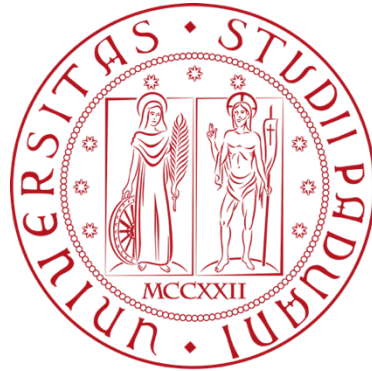


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze Naturali



ELABORATO DI LAUREA

**STRATEGIA PER IL TRASFERIMENTO DI
ENDOFITI DA VITI DI CAMPO (*Vitis vinifera*)**

Tutor: Prof.ssa Michela Zottini
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Irene Doro
Dipartimento di Biologia

Laureando: Diego Pavan Dalla Torre

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

RIASSUNTO

Per questo progetto di tesi sono state selezionate alcune varietà di vite per le loro qualità genotipiche e per le loro presenze endofitiche, in particolare dalla Sicilia e dall'Algeria. Da queste sono stati ricavati tralci ed in seguito ad un processo di sterilizzazione sono state ottenute delle talee, cresciute in cella fino allo sviluppo di radici, foglie ed al raggiungimento delle dimensioni ottimali per il processo di micro-innesto. In laboratorio sono state cresciute delle piante di vite varietà Pinot Noir dalle quali sono stati ottenuti dei nesti: ogni porta-innesto di piante siciliane o algerine è stato abbinato ad uno o più nesti Di Pinot Noir. Sfruttando l'innesto si ipotizza che gli endofiti presenti nel porta-innesto siano in grado di muoversi e colonizzare il nido di Pinot Noir. Per verificare ciò si esegue un esperimento di micro-innesto utilizzando come porta-innesto piante di Pinot Noir cresciute in terreno inoculato con batteri marcati con proteina GFP, sensibile alla luce fluorescente; raggiunte le dimensioni ottimali viene innestato su questo il Pinot Noir cresciuto senza inoculo batterico. Dopo un numero di giorni prestabiliti di crescita si ricavano dalle piante ibride sezioni di foglie apicali e fusto sulle quali si cerca la presenza di batteri.

1	INTRODUZIONE	1
1.1	<i>Vitis vinifera L.</i>	1
1.2	Batteri endofiti	2
1.2.1	<i>Bacillus licheniformis</i>	3
1.3	Mezzi di coltura	4
1.4	Innesto	5
1.5	Microscopia confocale	6
2	SCOPO DELLA TESI	7
3	MATERIALI E METODI	8
3.1	Materiale vegetale da campo e condizioni di crescita	8
3.2	Materiale vegetale da laboratorio e condizioni di crescita	9
3.3	Trasferimento degli endofiti	10
3.4	Validazione del trasferimento degli endofiti	11
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	13
4.1	Preparazione del materiale da viti di campo	13
4.2	Produzione di talee di Pinot Noir	15
4.3	Il micro-innesto	16
4.4	Infezione con <i>Bacillus licheniformis</i>	19
5	CONCLUSIONI	22
	BIBLIOGRAFIA	23

1 INTRODUZIONE

1.1 *Vitis vinifera L.*

Vitis vinifera L. è una pianta legnosa appartenente alla famiglia delle Vitaceae, coltivata in tutto il mondo per scopi alimentari ma sopra tutto per la produzione di vino. Si tratta di una specie lianosa e rampicante con fusto legnoso che può svilupparsi da uno a tre metri in altezza e che presenta poche diramazioni ma ad ampio sviluppo orizzontale.

La sua crescita è indotta dalla presenza di tre gemme differenti, possiamo infatti distinguere: gemme dormienti che sviluppano germogli durante la fase primaverile successiva, gemme pronte con funzione di accrescimento germogli di secondo ordine e gemme latenti che possono restare quiescenti e che porteranno allo sviluppo di germogli di secondo ordine.

Le foglie sono semplici e si presentano palmate con lamina a contorno cuoriforme o reniforme suddivisa in 3-5 lobi irregolarmente dentati, nella parte inferiore di queste si trova una caratteristica peluria. Profilo e sviluppo della foglia variano in base alla varietà di vite.

I fiori sono ermafroditi e congiunti in infiorescenze a pannocchia densa, erette durante la fase di accrescimento e pendule o a grappolo composto una volta mature. Il numero di fiori per grappolo è variabile, questi sono disposti lungo un'asse principale definito rachide che si articola in una serie di assi laterali ramificati a loro volta. L'impollinazione naturale tende ad essere incrociata a causa della posizione delle antere che si trovano all'altezza dello stamma e rivolte verso l'esterno. Il calice è formato da 5 sepali mentre la corolla da 5 petali, gli stami sono 5 e l'ovario bi-carpellare racchiude al suo interno 4 ovuli.

Il frutto della vite è una bacca, in particolare un acino elissoide o sferico di dimensioni comprese tra i 5 e 25 mm che presenta colorazioni e numero di semi in base alla genotipo e alle condizioni ambientali alla quale la pianta è sottoposta durante la crescita. Gli acini sono raggruppati in una conformazione a grappolo che solitamente è conica o piramidale.

1.2 Batteri endofiti

Le piante sono organismi sessili, il loro sviluppo dipende strettamente dalla loro capacità di adattamento all'ambiente nel quale si trovano durante il loro ciclo vitale. Queste stabiliscono continuamente interazioni con numerose specie di microrganismi benefici e non, in grado di cambiare la fitness e la crescita della pianta stessa. Potenzialmente tutti i compartimenti e tessuti sono colonizzati da comunità di microrganismi che prendono il nome di microbioma della pianta.

Con il termine generico di endofiti si intendono tutti quei microrganismi (batteri o funghi) che colonizzano i tessuti interni delle piante senza causare effetti negativi all'ospite (Baldan et al., 2014). I batteri endofiti si trovano frequentemente nel suolo, da dove colonizzano la pianta ospite sfruttando le rotture che si creano durante l'emergenza delle radici laterali, raggiungendo poi foglie, frutti e fiori attraverso il sistema vascolare della pianta ospite (Compant et al., 2008). Numerosi studi hanno dimostrato che gli endofiti colonizzano diverse specie ospiti suggerendo una presenza diffusa in quasi tutte le piante (Baldan et al., 2014).

Spesso tra endofiti e ospite si crea una cooperazione definita simbiosi, dove la pianta fornisce riparo e nutrimenti in cambio di vantaggi in termini di assorbimento di nutrienti, crescita e biomassa. Gli endofiti comunemente vengono intesi come commensali, il cui rapporto con la pianta ospite si dimostra per lo più neutrale; tuttavia, si è rilevata l'esistenza di endofiti che stabiliscono associazioni mutualistiche, quindi conferenti un vantaggio, con gli organismi vegetali (Hallmann et al., 1997).

L'esistenza di un continuum di specie dalle parti sotterranee alle parti aeree è all'origine del concetto di core microbiota. Questo può essere inteso come un insieme di specie che si trovano all'interno di un singolo individuo in tutti i compartimenti studiati, ma anche come insieme di specie rinvenute in un dato compartimento su individui diversi, qualunque siano i loro genotipo, età, posizione e proprietà climatiche o edafiche. Tra i microrganismi presenti nei tessuti della vite, alcuni sono benefici, altri sono patogeni e altri sono neutri, rispetto alle loro interazioni all'interno dell'ospite. Inoltre, a seconda del loro stato nella pianta (vale a dire vantaggioso vs dannoso) e il fatto che colonizzano o meno determinati tessuti/compartimenti, le ripercussioni generate sulla pianta possono essere diverse (Bettenfeld et al., 2021).

I batteri endofiti vengono distinti in batteri PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) e PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) in base alle attività biologiche possedute dai batteri stessi.

L'endofitismo microbico vegetale rappresenta una ricchezza di relazioni interattive che sono diffuse in natura e spesso si basano su vantaggi reciproci dovuti ai fenotipi che promuovono la crescita delle piante (PGP). In alcuni casi, l'effetto benefico è direttamente correlato al metabolismo microbico, come la fissazione dell'azoto, la

produzione di fitormoni, la solubilizzazione del fosfato e la soppressione dei patogeni; al contrario, tali benefici possono essere mediati dalla stimolazione di attività specifiche della pianta ospite, portando a un migliore assorbimento di acqua e nutrienti o risposte di difesa. Inoltre, i microrganismi endofitici occupano una nicchia ecologica che si sovrappone a quella di molti fitopatogeni e il loro sfruttamento come agenti di bio-controllo (BCA) rappresenta una possibile strategia per ridurre l'uso di pesticidi nei vigneti (Pacifico et al., 2019).

