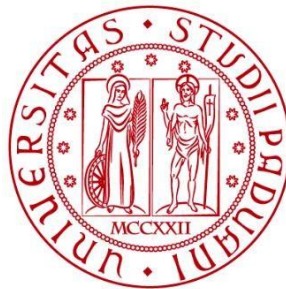


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Impiego di endofiti batterici in *Vitis vinifera* per il
miglioramento della resistenza allo stress idrico**

Tutor: Prof.ssa Michela Zottini
Dipartimento di Biologia

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

Laureando: Andrea Ferraro

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

1. Introduzione	3
1.1. Gli stress abiotici, la siccità	4
1.2. La vite (<i>Vitis vinifera</i> , L.)	5
1.3. Microbiota vegetale	5
1.4. Il microbiota nella vite (<i>Vitis vinifera</i> , L.)	6
1.5. Il microbiota e la siccità	7
2. Finalità dello studio	9
3. Materiali e metodi	10
3.1. Materiale vegetale	10
3.2. Ceppi batterici e condizioni di crescita	11
3.3. Inoculo di talee di Pinot Noir	13
3.4. Campionamento per la fenotipizzazione	13
3.5. Campionamento per il controllo degli endofiti	14
4. Risultati e discussione	15
4.1. Materiale vegetale al punto zero dell'esperimento	15
4.2. Parametri iniziali per le talee inoculate	15
4.3. Analisi materiale vegetale a 30 DPI (Days Post Inoculation)	16
4.4. Risultati dell'isolamento degli endofiti	18
5. Conclusioni	21
6. Bibliografia	22

1. Introduzione

Le piante, essendo organismi sessili, non hanno la possibilità di spostarsi per evitare condizioni ambientali avverse e, pertanto, sono esposte a una vasta gamma di stress abiotici a cui devono rispondere per sopravvivere. Nel corso dell'evoluzione, hanno sviluppato un'ampia varietà di strategie adattative per affrontare tali sfide. Gli stress abiotici che limitano la produttività agricola comprendono siccità, salinità, temperature estreme, inondazioni, carenze e tossicità nutrizionali. Tra questi, la siccità rappresenta uno degli stress più comuni, con un impatto diretto sulla vitalità e sulla resa delle colture, in quanto l'acqua è una delle risorse più limitanti per l'agricoltura (Shumilina et al., 2018).

Per superare queste difficoltà, le piante non si affidano esclusivamente ai loro meccanismi fisiologici e biochimici, ma traggono vantaggio anche dalle interazioni con microorganismi benefici presenti sia nei loro tessuti interni (microbiomi endofiti) sia nella rizosfera. Questi microorganismi, che includono batteri e funghi, svolgono un ruolo cruciale nell'aumentare la tolleranza agli stress abiotici e nel promuovere la crescita vegetale (Rana et al., 2020).

Gli endofiti, in particolare, migliorano la resistenza agli stress tramite una serie di meccanismi, tra cui la produzione di fitormoni come l'acido indol-3-acetico (IAA), che stimola la crescita radicale e ottimizza l'acquisizione di acqua e nutrienti, e la sintesi di siderofori, che mobilizzano il ferro in condizioni di carenza (Baldan et al., 2015).

Inoltre, alcuni endofiti fungono da agenti di biocontrollo contro i patogeni, contribuendo a ridurre l'uso di pesticidi e promuovendo una coltivazione più sostenibile (Nigris et al., 2018).

La vite (*Vitis vinifera* L.) è una delle colture fruttifere più antiche, largamente coltivate e di maggiore importanza economica a livello globale (Zecca et al., 2010). In particolare, la viticoltura ha un valore straordinario nelle regioni mediterranee (Marusig & Tombesi, 2020; Muhamad Insanu et al., 2021).

La produzione globale annuale di vino può raggiungere le 77,44 milioni di tonnellate metriche. Gran parte delle viti coltivate è destinata alla vinificazione, che ne utilizza dal 50% al 75%, mentre il resto è impiegato per il consumo come frutta fresca, uva passa e succo (Muhamad Insanu et al., 2021).

Le regioni in cui la vite viene coltivata sono spesso soggette a periodi di siccità, salvo nei casi in cui venga applicata l'irrigazione. Attualmente, gran parte della produzione mondiale di uva da vino non è irrigata: ad esempio, nel 2016 meno del 10% dei vigneti in Europa disponeva di sistemi di irrigazione (Costa et al., 2016;

Gambetta et al., 2020). L'aumento delle temperature globali e la crescente frequenza di episodi di siccità rappresentano una seria minaccia per la viticoltura, compromettendo sia la quantità che la qualità dei raccolti (Pacifico et al., 2019). Per affrontare queste sfide, la ricerca scientifica ha esplorato strategie innovative e sostenibili volte a migliorare la resilienza della vite agli stress abiotici. Gli endofiti batterici, che vivono in simbiosi all'interno delle piante, sono diventati un tema centrale per la loro capacità di favorire la crescita delle piante e di migliorarne la tolleranza agli stress. Attraverso meccanismi come la produzione di fitormoni (ad esempio, l'IAA), la solubilizzazione del fosfato e la produzione di siderofori, gli endofiti aiutano le piante a migliorare l'assorbimento di acqua e nutrienti, mitigando gli effetti negativi della siccità (Nigris et al., 2018). Questi microorganismi rappresentano, quindi, una soluzione promettente per garantire la sostenibilità della viticoltura, specialmente in un contesto di cambiamenti climatici e risorse idriche sempre più limitate.

1.1. Gli stress abiotici, la siccità.

Per stress abiotici si intendono quei fattori non biologici dell'ambiente che influenzano negativamente la crescita, lo sviluppo e la produttività delle piante. Tra questi si annoverano la siccità, la salinità, le temperature estreme (caldo e freddo), le inondazioni, gli squilibri nutrizionali, le radiazioni ultraviolette e l'inquinamento (Baldan et al., 2015). Gli stress abiotici rappresentano una delle principali limitazioni alla produttività agricola a livello globale, poiché inducono alterazioni metaboliche e fisiologiche che compromettono la crescita e la capacità riproduttiva delle piante (Rana et al., 2020). In particolare, la siccità provoca uno squilibrio idrico a livello cellulare, influenzando sul potenziale idrico, sulla pressione osmotica e sui meccanismi di trasporto dell'acqua, tra cui l'assorbimento radicale, la traspirazione e la conduzione attraverso lo xilema. La disponibilità di acqua, infatti, rappresenta il principale fattore limitante per la crescita e la sopravvivenza delle piante nelle regioni aride (Mengesha et al., 2016). Nei casi più gravi, uno stress idrico severo può portare all'inibizione della fotosintesi, alterare i processi metabolici essenziali e, in condizioni estreme, condurre al collasso fisiologico e alla morte della pianta (Jaleel, Cheruth Abdul et al., 2009).

Per fronteggiare gli effetti degli stress abiotici, le piante hanno sviluppato diverse strategie adattative volte a ottimizzare l'uso dell'acqua e a preservare la vitalità. Tra queste, una risposta cruciale è rappresentata dalla chiusura degli stomi, che riduce la traspirazione e limita la dispersione dell'acqua, un processo regolato dall'accumulo di acido abscissico (ABA), un fitormone che si accumula nelle

cellule di guardia in condizioni di siccità (Jaleel, Cheruth Abdul et al., 2009; Lim et al., 2015). Le piante possono inoltre adottare modifiche morfologiche, come lo sviluppo di radici più profonde per raggiungere l'acqua sotterranea o la formazione di foglie più piccole e spesse, che riducono la superficie esposta alla perdita d'acqua. Un ulteriore adattamento comprende l'accumulo di sostanze di riserva e la modulazione ormonale, che aiutano a mantenere l'equilibrio idrico e a favorire la resilienza della pianta agli stress (Shah et al., 2021).

