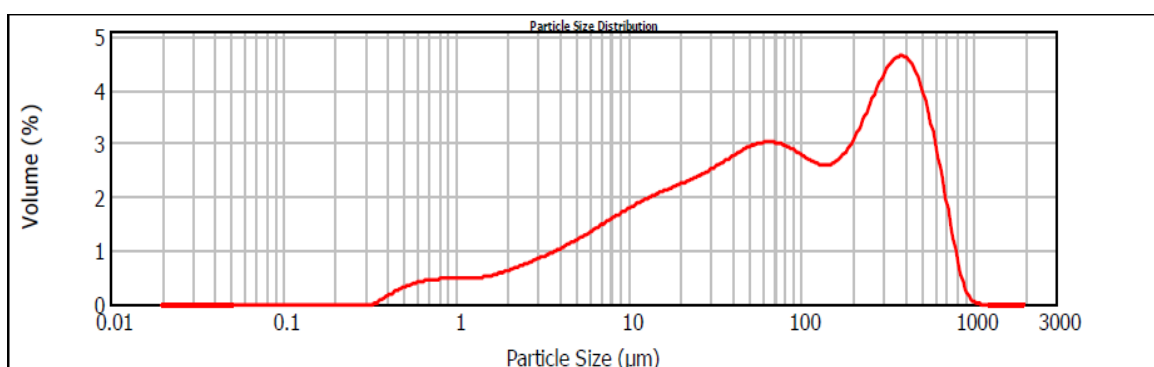


Figura 4.1 B Distribuzione percentuale delle dimensioni delle particelle del suolo sottoposti a ultrasuoni

Il contenuto idrico e la velocità di movimento dell'acqua nel suolo dipendono dal tipo di suolo. Il movimento dell'acqua attraverso il suolo è prevalentemente per flusso di massa portato dal gradiente di pressione.

	Argilla	Limo	Sabbia
Terreno normale	12.57	24.50	62.93
Terreno sottoposto ad ultrasuoni	14.10	27.16	58.74

Tab. 4.1 Composizione granulometrica dei terreni utilizzati (%)

	Azoto (N)	Zolfo (S)	TOC (Total Organic Carbon)
media	0.062	0.028	0.49

Tab.4.2 Composizione organica del terreno determinata attraverso (%) l'analizzatore elementare CNS

Quando predomina la sabbia, caratterizzata da particelle con un diametro elevato, i suoli presentano pori di grandi dimensioni. Pertanto i terreni sabbiosi sono ben areati e dotati di buon drenaggio; molto scarsa risulta invece la loro capacità di trattenere l'acqua.

I suoli dove predomina l'argilla, sono invece caratterizzati da scarsa aerazione e da difficile drenaggio; in presenza di acqua diventano plastici e sono compatti allo stato secco.

Dall'analisi granulometrica è emerso che il terreno utilizzato per la crescita delle piante è composto principalmente da sabbia (60% ca.), seguito dal limo (25% ca.) e dall'argilla (13 % ca.) (Tab. 4.1). Un suolo, dunque, che permette facilmente il passaggio dell'acqua e che ha una scarsa resistenza alla penetrazione delle radici. L'argilla e il limo presenti consentono di mantenere una umidità nel terreno adeguata alla crescita del nocciolo.

La sostanza organica del terreno è l'insieme dei composti organici presenti nel terreno, indipendentemente dalla sua origine. La sostanza organica nel terreno migliora ad esempio la ritenzione dell'acqua, la disponibilità di alcuni microelementi e il potere tampone.

Dall'esame all'analizzatore elementare (Tab. 4.2) è emerso che il terreno utilizzato contiene l'azoto mediamente allo 0.062%, lo zolfo allo 0.028% e il carbonio organico totale al 0.49% .

4.2 Analisi biometriche

I dati relativi alla lunghezza media delle piante, al numero di gemme totali e di foglie in funzione del tempo sono riportati nelle Figure seguenti.

La lunghezza media della pianta nel tempo (Fig. 4.2) presenta valori simili tra tutte le varie concentrazioni iniziali di crescita sia ad inizio che a fine trattamento; ad inizio del trattamento le lunghezze medie delle piante di nocciolo sono comprese tra il valore medio del gruppo di piante del controllo (95 cm) e il valore del gruppo di piante trattate con 10 ppm (107 cm). A fine analisi i valori sono compresi tra 103 cm (controllo) e 113 (1 ppm). I dati sottoposti ad analisi statistica non hanno rilevato differenze significative ($p \leq 0.05$).

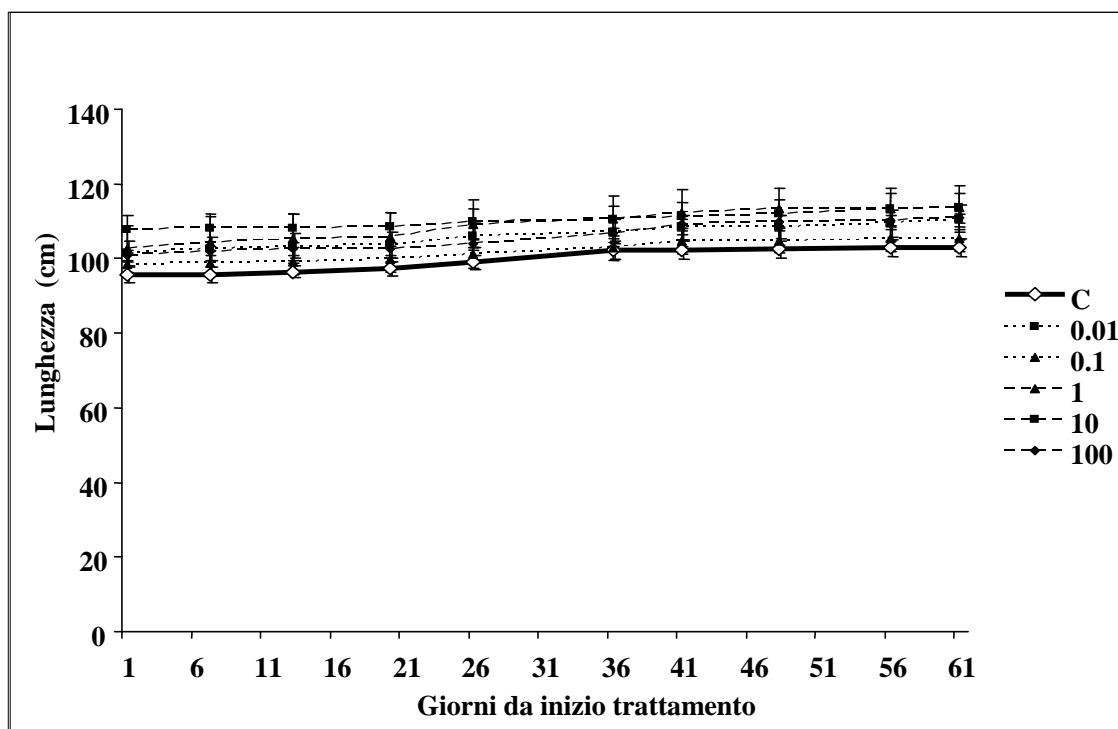


Figura 4.2 Lunghezza media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'errore standard (ES)

Il numero medio di gemme per pianta nel tempo (Fig. 4.3) tende per tutti i gruppi di crescita a zero e con andamento simile. Anche se inizialmente tutte le piante presentavano valori diversi, dovuto alla diversità genetica intrinseca, dopo 61 giorni dall'inizio del trattamento tutte le piante avevano quasi completamente trasformato le gemme in foglie. Anche questi dati sottoposti ad analisi statistica non hanno dimostrato differenze significative ($p \leq 0.05$).

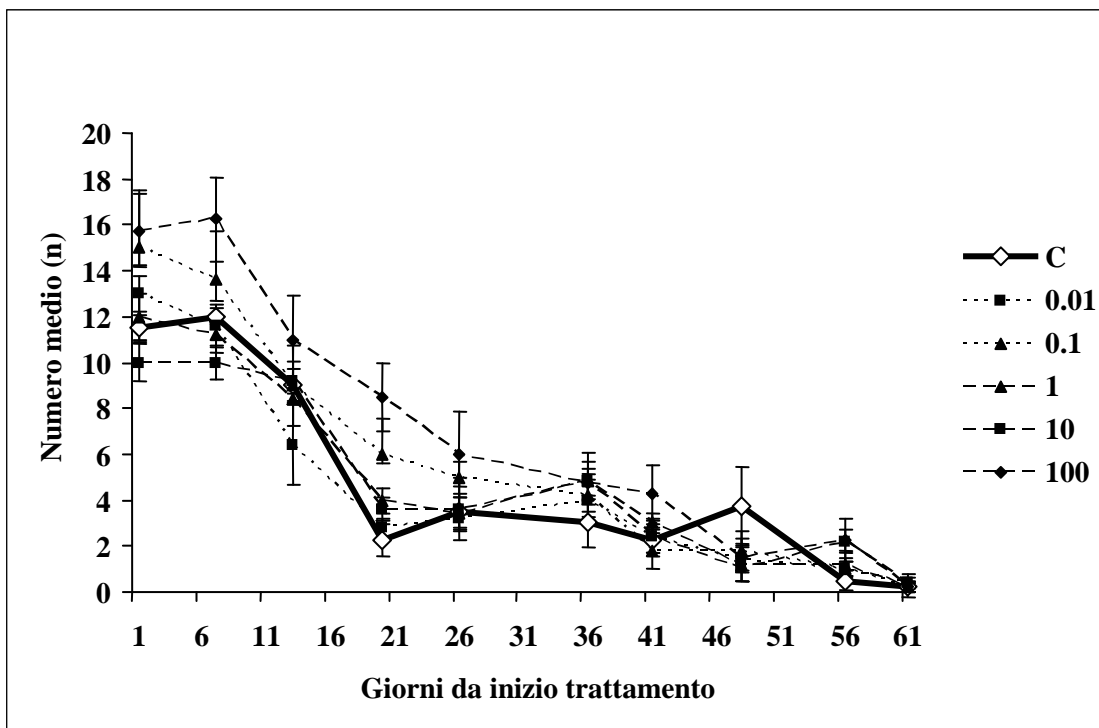


Figura 4.3 Numero di gemme medio delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES

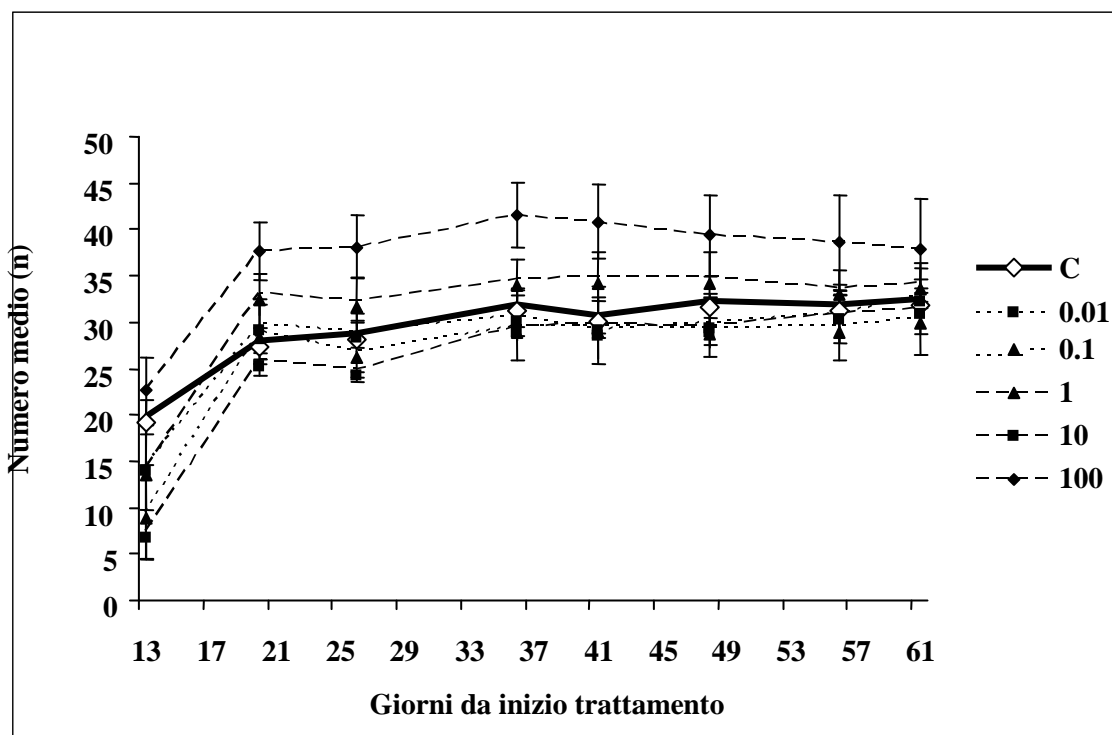


Figura 4.4 Numero di foglie delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES

L'andamento del numero medio di foglie per pianta nel tempo (Fig. 4.4) presenta un rapido incremento sino al giorno 20 circa dall'inizio del trattamento, per poi stabilizzarsi per la restante durata del tempo. A fine trattamento il gruppo 100 ppm presenta il numero medio di foglie per pianta maggiore rispetto agli altri gruppi (38.5), mentre il gruppo 0.1 ppm mostra il valore più basso (30.6); i gruppi restanti, insieme al controllo (32.5) si collocano in valori intermedi. Nessuna differenza significativa è stata messa in risalto con l'analisi statistica. ($p \leq 0.05$).

Nessun gruppo di trattamento presenta apprezzabili variazioni nel numero di foglie come segno di sofferenza; ciò è in contrasto con i dati ritrovati in letteratura (Dolliver et al., 2007; Liu et al., 2008), dove è stato rilevato un effetto negativo di SDZ sulla crescita delle foglie.

Da sottolineare il comportamento del gruppo 100 ppm, che presenta il maggior numero medio di foglie per l'intera durata del trattamento, ed insieme al gruppo 1 ppm, sono gli unici a presentare dei valori medi maggiori rispetto al controllo dall'inizio sino alla fine del trattamento.