L'uso di microrganismi coltivabili o di loro utili metaboliti secondari è previsto per favorire l'acquisizione dei nutrienti delle piante, la salute delle piante e la protezione dai patogeni. Recentemente, diversi gruppi hanno evidenziato il ruolo emergente dei microbi benefici anche nelle pratiche di viticoltura (Bulgari et al. 2011).

I meccanismi attraverso i quali i batteri possono promuovere la crescita e la salute delle piante sono molteplici e includono la produzione di sostanze come ormoni, l'alleviamento degli stress biotici e abiotici, l'antagonismo dei patogeni e l'induzione di risposte sistemiche (Compant et al., 2010).

Nella vite coltivata, la composizione delle comunità batteriche è significativamente associata al genotipo del portainnesto. È stato fatto uno studio su come diversi portainnesti potrebbero influenzare il reclutamento di batteri dal suolo circostante. E' stato scoperto che la diversità della comunità batterica e le interazioni tra le radici delle piante erano profondamente influenzati dal tipo di portainnesto. È interessante notare che il genotipo dei portainnesti influenza il genere delle diverse comunità batteriche che colonizzano la pianta (Pacifico et al., 2019).

Queste proprietà batteriche sono molto interessanti in quanto la combinazione di diversi ceppi rilasciano metaboliti che possono supportare o sostituire l'uso di pesticidi nei vigneti riducendo i carichi chimici verso l'ambiente.

1.2.1 *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis è un batterio endosporigeno, mai risultato patogeno nei confronti di animali o piante e viene particolarmente utilizzato per la produzione industriale su larga scala di esoenzimi, in quanto può secernere grandi quantità di proteine direttamente nel mezzo di coltura (Schallmey et al., 2004).

Per quanto riguarda il rapporto di tale microrganismo con organismi vegetali, molti ceppi di *Bacillus licheniformis* sono utilizzati per il bio-controllo di varie malattie vegetali, in particolar modo contro infezioni fungine, come quelle provocate da *Botrytis cinerea* (Kim et al. 2007), che attacca principalmente la vite a livello dei grappoli d'uva; da *Phytophthora capsici* (Lime, Kim, 2010), che agisce

compromettendo intere piantagioni di peperoni e di altre importanti colture commerciali, e da *Pseudoperonospora cubensis*, che causa la peronospora delle cucurbitacee.

Bacillus è ampiamente distribuito nelle piante, nel suolo e nella microflora vegetale. Ha una buona capacità di resistenza allo stress, prevenzione delle malattie e aumento della resa delle colture della pianta che colonizza. Alcuni ceppi di *Bacillus* tra cui *B. licheniformis* sono stati utilizzati per controllare le malattie delle piante. In genere questi sono in grado di creare spore per resistere più efficacemente al calore e tollerare meglio lo stress idrico (Wang et al., 2014).

1.3 Mezzi di coltura

I mezzi di coltura sono soluzioni acquose contenenti sostanze nutritive indispensabili alla crescita della pianta, tra queste si trovano nutrienti inorganici (macronutrienti e micronutrienti) e organici (carboidrati e amminoacidi) oltre che vitamine.

I macronutrienti sono elementi chimici necessari in quantità elevate (concentrazioni millimolari) per lo sviluppo della pianta, primi tra tutti i sali di azoto ma anche i sali di potassio e fosforo. I micronutrienti, invece, sono elementi chimici richiesti in quantità ridotte (concentrazioni micromolari) oppure in tracce. Tra questi troviamo sali di ferro, boro e il cloro (Pasqua G. et al. 2011).

Il carbonio è indispensabile per lo sviluppo strutturale della pianta, soprattutto nelle prime fasi quando l'attività fotosintetica è bassa. Questo viene fornito attraverso un apporto esterno di carboidrati che si trovano sotto forma di polisaccaridi quali zuccheri come il saccarosio.

Le vitamine svolgono un ruolo essenziale per le funzioni vitali come cofattori di vie metaboliche ma non ricoprono funzioni energetiche o plastiche, anche queste se fornite artificialmente influiscono positivamente sulla crescita della pianta nel mezzo di coltura.

I mezzi di coltura possono essere utilizzati sotto forma di soluzioni come nel caso delle colture idroponiche oppure in forma solida o semisolida; per ottenerli viene aggiunto al mezzo liquido l'agar, un estratto vegetale gelificante che permette il cambio di stato del mezzo a temperatura ambiente: questo si scioglie in acqua ad una temperatura di 60-100 gradi e solidifica a circa 50 gradi senza mai reagire con gli elementi presenti nel terreno di coltura.

1.4 Innesto

L'innesto è un metodo per la propagazione e il miglioramento della crescita delle piante, in particolare è una tecnica agronomica che permette la creazione di piante utilizzando un portainnesto (porzione inferiore che presenta fusto e radici) e un nesto (porzione superiore che viene innestata). L'innesto si riferisce all'unione di parti del corpo vegetale in modo che si stabilisca una continuità vascolare tra di esse e l'organismo composito risultante funzioni come un unico corpo vegetale (Mudge, 2008).

È ampiamente utilizzato negli alberi da frutto e in orticoltura per indurre benefici fenotipici al nesto, come le sue dimensioni, il miglioramento della resa, la qualità dei frutti e la resistenza agli stress biotici e abiotici (Gainza et al., 2015).

Il portainnesto influenza molti aspetti della vite alterando la resa, la composizione del frutto, il vigore della pianta e la configurazione della chioma.

Nelle viti europee l'innesto ha salvato i vigneti e l'industria del vino dagli effetti devastanti della fillossera introdotta dalle Americhe in Europa a metà del XIX secolo. La fillossera è un insetto succhiatore di linfa che distrugge l'apparato radicale della *Vitis vinifera*. Tuttavia, le specie di vite americane hanno sviluppato una resistenza contro la fillossera e l'innesto di *Vitis vinifera* su genotipi di specie americane (tra cui *V. riparia*, *V. berlandieri* e *V. rupestris*) o sui loro portainnesti ibridi è ancora l'unica soluzione efficace contro questo parassita (Tedesco et al., 2022).

Dalla manifestazione della fillossera in Europa, si sono via via sviluppate diverse tecniche d'innesto alla ricerca della perfetta unione di nesto e portainnesto. Tuttavia, i gradi variabili di successo dell'innesto, spesso associati ad aspetti fitosanitari, contribuiscono alle attuali preoccupazioni sulla limitata longevità dei vigneti. Tipicamente, dalla talea legnosa di *Vitis vinifera* che presenta gemme dormienti viene ricavato un nesto che viene innestato su una talea portainnesto americana o ibrida selezionata.

È assodato che in una pianta innestata il nesto e il portainnesto mantengono la propria integrità genetica, il che significa che un nesto di vite prelevato dalla specie europea e innestato su un ceppo americano svilupperà rami di *Vitis vinifera*. Tuttavia, in virtù dell'ampia gamma di influenze reciproche nesto-portainnesto, il prodotto finale di un innesto può essere considerato come un nuovo "bi-membro" nel funzionamento individuale come una relazione simbiotica unica (Tedesco et al., 2022).

Sia la preparazione delle talee che la formazione di tessuto calloso tra i partner dell'innesto sono fasi critiche nel processo di propagazione poiché le giunzioni

dell'innesto non completamente sigillate o guarite sono soggette a infezioni e creano debolezze strutturali nella pianta innestata. Allo stesso modo, le buone pratiche fitosanitarie sono fondamentali per prevenire l'infezione del materiale di propagazione. E' importante che si verifichi una corretta saldatura dell'innesto con partner compatibile.

Anatomicamente, il cambio dell'innesto e del portainnesto deve essere in contatto per formare un'unione. Durante il processo d'innesto delle viti adulte i vasi adiacenti all'interfaccia dell'innesto vengono sigillati da resine o gomma. Tale evento è seguito dall'inizio dell'attività cambiale vicino alla gemma del nastro, questa forma cellule callose indifferenziate che si differenzieranno in periderma, corteccia e canali vascolari. Sebbene esistano alcune differenze nel modo in cui le viti vengono innestate, non sembrano esserci differenze per quanto riguarda il processo di guarigione dell'innesto rispetto ad altre specie vegetali. La maggior parte degli articoli sull'innesto mette in risalto eventi strutturali molto simili che si verificano durante le fasi di formazione dell'innesto sia in specie legnose che erbacee. Tra questi troviamo l'adesione del nastro al portainnesto, la proliferazione delle cellule del callo e la loro differenziazione, la connessione funzionale di elementi vascolari tra i partner (Tedesco et al., 2022).