Oltre ai propri meccanismi fisiologici e morfologici, le piante beneficiano dell'interazione con microorganismi endofiti che vivono all'interno dei loro tessuti e vasi. Queste comunità microbiche giocano un ruolo fondamentale nel migliorare la resilienza agli stress abiotici e biotici. Gli endofiti possono contribuire a potenziare l'assorbimento di acqua e nutrienti, a modulare le risposte fisiologiche agli stress e a proteggere la pianta dai patogeni. Tali interazioni rappresentano una risorsa preziosa per affrontare le sfide poste dai cambiamenti climatici e dalla crescente pressione sulle risorse naturali, fornendo un'opportunità per rendere l'agricoltura più sostenibile e resiliente (Faist et al., 2016).

1.2. La vite (*Vitis vinifera*, L.).

La vite è la coltura da frutto con il più alto valore di produzione a livello mondiale, con la maggior parte della produzione che si svolge in aree temperate con un clima di tipo mediterraneo (FAO 2023). Secondo le stime dell'OIV (OIV, 2019), i vigneti mondiali coprono una superficie di circa 7,4 milioni di ettari e la produzione di uva ammonta a 77,8 milioni di tonnellate. Il cinquantasette per cento di queste uve è destinato alla produzione di vino, pari a 292 milioni di ettolitri, di cui metà è attribuita a soli tre paesi: Italia, Francia e Spagna (OIV, 2019). La *Vitis vinifera* è una coltura tipica del Mediterraneo con un impatto molto rilevante sul paesaggio, l'economia e la cultura italiana. Nel 2016, oltre 687.000 ha di terreno agricolo in Italia erano coltivati a vite, con una produzione totale di 84.000 tonnellate di frutti (ISTAT, 2016).

Quasi tutte le regioni viticole del mondo si trovano in zone temperate e molte hanno un clima mediterraneo caratterizzato da estati calde e secche. In queste regioni, le viti sono regolarmente esposte a periodi di siccità a meno che non venga applicata l'irrigazione, e attualmente gran parte della produzione mondiale di uva da vino non è irrigata. La vite è frequentemente esposta a periodi di siccità intermittente, intervallati da eventi di precipitazione o irrigazione. In questo contesto, la capacità di recuperare dallo stress idrico diventa un elemento cruciale per garantire l'efficienza dell'assimilazione del carbonio, l'accumulo di biomassa e la

produttività fisiologica, sia nell'arco della stagione vegetativa sia tra cicli produttivi successivi. Nonostante la siccità possa comportare una riduzione della resa, uno stress idrico moderato è spesso associato a un miglioramento della qualità dell'uva. Per questo motivo, molte strategie di irrigazione controllata, come il deficit irriguo, sono adottate dai produttori per ottimizzare la qualità del raccolto (Gambetta et al., 2020). Essendo una coltura perenne, la vite è progettata per produrre per decenni, il che rende fondamentale una tolleranza alla siccità che garantisca non solo la produttività a breve termine, ma anche la capacità di evitare effetti negativi cumulativi nel lungo periodo. La gestione dello stress idrico deve quindi mirare a preservare la vitalità della pianta, riducendo il rischio di danni permanenti o di mortalità indotta dalla siccità nel corso di molte stagioni consecutive (Gambetta et al., 2020).

1.3. Microbiota vegetale.

Le piante sono colonizzate da un numero sorprendente di microrganismi che svolgono ruoli fondamentali per la loro salute e produttività. Nella rizosfera, una stretta zona di terreno influenzata dalle secrezioni radicali, si possono trovare fino a 10^{11} cellule microbiche per grammo di radice e oltre 30.000 specie di procarioti (Berendsen et al., 2012). Questo ambiente, considerato il più grande serbatoio di diversità biologica al mondo, ospita una vasta gamma di comunità microbiche che interagiscono direttamente o indirettamente con le piante.

Il microbiota vegetale comprende batteri, funghi, alghe, archei e protisti, con batteri e funghi che rappresentano le forme dominanti e più studiate (Mendes et al., 2013; Trivedi et al., 2020). Questi microrganismi influenzano profondamente diversi aspetti della biologia vegetale, tra cui la germinazione dei semi, il vigore delle piantine, la crescita e lo sviluppo delle piante, la nutrizione, la resistenza ai patogeni e, infine, la produttività (Mendes et al., 2013). Tra i microrganismi benefici presenti nella rizosfera, i batteri azotofissatori, i funghi micorrizici e i batteri promotori della crescita delle piante (PGPR) sono particolarmente rilevanti per il miglioramento della salute e della crescita vegetale (Berendsen et al., 2012). Al contrario, alcuni microrganismi, come funghi patogeni e oomyceti, possono avere un impatto negativo sulla salute delle piante, sottolineando l'importanza di un equilibrio nella composizione microbica della rizosfera (Mendes et al., 2013).

È importante considerare che il microbiota vegetale non si limita a interazioni mutualistiche. Accanto ai microrganismi benefici esistono anche organismi neutri e patogeni, che non sempre favoriscono la salute della pianta. Tuttavia, i microrganismi benefici sono stati oggetto di ampi studi per il loro ruolo nel

promuovere la crescita delle piante, migliorare l'assorbimento dei nutrienti e aumentare la resistenza ai patogeni. Questi microorganismi sono in grado di instaurare interazioni simbiotiche e mutualistiche con le piante, evidenziando il loro enorme potenziale per lo sviluppo di pratiche agricole sostenibili (Trivedi et al., 2020).

1.4. Il microbiota nella vite (*Vitis vinifera*, L.)

Un endofita è un microrganismo, come un batterio endosimbionte o un fungo, che vive all'interno dei tessuti di una pianta. L'endofitismo rappresenta una relazione mutualistica e vantaggiosa sia per la pianta ospite che per l'endofita stesso, con effetti spesso significativi sullo stato fisiologico della pianta (Hamaoka et al., 2022). Un'analisi approfondita degli ecosistemi viticoli contribuisce alla comprensione del concetto di "terroir", definito come l'interazione tra pianta, ambiente e fattori umani. Questo concetto è fondamentale per collegare le caratteristiche sensoriali del vino alla sua origine geografica. Il microbiota locale, sia quello presente nel suolo sia quello all'interno dei tessuti della vite, è un elemento chiave del terroir, poiché può influenzare non solo la salute della pianta, ma anche la qualità finale del vino (Fabres et al., 2017).

La composizione e la diversità del microbiota endofitico della vite dipendono da vari fattori ambientali, come le condizioni del suolo e le pratiche agronomiche. Questi elementi possono determinare non solo la salute generale della pianta, ma anche la sua capacità di adattarsi a condizioni di stress. In definitiva, il microbiota endofitico della vite svolge un ruolo essenziale nell'interazione tra la pianta e il suo ambiente, contribuendo a modellare la produttività e la qualità del vino (Hamaoka et al., 2022).