La misura della lunghezza dello stelo cresciuto dalla gemma apicale nel tempo (Fig 4.5) mostra un accrescimento maggiore nei trattamenti con 1 (69 mm) e 100 (66) ppm rispetto al controllo (54 mm) e un accrescimento minore a 0.01 (47 mm) 0.1 (40 mm) e 10 (39) ppm.

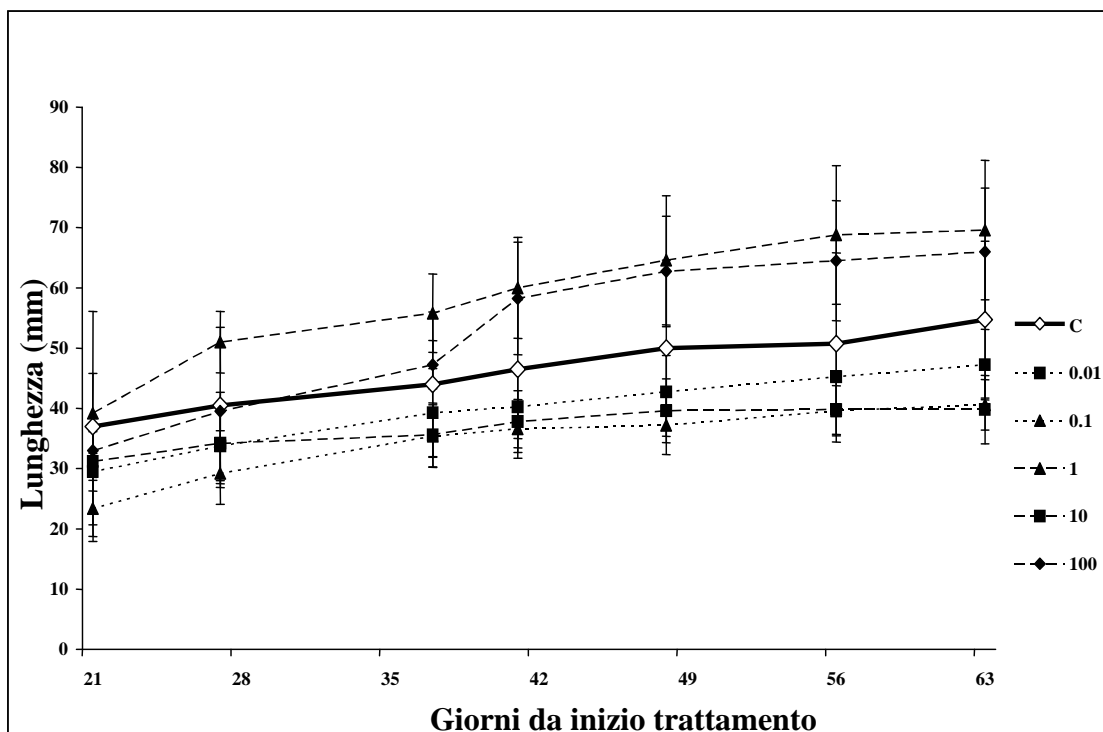


Figura 4.5 Lunghezza media dello stelo cresciuto dalla gemma apicale delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES

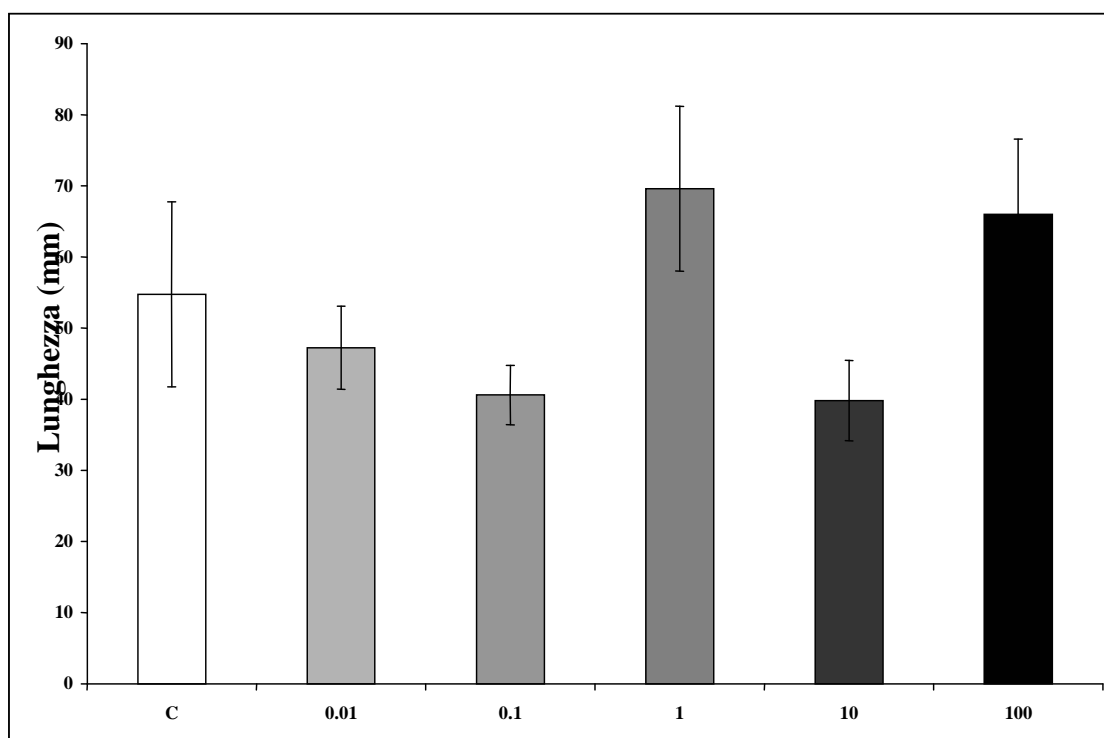


Figura 4.6 Lunghezza media finale dello stelo delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES.

La lunghezza dello stelo al termine dell'esperimento è riportata nella Figura 4.6, dove i valori misurati sono simili per tutte le tesi di trattamento. Nessun gruppo di trattamento ha mostrato sostanziali differenze di crescita rispetto al controllo e in entrambi i parametri analizzati non è stata riscontrata nessuna differenza statistica significativa ($p \leq 0.05$).

La misura della lunghezza del rametto cresciuto dalla gemma apicale avrebbe potuto mettere in risalto dei segnali di sofferenza sull'accrescimento della pianta durante una stagione vegetativa in relazione alle concentrazioni iniziali di SDZ.

L'incremento percentuale è definito dalla formula:

$$\text{Inc. \%} = \frac{T_i - T_0}{T_i} \times 100$$

dove T_i rappresenta la lunghezza della pianta al tempo della misura, T_0 rappresenta la lunghezza della pianta al tempo 0, nel nostro caso all'inizio del trattamento.

Nei grafici riguardanti l'incremento percentuale della lunghezza della pianta nel tempo (Fig. 4.7) e alla fine dell'esperimento (Fig 4.8) si può vedere come i diversi gruppi di trattamento si accrescano in maniera simile senza mostrare sostanziali differenze tra di loro, fatto confermato

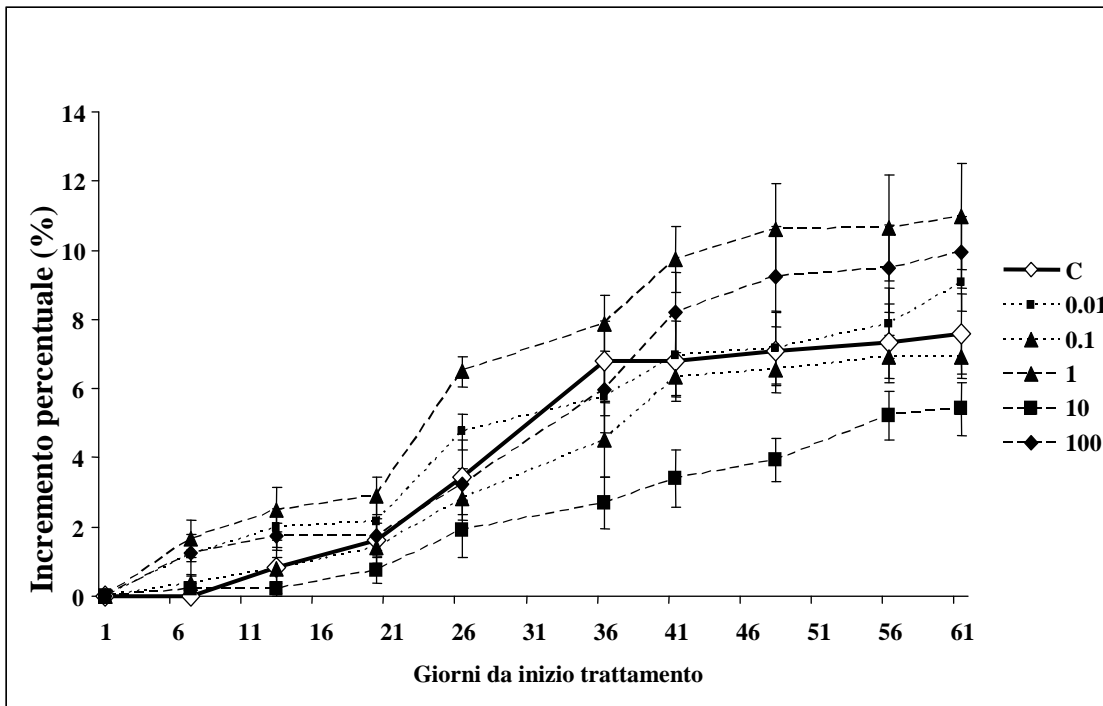


Figura 4.7 Incremento percentuale rispetto al tempo 0 della lunghezza delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES

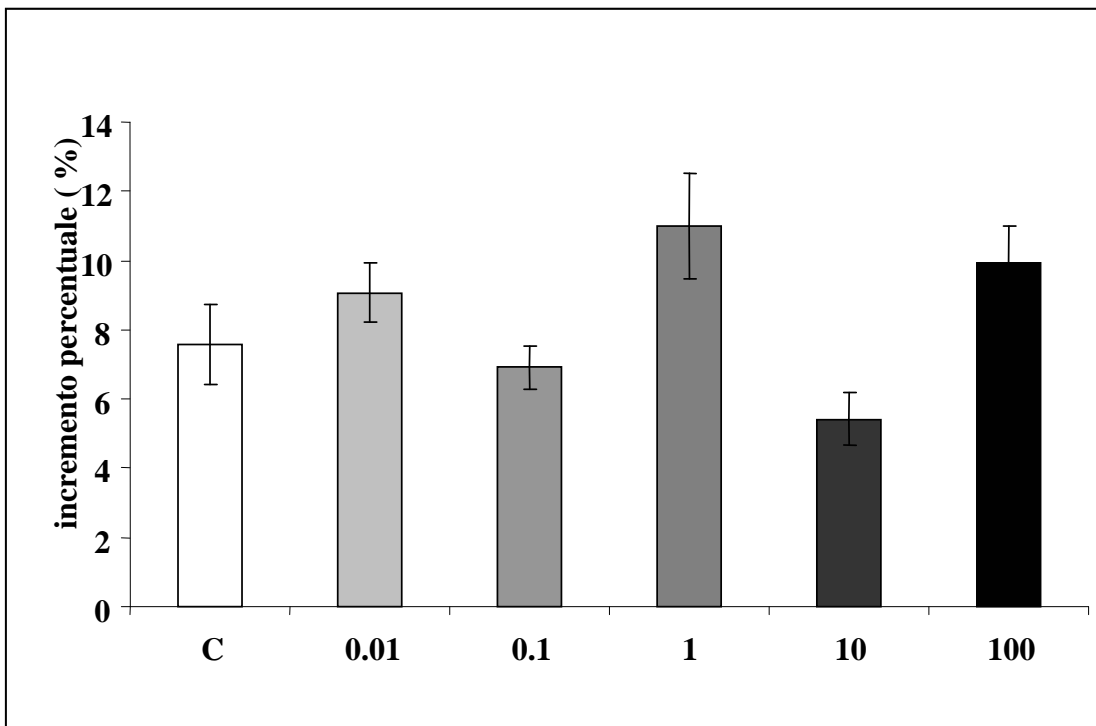


Figura 4.8 Incremento percentuale medio finale della lunghezza delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES

dall'analisi statistica dei dati ($p \leq 0.05$). Questo non ci consente, ancora una volta, di associare una maggiore concentrazione di SDZ ad un segno di sofferenza per la pianta.

Da sottolineare l'accrescimento delle tesi 1 (10%) e 100 (9%) ppm che mostrano un incremento percentuale maggiore rispetto al controllo (7%) per tutta la durata del trattamento, e il comportamento del gruppo 10 (5%) che presenta i valori minori.

Per quanto riguarda la biomassa fogliare (Fig. 4.9), il peso minore è stato misurato nella piante controllo (2.2 g), i pesi maggiori nelle classi 1 e 100 (3.6 g) ppm, e le restanti tesi in valori intermedi.