Tuttavia, ci sono diversi requisiti per ottenere un innesto di successo e la compatibilità è solo uno dei criteri essenziali (Hartmann et al., 2011). Allo stesso modo, l'incompatibilità è solo una delle cause del fallimento dell'innesto. Oltre all'incompatibilità, l'uso di nastri essiccati o malati, una tecnica di innesto difettosa, un cattivo allineamento del cambio vascolare, condizioni ambientali avverse e molte altre cause possono contribuire al fallimento di un innesto (Hartmann et al., 2011). Vi è un consenso generale a lungo termine sul fatto che maggiore è la distanza tassonomica tra un rampollo e un portainnesto, maggiore è la possibilità di produrre un innesto incompatibile (tedesco 2022).

1.5 Microscopia confocale

La microscopia confocale è una tecnologia volta all'osservazione ad alta risoluzione di campioni biologici. Un microscopio a fluorescenza confocale laser offre diversi vantaggi come una elevata qualità dell'immagine ad alti ingrandimenti, il controllo della profondità del campo, l'eliminazione di aloni dovuti alla luce diffusa nei piani fuori fuoco del preparato ed infine permette di eseguire sezioni ottiche seriali ottenendo immagini tridimensionali ad alta risoluzione. Il microscopio confocale sfrutta un fascio di luce puntiforme prodotto da un pinhole, posto davanti alla sorgente in sostituzione del diaframma di campo che risulta fisso e di ridotte dimensioni. La luce viene focalizzata dal collettore e dal condensatore sul campione per essere incanalata nell'obiettivo e poi nell'eventuale oculare o

videocamera; successivamente il fascio viene focalizzato su un secondo pinhole dove in corrispondenza del quale è presente il rivelatore d'immagine che produce un segnale proporzionale all'intensità della luce che lo colpisce. Il pinhole di rivelazione e quello di illuminazione appartengono a piani focali coniugati e si dicono per questo confocali.

2 SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo progetto di tesi è quello di mettere a punto in *Vitis vinifera* un protocollo per trasferire endofiti da una pianta donatrice ad un'altra pianta tramite l'innesto. Nello specifico sono stati utilizzati come porta-innesto piante di vite provenienti da campo (colonizzati da endofiti) sui quali vengono innestate piante cresciute in laboratorio prive di endofiti. Infine sono stati condotti esperimenti di microscopia confocale per valutare qualitativamente l'efficacia dell'innesto e del trasferimento dei batteri.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale da campo e condizioni di crescita

Il materiale vegetale da campo usato per l'esperienza di trasferimento degli endofiti (vedi paragrafo 3.3) proviene da piante di vite della Sicilia e dell'Algeria. Per ogni regione sono stati utilizzati tralci di piante di 2 varietà diverse e per ogni varietà sono state selezionate 3 piante madri.

Le varietà selezionate per la Sicilia sono Grillo (piante madri GRI.6.7, GRI.6.13, GRI.6.19) e Nero d'Avola (piante madri NAV.4.6, NAV.4.20, NAV.5.8), mentre le varietà selezionate per l'Algeria sono Muscat (piante madri MUS.7.1, MUS.8.2, MUS.10.4) ed Ahmar Bouamar (piante madri MB.1.1, MB.3.24, MB.7.17).

I tralci di vite siciliani ed algerini sono stati prima lavati sotto acqua corrente e poi sterilizzati con un lavaggio di 2 minuti con 0,1% Tween20 seguito da un lavaggio di 2 minuti con 70% etanolo. Dopo la sterilizzazione, i tralci sono stati tagliati per ricavare delle talee con 1-2 nodi ciascuna che poi sono state posizionate in perlite imbevuta di idroponica. La composizione della soluzione idroponica portata a pH 7 con KOH 1M è riportata in Tabella 1. Dopo un mese, le talee che hanno sviluppato foglie e radici sono state trasferite in un mix di perlite, sabbia e terra (4:2:1). Dopo il trasferimento, le talee sono state cresciute per due mesi alternando idroponica e millirho in una cella di crescita tenuta a temperatura di 27°C, umidità del 60% e fotoperiodo di 16/8 ore.

MACROELEMENTI	PM (g/mol)	Concentrazione finale
KH_2PO_4	136.09	0,5 mM
K_2SO_4	174.27	0.5 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236.15	2 mM
MgSO_4	120.37	0,65 mM
MICROELEMENTI	PM (g/mol)	Concentrazione finale
H_3BO_3	61.83	0,5 uM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.7	0,05 uM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.53	0.05 uM
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1235.86	0,02 uM
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169	0,05 uM
FeEDDHA	435.2	10 uM

Tabella 1: Composizione della soluzione idroponica.

3.2 Materiale vegetale da laboratorio e condizioni di crescita

Il materiale vegetale da laboratorio usato per l'esperimento di trasferimento degli endofiti (vedi paragrafo 3.3) e di validazione del trasferimento degli endofiti (vedi paragrafo 3.4) sono piante di Pinot Noir propagate in terreno MS $\frac{1}{2}$ (Murashige & Skoog, 1962) di composizione riportata in Tabella 2 con 15 g/L saccarosio e 8 g/L plant agar, portato a pH 5.8 con KOH 1M. Queste piante sono state cresciute in una cella di crescita tenuta a temperatura di 25°C, umidità del 60% e fotoperiodo di 16/8 ore. Le piante di Pinot Noir che avevano 1 mese dall'ultimo trasferimento in terreno MS $\frac{1}{2}$, sono state trasferite in un mix di terra e perlite (1:1) imbevuto di idroponica previo lavaggio delle radici in acqua. Dopo il trasferimento, le piante sono state adattate alla nuova condizione aprendo gradualmente il coperchio del contenitore e sono state cresciute per due mesi alternando idroponica e milliRHO in una cella di crescita tenuta con le stesse condizioni della precedente.

MACRONUTRIENTI INORGANICI	Concentrazione
NH ₄ NO ₃	10.305 mM
CaCl ₂	1.495 mM
MgSO ₄	0,750mM
KH ₂ PO ₄	0,625 mM
KNO ₃	9.395 mM
MICRONUTRIENTI INORGANICI	
H ₃ BO ₃	50,135 uM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,055 uM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.050 uM
FeNaEDTA	50,000 uM
MnSO ₄ ·H ₂ O	50,000 uM
KI	2,500 uM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,515 uM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	14,955 uM
VITAMINE	
Mio-inositolo	272,470 uM
Acido nicotinico	2,030 uM
Piridossina HCl	1,215 uM
Tiamina HCl	0,150 uM
Glicina	12,320 uM

Tabella 2: Composizione del terreno MS $\frac{1}{2}$.

3.3 Trasferimento degli endofiti

Il materiale vegetale usato per questo esperimento sono le piante di vite siciliane, algerine (vedi paragrafo 3.1) e le piante di Pinot Noir (vedi paragrafo 3.2).

In questo esperimento è stata usata la tecnica del micro-innesto. È stato prima di tutto ricavato il porta-innesto tagliando il fusto della pianta siciliana o algerina a livello del secondo nodo a partire dal basso. Dopo il taglio, è stata eseguita un'incisione parallela alla direzione di crescita del fusto. A livello del taglio eseguito è stata inserita una micro-clip da micro-innesto. È stata poi ricavato il nesto facendo un doppio taglio speculare a livello del fusto della parte apicale della pianta di Pinot Noir. Infine, è stato unito il fusto della pianta siciliana o algerina con il fusto della pianta di Pinot Noir sfruttando il supporto della micro-clip. Lo schema di questo esperimento è mostrato in Figura 1. Le piante innestate sono state coperte con un contenitore sigillato con del nostro traspirante per mantenere una condizione di alta umidità e garantire la circolazione d'aria, sono state posizionate in una camera di crescita tenuta alla temperatura di 26°C, umidità del 60%, fotoperiodo di 16/8 ore e sono state cresciute con milliRHO.