1.5. Il microbiota e la siccità.

La siccità rappresenta una delle principali sfide per l'agricoltura globale. Un esempio emblematico si è verificato in Europa nel 2003, quando un episodio di siccità estrema, aggravato da temperature estive eccezionalmente alte, ha determinato un drastico calo della produttività primaria (Ciais et al., 2005; Olesen et al., 2011; Palliotti et al., 2015). Nonostante il crescente impatto della siccità sull'agricoltura, il ruolo del microbioma batterico associato alle radici nell'adattamento delle piante allo stress idrico rimane poco approfondito (Rolli et al., 2015). Diventa quindi essenziale sviluppare soluzioni agricole sostenibili che possano preservare la produttività delle colture e ridurre il rischio di un eccessivo

consumo delle risorse idriche. In questo contesto, il microbioma benefico associato alle radici e ai tessuti delle piante, inclusi i batteri promotori della crescita delle piante (PGP) (Hanif et al., 2024), offre un potenziale significativo per mitigare lo stress idrico attraverso una serie di meccanismi biologici (Sun et al., 2024).

Il rischio che l'introduzione di endofiti possa alterare l'equilibrio microbiologico del suolo è considerato minimo. Numerosi studi in ecologia microbica dimostrano che i microrganismi introdotti hanno un impatto trascurabile sulle comunità microbiche autoctone, in quanto la sopravvivenza e la moltiplicazione dei microrganismi esogeni sono limitate dalla forte competizione esercitata dai batteri residenti (Borghi et al., 2024).

Tra i numerosi benefici offerti dai batteri del suolo, la capacità di formare biofilm attorno alle radici si distingue per la sua efficacia nel creare una barriera fisica che riduce la perdita d'acqua nel suolo (Bhattacharyya et al., 2023). Tuttavia, un approccio ancora più promettente è rappresentato dall'attivazione mediata dai microrganismi dei geni legati alle risposte delle piante agli stress, attraverso l'attivazione trascrizionale dell'olobioma. Questo processo permette di aumentare la resilienza specifica della pianta a molteplici stress (Borghi et al., 2024).

La componente endofitica del microbiota è particolarmente interessante per la capacità di migliorare la resilienza della vite agli stress abiotici. Gli endofiti sono in grado di attivare risposte locali e sistemiche nella pianta, migliorando la tolleranza al calore, alla siccità e all'elevata salinità (Pacifico et al., 2019). Tali benefici possono derivare da effetti diretti, come l'induzione di geni specifici per la risposta agli stress, o da effetti indiretti, preparando la pianta a fronteggiare esposizioni future (Pacifico et al., 2019).

I batteri endofitici possono contrastare i danni causati dalla siccità in diversi modi. Oltre a stimolare lo sviluppo radicale e vegetativo, contribuiscono a modulare i processi biochimici delle piante, migliorando la detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), favorendo la sintesi di metaboliti specializzati e regolando la produzione e la risposta a fitormoni come le auxine e l'acido abscissico (ABA) (Pacifico et al., 2019). In sintesi, l'azione degli endofiti si presenta come una strategia promettente per potenziare la tolleranza della vite agli stress abiotici (Borghi et al., 2024).

2. Finalità dello studio

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi, incentrato sulla fenotipizzazione di talee di *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir inoculate con singoli ceppi batterici endofiti, è stato quello di valutare l'influenza di ciascun endofita sulle caratteristiche fisiologiche e morfologiche delle piante. Tale lavoro è parte di un progetto più vasto che mira ad individuare ceppi batterici endofitici che possano conferire resilienza allo stress idrico per poter essere utilizzati in una prospettiva di viticoltura sostenibile.

In questa tesi presento l'esperimento *in vivo* di fenotipizzazione di talee di *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, inoculate con singoli endofiti batterici. Attraverso l'inoculo con i ceppi *Bacillus stercoris*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Microbacterium algeriense* e *Pantoea conspicua*, si intende monitorare e confrontare le variazioni nei parametri fisiologici delle piante, come il numero di nodi, il numero di foglie, il peso fresco e secco della parte aerea e dell'apparato radicale. Dopo 30 giorni dall'inoculo, l'esperimento include anche la verifica della presenza dei ceppi batterici all'interno delle piante inoculate, per confermare la colonizzazione endofitica e identificare i ceppi con un potenziale significativo di promozione della crescita e di resistenza agli stress ambientali.

3. Materiali e metodi.

3.1. Materiale vegetale.

L'esperimento è stato condotto utilizzando talee di *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir. Le piante sono state propagate *in vitro* sei mesi prima dell'inizio dell'esperimento all'interno di contenitori in polipropilene (Eco2box, modello O95/114 + OD95 con filtro) contenenti 100 ml di terreno solido ½ MS, arricchito con il 1,5% di saccarosio e 2,5 µM di acido indol-3-butirrico (IBA), e regolato a un pH di 5,8 per favorire la crescita ottimale. Tutte le piante sono state mantenute in una camera di crescita con condizioni ambientali strettamente controllate: la temperatura è stata mantenuta costante a 22°C, l'umidità relativa era fissata al 50%, e il fotoperiodo impostato su un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. Queste condizioni standardizzate hanno garantito un ambiente ideale per la coltivazione *in vitro* delle piante, assicurando una crescita uniforme e riducendo al minimo le variazioni fisiologiche che potrebbero influenzare i risultati dell'esperimento.

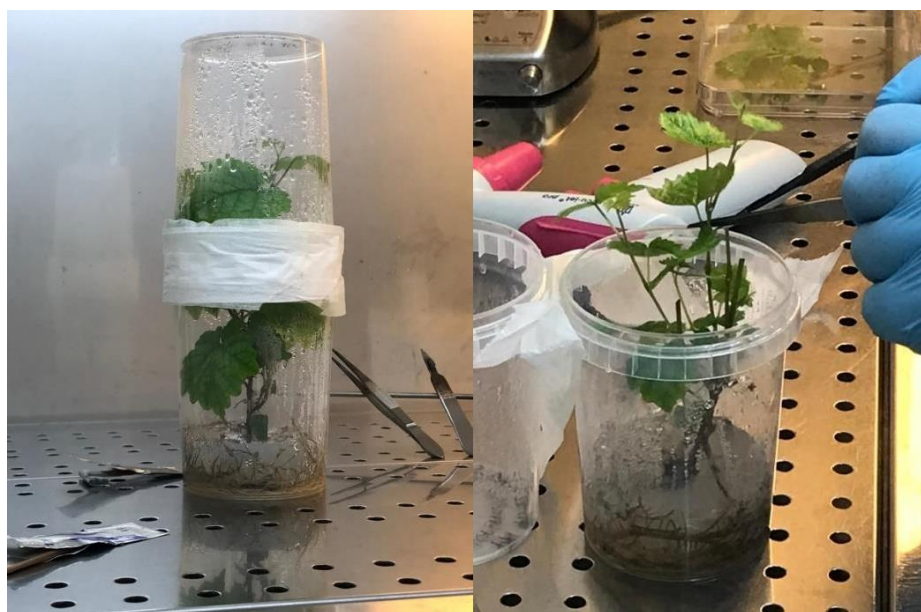


Figura 1: a sx, una pianta di *Vitis vinifera* cresciuta per 6 mesi prima del prelievo delle talee; a dx prelievo delle talee. Le operazioni di taglio sono state svolte sotto cappa per ridurre al minimo possibili contaminazioni.