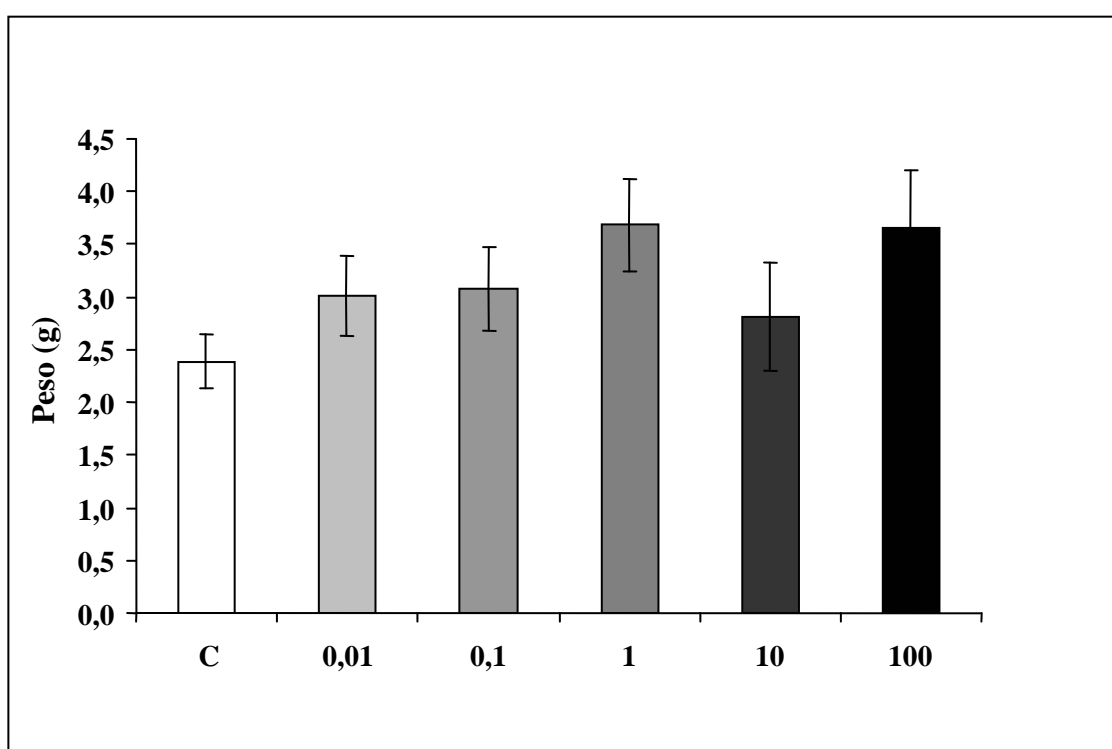


Figura 4.9 Peso medio finale della biomassa fogliare delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES

L'area fogliare totale media per pianta (Fig. 4.10), ottenuta attraverso il software ImageJ, presenta un andamento simile a quello della biomassa fogliare, in quanto il valore più basso di questo parametro è quello del controllo (197 cm²), i valori maggiori sono quelli relativi ai trattamenti con 1 (301 cm²) e 100 ppm (295 cm²), e i restanti tre si collocano in valori intermedi. Nessuna differenza significativa è stata messa in risalto con l'analisi statistica. ($p \leq 0.05$).

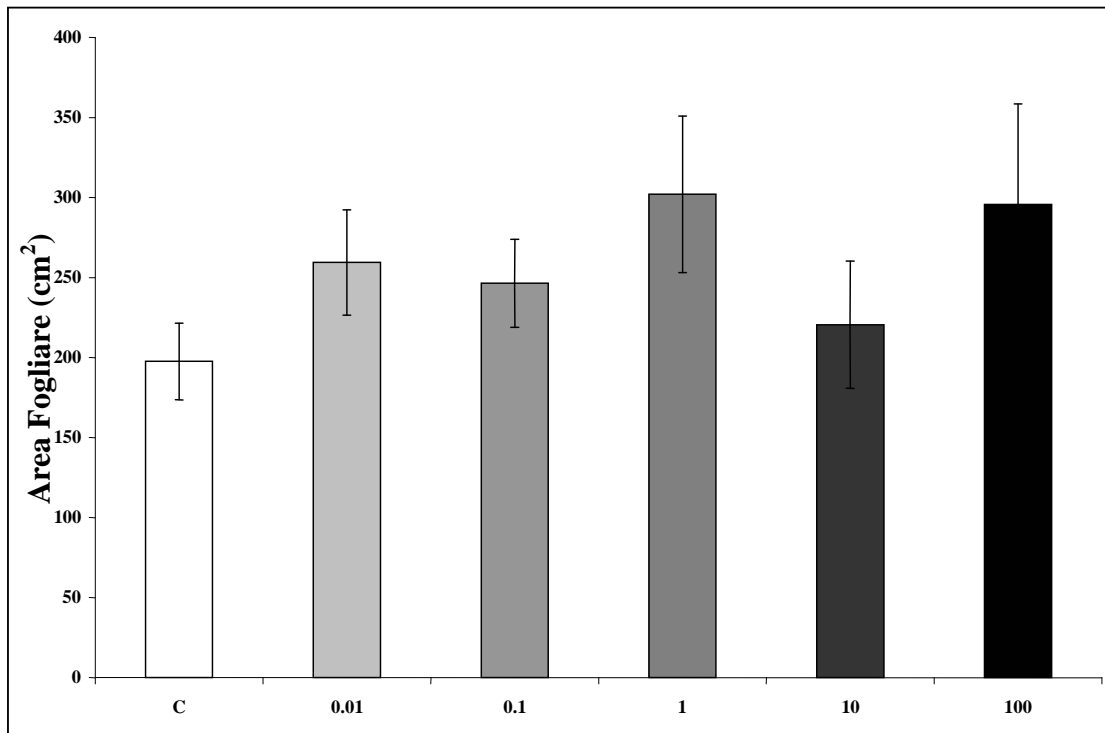


Figura 4.10 Area fogliare totale media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES

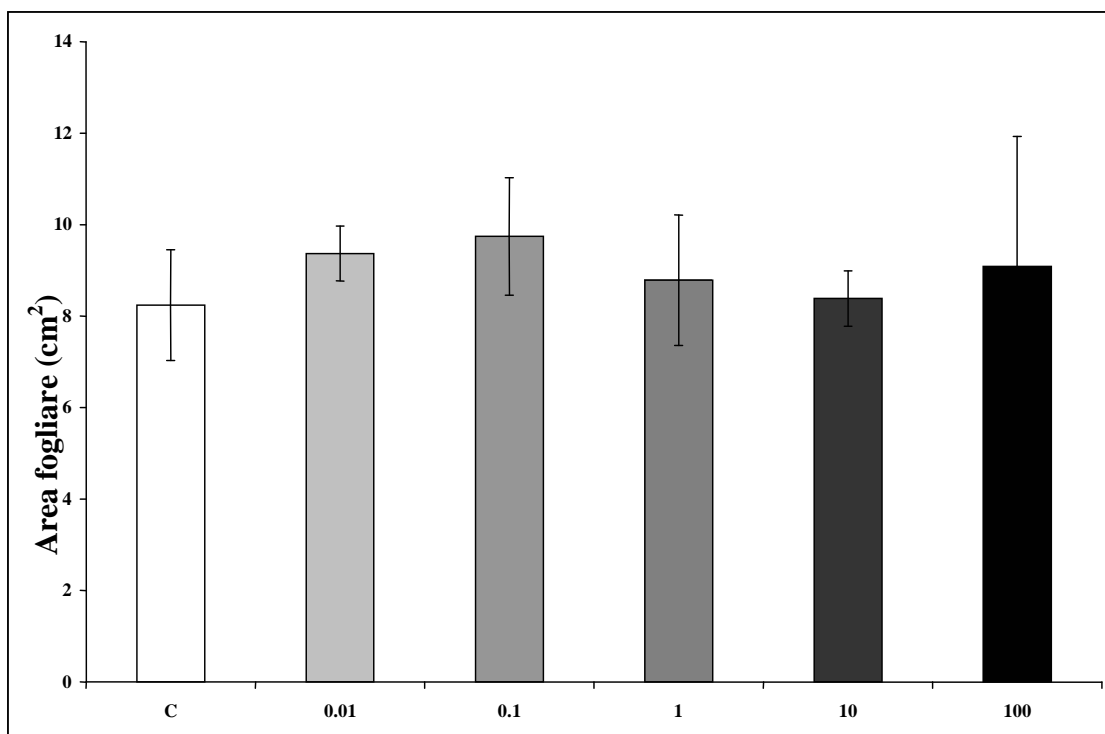


Figura 4.11 Area media finale di una singola foglia delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES

Nell'istogramma relativo alla superficie media della singola foglia (Fig. 4.11) è possibile distinguere una relazione dose/effetto di tipo ormetico fino alla concentrazione 10 ppm, tuttavia, anche in questo caso nessuna differenza significativa è stata messa in risalto con l'analisi statistica ($p \leq 0.05$). I valori più bassi appartengono alle piante controllo (8.2 cm^2) e a quelle trattate con 10 ppm (8.3 cm^2), mentre il valore più alto appartiene al trattamento 0.1 ppm (9.7 cm^2), mentre il trattamento con 100 ppm (9.0 cm^2) presenta un valore maggiore rispetto al controllo.

Per quanto riguarda il peso della biomassa radicale delle piante controllo e trattate, con l'analisi della Figura 4.12 è possibile vedere un andamento dose/effetto di tipo ormetico di questo parametro, anche se nessuna differenza significativa è stata messa in risalto con l'analisi statistica ($p \leq 0.05$).

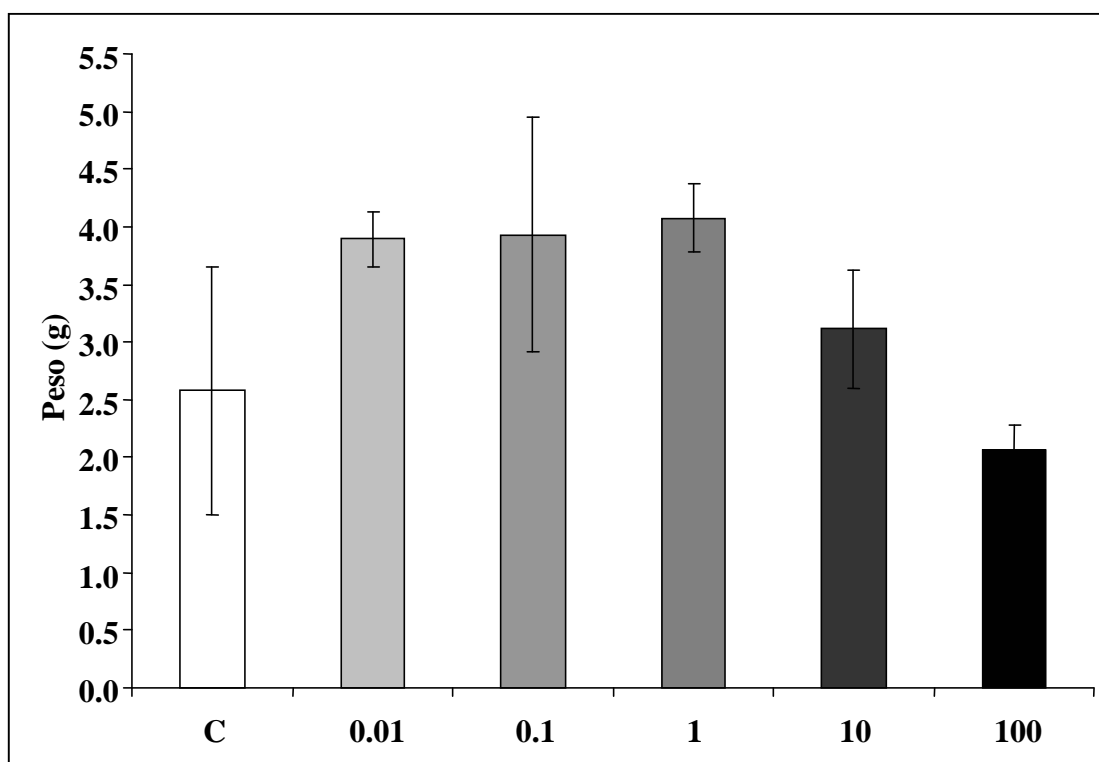


Figura 4.12 Peso medio delle radici a fine trattamento delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES

L'ormesi può essere considerata una funzione adattativa caratterizzata da una risposta bifasica dose-dipendente, che si manifesta come conseguenza dell'esposizione ad un range molto ampio di stimoli. Le risposte ormetiche, in genere, mostrano una modesta stimolazione alle basse dosi e un'inibizione alle alte dosi. La curva dose/risposta può essere raffigurata da una U dritta, se viene valutato un danno all'organismo, ad. esempio alterazioni di funzioni

fisiologiche, incidenze di malattie, o ad una U rovesciata, se si considerano funzioni quali accrescimento o sopravvivenza (Calabrese e Baldwin, 2002).

Il gruppo di piante controllo presenta un peso medio delle radici minore (2,5 g) rispetto alle piante cresciute a basse concentrazioni, sino al valore massimo registrato per le piante trattate con 1 ppm di SDZ (4.0 g). Concentrazioni maggiori diminuiscono il loro peso e il valore più basso è mostrato dalle piante cresciute in presenza di 100 ppm di SDZ (2.0 g).

Lo stesso andamento è stato riscontrato in un esperimento eseguito su piante di *Zea mays* L. utilizzando tetracicline. In quel caso l'effetto dose/effetto di tipo ormetico veniva riscontrato sia per la parte ipogea che epigea della pianta (Migliore et al., 2009). In piante di *Salix fragilis* L. trattate in idroponica con sulfadimetossina 0.01- 10 ppm l'effetto ormetico è stato osservato, come qui, solo a livello di apparato radicale (Toscano, 2011).

Una diversificazione morfologica delle radici e degli apici radicali è stata notata all'analisi visiva degli apici radicali; mentre a livello globale (Fig. 4.13) non è visibile nessuna differenza sostanziale tra i vari apparati radicali, al contrario, scendendo nel dettaglio (Fig. 4.14), si nota una sostanziale differenza tra gli apici radicali delle varie classi di trattamento.

Gli apici radicali delle piante cresciute senza SDZ (controllo) e a concentrazioni iniziali basse (0.01 e 0.1 ppm) sono di colore giallo chiaro, privi di ramificazioni laterali e di una lunghezza paragonabile tra loro. Nelle piante cresciute a concentrazioni iniziali maggiori (10 e 100 ppm) gli apici radicali mostrano un'alterata morfologia. Essi si presentano, infatti, di dimensioni ridotte, sono di colore scuro tendente al nero e con molte ramificazioni laterali, il che segnala una situazione di stress.

Questi effetti possono essere associati ai test di geminabilità effettuati in presenza di antibiotici tra cui i SAs, i quali hanno dimostrato di incidere negativamente sulla germinabilità dei semi e sulla crescita delle piante utilizzate, ma solo i SAs hanno mostrato un notevole effetto sulla crescita delle radici delle piante di *Oryza sativa* L. Anche nel nostro trattamento, la SDZ ha determinato dei cambiamenti morfologici nelle radici, ma solo alle concentrazioni più alte.