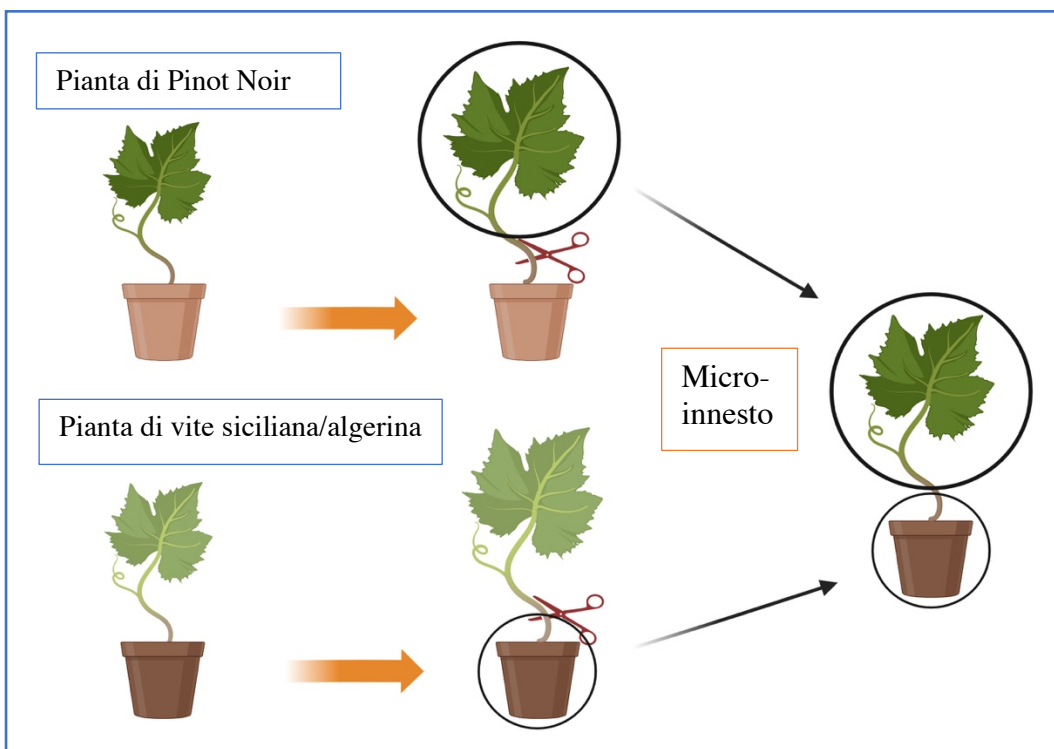


Figura 1: Schema dell'esperimento di trasferimento degli endofiti..

3.4 Validazione del trasferimento degli endofiti

Per questo esperimento sono state usate le piante di Pinot Noir (vedi Paragrafo 3.2) e il batterio *Bacillus licheniformis* marcato con la proteina fluorescente GFP (Nigris *et al.*, 2018).

In questo esperimento, una colonia batterica fluorescente è stata inoculata in terreno NB addizionato a 30ug/ μ l di kanamicina e cresciuta per 24 ore. Dopo la crescita, i batteri sono stati centrifugati e risospesi in 5 ml di MgSO_4 10mM. Dopo aver misurato la densità ottica della sospensione, i batteri sono stati diluiti con lo stesso buffer ad una densità cellulare di 10^6 cell/ml. Una goccia (5 μ L) della sospensione batterica è stata depositata sulla superficie del terreno MS (Murashige & Skoog, 1962) di composizione riportata in Tabella 3 con 8 g/L plant agar e portato a pH 5.8 con KOH 1M. In corrispondenza della goccia, è stata infine posizionata una talea ricavata dall'apice della pianta di Pinot Noir.

MACRONUTRIENTI	Concentrazione
NH_4NO_3	20,61 mM
CaCl_2	2,99 mM
MgSO_4	1,50 mM
KH_2PO_4	1.25 mM
KNO_3	18,79 mM
MICRONUTRIENTI INORGANICI	
H_3BO_3	100,27 μ M
$\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,11 μ M
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.10 μ M
FeNaEDTA	100 μ M
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100 μ M
KI	5 μ M
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,03 μ M
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	29,91 μ M
VITAMINE	
Mio-inositolo	554,94 μ M
Acido nicotinico	4,06 μ M
Piridossina HCl	2,43 μ M
Tiamina HCl	0,30 μ M
Glicina	24,64 μ M

Tabella 3: Composizione del terreno MS.

Le piante inoculate sono state posizionate in cella di crescita tenuta alla temperatura di 25°C con fotoperiodo di 16/8 ore ed analizzate al microscopio confocale 15 e 30 DPI (Days Post Inoculation). Dopo 45 giorni dall'inoculo, le piante di Pinot Noir inoculate sono state innestate con delle talee di Pinot Noir prive di batteri. Il nesto delle piante innestate è stato analizzato al microscopio confocale 30 DPG (Days Post Grafting). Lo schema di questo esperimento è mostrato in Figura 2.

Le piante inoculate ed innestate sono state osservate al microscopio confocale Zeiss LSM900 impostando le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione appropriate: eccitazione 488 nm ed emissione 505 nm per GFP, eccitazione 640 nm ed emissione 665 nm per clorofilla. Sono state osservate le sezioni di fusto e foglie delle piante inoculate ed innestate. I campioni sono stati posizionati in vetrini da microscopio e in seguito eccitati per vedere il segnale della clorofilla e della proteina GFP. Le immagini sono state prese con un ingrandimento 20x ed analizzate con il software Fiji-ImageJ.

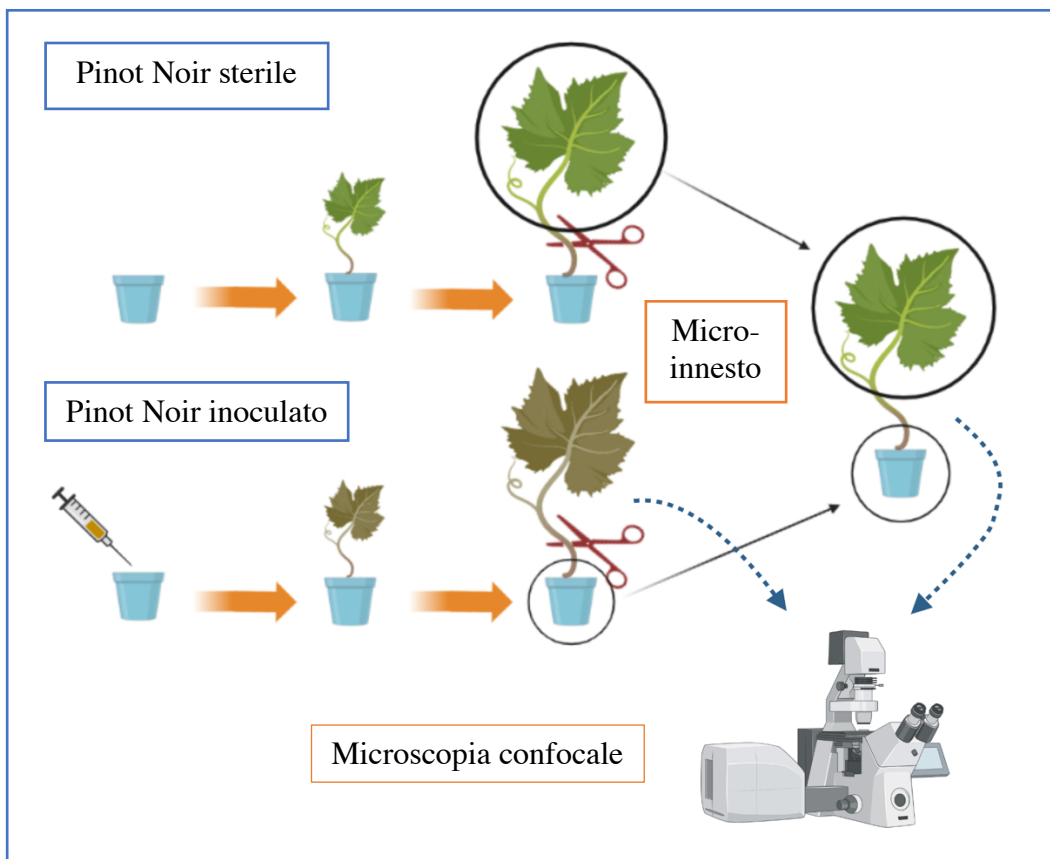


Figura 2: Schema dell'esperimento di validazione del trasferimento degli endofiti.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Preparazione del materiale da viti di campo

La scelta delle varietà da utilizzare per l'esperimento ricade su piante provenienti dalla Sicilia e dall'Algeria perché caratterizzate da una popolazione endofitica modulata dal clima arido; questo ha influito notevolmente sulla selezione e sviluppo delle popolazioni di endofiti che colonizzano queste viti. Dai vigneti siciliani e algerini durante il periodo invernale, quando le gemme sono dormienti, sono stati raccolti tralci come visibile in Figura 3. Successivamente sono stati sterilizzati superficialmente per eliminare possibili batteri e muffe presenti esternamente.