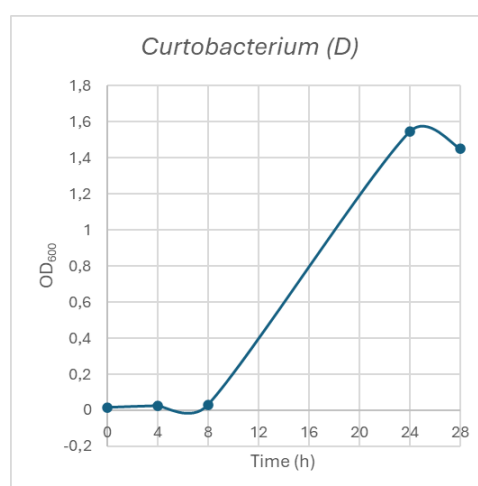
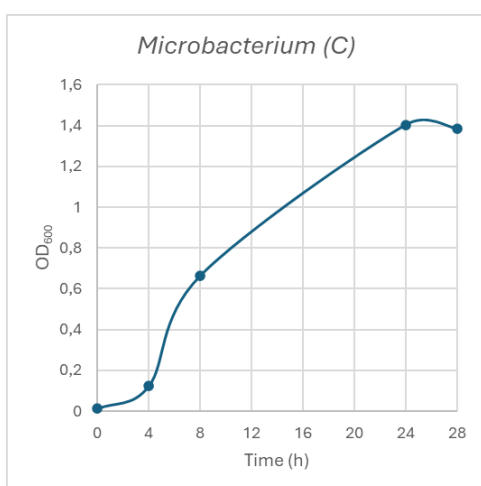
3.2. Ceppi batterici e condizioni di crescita.

Le colture batteriche sono state preparate prelevando ciascun ceppo dai campioni conservati a -80°C utilizzando un'ansa sterile per inoculo, e trasferendo i batteri in 5 mL di terreno liquido PCA. Questo pre-inoculo è stato incubato per una notte a 28°C , in condizioni di oscurità, con agitazione costante a 130 rpm su uno shaker orbitale, permettendo una crescita preliminare uniforme dei batteri. Successivamente, sono stati prelevati 100 μL di questo pre-inoculo e trasferiti in 10 mL di terreno liquido PCA fresco, per essere incubati nelle stesse condizioni di temperatura, oscurità e agitazione. Questo processo ha garantito che i batteri raggiungessero una fase di crescita esponenziale.

Strain	Code	Growth	NH_4^+ production	IAA production
<i>Bacillus stercoris</i>	G	slow	(-)	(+)
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	D		(-)	(++)
<i>Microbacterium algeriense</i>	C		(+/-)	(-)
<i>Pantoea conspicua</i>	O		(+/-)	(+)

Strain	Code	PO_4^{3-} solubilization	Siderophore production	0,5 M Sorbitol
<i>Bacillus stercoris</i>	G	(-)	(++)	(++)
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	D	(+)	(++)	(+/-)
<i>Microbacterium algeriense</i>	C	(-)	(++)	(+)
<i>Pantoea conspicua</i>	O	(+)	(+/-)	(+)

Tabella 1: nelle tabelle sono riportati il nome dei batteri utilizzati in questo esperimento, le lettere con le quali sono indicate e la relativa positività o negatività a diversi test di attività biochimiche.



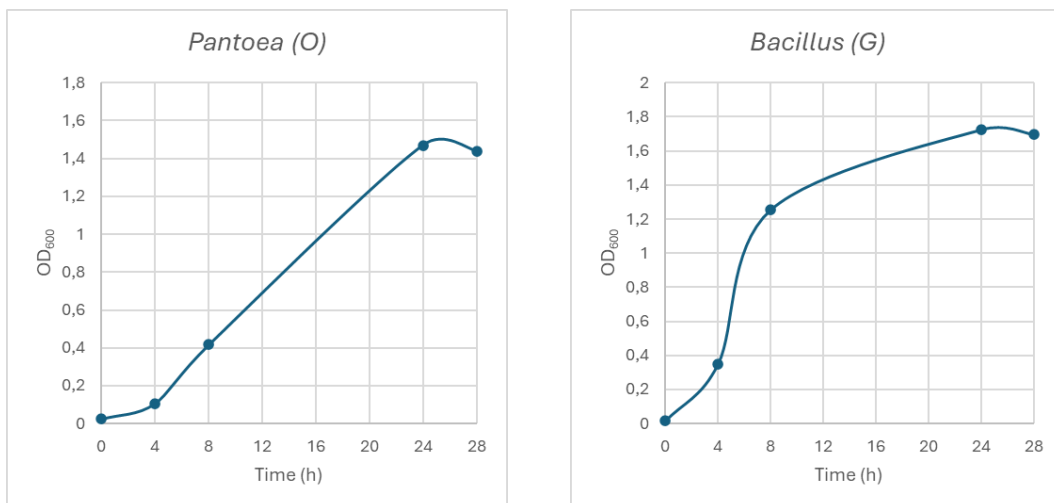


Figure 2: curve di crescita batteriche per i quattro diversi ceppi di batteri utilizzati nell'esperimento di inoculo

Il PCA (Plate Count Agar) è un mezzo nutriente generale che fornisce una base bilanciata di componenti necessari per il mantenimento e la proliferazione di molti tipi di batteri. La composizione del PCA prevede l'inclusione di peptone, che fornisce azoto e amminoacidi essenziali per il metabolismo batterico, nella quantità di 5,0 g/L (33,3%). L'estratto di lievito, presente con una concentrazione di 2,5 g/L (16,7%), rappresenta una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B, e altri fattori di crescita necessari per la crescita dei batteri. Inoltre, il glucosio (o destrosio), con una concentrazione di 1,0 g/L (6,7%), agisce come fonte di carboidrati per sostenere il metabolismo energetico dei batteri. L'agar, presente a una concentrazione di 15,0 g/L viene utilizzato come agente gelificante nel terreno solido. I batteri sono stati fatti crescere in Falcon da 50ml.



Figura 3: l'illustrazione mostra un oscillatore sul quale vengono depositate le Falcon da 50ml per permettere la crescita dei batteri.

3.3. Inoculo di talee di Pinot Noir.

Le colture batteriche per ciascuno dei 4 ceppi sono state cresciute come riportato nel paragrafo 3.2. Successivamente sono state centrifugate e risospese in 5 ml di MgSO₄ 10 mM. Una volta misurate le densità ottiche, i ceppi sono stati diluiti in MgSO₄ 10 mM per raggiungere una densità cellulare descritta nella seguente tabella:

Ceppo	Concentrazione (cell/ml)
<i>Microbacterium algeriense</i>	$1,2 \cdot 10^7$
<i>Pantoea conspicua</i>	$2,6 \cdot 10^6$
<i>Bacillus stercoris</i>	$3,8 \cdot 10^6$
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	$6,5 \cdot 10^6$

Tabella 2: in tabella è riportata la densità cellulare dei diversi ceppi dopo la diluizione

Il giorno 03/05/2024, sono state prelevate 45 talee da piante di *Vitis vinifera* che sono state fatte crescere per 6 mesi in contenitori in polipropilene.

Il processo di inoculo è stato effettuato ponendo 5 µl di soluzione batterica di ciascun ceppo (C, O, G, D) sulla superficie di circa 100 ml di mezzo solido ½ MS pH 5.8. In corrispondenza di ciascuna goccia, una talea apicale di Pinot Noir con una foglia espansa è stata piantata nel mezzo. Il controllo è stato effettuato inoculando le talee con 5 µl di MgSO₄ 10 mM. Le 45 talee sono state nominate e poste nelle stesse condizioni di crescita precedenti, ovvero la temperatura è stata mantenuta costante a 22°C, l'umidità relativa era fissata al 50%, e il fotoperiodo impostato su un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

3.4. Campionamento per la fenotipizzazione

Nello stesso giorno dell'inoculo delle talee di Pinot Noir, sono stati raccolti i parametri fisiologici relativi alla parte aerea delle piante, al fine di monitorare le condizioni iniziali di crescita. In particolare, per ciascuna delle sei talee, sono stati misurati il numero di nodi e di foglie, che forniscono informazioni sulla ramificazione e sullo sviluppo vegetativo delle piante. Inoltre, sono stati determinati il peso fresco e il peso secco della parte aerea, per valutare la biomassa totale e la relativa composizione idrica delle talee.