In conclusione le analisi morfometriche indicano che il nocciolo non sembra risentire in maniera marcata della presenza di SDZ nel terreno: infatti, lo sviluppo della parte epigea sembra addirittura maggiore nelle piante trattate con 100 ppm di SDZ. La biomassa ipogea, invece, esibisce un andamento di tipo ormetico, con una crescita lievemente stimolata alle basse concentrazioni di SDZ e inibita alle concentrazioni più alte. L'effetto negativo osservato



Fig. 4.13 Foto delle radici delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) a fine trattamento

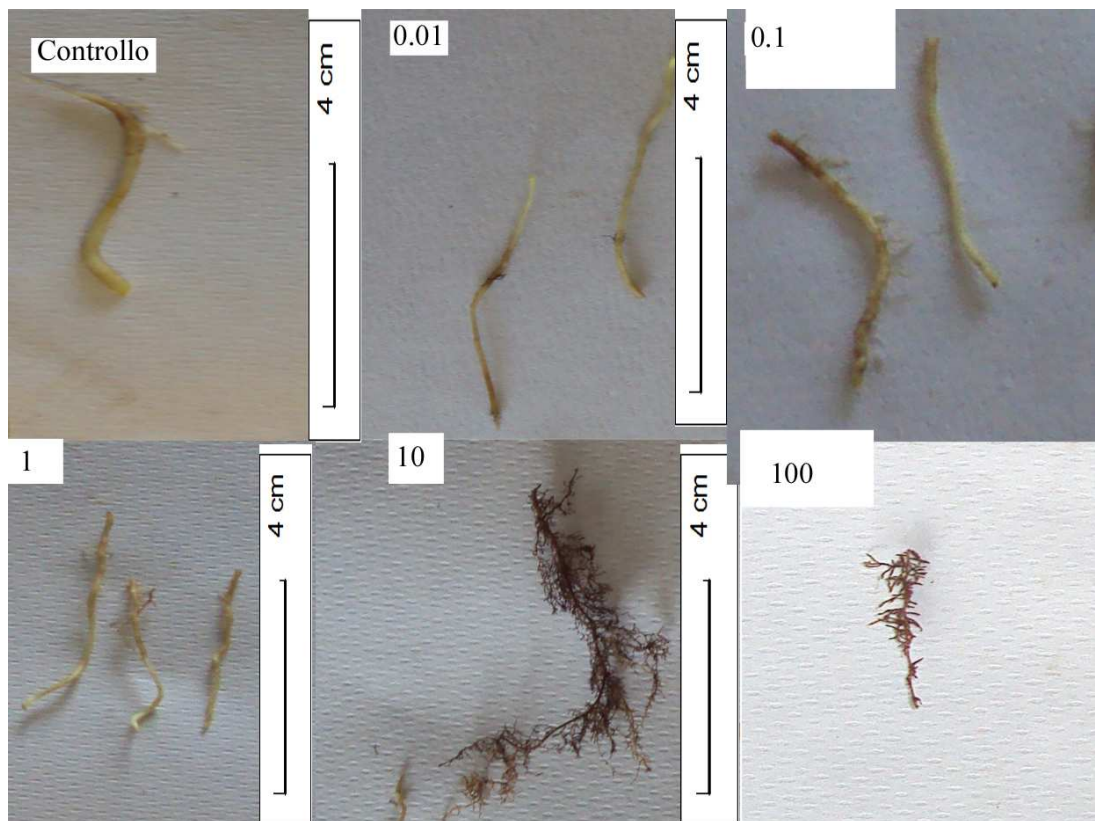


Fig. 4.14 Foto degli apici radicali delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) a fine trattamento

alle alte concentrazioni risulta evidente anche nella morfologia delle radici trattate che mostrano ramificazioni e segni di sofferenza. Questi risultati sono in accordo con quanto riscontrato in piante di salice trattate con sulfadimetossina (Michelini e al., 2011), tuttavia, sono differenti da quanto descritto da Dolliver et al., (2007) e Liu et al. (2008), in cui altre specie vegetali hanno mostrato una riduzione della crescita se cresciute in presenza di antibiotici.

Ad esempio, la sulfadimetossina ha ridotto significativamente la crescita di altre specie (Jjemba, 2001), ma la SDZ sembra non abbia particolari effetti sulla parte epigea della pianta, mentre la parte ipogea sembra essere addirittura stimolata a basse concentrazioni di SDZ; anche questo in contrasto con la riduzione della crescita delle radici di piante di *Pisum sativa* L. cresciute in presenza di antibiotici (Dolliver et al., 2007).

4.5 Fotosintesi netta

Di seguito sono riportati i risultati relativi alle misure di fotosintesi netta media per tesi di trattamento (Fig. 4.15) effettuate con *infrared gas analyzer LiCor LI-6400 XT-system* espressi in $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Le lettere sugli istogrammi si riferiscono all'analisi statistica ANOVA; nella figura successiva (Fig. 4.16) sono, invece, riportati gli stessi dati espressi come percentuale rispetto al controllo.

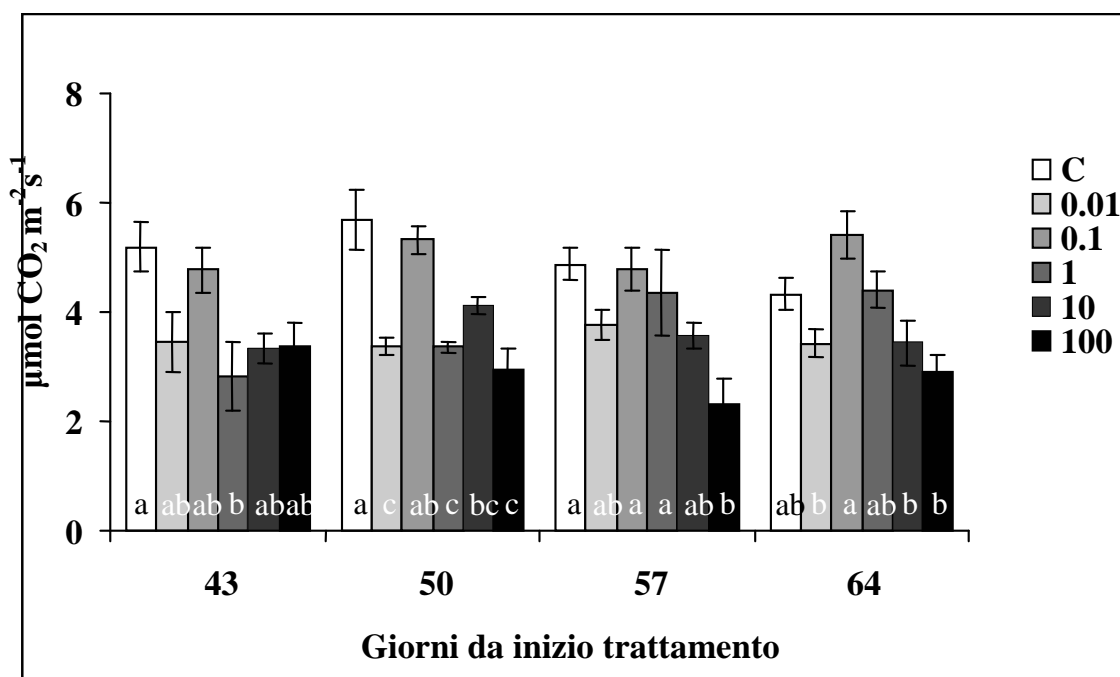


Figura 4.15 Fotosintesi netta media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES. Le lettere diverse indicano differenze significativa ($P \leq 0.05$).

Dal grafico riportato in Figura 4.15 è possibile vedere come le foglie delle piante controllo e quelle del trattamento con 0.1 ppm di SDZ mantengano sempre i valori medi di fotosintesi netta più alta, con un valore medio delle piante controllo di 5.20, 5.69, 4.88 e 4.33 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nelle quattro giornate di misura.

Le piante cresciute a concentrazioni maggiori (1, 10 e 100 ppm) mostrano sempre valori medi di fotosintesi netta minori rispetto ai valori registrati per le piante controllo: queste piante fotosintetizzano in media il 60% della CO_2 fissata dalle piante controllo nelle giornate 43 e 50 (Fig. 4.16). Nelle due giornate successive si può notare un diverso andamento dei valori di questo parametro nelle piante cresciute a 1, 10 e 100 ppm (Fig. 4.16). Infatti, a questi dosaggi la fotosintesi si riduce in relazione inversa alla concentrazione di SDZ di crescita: ad esempio, il valore maggiore di fotosintesi nella giornata 64 è stato misurato per la tesi 0.1 ppm (5.41 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), seguita dalla tesi 1 ppm (4.41 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e dalla tesi 10 (3.44 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ed il valore minore è stato registrato dalla tesi 100 ppm (2.92 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

I risultati in nostro possesso sono leggermente inferiori ad alcuni dati ritrovati in letteratura. Ad esempio, la fotosintesi netta misurata per alcuni ibridi di nocciolo varia tra i 10 e i 18 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Awada, 2007).

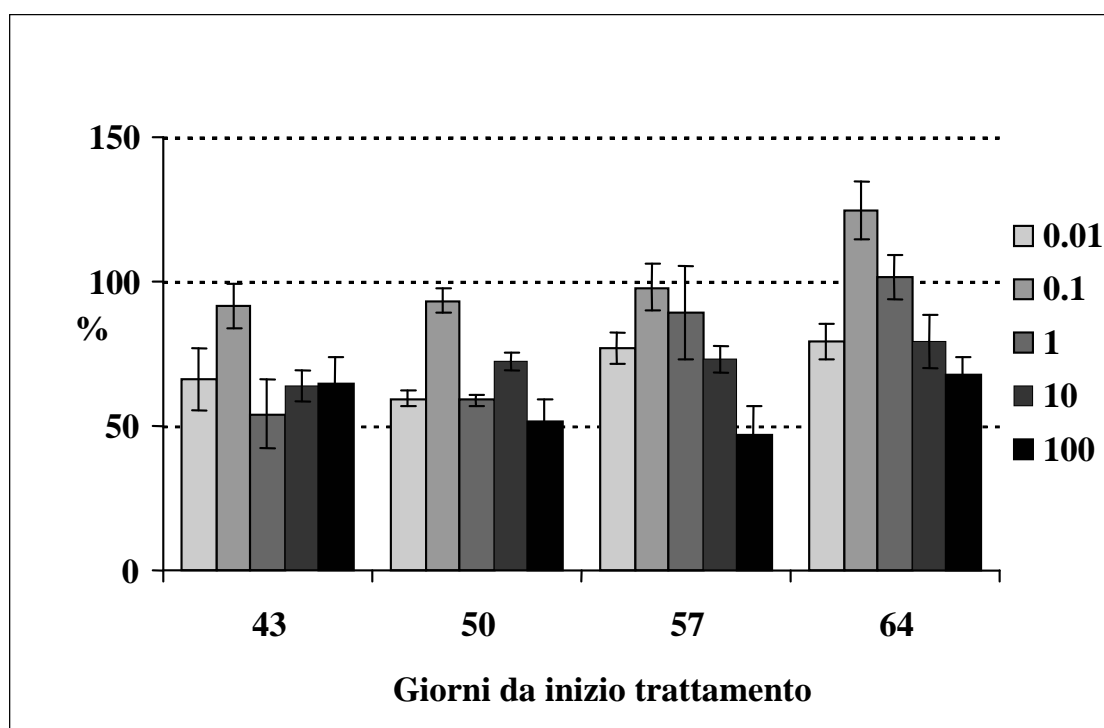


Figura 4.16 Fotosintesi netta media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo espresse come percentuale del controllo. Le barre indicano l'ES.

4.3 Traspirazione, Conduttanza, WUE

Nella Figura 4.17 sono riportati gli istogrammi relativi alla traspirazione effettuate con *infrared gas analyzer LiCor LI-6400 XT-system* espressi in $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, Le lettere si riferiscono all'analisi statistica ANOVA effettuata sui dati. Nella Figura seguente (4.18) sono riportati gli stessi dati espressi in percentuale rispetto al controllo.

Le piante controllo si posizionano tra i valori più alti di traspirazione ($0,80 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) misurati nelle quattro giornate, mentre le piante cresciute a più alto dosaggio di SDZ (1, 10 e 100 ppm) registrano sempre i valori minori in tutte le giornate.

Come visto per la fotosintesi netta (Fig. 4.15 e 4.16) anche la traspirazione delle piante cresciute a concentrazioni iniziali maggiori (1, 10 e 100 ppm) presentano mediamente il 60% (Fig. 4.18) della traspirazione misurata dalla piante controllo nelle prime 2 giornate di misura.

Nelle ultime due giornate di misura si può notare un diverso andamento dei valori di traspirazione delle tesi 1, 10 e 100 (Fig. 4.18): come nella fotosintesi, la traspirazione media diminuisce in relazione inversa alla concentrazione di SDZ di trattamento.