Dai tralci interi sono state ottenute talee a singolo o doppio nodo a seconda della conformazione e spessore dei tralci stessi (Figura 4).

Le talee ottenute sono state posizionate in perlite con soluzione idroponica (50mL) e posti in camera di crescita per un mese. Le talee che hanno sviluppato foglie e radici sono state trasferite in un mix di perlite, sabbia e terra (Figura 5).

Successivamente al trasferimento, le talee sono state cresciute per due mesi in una cella di crescita a temperatura, umidità e fotoperiodo controllati alternando l'innaffiatura con soluzione idroponica o acqua bidistillata.



Figura 3: Tralci provenienti dall'Algeria



Figura 4: Talee a singolo oppure doppio nodo ottenute dai tralci di vite Algerini.

La sterilizzazione delle piante di vite provenienti dalla Sicilia e dall'Algeria ha dato i risultati riportati in Tabella 4 e Tabella 5 dove sono riportati il numero di talee sterilizzate, il numero e la percentuale di talee sterilizzate sopravvissute.

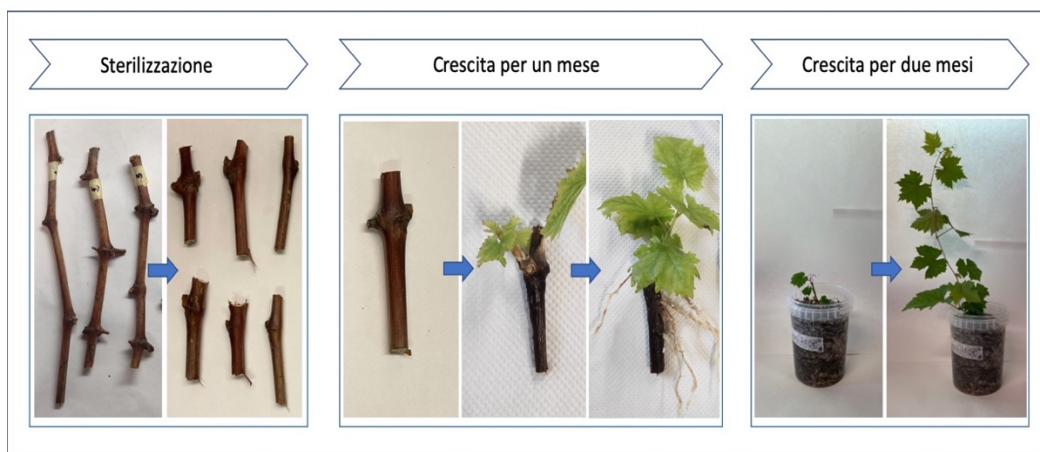


Figura 5: Flusso di lavoro di sterilizzazione e crescita delle talee siciliane ed algerine.

Varietà	Piante madre	N° talee sterilizzate	N° talee sterilizzate sopravvissute	% talee sterilizzate sopravvissute
Grillo	GRI.6.7	27	8	29,6
	GRI.6.13	25	14	51,9
	GRI.6.17	24	10	41,7
Nero d'Avola	NAV.4.6	28	12	42,9
	NAV.4.20	24	12	50,0
	NAV.5.8	29	4	13,8
		Totale: 157	Totale: 60	

Tabella 4: Risultati della sterilizzazione delle varietà della Sicilia.

Varietà	Piante madre	N° talee sterilizzate	N° talee sterilizzate sopravvissute	% talee sterilizzate sopravvissute
Muscat	MUS7.1	49	37	75,5
	MUS.8.2	41	23	56,1
	MUS.10.4	47	29	61,7
Ahmar Bouamar	MB.1.1	25	17	68,0
	MB.3.24	34	13	38,2
	MB.7.17	25	17	68,0
		Totale: 221	Totale: 136	

Tabella 5: Risultati della sterilizzazione delle varietà dell'Algeria.

Le talee sterilizzate sono 157 per le varietà Grillo e Nero d'Avola della Sicilia (76 talee per Grillo, 81 talee per Nero d'Avola) e 221 per le varietà Muscat e Ahmar Bouamar dell'Algeria (137 talee per Muscat, 84 talee per Ahmar Bouamar).

Le talee sopravvissute sono pari a 60 per le varietà della Sicilia e 136 per le varietà dell'Algeria. La percentuale di sopravvivenza nelle varietà della Sicilia varia da un massimo pari a 50% per la pianta madre GRI.6.13 ad un minimo pari a 13,8% per la pianta madre NAV.5.8. Per quanto riguarda le varietà dell'Algeria, le percentuali di sopravvivenza sono nettamente più alte di quelle delle varietà siciliane, con un valore minimo pari a 38% per la pianta madre MB.3.24 ed un valore massimo pari al 75,5% per la pianta madre MUS.7.1.

Le percentuali delle talee sterilizzate non sopravvissute è significativa, le principali cause di morte sono state correlate alla formazione di muffa oppure all'incapacità delle stesse di formare germogli e radici.

4.2 Produzione di talee di Pinot Noir

Le piante utilizzate per ottenere nesti per il trasferimento degli endofiti (vedi paragrafo 3.3) e per la validazione del loro trasferimento (vedi paragrafo 3.4) sono della varietà Pinot Noir. Queste a seguito di propagazione mediante talea apicale trasferita in terreno MS ½ (Murashige & Skoog,1962), sono state poi cresciute in una cella di crescita tenuta a temperatura, umidità e fotoperiodo controllati.

Dopo un mese di crescita le piante di Pinot Noir sono state trasferite in un mix di terra e perlite con soluzione idroponica. Dopo il trasferimento, le piante sono state cresciute per due mesi (vedi Figura 6) nella stessa cella di crescita precedente alle medesime condizioni e alternando l'innaffiatura con soluzione idroponica o acqua bidistillata. Sono state ottenute talee più simili possibili tra loro da utilizzare nell'esperimento d'innesto.

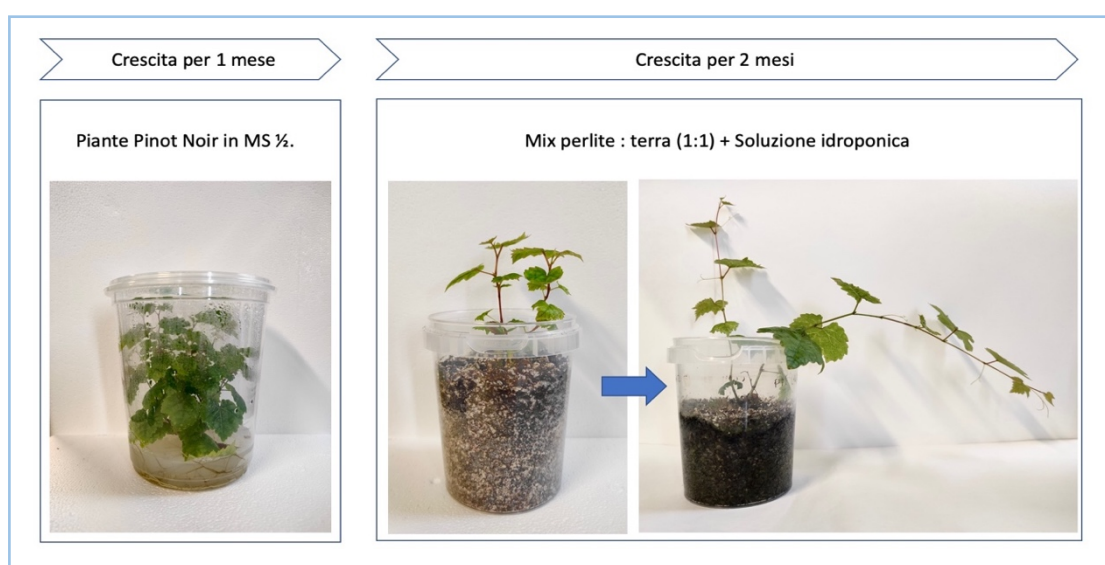


Figura 6: Flusso di lavoro di trasferimento e crescita delle piante di Pinot Noir.