Trenta giorni dopo l'inoculo, sono state selezionate altre sei piante per ciascun trattamento sperimentale. Queste piante sono state utilizzate per raccogliere nuovamente i parametri fisiologici relativi sia alla parte aerea che alla parte radicale. Per la parte aerea, sono stati misurati nuovamente il numero di nodi, il numero di foglie e il peso fresco e secco, al fine di confrontare la crescita e lo sviluppo nel

corso del tempo rispetto ai valori iniziali. Per la parte radicale, sono stati misurati la lunghezza totale dell'apparato radicale, che fornisce indicazioni sullo sviluppo delle radici, e sono stati determinati il peso fresco e il peso secco delle radici, per l'efficienza di assimilazione dei nutrienti e la risposta fisiologica delle piante in relazione allo sviluppo radicale.

Questi dati permettono di ottenere un quadro complessivo delle reazioni fisiologiche delle piante al trattamento di inoculo, non solo per quanto riguarda la crescita aerea, ma anche per la salute e la crescita delle radici.

3.5 Campionamento per il controllo degli endofiti.

Trenta giorni dopo l'inoculo, sono state selezionate 3 piante per il controllo e il ceppo D e 4 piante per i ceppi C, G ed O, per verificare la presenza dei ceppi batterici all'interno delle piante inoculate. A questo scopo, sono stati prelevati 2 grammi di materiale vegetale quali foglie e fusto, successivamente sono state pestate in un mortaio con all'interno 5 ml di acqua sterile per rompere le pareti cellulari e ottenere gli endofiti batterici in sospensione. Il tutto è stato fatto in condizioni di sterilità sotto cappa per evitare contaminazioni esterne.

In seguito 100 µl di soluzione venivano prelevati e posizionati su piastre Petri contenenti un terreno di coltura solido, adatto alla crescita batterica, questo, per confermare l'attività e monitorare la presenza dei ceppi specifici all'interno dei tessuti vegetali.

4. Risultati e discussione.

4.1. Materiale vegetale al punto zero dell'esperimento.

Al punto zero dell'esperimento, sono stati registrati i pesi del materiale vegetale secco e fresco delle piante di *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, con l'obiettivo di ottenere un quadro di riferimento per le condizioni iniziali delle piante. I risultati sono stati analizzati separatamente per i fusti e le foglie.

Peso del materiale vegetale secco (g)						
Numero della pianta	Peso delle piastre Petri	Peso secco fusto e Petri	Peso secco fusto	Peso Petri per le foglie	Peso secco foglie e Petri	Peso secco foglie
1	3,2502	3,279	0,0288	3,2502	3,2868	0,0366
2	3,2516	3,261	0,0094	3,2506	3,2644	0,0138
3	3,2511	3,2608	0,0097	3,2518	3,2679	0,0161
4	3,2513	3,2554	0,0041	3,249	3,2686	0,0196
5	3,2482	3,2562	0,008	3,2518	3,2734	0,0216
6	3,2478	3,2584	0,0106	3,2484	3,2666	0,0182
Media			0,0118			0,021
Deviazione standard			0,0086			0,008

Tabella 3: in tabella sono riportati i dati ottenuti dalle misurazioni dei pesi secchi delle piante di vite (*Vitis vinifera*, L.), al momento del prelievo delle talee per l'esperimento di fenotipizzazione.

Peso materiale vegetale fresco (g)						
Numero della pianta	Peso delle piastre Petri	Peso fresco fusto e Petri	Peso fresco fusto	Peso Petri per le foglie	Peso fresco foglie e Petri	Peso fresco foglie
1	0,3773	3,2502	3,4037	0,1535	3,2502	3,446
2	0,1964	3,2516	3,344	0,0924	3,2506	3,3492
3	0,2155	3,2511	3,3459	0,0948	3,2518	3,3612
4	0,19	3,2513	3,3106	0,0593	3,249	3,3762
5	0,2323	3,2482	3,3403	0,0921	3,2518	3,3865
6	0,2243	3,2478	3,3555	0,1077	3,2484	3,3606
Media			0,0999			0,1300
Deviazione standard			0,0310			0,0350

Tabella 4: In tabella sono riportati i dati relativi ai pesi freschi delle piante di vite (Vitis vinifera L.), misurati al momento del prelievo delle talee per l'esperimento di fenotipizzazione.

Questi dati iniziali forniscono un quadro chiaro delle condizioni delle piante all'inizio dell'esperimento, con una distribuzione abbastanza omogenea dei pesi sia nel materiale secco che fresco. Questo dato di partenza è fondamentale per monitorare l'effetto dell'inoculo con endofiti sui parametri di crescita e sviluppo delle piante. Le foglie rappresentano, sia per il peso secco che fresco, una porzione maggiore della biomassa totale rispetto agli steli. In particolare il peso secco medio delle foglie, è superiore rispetto a quello dei fusti e questa tendenza si ha anche per quanto riguarda il peso fresco. Queste differenze sottolineano il ruolo predominante delle foglie nell'accumulo di acqua

4.2. Parametri iniziali per le talee inoculate.

Prima e durante l'inoculo con endofiti, sono stati raccolti i dati relativi al numero di foglie, numero di nodi e peso fresco delle talee di *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir per il controllo MgSO₄ e per i ceppi D, O, G e C. Questi dati di partenza permettono di stabilire una base uniforme per il confronto dei parametri di crescita vegetativa nei diversi gruppi, fornendo un quadro chiaro delle condizioni iniziali.

Parametri del taglio per il controllo MgSO ₄ al 03/05/2024				
n. foglie	n. internodi	Peso vasetto con il mezzo	Peso vasetto, con mezzo e talea	Peso fresco talea
3	4	136,62	136,66	0,04
3	3	155,16	155,17	0,01
3	4	159,96	160,53	0,57
4	4	156,28	156,18	-0,10
3	3	156,70	157,28	0,58
3	3	159,72	160,21	0,49
3	3	162,13	162,31	0,18
3	4	133,55	133,81	0,26
3	4	149,15	149,33	0,18
Parametri del taglio per il ceppo D al 03/05/2024				
n. foglie	n. internodi	Peso vasetto con il mezzo	Peso vasetto, con mezzo e talea	Peso fresco talea
3	3	155,52	155,52	0,00
4	4	150,43	150,87	0,44
3	4	156,70	157,11	0,41
4	4	128,60	129,07	0,47
4	4	136,64	136,84	0,20
3	3	128,37	128,61	0,24
3	4	131,05	131,42	0,37
3	4	152,42	152,93	0,51
3	4	153,47	153,82	0,35