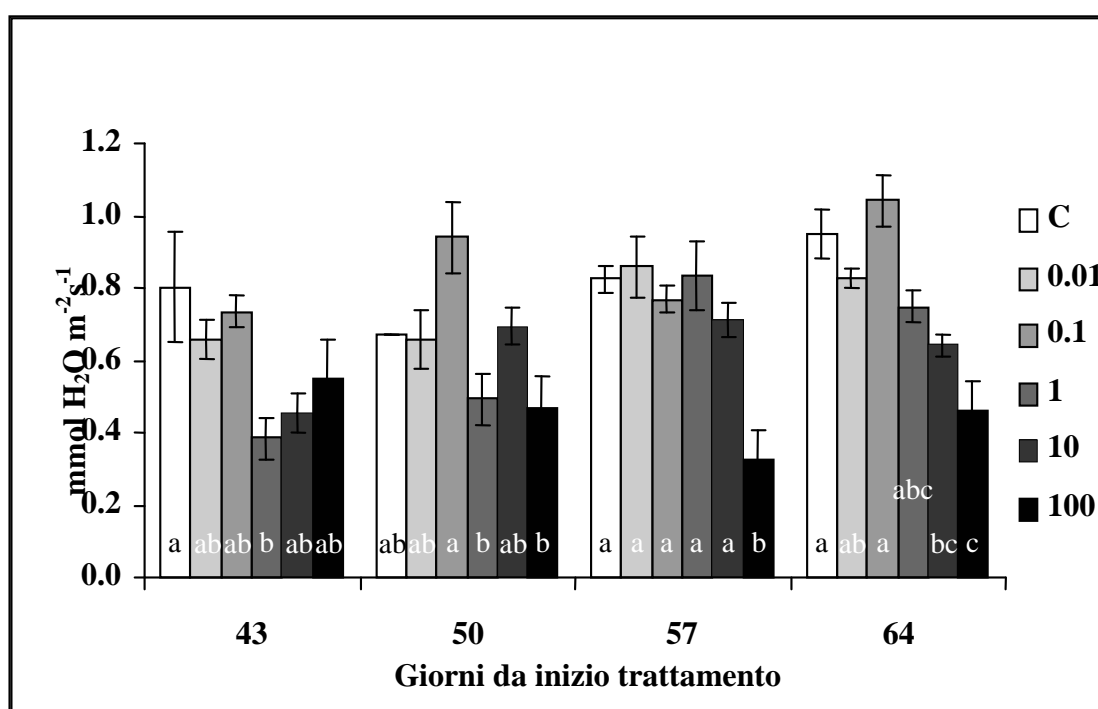


Figura 4.17 Traspirazione media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES. Lettere diverse indicano differenze significative ($P \leq 0.05$)

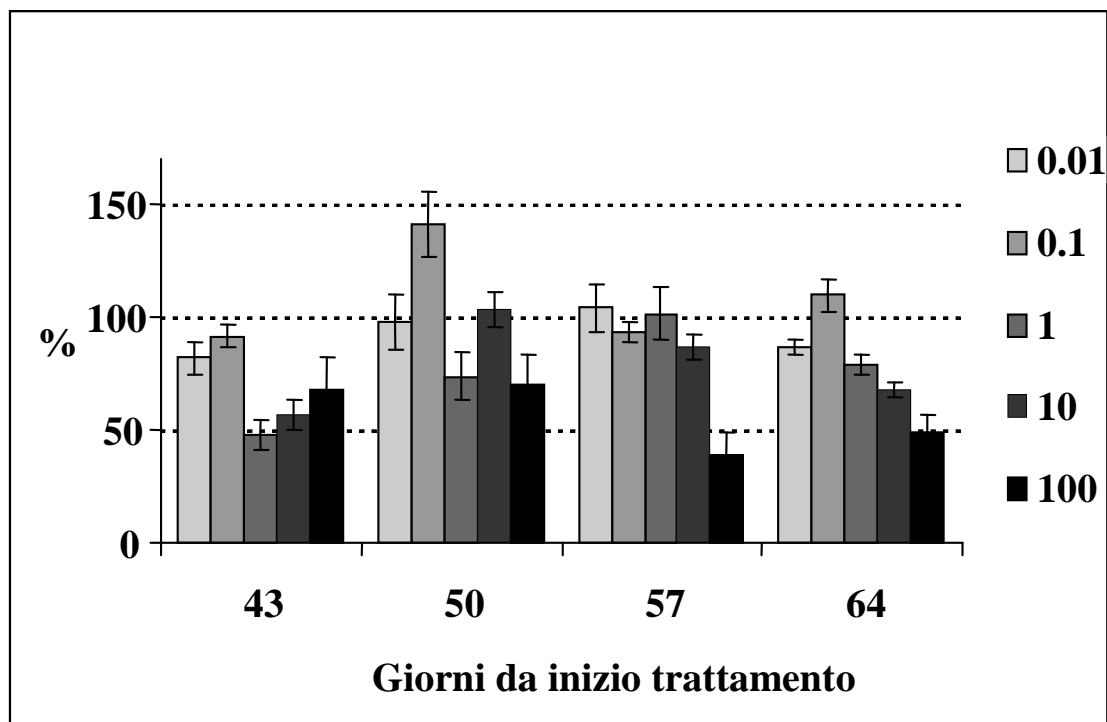


Figura 4.18 Traspirazione media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm), nel tempo espressa come percentuale del controllo. Le barre indicano l'ES.

Il valore maggiore misurato nella giornata 64 è registrato dalla classe 0.1 ppm ($1.04 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), seguita dalla classe 1 ppm ($0,75 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), dalla tesi 10 ppm ($0,64 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ed infine dalla classe 100 ($0,46 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) che registra il valore minore di traspirazione nella giornata 64, circa il 50% del valore di traspirazione registrato per le piante controllo.

Nella Figura 4.19 sono riportati gli istogrammi relativi alle misurazioni di conduttanza stomatica effettuate con *infrared gas analyzer LiCor LI-6400 XT-system* espressi in $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$; nella Figura successiva (Fig. 4.20) sono riportati gli stessi dati in percentuale rispetto al controllo. Le lettere si riferiscono all'analisi statistica ANOVA effettuata sui dati.

Anche in questo caso, le piante controllo si posizionano tra i valori maggiori di conduttanza stomatica registrati nelle 4 giornate di misura (Fig 4.19); mentre le piante cresciute a più alto dosaggio (1, 10 e 100 ppm) registrano dei valori minori in ogni giornata. Anche in questo caso (Fig. 4.20) le tesi 1, 10 e 100 ppm registrano il 60% circa della conduttanza stomatica registrata per le piante controllo nelle prime 2 giornate di misura.

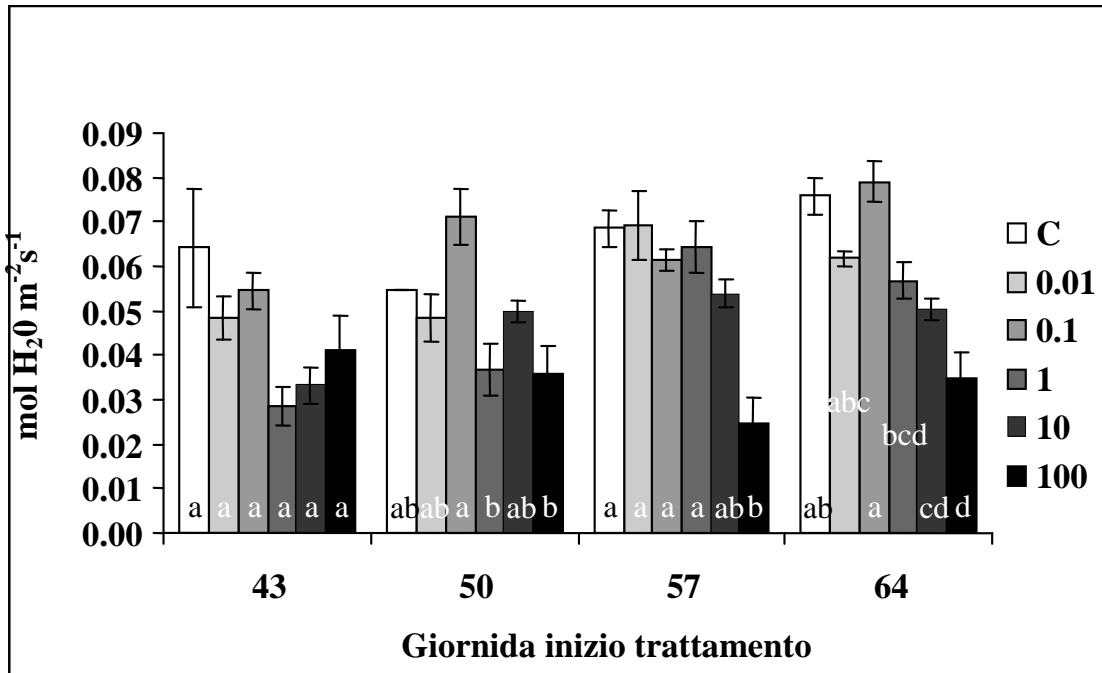


Figura 4.19 Conduttanza media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES. Lettere diverse indicano differenze significative ($P \leq 0.05$).

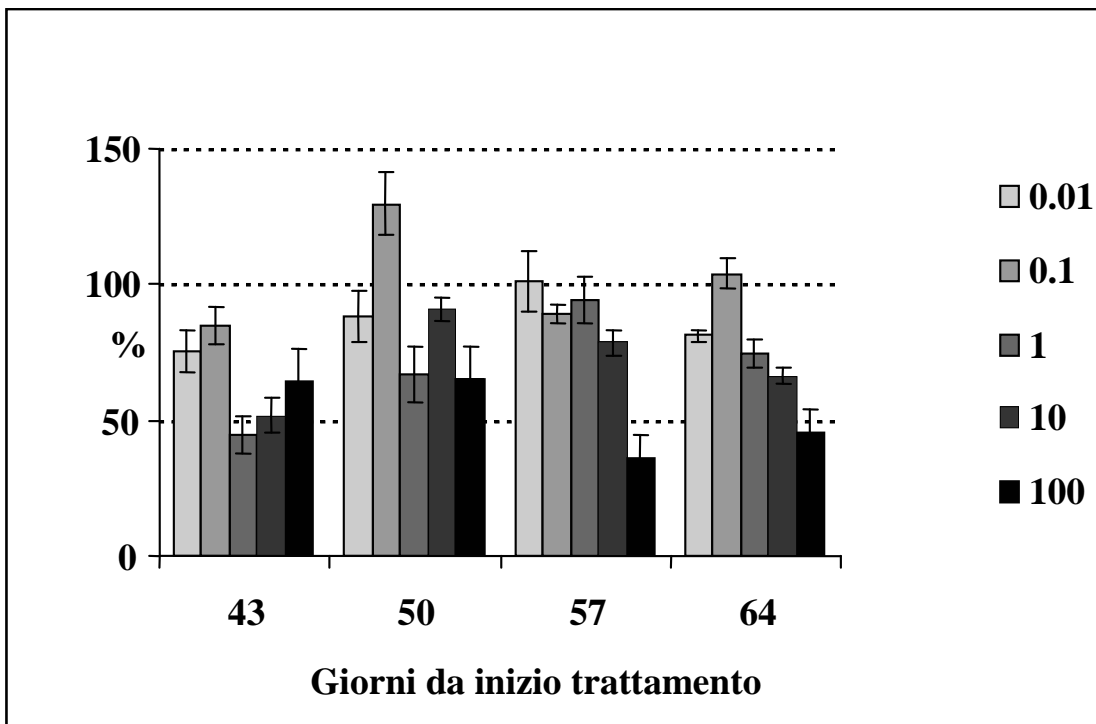


Figura 4.20 Conduttanza media delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm), nel tempo espressa come percentuale del controllo. Le barre indicano l'ES.

Nelle due giornate finali di rilievo, i valori di conduttanza stomatica registrano una diversificazione del loro andamento: come visto per la fotosintesi netta e per la traspirazione, anche la conduttanza stomatica presenta una relazione inversa con le concentrazioni di SDZ di trattamento. Infatti, nella giornata 64 (Fig. 4.19) il valore maggiore è registrato dalla classe 0.1 ($0,079 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), seguita dalla classe 1 ($0,056 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), dalla classe 10 ($0,050 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ed infine dalla classe 100 ($0,034 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), che registra il valore minore anche nella giornata 57. Pertanto, questi dati suggeriscono che le piante trattate con le alte concentrazioni di SDZ abbiano una traspirazione rallentata (deficit idrico), forse anche come meccanismo di difesa per rallentare l'accumulo del principio attivo a livello fogliare (avoidance).

I dati in nostro possesso sono mediamente maggiori dei valori di conduttanza stomatica descritte in letteratura per il nocciolo: la conduttanza stomatica nel nostro trattamento varia tra 0.03 e $0.08 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, in letteratura varia tra 0.02 e 0.04 (Awada, 2007)

Nella Figura 4.21 è riportato l'andamento del parametro WUE (water use efficiency), per definizione il rapporto tra moli di CO_2 fissate e moli di H_2O traspirate. Nella successiva Figura (Fig. 4.22) gli stessi dati sono riferiti in termini percentuali rispetto al controllo. Nella Figura 4.21 è possibile notare come le differenze tra i trattamenti siano in genere meno che nei grafici della fotosintesi e della traspirazione e che i valori di WUE si attestino tutti intorno il 5%, senza differenze significative, come indicato dall'analisi statistica.

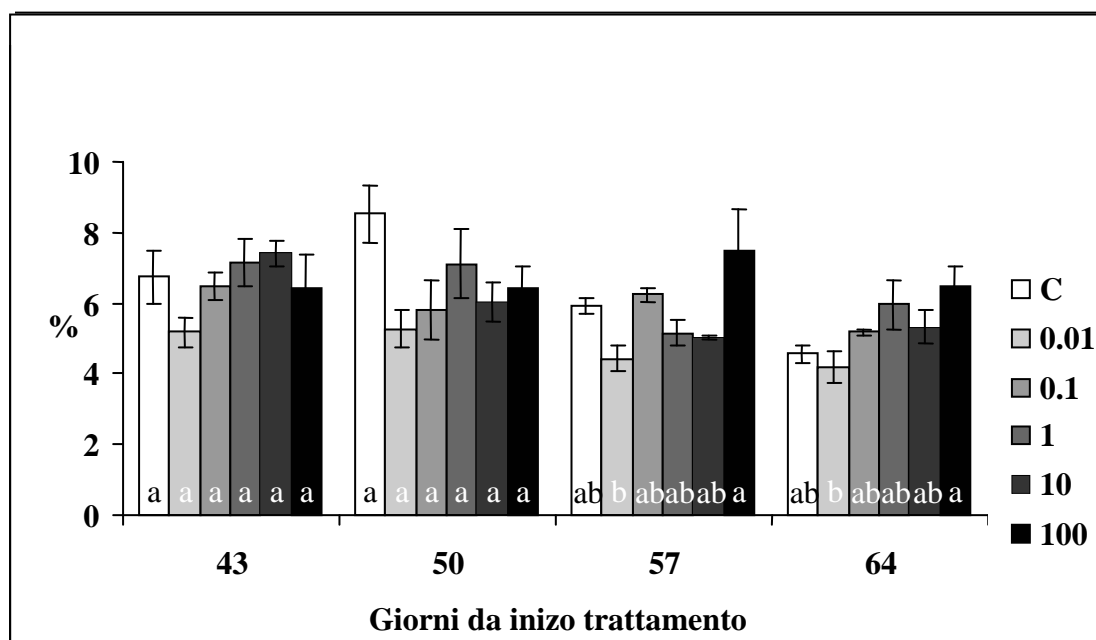


Figura 4.21 WUE medio delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm), nel tempo. Le barre indicano l'ES. Lettere diverse indicano differenze significativa ($P \leq 0.05$).