4.3 Il micro-innesto

L'innesto è una tecnica di laboratorio volta a migliorare le condizioni di crescita generali e fitness di una pianta, prevede l'unione tra la parte basale di una pianta con la parte apicale di una pianta compatibile. Il micro-innesto prevede l'innesto *in vitro* dell'apice meristemato di una pianta sul fusto di una pianta erbacea senza l'ausilio di resine o collanti ma con micro-clip da micro-innesto. La procedura di micro-innesto è stata utilizzata per innestare piante di Pinot Noir su piante siciliane ed algerine.

Per prima cosa è stato effettuato il taglio del fusto della porta-innesto a livello del secondo nodo a partire dal basso in modo tale da lasciare una porzione di fusto cospicua; dopo il taglio, è stata eseguita un'incisione parallela alla direzione di crescita del fusto (Figura 7-A). A livello del taglio eseguito è stata inserita una micro-clip da micro-innesto.

La parte apicale del Pinot Noir è stata tagliata ricavando un nesto (Figura 7-B). Successivamente il porta-innesto è stato innestato con il germoglio di Pinot Noir sfruttando il supporto della micro-clip (Figura 7-C).

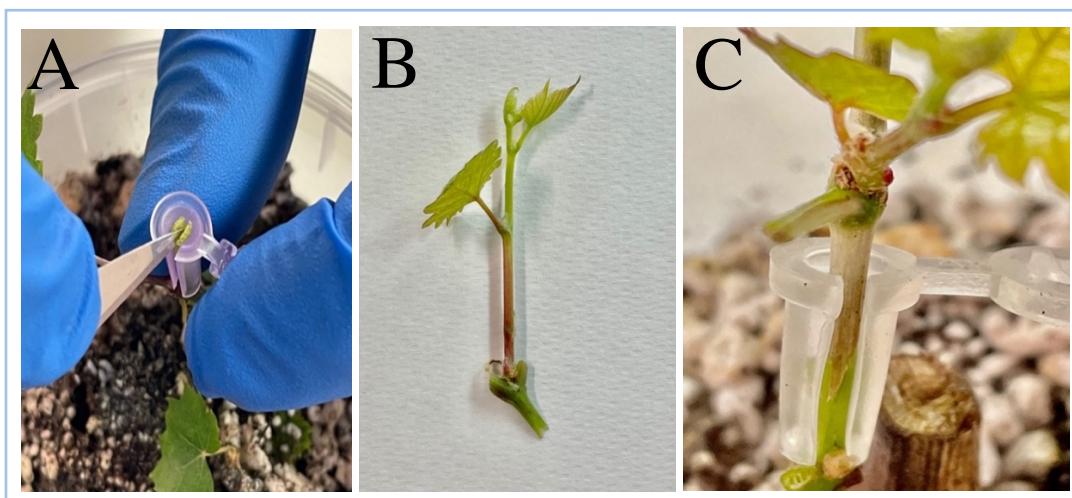


Figura 7:
(A) Taglio del fusto della pianta siciliana o algerina.
(B) Talea ricavata dalla pianta di Pinot noir.
(C) Unione della pianta siciliana con la talea di Pinot Noir.

Nelle Tabella 6 e Tabella 7 sono riportati il numero di talee a disposizione per il micro-innesto (ovvero il numero di talee sopravvissute dopo la sterilizzazione), il numero di micro-innesti effettuati e il numero di innesti avvenuti con successo.

Sono state ricavate 60 talee dalle piante della Sicilia e di queste ne sono state utilizzate 46 come piante portainnesto, a distanza di un mese ne sono sopravvissute 25 (Tabella 6). Per le varietà provenienti dall'Algeria sono state utilizzate 124

piante come portainnesto su 136 totali sterilizzate, di queste a distanza di un mese ne sono sopravvissute 31 (Tabella 7).

Varietà	Piante madre	N° talee	N° micro-innesti	N° piante innestate con successo
Grillo	GRI.6.7	8	6	3
	GRI.6.13	14	11	6
	GRI.6.17	10	8	5
Nero d'Avola	NAV.4.6	12	12	7
	NAV.4.20	12	7	3
	NAV.5.8	4	2	1
		Totali: 60	Totali: 46	Totali:25

Tabella 6: Risultati del micro-innesto delle varietà della Sicilia.

Varietà	Piante madre	N° talee	N° micro-innesti	N° piante innestate con successo
Muscat	MUS.7.1	37	30	6
	MUS.8.2	23	23	6
	MUS.10.4	29	26	6
Ahmar	MB.1.1	17	15	3
Bouamar	MB.3.24	13	13	4
	MB.7.17	17	17	6
		Totali 136	Totali:124	Totali:31

Tabella 7: Risultati del micro-innesto delle varietà dell'Algeria.

Le talee erano molto eterogenee e non tutte avevano raggiunto il diametro sufficiente del fusto per poterle usare come portainnesti, di conseguenza il numero di micro-innesti è inferiore al numero di talee che avrebbero potuto potenzialmente essere usate come piante supporto all'innesto.

Molte delle piante sulle quali è stato eseguito l'innesto hanno riportato sintomi di sofferenza e stress come la disidratazione del margine fogliare (Figura 8-A) o la formazione di muffe bianche nei punti di giuntura dell'innesto (Figura 8-B); altre

hanno reagito in maniera spontanea con l'accrescimento di radici nel punto di giunzione (Figura 8-C).

La contaminazione da agenti esterni durante i processi d'innesto incide profondamente sul risultato finale: piante infette che hanno sviluppato muffe o funghi sono probabilmente la conseguenza di un ambiente di crescita non asettico.

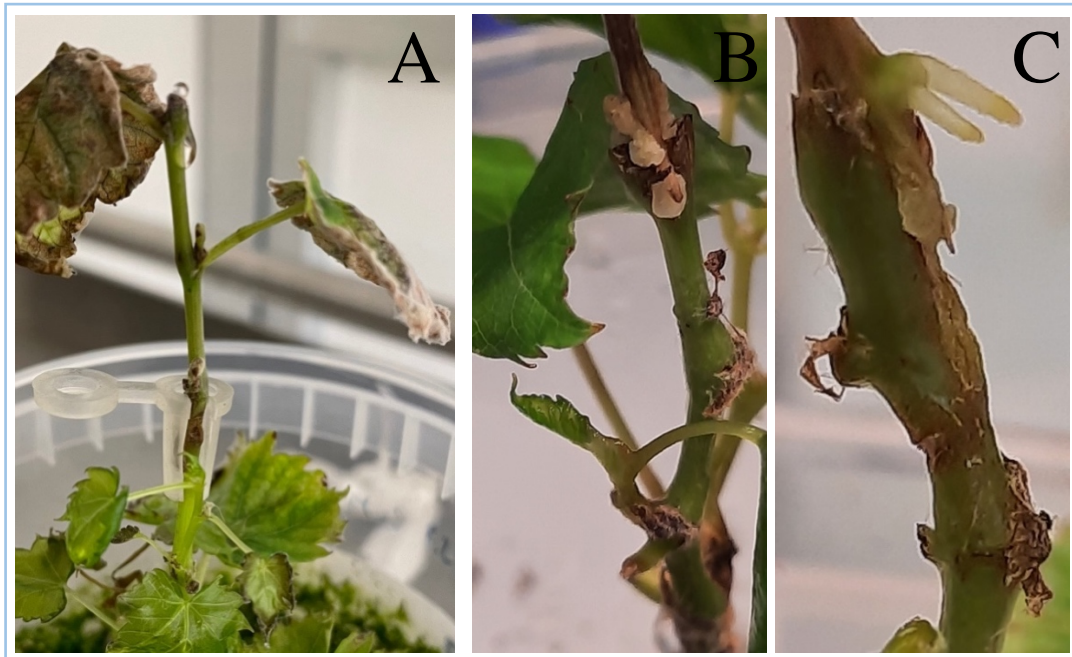


Figura 8:

(A) Innesto non partito, le foglie sono morte e hanno sviluppato muffa sulla superficie.

(B) Formazione di muffa bianca sulla giuntura dell'innesto.

(C) Formazione di radici a livello della giuntura dell'innesto.