Parametri del taglio per il ceppo O al 03/05/2024				
n. foglie	n. internodi	Peso vasetto con il mezzo	Peso vasetto, con mezzo e talea	Peso fresco talea
3	3	127,35	127,68	0,33
3	4	158,52	158,27	-0,25
3	4	143,94	144,42	0,48
3	4	152,71	152,83	0,12
3	3	155,55	155,30	-0,25
3	4	150,33	150,45	0,12
2	3	159,49	159,75	0,26
4	4	149,15	149,41	0,26
Parametri del taglio per il ceppo G al 03/05/2024				
n. foglie	n. internodi	Peso vasetto con il mezzo	Peso vasetto, con mezzo e talea	Peso fresco talea
3	4	140,51	141,03	0,52
2	3	154,41	154,58	0,17
2	3	152,16	152,33	0,17
3	2	143,48	143,8	0,32
3	3	155,35	155,45	0,10
3	3	148,02	147,92	-0,10
3	3	133,44	133,37	-0,07
3	3	139,85	140,17	0,32
2	3	132,96	133,34	0,38
2	5	152,58	152,98	0,40
Parametri del taglio per il ceppo C al 03/05/2024				
n. foglie	n. internodi	Peso vasetto con il mezzo	Peso vasetto, con mezzo e talea	Peso fresco talea
3	4	129,17	129,28	0,11
3	3	154,61	154,97	0,36
4	4	173,41	173,10	-0,31
4	4	164,24	163,60	-0,64
3	3	164,51	164,14	-0,37
3	3	159,25	158,95	-0,30
3	3	149,42	149,15	-0,27

4	4	139,07	138,76	-0,31
4	4	162,67	162,19	-0,48

Tabella 5: in tabella sono riportati i dati raccolti all'inizio dell'esperimento di fenotipizzazione

Alcuni dati negativi sono stati registrati, in particolare per i ceppi O e C. Valori negativi del peso fresco non sono biologicamente plausibili e potrebbero derivare da errori di misurazione o sottrazione. Tuttavia, i dati raccolti costituiscono un punto di riferimento iniziale essenziale per valutare gli effetti degli endofiti sulla crescita delle talee. Questi valori rappresentano una base fondamentale per monitorare le variazioni successive e analizzare l'impatto dell'inoculo degli endofiti sulla resistenza allo stress idrico e sulla crescita complessiva delle talee.

4.3. Analisi materiale vegetale a 30 DPI (Days Post Inoculation).

Per valutare la risposta delle talee di *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir all'inoculo, dopo 30 giorni si vanno a contare: il numero di foglie e il numero di nodi. Questi due parametri sono indicatori chiave per la crescita e lo sviluppo vegetativo delle piante, in quanto un maggior numero di foglie e nodi può riflettere una maggiore attività metabolica e crescita vegetativa.

Le talee del gruppo di controllo trattate con MgSO₄ mostrano una crescita moderata in termini di foglie e nodi. Le talee inoculate con il ceppo D presentano la crescita migliore, evidenziando un numero maggiore sia di foglie che di nodi. Al contrario, quelle trattate con il ceppo O mostrano una crescita inferiore rispetto al controllo e al ceppo D. I ceppi G e C evidenziano una crescita limitata, con valori simili tra loro, caratterizzati da un numero ridotto di foglie e nodi.

Da questa analisi risulta che il ceppo D stimola la crescita delle talee di *Vitis vinifera*, in modo più significativo rispetto agli altri ceppi, evidenziando un numero medio di foglie e nodi superiore rispetto sia al controllo sia agli altri ceppi testati.

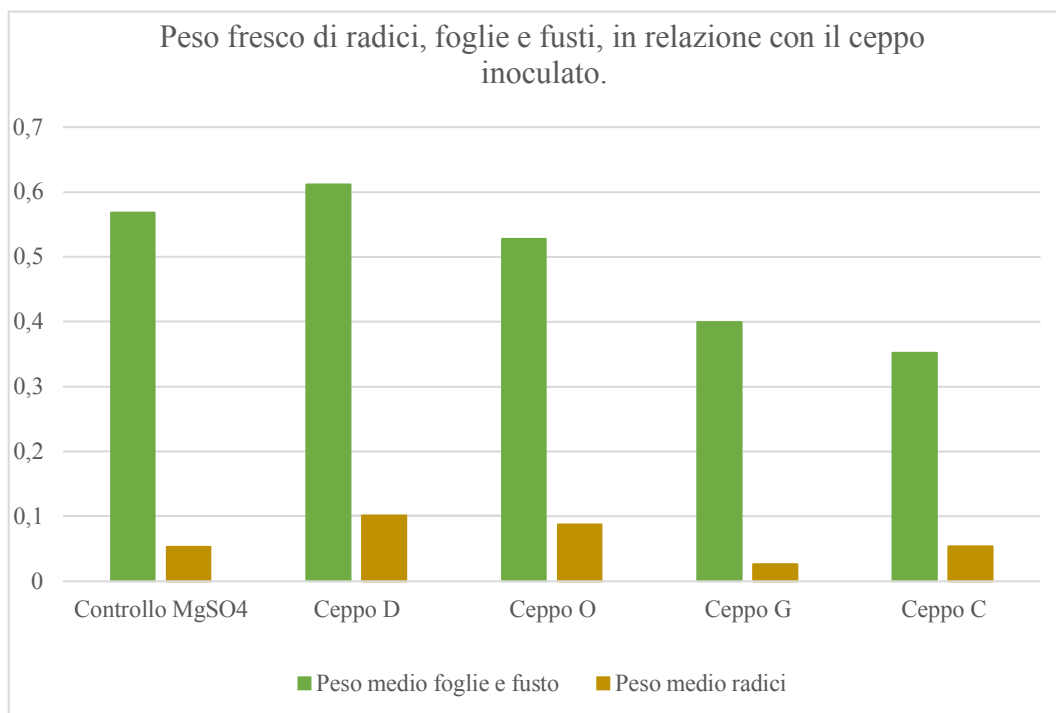


Figura 4: Il grafico mostra il peso fresco medio di radici, foglie e fusti per diversi gruppi di trattamento (Controllo MgSO4 e ceppi batterici D, O, G e C). I dati indicano il contributo relativo delle radici rispetto alla biomassa totale di foglie e fusti.

Nel gruppo di controllo (MgSO₄), si osserva un peso medio elevato per le foglie e i fusti, a indicare una buona crescita della parte aerea, mentre il peso medio delle radici è il più basso tra tutti i gruppi. Questo suggerisce che, in assenza di inoculo batterico, le piante favoriscono lo sviluppo della parte aerea a scapito di quello radicale. Le talee inoculate con il ceppo D presentano la crescita migliore tra tutti i gruppi. Questo trattamento ha prodotto il peso fresco più elevato sia per le foglie e i fusti sia per le radici. L'efficacia del ceppo D evidenzia il suo potenziale nel migliorare la biomassa complessiva, rendendolo un trattamento particolarmente promettente. Il ceppo O ha mostrato risultati intermedi, con un peso fresco medio inferiore rispetto al controllo e al ceppo D, ma superiore a quello dei ceppi G e C. Il peso delle radici è anch'esso intermedio, suggerendo un effetto moderato dell'inoculo sulla crescita vegetativa. I ceppi G e C, invece, hanno evidenziato una crescita limitata. Entrambi i ceppi hanno registrato i pesi medi più bassi sia per le foglie e i fusti sia per le radici, suggerendo che il loro impatto sulla biomassa vegetativa è stato minimo. Il ceppo G si distingue leggermente rispetto al ceppo C per valori marginalmente migliori, ma entrambi rimangono significativamente inferiori rispetto agli altri trattamenti.

Lunghezza media radici delle talee non dedicate all'isolamento (cm)				
Controllo MgSO4	Ceppo D	Ceppo O	Ceppo G	Ceppo C
1,0434	(isolamento)	1,723	0,354	(isolamento)
(isolamento)	1,924	0,651	0	0
0,977	0,881	0,582	0	0
0,588	1,465	(isolamento)	0,780	0,983
(isolamento)	1,252	(isolamento)	0,761	0
1,518	1,478	1,613	(isolamento)	0
0	0,805	0,730	(isolamento)	(isolamento)
0	(isolamento)	1,866	0,498	(isolamento)
(isolamento)	(isolamento)	(isolamento)	(isolamento)	1,781

Tabella 6: in tabella sono riportati i dati riguardanti la lunghezza media delle radici delle talee non dedicate all'isolamento in cm.