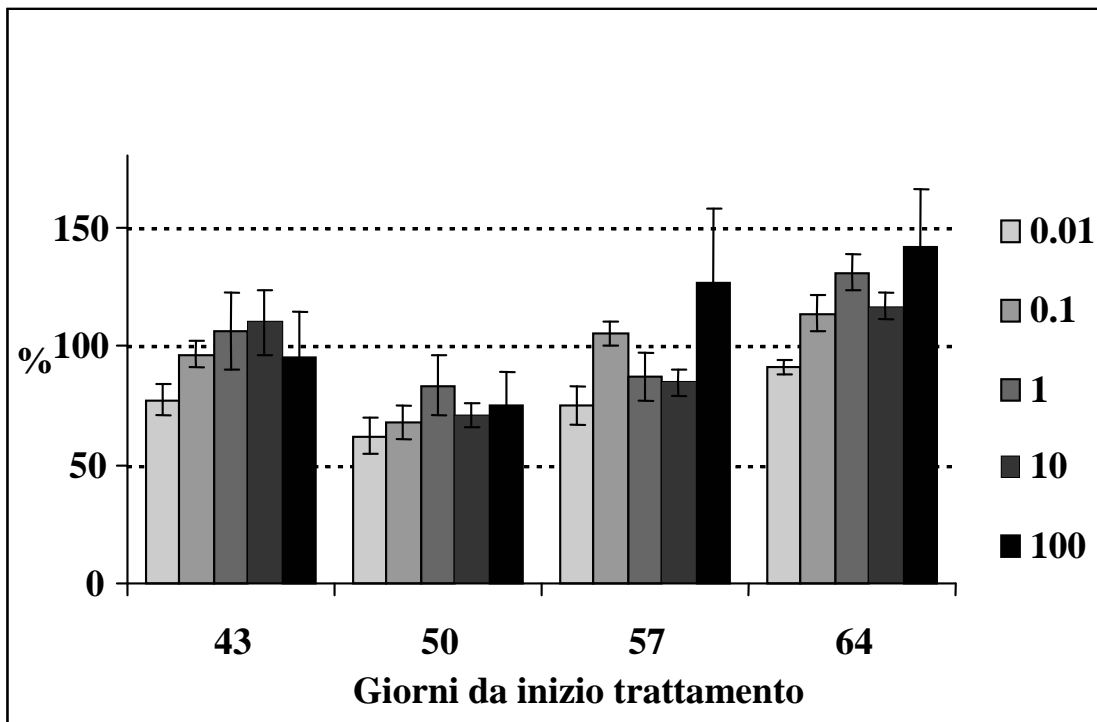


Figura 4.22 WUE medio delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm), nel tempo espressa come percentuale del controllo. Le barre indicano l'ES.

Nell'ultima giornata di misura, giorno 64 (Fig. 4.21), le piante controllo si posizionano tra i valori più bassi calcolati (4.57%), mentre la tesi 100 ppm registra il valore maggiore (6.64 %) e le restanti classi registrano posizioni intermedie, in una relazione diretta tra concentrazione di crescita e WUE. Tale andamento crescente della WUE con la concentrazione di SDZ, seppure senza una significatività statistica sembra indicare che gli effetti negativi del trattamento delle piante di nocciolo con SDZ si realizzino più a livello di relazioni idriche che di fotosintesi.

Nei dati descritti in letteratura il WUE varia tra il 2 e il 4% circa in quattro sottospecie di nocciolo (Awada, 2007) e sono, pertanto, in linea con quanto da noi rilevato.

In conclusione, le analisi dei parametri relativi agli scambi gassosi indicano che le concentrazioni più alte di SDZ inducono un generale abbassamento della velocità con cui avvengono gli scambi gassosi nelle foglie. Tuttavia, conduttanza stomatica e traspirazione diminuiscono in maniera più sensibile della fotosintesi, dato, questo, confermato dall'aumento della WUE con la concentrazione di SDZ.

4.4 Fluorescenza

Negli istogrammi successivi (Fig. 4.23) sono riportati i dati relativi al rendimento del fotosistema II (Φ PSII) effettuati con *infrared gas analyzer LiCor LI-6400 XT-system*, e nella Figura 4.24 sono riportati i dati in rapporto percentuale con il controllo.

In tutte e quattro le giornate di misura le piante controllo si posizionano tra i valori più alti registrati insieme a quelle della tesi 0.1 ppm, ma in questo caso, le differenze con le piante cresciute ad elevate concentrazioni (1, 10 e 100 ppm) sono meno evidenti che per la fotosintesi netta. Infatti, le piante cresciute ad alte concentrazioni di SDZ mostrano circa il 10% in meno di rendimento del PSII rispetto al controllo (Fig. 4.24). Diversamente dai dati relativi agli scambi gassosi, l'andamento del Φ PSII con la concentrazione di SDZ è molto simile tra le diverse giornate di misura, con una tendenza alla diminuzione, seppur lieve, a partire da 0.1 ppm, dose a cui si registrano i valori più alti.

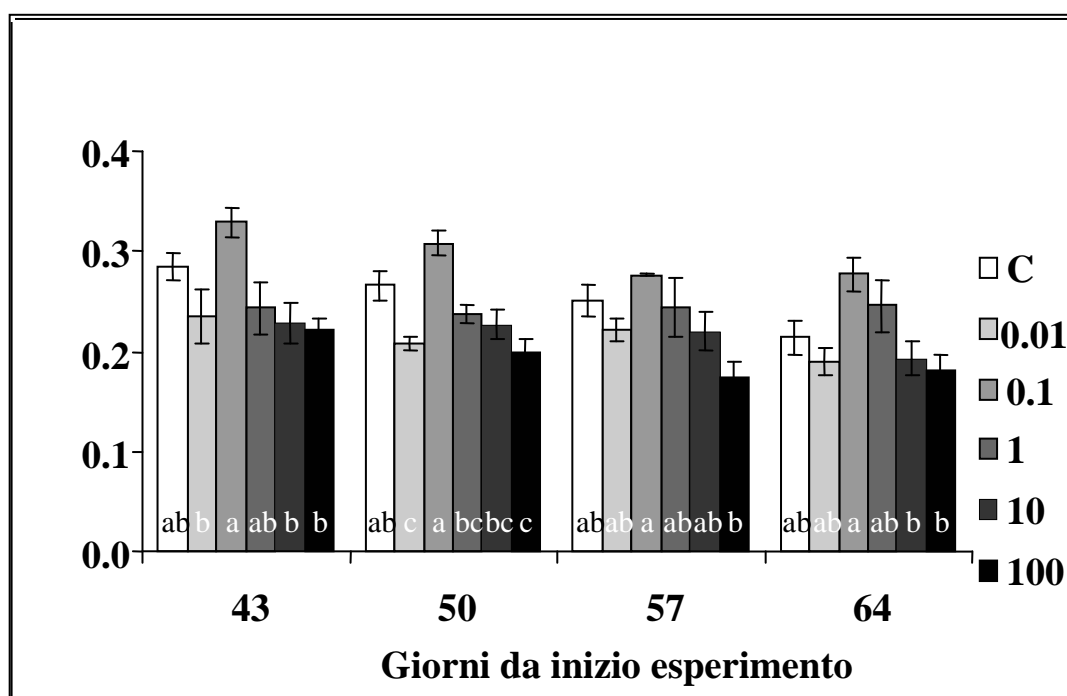


Figura 4.23 Φ PSII medio per tesi di trattamento nel tempo delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES. Lettere diverse indicano differenze significative ($P \leq 0.05$).

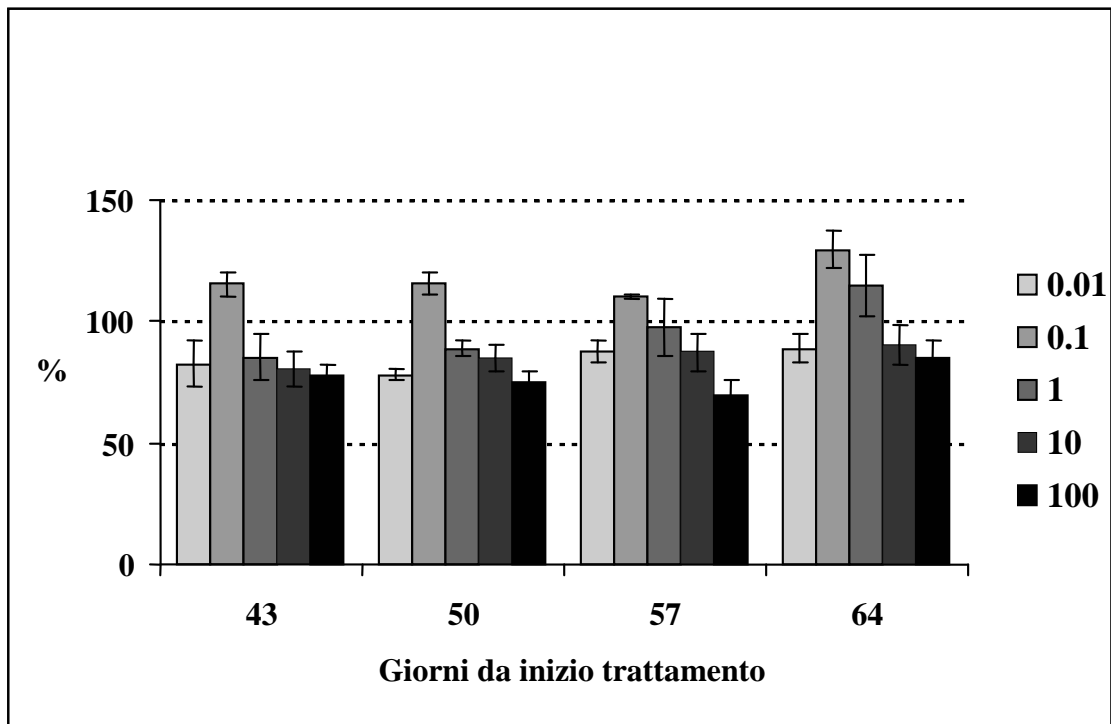


Figura 4.24 Φ PSII medio delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm), nel tempo espresso come percentuale del controllo. Le barre indicano l'ES.

Nella Figura 4.25 sono riportati i risultati delle misurazioni del trasporto fotosintetico di elettroni (ETR) in $\mu\text{mol e m}^{-2}\text{s}^{-1}$, effettuati con *infrared gas analyzer LiCor LI-6400 XT-system*.

Anche per l'ETR le piante controllo, insieme a quelle cresciute a 0.1 ppm, presentano valori tra i più alti in tutte 4 le giornate di misura (Fig. 4.25) e le altre tesi di trattamento mostrano in genere livelli di poco inferiori al controllo di circa il 10% in tutte le giornate di misura (Fig. 4.26). Come visto per il Φ PSII, anche l'andamento dell'ETR mostra una relazione inversa con la concentrazione di SDZ in tutte le giornate, a partire dalla dose 0.1 ppm. Ad esempio, nell'ultima giornata di misura la tesi 0.1 registra il valore massimo di ETR ($36 \mu\text{mol e m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Fig. 4.26), seguita dalla tesi 1 ($32 \mu\text{mol e m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e 10 ($25 \mu\text{mol e m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ppm, ed infine dalla tesi 100 ($23 \mu\text{mol e m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

In conclusione, i dati relativi al Φ PSII e all'ETR indicano che la fase luminosa della fotosintesi è meno influenzata della velocità di fissazione della CO_2 , dalla presenza di SDZ nel terreno.

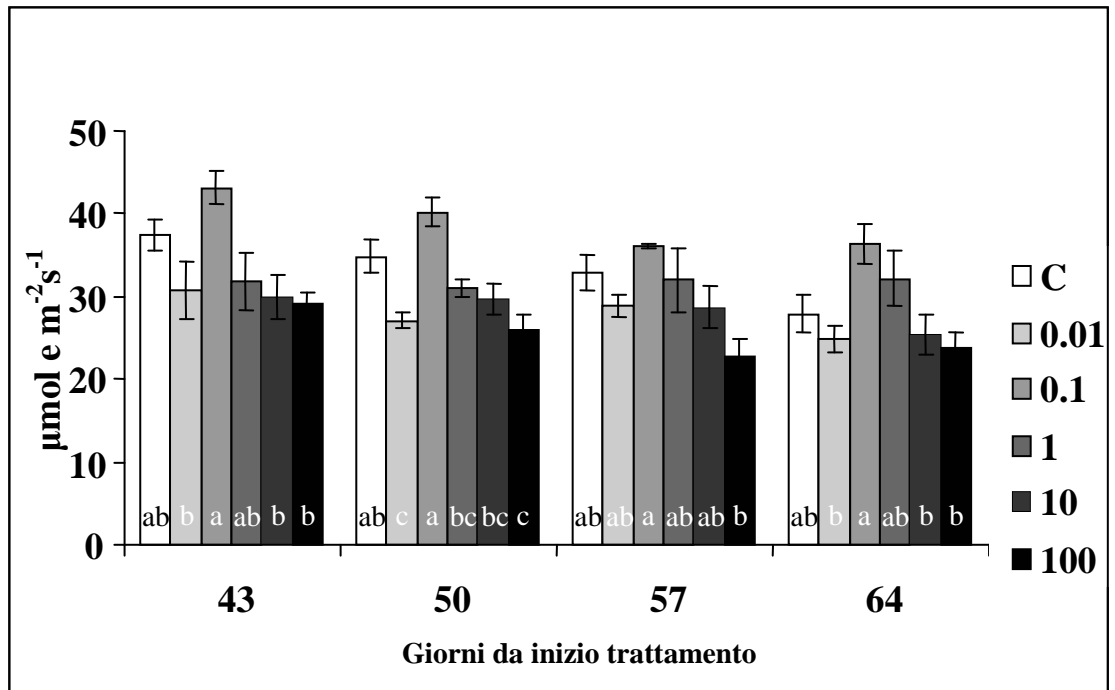


Figura 4.25 ETR medio delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm) nel tempo. Le barre indicano l'ES. Lettere diverse indicano differenze significative ($P \leq 0.05$).

