

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti  
Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE)**

**DOTTORATO DI RICERCA IN VITICOLTURA, ENOLOGIA E  
MARKETING DELLE IMPRESE VITIVINICOLE  
CICLO XXV**

# **Ricerca di nuovi indici molecolari e microbiologici dello stato nutrizionale della vite**

**Coordinatore: Ch.mo Prof.ssa Viviana Corich  
Supervisore: Ch.mo Prof. Giuseppe Concheri**

**Co-supervisore: Dott. Piergiorgio Stevanato  
Co-supervisore: Dott.ssa Francesca Ragazzi**

**Dottorando: Dott. Marco Bertaglia**



## INDICE

	Pag.
<b>RIASSUNTO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>1 INTRODUZIONE</b>	5
1.1 Premessa	5
1.2 Origini e storia della viticoltura vicentina	5
1.3 La zona D.O.C. Gambellara	12
1.4 Il vitigno "Garganega"	18
1.5 Il suolo e la nutrizione della vite	21
1.6 Le comunità microbiche del suolo	27
1.7 Fertilità biologica del suolo	29
1.8 Estrazione di DNA da suolo: approccio diretto e indiretto	30
1.9 Purificazione di DNA da suolo	34
1.10 Limiti delle tecniche tradizionali di analisi di comunità microbiche del suolo	37
1.11 Metodi di analisi molecolare per lo studio dei microrganismi del suolo	39
1.12 La diagnostica fogliare	42
1.13 Aspetti molecolari della nutrizione della vite	43
<b>2 SCOPO DEL LAVORO</b>	46
<b>3 MATERIALI E METODI</b>	47
3.1 Campionamento del suolo	47
3.2 Analisi fisico-chimiche del suolo	49
3.3 Analisi microbiche del suolo	65
3.3.1 Analisi biodegradativa sostanza organica	65
3.3.2 Messa a punto di un metodo automatizzato di estrazione di DNA da suolo	69
3.3.3 Analisi della biodiversità microbica (analisi ARISA)	78
3.4 Analisi fogliari	80
3.4.1 Diagnostica fogliare	80
3.4.2 Analisi di espressione genica	81
3.5 Analisi statistica dei dati	87
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	88
4.1 Analisi fisico-chimiche del suolo	88
4.2 Analisi microbiche del suolo	95

4.2.1	Analisi biodegradativa sostanza organica	95
4.2.2	Messa a punto di un metodo automatizzato di estrazione di DNA da suolo	99
4.2.3	Analisi della biodiversità microbica (analisi ARISA)	114
<b>4.3</b>	<b>Analisi fogliari</b>	117
4.3.1	Diagnostica fogliare	117
4.3.2	Analisi di espressione genica	120
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	123
<b>6</b>	<b>APPENDICE</b>	124
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	129

## RIASSUNTO

Lo studio della relazione suolo-pianta è un presupposto fondamentale per il controllo vegeto-produttivo del vigneto. In siti vitati della zona D.O.C. di Gambellara, ci si è proposti di studiare la relazione fra la produttività, le principali caratteristiche fisico-chimiche del suolo e alcuni indici innovativi per la diagnosi dello stato nutrizionale della vite quali la capacità biodegradativa della sostanza organica valutata mediante la degradazione di fili di natura vegetale e animale inseriti nel suolo e la valutazione dell'espressione di geni che potrebbero essere coinvolti nei meccanismi di difesa della vite dagli stress abiotici. Ampie e significative differenze ( $p < 0,05$ ) sono state riscontrate fra i parametri di fertilità fisico-chimica esaminati. I vigneti caratterizzati da maggiore produttività sono quelli che evidenziano valori di pH neutro, buona dotazione di sostanza organica e un adeguato rapporto C/N. Questi suoli presentano, inoltre, elevata capacità biodegradativa della sostanza organica determinata in base alla degradazione dei fili immessi nel suolo. L'analisi ARISA (Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), eseguita su campioni di DNA estratto da suolo in maniera automatizzata tramite la messa a punto di un nuovo protocollo, ha evidenziato che i siti Pio Paulsen e Pio Carenza, caratterizzati da bassa attività biodegradativa della sostanza organica, hanno una ridotta similarità genetica rispetto ai siti Chiarafontana e Branco caratterizzati viceversa da pronunciata attività biodegradativa. Inoltre, il numero di picchi ARISA, indice della numerosità delle specie batteriche presenti nel suolo, è risultato statisticamente inferiore ( $p < 0,05$ ) nei siti Pio Paulsen e Pio Carenza rispetto ai siti Chiarafontana e Branco.

Nelle piante del sito Campilonghi che è caratterizzato da pH acido, scarsa dotazione di sostanza organica, basso rapporto C/N, limitata

attività degradativa dei fili vegetali e da basso contenuto fogliare di azoto e zolfo è stata riscontrata la sovra-espressione, rispetto al sito di controllo Pio Paulsen, dei geni *WRKY*, *SuSy*, *PAL* e *STS1*. In conclusione, la capacità degradativa dei fili e la valutazione dell'espressione dei suddetti geni sembrano essere dei validi indicatori della fertilità del suolo e dello stato nutrizionale della vite.