4.4 Infezione con *Bacillus licheniformis*

Una seconda serie di esperimenti è stata messa a punto per verificare che effettivamente i batteri fossero in grado di passare da una pianta all'altra attraverso l'innesto. Per questo scopo sono state utilizzate piante di Pinot Noir e *Bacillus licheniformis* marcato con la proteina fluorescente GFP (Nigris *et al.*, 2018).

In particolare una pianta di Pinot Noir è stata infettata con *Bacillus licheniformis*-GFP e poi è stata innestata con un nesto di Pinot Noir sterile (vedi paragrafo 3.4). L'infezione batterica del porta-innesto di Pinot Noir è stata effettuata depositando una goccia di sospensione batterica (5 uL) sulla superficie del terreno MS (Figura 9-B); in corrispondenza di questa è stata fatta crescere una talea ricavata dall'apice della pianta di Pinot Noir sterile (Figura 9-A-C). Le piante inoculate sono state poi cresciute in cella a temperatura, umidità e fotoperiodo controllati per poi essere analizzate al microscopio confocale dopo 15 e 30 giorni dall'inoculo (DPI: Days Post Inoculation).

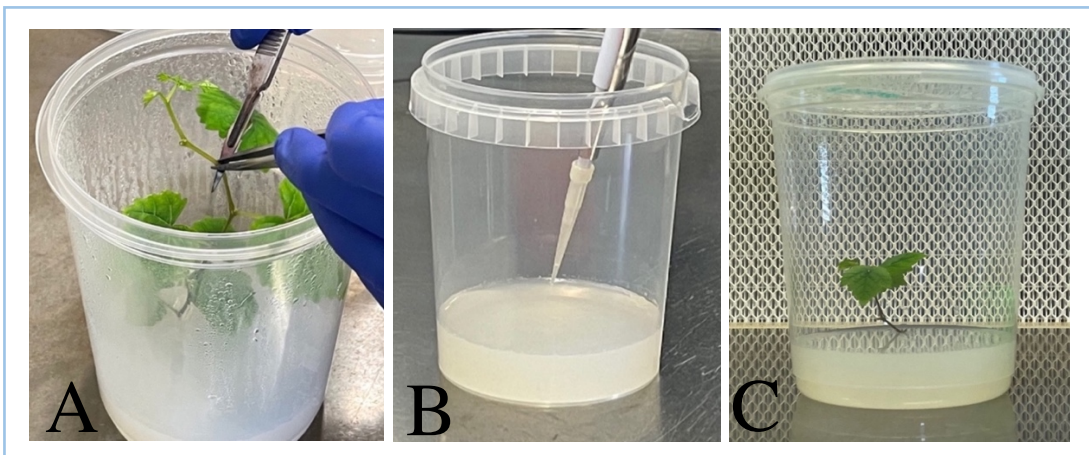


Figura 9:

(A) Taglio delle talee apicali di Pinot noir.

(B) Deposito di una goccia di sospensione batterica sul substrato MS con l'ausilio di una micro pipetta.

(C) Talea apicale impiantata in terreno inoculato con ceppo batterico.

Come si può osservare in Figura 10-A, a 15 DPI (Days Post Inoculation) i batteri sono presenti nelle foglie basali e nel primo internodo del fusto della pianta di Pinot Noir (Figura 10-B). La presenza di batteri è stata osservata soprattutto a livello dei vasi dei tessuti analizzati. In Figura 10-C e Figura 10-D, si può osservare che dopo 30 DPI i batteri sono presenti a livello del secondo internodo del fusto e nelle foglie della pianta. Anche in questo caso la presenza di batteri è stata osservata soprattutto a livello dei vasi dei tessuti analizzati.

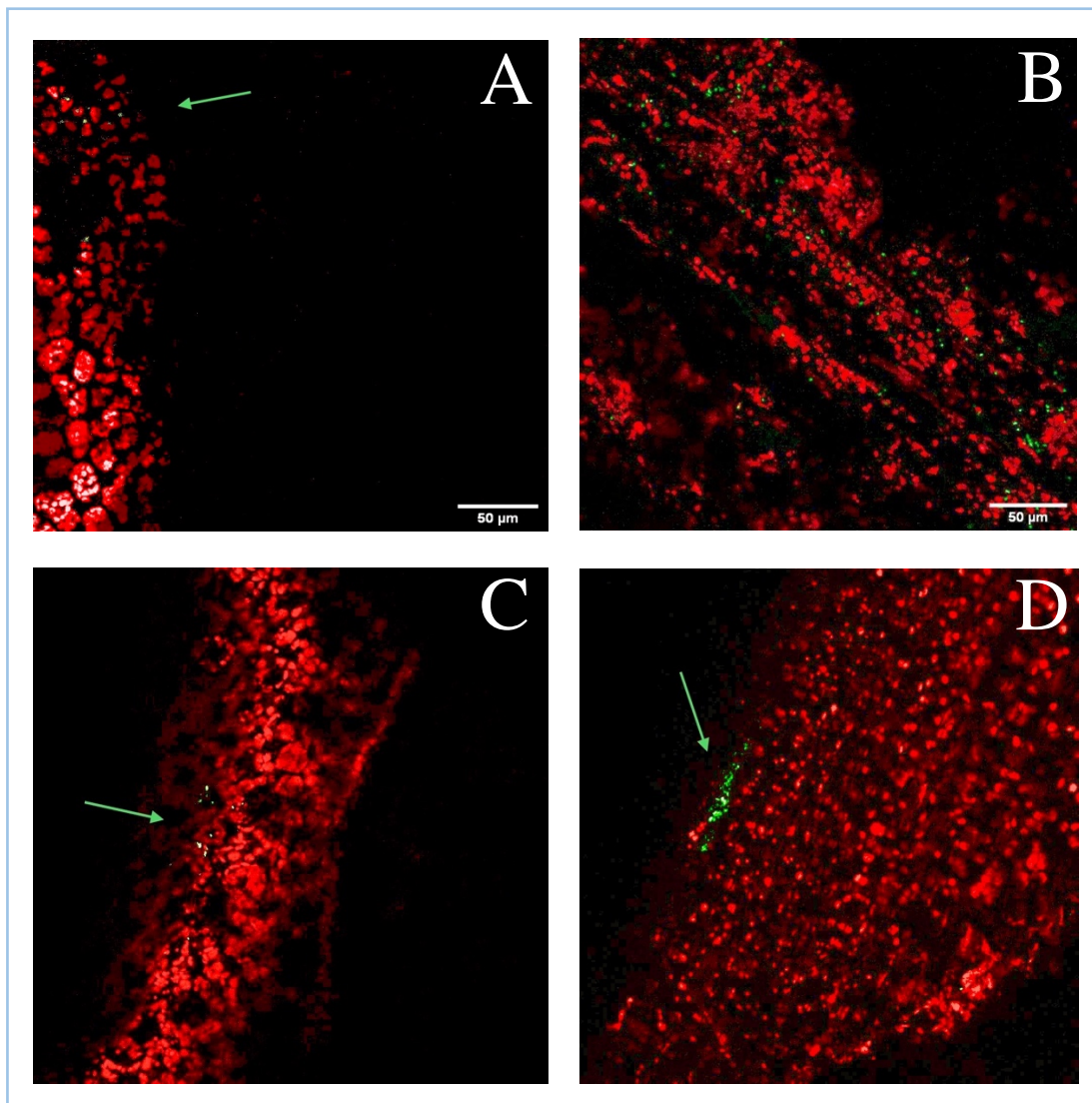


Figura 10: Immagini al microscopio confocale con luce fluorescente di sezioni sottili di piante in vitro inoculate con il batterio endofita *Bacillus licheniformis* a 15 e 30 giorni dopo l'inoculo (DPI). Sovrapposizione del segnale della proteina verde (GFP) di colore verde e della clorofilla (rosso). Le frecce indicano le cellule batteriche endofitiche.

- (A) Foglia basale 15 DPI.
- (B) Fusto a livello del primo internodo 15 DPI.
- (C) Sezione foglia apicale con endofiti 30 DPI.
- (D) Sezione del fusto a livello del secondo internodo 30 DPI.

La pianta inoculata con *Bacillus licheniformis*-GFP è stata usata come porta-innesto per un'altra pianta di Pinot Noir ma priva di endofiti. Il micro-innesto è stato effettuato a livello del secondo internodo in quanto le immagini acquisite successivamente all'inoculo dimostravano come i batteri avevano già raggiunto quel punto della pianta; dopo 30 giorni (DPG: Days Post Grafting) sono state analizzate le porzioni superiori della pianta ottenuta.