Il controllo ha mostrato una crescita moderata e uniforme delle radici, rappresentando un punto di riferimento per i confronti. Il Ceppo D si è dimostrato il più efficace, favorendo uno sviluppo radicale maggiore. Il ceppo O ha prodotto risultati variabili, con alcune talee che hanno sviluppato radici lunghe e altre che hanno mostrato una crescita ridotta. Al contrario per quanto il ceppo G si sono sviluppate talee, con radici corte o assenti nella maggior parte dei campioni. Il ceppo C ha mostrato risultati limitati, con radici più lunghe rispetto al controllo, sebbene i dati disponibili siano più limitati con quattro talee che non hanno prodotto radici. In conclusione, il ceppo D si distingue come il trattamento più promettente, mentre i ceppi G e C sembrano avere un impatto trascurabile sulla crescita radicale.

4.4. Risultati dell'isolamento degli endofiti.

Condizione	Numero della pianta	Radicazione	Peso fresco parte aerea (g)	Peso media parte aerea (g)
Control, MgSO ₄	2	si	0,3974	0,3849
	5	si	0,4542	
	9	si	0,3031	
Strain O	Prova	si	0,5028	0,4088
	4	si	0,4430	
	5	no	0,2829	
	9	si	0,4063	
Strain D	1	si	0,2639	0,3689
	8	si	0,4275	
	9	si	0,4153	
Strain G	6	si	0,2724	0,2573
	7	si (poco)	0,3329	
	9	si (poco)	0,3600	
	Prova	si	0,0640	
Strain C	7	no	0,1833	0,3915
	8	si	0,5250	
	Prova	si	0,4662	
	1	no	0,3974	

Tabella 7: a tabella riportata contiene i dati relativi alla valutazione del peso delle parti aeree di piante trattate con diverse condizioni sperimentali, tra cui un controllo (MgSO₄) e differenti ceppi batterici, O, D, G, C. Ogni condizione include informazioni

Nel caso del controllo (MgSO₄), tutte le piante hanno radicato, registrando un peso medio di 0,3849 g. Questo gruppo ha fornito un punto di riferimento per valutare l'efficacia dei ceppi batterici. Il ceppo O ha ottenuto il peso medio più alto, tre piante su quattro hanno radicato, mentre una non ha radicato. Il ceppo D ha mostrato un peso medio leggermente inferiore al controllo con tutte le piante che hanno radicato. Il ceppo G ha registrato un peso medio della parte aerea più basso rispetto al controllo suggerendo che il ceppo G non favorisce in modo consistente la crescita delle parti aeree. Inoltre, le tre talee trattate con il ceppo G hanno prodotto radici molto limitate. Infine il ceppo C ha mostrato un peso medio della parte aerea leggermente superiore al controllo con due piante che hanno radicato e una che non ha radicato.

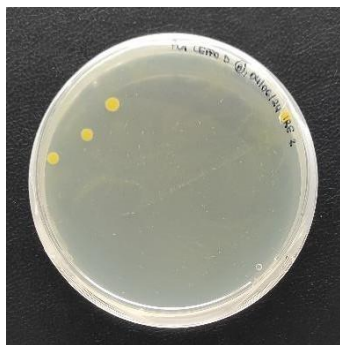


Figura 6: piastra appartenente al Ceppo D

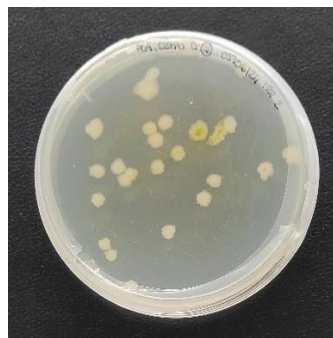


Figura 5: piastra contenente colonie del ceppo G

Dopo 30 giorni dall'inoculo, l'analisi delle sospensioni batteriche isolate dai tessuti delle talee di *Vitis vinifera* ha mostrato risultati variabili tra i ceppi. Il controllo trattato con $MgSO_4$, il ceppo C non hanno prodotto alcuna colonia, suggerendo l'assenza di contaminazioni e una mancata colonizzazione delle foglie e del fusto da parte del ceppo C che potrebbe essere presente in altri tessuti come nelle radici. Le piastre del ceppo O sono tutte contaminate pertanto non è possibile capire se è avvenuta la colonizzazione dei tessuti. I ceppi G, e D invece, hanno prodotto colonie, la cui forma varia da specie a specie, la presenza di colonie indica l'avvenuta colonizzazione dei tessuti vegetali quali le foglie e il fusto e la mancata contaminazione. In sintesi, il ceppo C non ha prodotto colonie pertanto è da ipotizzare un'assente colonizzazione della parte aerea, le piastre del ceppo O sono contaminate invece i ceppi G e D, che hanno sviluppato colonie, hanno colonizzato la parte aerea.

5. Conclusioni.

I risultati dello studio confermano il potenziale degli endofiti come strumento per migliorare la crescita e la resistenza delle piante di vite (*Vitis vinifera*). Tra i ceppi testati, il ceppo D ha dimostrato una capacità significativa di promuovere lo sviluppo vegetativo delle talee, con una maggiore produzione di foglie e nodi, oltre a un buon incremento del peso delle radici e dei fusti. La colonizzazione osservata per questo ceppo evidenzia un'avvenuta colonizzazione delle foglie e dei fusti. Il ceppo O ha mostrato un effetto moderato sulla crescita della parte aerea ma non è stato possibile definire l'efficienza di colonizzazione data l'assenza di piastre non contaminate, mentre i ceppi G e C si sono rivelati meno efficaci, con una crescita vegetativa più limitata e una colonizzazione della parte aerea assente nel caso del ceppo C, che invece potrebbe essere presente in altri tessuti, ad esempio nelle radici. Il ceppo G ha prodotto diverse colonie durante l'isolamento pertanto si può affermare che sia avvenuta la colonizzazione dei tessuti.

Questi risultati suggeriscono che non tutti i ceppi batterici sono ugualmente efficaci nell'influenzare positivamente la pianta. In particolare, il ceppo D emerge come il più promettente per stimolare la crescita vegetativa, seguito dal ceppo O. D'altra parte, i ceppi G e C necessitano di ulteriori indagini per comprendere meglio le loro potenzialità e limitazioni.

L'applicazione degli endofiti nella viticoltura rappresenta una strategia sostenibile per affrontare le sfide legate ai cambiamenti climatici e alla gestione degli stress abiotici, come la siccità. Studi precedenti hanno dimostrato che i batteri endofiti possono migliorare l'efficienza idrica, ridurre i danni da stress ossidativo e favorire lo sviluppo radicale, aumentando la capacità delle piante di accedere alle risorse limitate del suolo (Nigris et al., 2018; Sandhya et al., 2017). I meccanismi alla base di questi benefici includono la sintesi di fitormoni, la solubilizzazione dei nutrienti e la modulazione delle risposte allo stress (Pacifico et al., 2019; Rana et al., 2020). In conclusione, i ceppi D e O si configurano come opzioni valide per l'utilizzo in viticoltura, mentre ulteriori studi sono necessari per migliorare l'efficacia dei ceppi G e C. La scelta dei batteri e la definizione di protocolli standardizzati di inoculo rappresentano passaggi cruciali per il successo dell'applicazione degli endofiti. Un approccio integrato che combini la selezione di ceppi performanti con altre pratiche agronomiche potrebbe contribuire a una viticoltura sostenibile, in linea con le esigenze future del settore.