**Parole chiave:** suolo, vite, stress nutrizionale, sostanza organica, espressione genica

## ABSTRACT

The study of soil-plant relationships is a prerequisite for controlling production of the vineyard. In vineyard sites of Gambellara, we studied the relationship between productivity, the main physico-chemical properties of soils and some innovative indices for the diagnosis of the nutritional status of the grape as i) the biodegradation capacity of organic matter evaluated by means of degradation of filaments of vegetal and animal origin and ii) the expression of genes that could be involved in defence mechanisms of grape to abiotic stress. Large and significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed for physical and chemical fertility parameters evaluated. The vineyards characterized by high productivity are those showing a neutral pH, good supply of organic matter and adequate C/N ratio. These soils also showed high biodegradation of organic matter determined through the soil filaments degradation. The ARISA analysis (Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), carried out on DNA samples isolated through an automatic procedure, showed that sites Pio Paulsen and Pio Carenza, characterized by low biodegradation capacity of organic matter, have a reduced genetic similarity compared to sites Chiarafontana and Branco viceversa characterized by high biodegradation capacity. Furthermore, the number of ARISA peaks, index of the number of soil bacterial species, was statistically lower ( $p < 0.05$ ) in sites Pio Paulsen and Pio Carenza with respect to sites Chiarafontana and Branco. Plants of Campilonghi's vineyard which is characterized by acid pH, scarce organic matter content, low C/N ratio, limited degradation capacity of filaments and low leaves content of nitrogen and sulphur showed, with respect plants of Pio Paulsen involved as control, up-regulation of *WRKY*, *SuSy*, *PAL* and *STS1* genes. In conclusion, the degradative capacity of filaments and the assays of expression of above

genes seem to be valid indicators of soil fertility and grape nutritional status.

**Key words:** soil, grape, nutritional stress, organic matter, genetic expression

# **1 INTRODUZIONE**

## **1.1 Premessa**

La crisi economica mondiale, originata dal settore finanziario, si è estesa a numerosi comparti compreso quello vitivinicolo. Il settore del vino italiano è caratterizzato da un consumo pro-capite in netta flessione mentre aumenta la competizione da parte dei nuovi Paesi esteri. Inoltre, il consumatore ha sposato la filosofia del “bere poco ma meglio” e conseguentemente il consumo di vino è diminuito. Pertanto, gli obiettivi da porsi sono quelli di ridurre i costi di produzione, puntare sulla qualità e tipicità delle produzioni offrendo vini a prezzi concorrenziali. Questi obiettivi si possono raggiungere aumentando la conoscenza delle complesse relazioni che esistono tra suolo e pianta. Si potranno così individuare gli strumenti che meglio possono essere utilizzati per massimizzare la qualità delle uve e quindi dei vini. Ciò permetterà anche di farli conoscere in tutta Italia e possibilmente anche nel mondo valorizzando il territorio di provenienza e il paesaggio.

## **1.2 Origini e storia della viticoltura vicentina**

La viticoltura in provincia di Vicenza ha una tradizione molto antica confermata da reperti di alcune vitacee fossili, classificate nel genere *Ampelophillum*, che sono stati rinvenuti nella seconda metà del secolo scorso, sul confine orientale (Massolongo, 1859). L'origine delle ampelidacee risale, come attestano alcuni fossili, all'era Terziaria dell'Eocene medio. A quell'epoca, mentre la pianura Padana era sommersa dalle acque e mentre sui monti Lessini il fenomeno vulcanico era ancora in piena attività, le piante appartenenti alla famiglia delle

Vitacee erano già esistenti. Altre vitacee dello stesso periodo e rinvenute nella zona di Salcedo, sono state classificate fra i *Cissus* nelle specie *paroliniana* e *primavera*. Il rinvenimento degli *Ampelophillum* e dei *Cissus* è quindi avvenuta nella stessa zona dove ancora oggi prospera la coltivazione della *Vitis vinifera*. E' anche probabile che da alcuni di questi *Ampelophillum*, dopo la scomparsa durante il periodo delle glaciazioni, siano derivate le viti spontanee e selvatiche e da queste, la *Vitis vinifera*. La *Vitis silvestris* allo stato selvatico, o spontanea, era possibile ritrovarla nei boschi montani e collinari vicentini fino a qualche decennio fa. Si ritiene che fin dai tempi preistorici sia incominciata, anche in queste zone, una graduale introduzione di vitigni da altri paesi del bacino del Mediterraneo in modo particolare dall'Asia Minore, proveniente dalla Mesopotamia. I vinaccioli della vite furono reperiti, fin dal secolo scorso, anche nei resti delle palafitte del lago di Fimon risalenti all'età del bronzo (Buschan, 1895, Scienza *et al.*, 1998).