Come si può osservare nella Figura 11-A, a 30 DPG il batterio è stato trovato a livello del secondo internodo del fusto e nelle foglie apicali del nesto di Pinot Noir (Figura 11-B). Anche in questo caso, la presenza di batteri è stata osservata soprattutto a livello dei vasi dei tessuti analizzati.

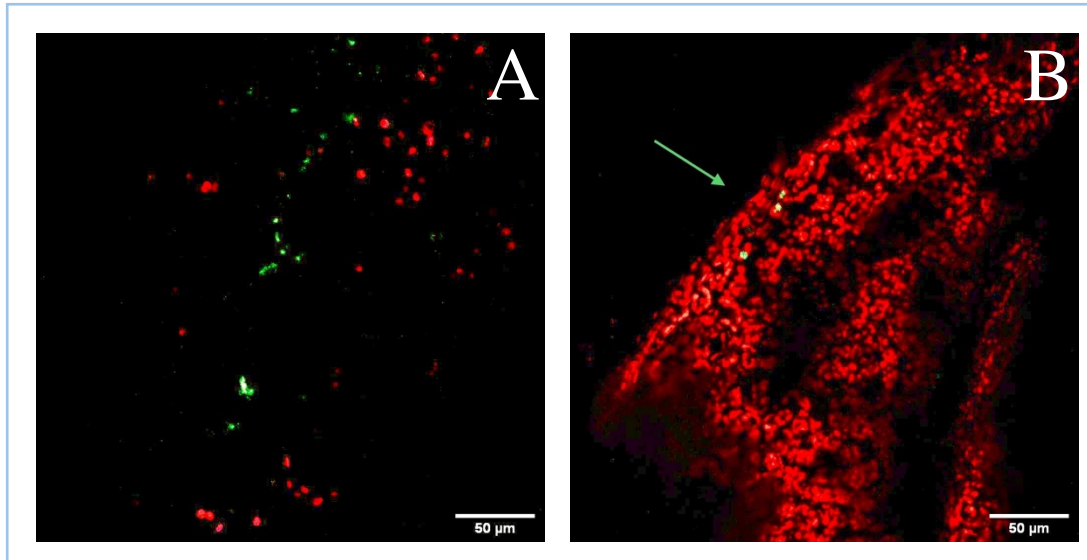


Figura 11: Immagini al microscopio confocale di piante dopo l'inoculo con il batterio endofita *Bacillus licheniformis* 30 giorni dopo l'innesto (DPG: Days Post Inoculation). Sovrapposizione del segnale della proteina verde (GFP) di colore verde e della clorofilla (rosso). La freccia indica le cellule batteriche endofitiche.

(A) Fusto a livello del secondo internodo 30 DPG.

(B) Foglia apicale 30 DPG.

5 CONCLUSIONI

La propagazione utilizzando tralci di piante di campo della Sicilia e dell'Algeria ha restituito esiti positivi con una buona percentuale di sopravvivenza; la micropropagazione del Pinot Noir è stata eseguita *in vitro* e ha portato allo sviluppo di piante per ottenere sia nesti che porta-innesti. La contaminazione da agenti esterni durante i processi di micropropagazione incide profondamente sul risultato finale: alcune piante hanno sviluppato muffe o funghi che si sono rivelati fatali.

Dalle osservazioni eseguite con il microscopio confocale risulta che gli endofiti si spostano dal porta-innesto al nesto sfruttando quindi l'innesto. Nelle immagini acquisite la loro presenza nelle zone limitrofe ai vasi conduttori ci suggerisce che probabilmente i batteri si muovono attraverso questi.

Dalle analisi dei dati ottenuti sulla presenza di *Bacillus licheniformis*-GFP nei diversi compartimenti vegetali delle piante inoculate, si conclude che gli endofiti sono in grado di spostarsi dal mezzo di coltura alla pianta colonizzando fusto e foglie. Per penetrare nella pianta i batteri sfruttano i canali vascolari esposti alla base del fusto della talea impiantato nel terreno di crescita. Come dimostrato dalle immagini acquisite con il microscopio confocale gli endofiti, a distanza di 30 giorni dall'inoculo nel terreno di crescita, sono stati in grado di colonizzare una pianta di Pinot Noir raggiungendo le foglie apicali.

Di tutti gli endofiti esistenti solo una parte sono coltivabili e può essere che questi non siano quelli che conferiscono le resistenze agli stress cercate. Non essendo garantito che i batteri estratti dalla pianta siano coltivabili, se quelli benefici sono trasferibili attraverso i vasi conduttori mediante l'innesto, sarebbe un notevole guadagno economico in quanto si risparmierebbe la loro coltivazione e probabilmente ci sarebbe una maggiore efficacia nel loro trasferimento. Sarebbe interessante testare l'innesto su piante legnose in campo. Dai dati ottenuti in laboratorio si può ipotizzare che la pratica dell'innesto sia un metodo abbastanza semplice oltre che economico ed efficace per trasferire endofiti da una pianta all'altra.

BIBLIOGRAFIA

Baldan, E., S. Nigris, F. Populin, M. Zottini, A. Squartini & B. Baldan, (2014). Identification of culturable bacterial endophyte community isolated from tissues of *Vitisvinifera* “Glera”, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 148:3, 508-516.

Bettenfeld P., J. Cadena i Canals, L. Jacquens, O. Fernandez, F. Fontaine, E. van Schaik, P. Courty, S. Trouvelot, (2021). The microbiota of the grapevine holobiont: A key component of plant Health. *Journal of Advanced Research*, 1-15.

Bulgari D., P. Casati, P. Crepaldi, D. Daffonchio, F. Quaglino, L. Brusetti, and P. A. Bianco, (2011). Restructuring of Endophytic Bacterial Communities in Grapevine Yellows-Diseased and Recovered *Vitis vinifera* L. *Plants*, 77(14), 5018-5022.

Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., Barka, E. A., & Clément, C. (2008). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by Burkholderia phytotirmans strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS microbiology ecology*, 63(1), 84-93.

Compant S., M. G.A. van der Heijden & A. Sessitsch, (2010). Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions, *FEMS Microbiol Ecology*, 197-214.

Hallmann, J., Quadt-Halimann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., and Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16, 463-471.

Kim H.J., S.H. Lee, C.S. Kim, E.K. Lim, K.H. Choi, H.G. Kong, D.W. Kim, S.W. Lee, B.J. Moon (2007). Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 438-444.

Mudge, K. (2008). Innesto; teoria e pratica. In: Beyi, CA, Trigiano. R. fa cura di *Concetti di propagazione vegetale ed esercizi di laboratorio*. CRC Press, New York, pp. 273-292.

Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., Goldschmidt, EE. (2009). Una storia di innesto, In: Janick, J. (a cura di). Horticultural Reviews 35. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 437-493.

Murasnige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant*, 15(3), 473-497.

Pacifico D, Squartini A, Crucitti D, Barizza E, Lo Schiavo F, Muresu R, Carimi F and Zottini M, (2019). The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers. *Front. Plant Sci.* 10:1256, 1-15.

Pasqua, G., Cozzolino, S., Di Sansebastiano, G. P., Forni C., Genre, A., Lanfranco, L., Micheli, A., Trainotti, L., Valletta, A. (2011). *Biologia cellulare & biotecnologie vegetali*. Piccin, Padova.

S Nigris, et al. “Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera.” *BMC microbiology* 18.1 (2018): 1-16.

Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50:1-17.

Tedesco S., P. Fevreiro, F. Kragler, A. Pina, (2022). Plant grafting and graft incompatibility: A review from the grapevine perspective. *Scientia Horticulturae* 299, 1-12.

Wang, Z., Wang, Y., Zheng, L., Yang, X., Liu, H., & Guo, J. (2014). Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheniformis* H\$10. *Biochemical and biophysical research communications*, 454(1), 48-52.

Wang, J., Jang, L., Wu, A., (2017). Innesto di piante: come lo scambio genetico promuove la riconnessione vascolare, *Nuovo Fitolo*, 214, 56-65.

Zhang X., WU Y., LI Z., Song C., Wang X., (2021). Advancements in plant regeneration and genetic transformation of grapevine (*Vitis* spp.). *Journal of Integrative Agriculture* 2021, 20(6): 1407–1434.