6. Bibliografia

- Baldan, E., Nigris, S., Romualdi, C., D'Alessandro, S., Clocchiatti, A., Zottini, M., Stevanato, P., Squartini, A., & Baldan, B. (2015). Beneficial Bacteria Isolated from Grapevine Inner Tissues Shape *Arabidopsis thaliana* Roots. *PLOS ONE*, *10*(10), e0140252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140252>
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
- Bhattacharyya, A., Mavrodi, O., Bhowmik, N., Weller, D., Thomashow, L., & Mavrodi, D. (2023). Bacterial biofilms as an essential component of rhizosphere plant-microbe interactions. In *Methods in Microbiology* (Vol. 53, pp. 3–48). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2023.05.006>
- Borghini, M., Pacifico, D., Crucitti, D., Squartini, A., Berger, M. M. J., Gamboni, M., Carimi, F., Lehad, A., Costa, A., Gallusci, P., Fernie, A. R., & Zottini, M. (2024). Smart selection of soil microbes for resilient and sustainable viticulture. *The Plant Journal*, *118*(5), 1258–1267. <https://doi.org/10.1111/tpj.16674>
- Ciais, Ph., Reichstein, M., Viovy, N., Granier, A., Ogée, J., Allard, V., Aubinet, M., Buchmann, N., Bernhofer, Chr., Carrara, A., Chevallier, F., De Noblet, N., Friend, A. D., Friedlingstein, P., Grünwald, T., Heinesch, B., Keronen, P., Knohl, A., Krinner, G., ... Valentini, R. (2005). Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature*, *437*(7058), 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature03972>
- Costa, J. M., Vaz, M., Escalona, J., Egipto, R., Lopes, C., Medrano, H., & Chaves, M. M. (2016). Modern viticulture in southern Europe: Vulnerabilities and strategies for adaptation to water scarcity. *Agricultural Water Management*, *164*, 5–18. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.08.021>
- Fabres, P. J., Collins, C., Cavagnaro, T. R., & Rodríguez López, C. M. (2017). A Concise Review on Multi-Omics Data Integration for Terroir Analysis in *Vitis vinifera*. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1065. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01065>
- Faist, H., Keller, A., Hentschel, U., & Deeken, R. (2016). Grapevine (*Vitis vinifera*) Crown Galls Host Distinct Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(18), 5542–5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.01131-16>
- Gambetta, G. A., Herrera, J. C., Dayer, S., Feng, Q., Hochberg, U., & Castellarin, S. D. (2020). The physiology of drought stress in grapevine: Towards an integrative definition of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *71*(16), 4658–4676. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa245>
- Hamaoka, K., Aoki, Y., Takahashi, S., Enoki, S., Yamamoto, K., Tanaka, K., & Suzuki, S. (2022). Diversity of endophytic bacterial microbiota in grapevine shoot

xylems varies depending on wine grape-growing region, cultivar, and shoot growth stage. *Scientific Reports*, *12*(1), 15772. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20221-8>

Hanif, M. S., Tayyab, M., Baillo, E. H., Islam, M. M., Islam, W., & Li, X. (2024). Plant microbiome technology for sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1500260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1500260>

Jaleel, Cheruth Abdul, Somasundaram, Ramamurthy, Manivannan, Paramasivam, Wahid, Abdul, Farooq, Muhammad, Al-Juburi, Hameed Jasim, Somasundaram, Ramamurthy, & Panneerselvam, Rajaram. (2009). Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology*, *11*(1), 100–105.

Lim, C., Baek, W., Jung, J., Kim, J.-H., & Lee, S. (2015). Function of ABA in Stomatal Defense against Biotic and Drought Stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(7), 15251–15270. <https://doi.org/10.3390/ijms160715251>

Marusig, D., & Tombesi, S. (2020). Abscisic Acid Mediates Drought and Salt Stress Responses in *Vitis vinifera*—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8648. <https://doi.org/10.3390/ijms21228648>

Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>

Mengesha, B., Mekbib, F., & Abraha, E. (2016). <i>In Vitro</i> Screening of Cactus [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] Genotypes for Drought Tolerance. *American Journal of Plant Sciences*, *07*(13), 1741–1758. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.713163>

Muhamad Insanu, Hana Karimah, Hegar Pramastya, & Irda Fidrianny. (2021). Phytochemical Compounds and Pharmacological Activities of *Vitis vinifera* L.: An Updated Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *11*(6), 13829–13849. <https://doi.org/10.33263/BRIAC115.1382913849>

Nigris, S., Baldan, E., Tondello, A., Zanella, F., Vitulo, N., Favaro, G., Guidolin, V., Bordin, N., Telatin, A., Barizza, E., Marcato, S., Zottini, M., Squartini, A., Valle, G., & Baldan, B. (2018). Biocontrol traits of *Bacillus licheniformis* GL174, a culturable endophyte of *Vitis vinifera* cv. Glera. *BMC Microbiology*, *18*(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1306-5>

Olesen, J. E., Trnka, M., Kersebaum, K. C., Skjelvåg, A. O., Seguin, B., Peltonen-Sainio, P., Rossi, F., Kozyra, J., & Micale, F. (2011). Impacts and adaptation of European crop production systems to climate change. *European Journal of Agronomy*, *34*(2), 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2010.11.003>

Pacifico, D., Squartini, A., Crucitti, D., Barizza, E., Lo Schiavo, F., Muresu, R., Carimi, F., & Zottini, M. (2019). The Role of the Endophytic Microbiome in the

Grapevine Response to Environmental Triggers. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1256. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01256>

Palliotti, A., Tombesi, S., Frioni, T., Silvestroni, O., Lanari, V., D'Onofrio, C., Matarese, F., Bellincontro, A., & Poni, S. (2015). Physiological parameters and protective energy dissipation mechanisms expressed in the leaves of two *Vitis vinifera* L. genotypes under multiple summer stresses. *Journal of Plant Physiology*, *185*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.007>

Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A. N., Yadav, N., Dhaliwal, H. S., & Saxena, A. K. (2020). Endophytic microbes: Biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie van Leeuwenhoek*, *113*(8), 1075–1107. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y>

Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti Cei, F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology*, *17*(2), 316–331. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439>

Sandhya, V., Shrivastava, M., Ali, Sk. Z., & Sai Shiva Krishna Prasad, V. (2017). Endophytes from maize with plant growth promotion and biocontrol activity under drought stress. *Russian Agricultural Sciences*, *43*(1), 22–34. <https://doi.org/10.3103/S1068367417010165>

Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., & Smith, D. L. (2021). PGPR in Agriculture: A Sustainable Approach to Increasing Climate Change Resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *5*, 667546. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>

Shumilina, J. S., Kuznetsova, A. V., Frolov, A. A., & Grishina, T. V. (2018). Drought as a Form of Abiotic Stress and Physiological Markers of Drought Stress. *JOURNAL OF STRESS PHYSIOLOGY & BIOCHEMISTRY*, *14*(4), 05–15.

Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Soleymani, A. (2024). The Roles of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Based Biostimulants for Agricultural Production Systems. *Plants*, *13*(5), 613. <https://doi.org/10.3390/plants13050613>

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome interactions: From community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(11), 607–621. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>

Zecca, G., De Mattia, F., Lovicu, G., Labra, M., Sala, F., & Grassi, F. (2010). Wild grapevine: *Silvestris*, hybrids or cultivars that escaped from vineyards? Molecular evidence in Sardinia. *Plant Biology*, *12*(3), 558–562. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00226.x>