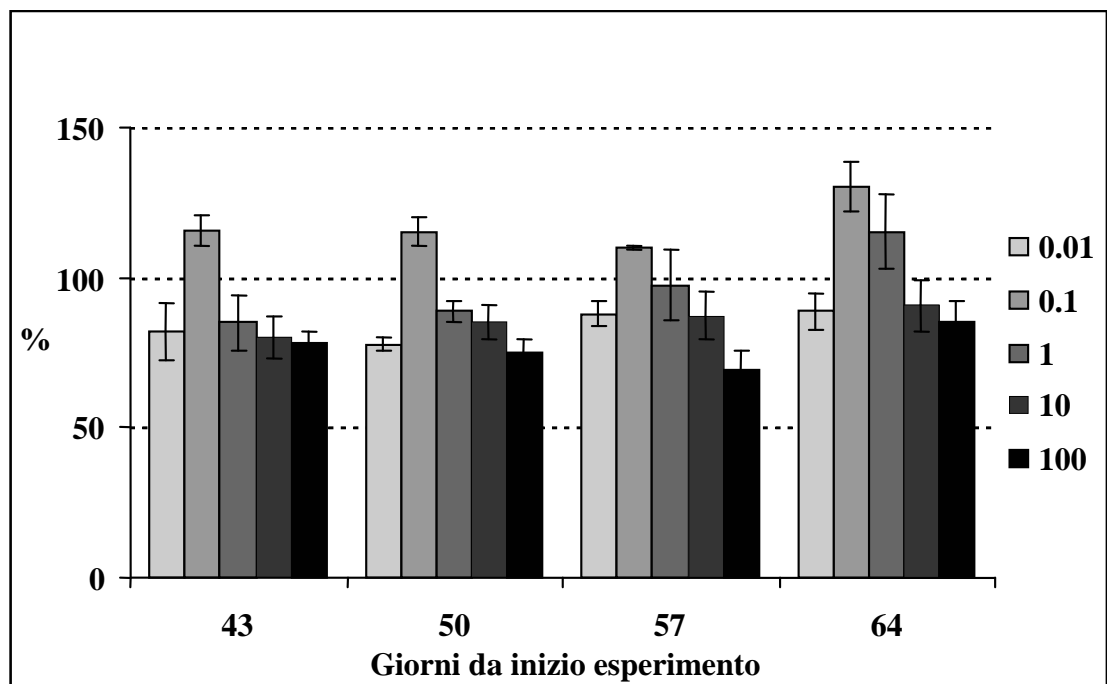


Figura 4.26 ETR medio delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm), nel tempo espresso come percentuale del controllo. Le barre indicano l'ES.

4.5 Parametri fotosintetici riferiti all'area fogliare delle piante

Riferendo all'area fogliare totale i parametri fotosintetici e relativi agli scambi gassosi è possibile valutare gli effetti del trattamento con SDZ a livello di pianta intera. Il calcolo è stato eseguito utilizzando le ultime misurazioni effettuate (giorno 64 per i parametri fotosintetici, giorno 70 per le aree fogliari). Nei grafici così ottenuti (Fig. 4.27, 4.28, 4.29 e 4.30) è possibile notare un curva dose/effetto di tipo ormetico, fino alla concentrazione di 10 ppm, in quanto alla dose 100 ppm si osservano valori di fotosintesi totale, conduttanza e traspirazione paragonabili al controllo. Con l'eccezione delle piante 10 ppm, l'andamento per superficie totale del WUE è, invece, di tipo crescente (Fig. 4.30). E' da ricordare, comunque, che nessuna differenza significativa è stata messa in risalto con l'analisi statistica. ($p \leq 0.05$).

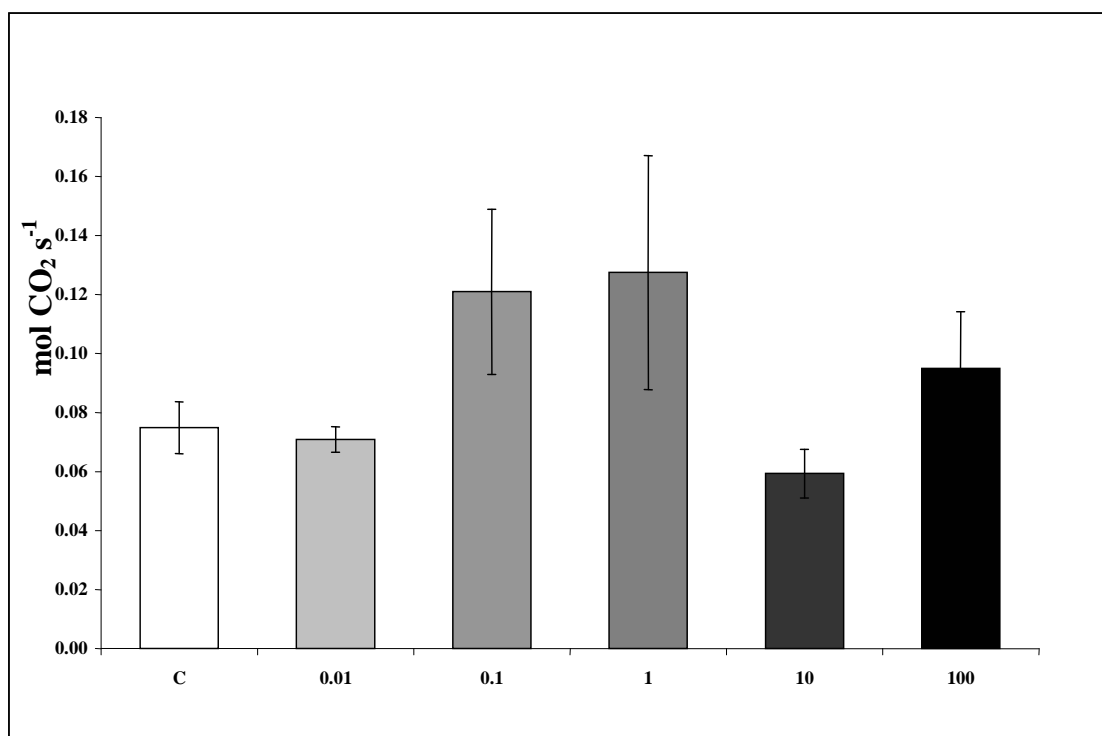


Figura 4.27 Fotosintesi netta media delle piante di *Corylus avellana* L. calcolata per l'area fogliare totale a fine trattamento alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES.

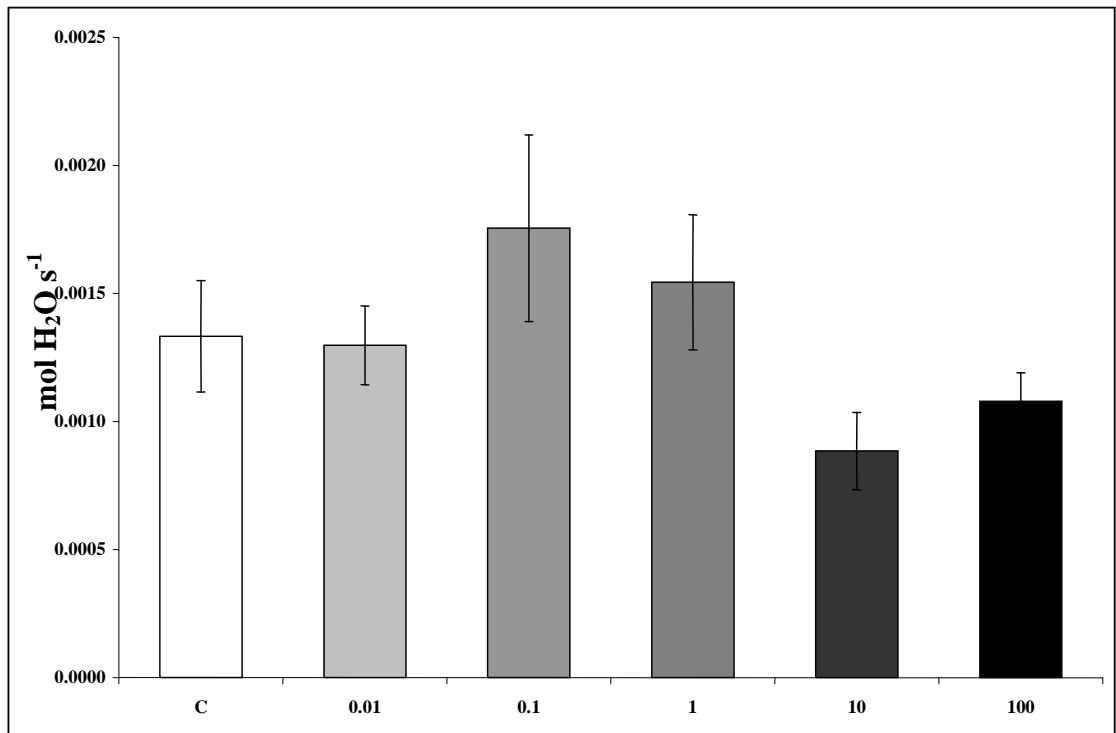


Figura 4.28 Conduttanza media delle piante di *Corylus avellana* L. calcolata per l'area fogliare totale a fine trattamento alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES.

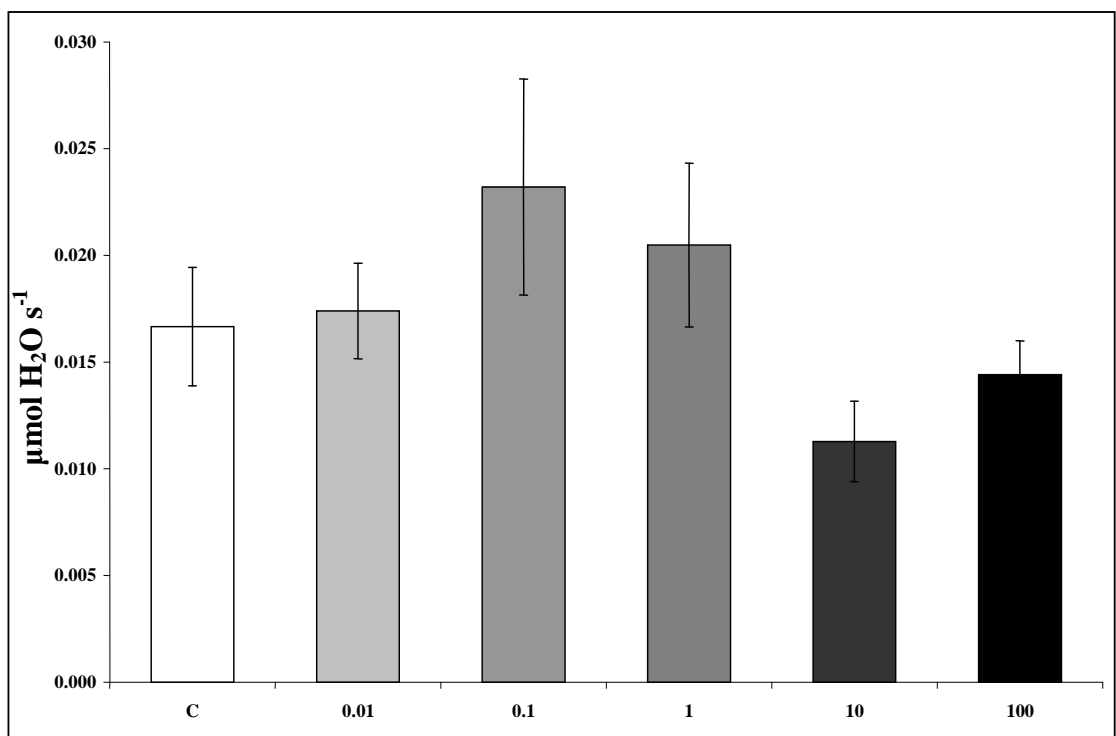


Figura 4.29 Traspirazione media delle piante di *Corylus avellana* L. calcolata per l'area fogliare totale a fine trattamento alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES.

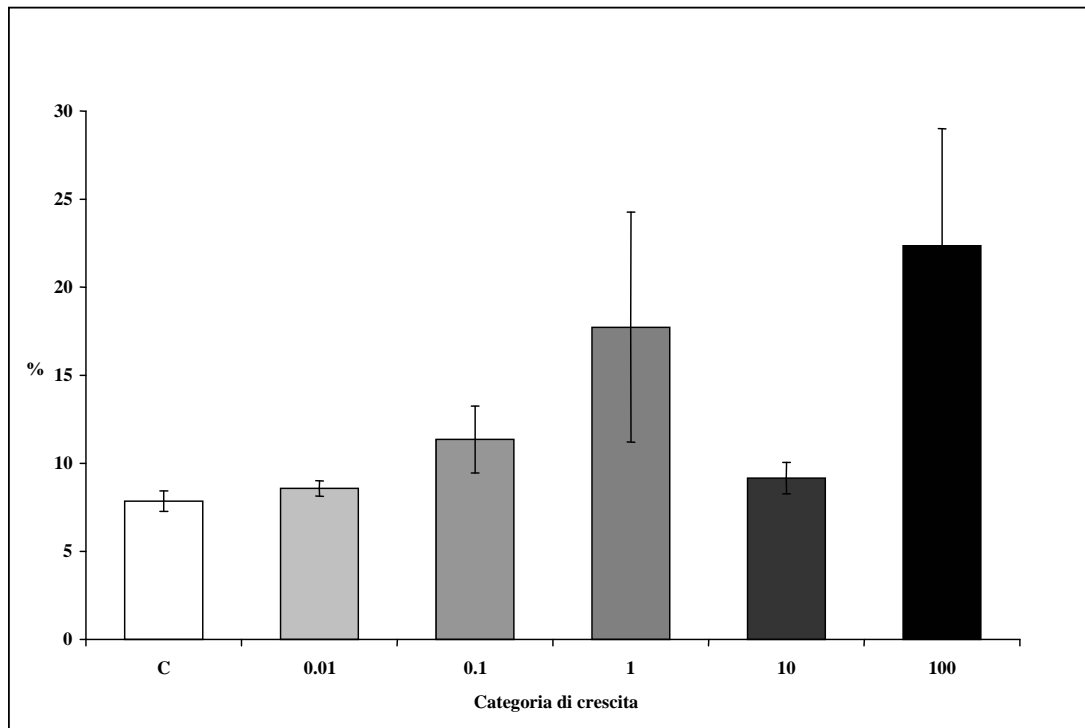


Figura 4.30 WUE medio delle piante di *Corylus avellana* L. calcolato per l'area fogliare totale a fine trattamento alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES.

In conclusione i dati relativi alla fissazione di CO₂ per l'intera area fogliare potrebbero indicare che le piante sottoposte a concentrazioni troppo elevate di SDZ compensino la minore velocità di fotosintesi attraverso la produzione di un numero maggiore di foglie. Alternativamente si potrebbe pensare che queste piante abbiano a disposizione un maggior quantitativo di carbonio per la crescita dell'apparato epigeo poichè il loro apparato radicale è ridotto per l'effetto tossico della SDZ.

4.5 Microorganismi endofiti

Nella figura 4.31 è riportato il conteggio, mediato su 5 campioni, delle colonie di endofiti presenti nelle varie tesi. Le piastre del controllo contengono un valore medio di colonie pari a 9, mentre quelle delle tesi 0.01 e 0.1 ppm, seppure con una certa variabilità, presentano i valori di colonie più alti (mediamente intorno a 45). Questi risultati potrebbero essere spiegati da una induzione alla migrazione fisica degli endofiti dalle radici, organo dove i sulfamidici preferenzialmente si accumulano (Michelini et al. 2011), verso gli organi epigei della pianta, stimolata dalla percezione di concentrazioni subletali di antibiotico. Tale induzione è postulabile possa iniziare anche da suolo stesso, provocando un maggior passaggio dalla vita rizosferica a quella endofitica e la successiva ascesa alle parti aeree della pianta quale meccanismo di rifugio ed evitamento del composto tossico. Nelle tesi 1, 10 e 100 ppm si riscontrano, invece, i numeri più bassi di colonie (rispettivamente 1, 4 e 0), presumibilmente perché a queste concentrazioni il sulfamidico si accumula anche a livello fogliare raggiungendo concentrazioni troppo elevate per la crescita degli endofiti, o per un effetto di letalità già acuto a livello di suolo e di sedi radicali con conseguente abbattimento delle cariche microbiche sia rizosferiche che endofitiche.

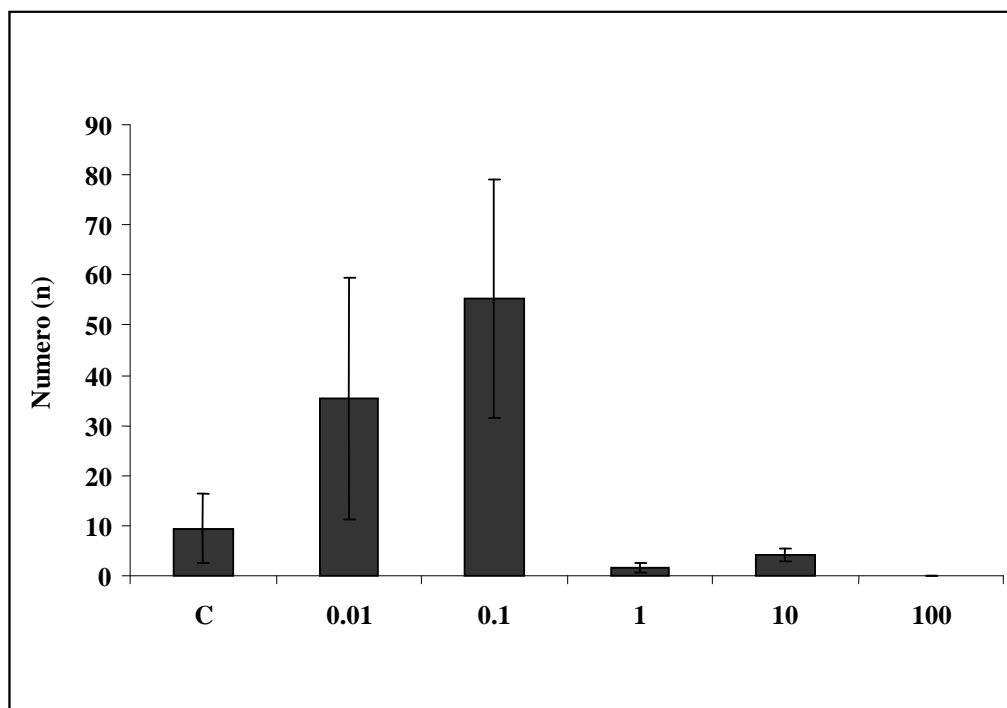


Figura 4.31 Numero medio di colonie di endofiti a fine esperimento delle piante di *Corylus avellana* L. alle diverse concentrazioni di SDZ (ppm). Le barre indicano l'ES

Hammesfahr et al. (2010) hanno riscontrato differenti modificazioni nella struttura della comunità e nell'attività microbica del suolo, a seconda del quantitativo di SDZ aggiunto al terreno. Non è da escludere, quindi, che anche all'interno della pianta si possano avere effetti sulla presenza ed abbondanza di microrganismi in relazione alla concentrazione di sulfamidico. Questi fenomeni, oltre alle evidenze della Figura 4.31, sono visualizzabili anche analizzando il numero di repliche nelle quali si siano riscontrate colonie e quelle in cui nelle piastre non si era invece osservata crescita (tabella 4.3). In particolare nelle tesi 1 e 10, pur con numeri di colonie bassi, risulta positivo un numero di piastre superiore a quelle del controllo, mentre dalla tesi 100, non si recupera nessuna colonia di endofiti. I sulfamidici, a dosi basse appaiono quindi stimolare l'accesso all'endofitismo ed alla traslocazione dei batteri verso le parti aeree della pianta, mentre a dosi alte la loro tossicità acuta si presenta tale da rendere non praticabile tale strategia di rifugio.

	C	0.01	0.1	1	10	100
Presenza	2	4	3	3	5	0
Assenza	3	1	2	2	0	5

Tab. 4.3 Numero di piastre per PCA con la presenza o assenza di colonie di microorganismi

5. Conclusioni

I risultati mostrano che la crescita epigea delle piante di *Corylus avellana* L. non è influenzata negativamente dalla presenza di SDZ durante i 70 giorni di esperimento. Nessuna tesi mostra numero di foglie, lunghezza dello stelo, superficie fogliare inferiore al controllo. Seppure senza significatività statistica, le piante trattate con 100 ppm esibiscono valori maggiori in molti parametri biometrici considerati.

Diverso è il comportamento dell'apparato radicale che si trova a diretto contatto con il sulfamidico. Infatti, gli apici radicali delle piante cresciute a concentrazioni elevate di SDZ risultano essere di colore scuro e di dimensioni minori rispetto agli apici radicali delle piante adibite a controllo, inoltre, presentano una maggiore ramificazione secondaria rispetto alle piante controllo.

Le analisi degli scambi gassosi hanno messo in evidenza una fotosintesi netta minore nelle piante cresciute a più alte dosi di SDZ, insieme ad un rallentamento più sensibile della conduttanza stomatica e della traspirazione. Tali diminuzioni, portando ad un minore flusso di acqua dal suolo alla radice potrebbero rappresentare un meccanismo di difesa messo in atto dalla pianta per rallentare l'accumulo del principio attivo nelle foglie.

Le analisi della fluorescenza dimostrano, inoltre, che la fase luminosa della fotosintesi è meno influenzata dalla presenza di SDZ, che la velocità di fissazione di CO₂. Pertanto, il calo di fotosintesi rilevato alle più alte concentrazioni di SDZ sembra dovuto ad effetti a livello fase oscura della fotosintesi, anche in relazione ad una ridotta disponibilità di CO₂ dovuta alla chiusura stomatica.

Per quanto riguarda gli endofiti, questi sono poco presenti nei piccioli fogliari delle piante cresciute a concentrazioni iniziali maggiori di 1 ppm di SDZ, probabilmente per il bioaccumulo di dosi letali di SDZ. Il minore numero di microorganismi a tali dosaggi di SDZ potrebbe portare ad un maggior quantitativo di carbonio fissato disponibile per la crescita delle piante e giustificare così i valori dei parametri biometrici misurati nelle piante cresciute con 100 ppm di SDZ. A concentrazioni iniziali più basse gli endofiti sono, invece, maggiormente presenti che nel controllo, probabilmente dovuta ad una migrazione fisica degli endofiti dalle radici verso gli organi epigei della pianta.

Sarà interessante, comunque, valutare gli effetti della presenza del sulfamidico a livello di micorrize del nocciolo e comunità batterica del suolo.

Uno sviluppo futuro, di particolare interesse, potrebbe essere un'indagine qualitativa degli endofiti presenti. L'indagine qualitativa permetterebbe di stabilire le concentrazioni letali per alcuni microorganismi patogeni del *Corylus avellana* L.

6. Bibliografia

- Awada T., Josiah S., 2007 “Physiological response of four hazelnut hybrids to water availability in Nebraska” *Great Plains Research* Vol. 17 No. 2. 2007
- Baran W., Adamek E., Ziemianska J., Sobczak A., 2011 “Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health” *Journal of hazardous Materials* 196
- Bialk-Bielinska A., Stolte S., Arning J., Uebers U., Bösch A., Stepnowski P., Matzke M., 2011 “Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides” *Chemosphere*
- Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2002 “Defining hormesis”, *human and experimental toxicology* vol. 21 pp 91-97
- Deriu L., 2009 “Selezione di funghi endofiti antagonisti di patogeni forestali” Dottorato di ricerca, Università degli Studi di Sassari
- Dolliver H., Kumar K., Gupta S., 2009 “Sulfamethazine uptake from Manure-amended Soil”
- Hammesfahr U., Heuer H., Manzke B., Smalla K., Thiele-Bruhn S., 2008 “Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils” *Soil biology e biochemistry* 40
- Hammesfahr U., Kotzerke A., Lamshöft, Wilke B., Kandeler E., Thiele-Bruhn S., 2010 “Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community” *European journal of soil biology* 47
- Hu X., Zhou Q., Lou Y., 2010 “Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China” *Environmental pollution* 158

- Jjemba P., 2001 “The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolid on plants grown on arable land: a review” *Agriculture, Ecosystem and environment* 93 (2002)
- Katzung Bertram G., 2006 “Farmacologia generale e clinica” Piccin
- Liu F., Ying G., Tao R., Zhao J., Yang J., Zhao L., 2008 “Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities” *Environmental pollution* 157
- Michelini L., Meggio F., La Rocca N., Ferro S., Ghisi R., 2011 “Accumulation and effect of sulfadimethoxine in *Salix fragilis* L., Plants: a preliminary study to phytoremediation purposes” *international journal of phytoremediation*
- Migliore L., Godeas F., De Filippis S., 2009 “Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*” , *Environmental pollution*
- Min. Salute, 2011 “Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia” Dipartimento della sanità pubblica veterinaria, della sicurezza alimentare e degli organi collegiali per la tutela della salute, direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari, ufficio IV ex DGSA – Medicinali veterinari e dispositivi medici ad uso veterinario
- Proietti Zolla C., 2006 “Analisi genetica e molecolare dei batteri implicati nella moria del nocciolo” Dottorato di ricerca, Università degli studi della Tuscia
- Rizzoli-Larousse, 1989 “Nuova enciclopedia univesale” Rizzoli
- Sinclair T.R., Tanner C.B., Bennett J.M., 1984 “Water-use efficiency in crop production” *Bioscience* vol.34 pp 36-40
- Sukul P. Spiteller M., 2006 “Sulfonamides in the environment as veterinary drugs” *Rev. Environ contam Toxicol* 187

Thiele-Bruhn Sören, 2003 “Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review” J. plant Nutr. Soil Sci. 166

Wikipedia, www.wikipedia.it

Wilhelm O., 1885 “Thomé *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* ” Gera, Germany

Ringraziamenti

Innanzitutto vorrei ringraziare tutta la mia famiglia, non solo la mamma e il papà, per avermi dato la possibilità di finire questo ciclo di studi e per avermi dato supporto e aiuto in tutto questo tempo.

Subito dopo devo ringraziare i miei amici, tutti, vicini e lontani, per aver creduto che prima o poi ce l'avrei fatta anche io, per avermi aiutato nei momenti difficili e per aver festeggiato con me anche quando gli esami non erano andati come avevo previsto. Tutti i conquilini che hanno vissuto con me, visto che anche io ho avuto i miei alti e bassi e sono riusciti a sopportarmi senza uccidermi.

Ringrazio il prof. Andrea Squartini e la dott. Sara Alberghini per avermi suggerito e seguito nelle tecniche di analisi dei microorganismi endofiti.

Ringrazio il dott. Giuseppe Concheri per aver effettuato le analisi di granulometria, e il dott. Fabio Stellin per le analisi dei componenti organici del suolo.

Ringrazio la ditta Agrituber di Cimadolmo (TV) per avermi donato le piante di nocciolo per effettuare l'esperimento.

Vorrei, anche, ringraziare il il prof. Francesco Morari, il dott. Gianluca Simonetti, il prof. Lucio Montecchio e la dott. Linda Scattolin del dipartimento DAFNAE (dip. di Agronomia animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente) di Padova per la disponibilità e il tempo concessomi nella realizzazione di questo progetto.