#### *L'evoluzione dal periodo romano al XIX secolo*

Durante il periodo romano il vino prodotto nel vicentino era chiamato "retico" in quanto si produceva nell'ampia zona Retica, che comprendeva tutta la fascia pedemontana che andava da Vicenza a Como. La viticoltura era a quel tempo fiorente e ben diffusa in tutta la zona collinare vicentina. Un centro enologico doveva far capo a Montebello Vicentino, nell'attuale zona del Gambellara, perché in quella zona, nel 1910, è stata rinvenuta una grande villa romana del I o II secolo d.C. nella quale sono stati individuati un'ampia tinaia e numerosissimi vinaccioli ancora ben conservati. Alla fine del VI secolo d.C. il settentrione italiano, compreso il territorio vicentino, fu invaso dai Longobardi. Per questo popolo, l'orto era il supporto primario per

l'alimentazione e qui si trovava anche la vite tanto che il vino sostituì la cervogia, l'antenata della birra. L'editto di Rotari del 643 ha sancito il rapporto tra i Longobardi e la terra conquistata; la viticoltura doveva avere una parte importantissima nell'economia di questo popolo, poiché ben cinque articoli dell'Editto riguardano la vite. In essi venivano definite le multe che dovevano pagare chi tagliava le viti, chi spezzava tralci o frasche, chi toglieva un palo oppure un sostegno e per ultimo chi toglieva più di tre grappoli (Calò et al., 1996). In seguito, la diffusione del monachesimo benedettino, con le sue evolute aziende agricole, favorì la coltivazione della vite.

I conflitti tra Papato e Longobardi portò, nel 774, sulla scena i Franchi e Carlo Magno il quale, intorno all'anno 800, emanò il capitulare "De villis", ordinanza che elencava i vegetali che dovevano essere piantati e coltivati nei domini reali. In esso ben sei articoli riguardavano la vite, la vendemmia e la produzione del vino (Lovo e Onorato, 1998).

La fine del IX secolo è caratterizzato dalle invasioni degli Ungari che distrussero il monastero dei S.S Felice e Fortunato e ne avevano disperso i monaci ma nel 983 il Vescovo di Vicenza fece loro restituire quanto possedevano permettendogli così di impegnarsi nella bonifica dei terreni e nell'impianto dei vigneti. Il vino in quei secoli era importante non solo per la sua funzione religiosa, ma anche per il consumo degli stessi monaci. Documenti medioevali parlano di un consumo pro capite di oltre due litri al giorno. Si deve, quindi, alla presenza dei monaci Benedettini la sopravvivenza ed il primo sviluppo della viticoltura in questi territori.

Nel vicentino i documenti medioevali che trattavano di agricoltura, segnalavano spesso la frase "terra cum vinei" cioè l'appezzamento di terra coltivato interamente a vigneto. In alcuni contratti d'affitto si precisava che le viti si dovevano coltivare "ad jugum" cioè sostenute da bastoni o canne. La vite in collina era generalmente coltivata "bassa",

mentre in pianura era coltivata “alta” appoggiata a sostegni vivi o morti. Fra i vitigni utilizzati alcuni documenti segnalano anche il “Garganego”. Con l’anno mille iniziò una lenta decadenza dell’organizzazione benedettina; vi fu un risveglio borghese ed un progressivo passaggio di proprietà dai Benedettini alle famiglie emergenti feudali, nobili e al clero. Un avvenimento viticolo importante per la città di Vicenza accadde nel 1250 quando su iniziativa della podesteria cittadina, il Monte Berico venne “tutto vitato” (Botrè, 1956). In questo secolo si accentuò l’incremento della coltivazione della vite, che spesso veniva imposta dai proprietari nei contratti d’affitto. La legislazione degli Statuti Cittadini del 1264 e del 1311, regolava anche le possibili acquisizioni dei vigneti, che i maggiori proprietari potevano effettuare per ingrandire le loro proprietà (Maroso e Varanini, 1984). Di notevole interesse vitivinicolo sono gli Statuti di Bassano del 1259 e del 1295 che costituiscono il Codice “Vineale” o “Vignale” studiato dal Chiuppani (Calò et al., 1996).

Questi statuti costituiscono una chiara testimonianza della viticoltura nel territorio bassanese, dell’importanza che aveva nel XIII secolo e per l’epoca in cui furono redatti possono essere considerati “disciplinari di produzione”. Le contingenze belliche del XIV secolo portarono gravi danni alla coltivazione della vite. In qualche caso, si arrivava al deliberato danneggiamento delle coltivazioni poiché era da questa risorsa che le popolazioni locali traevano il maggior sostegno economico (Piacentino, 1930).

Nei primi anni del Quattrocento, la Serenissima Repubblica di Venezia è subentrata nel territorio vicentino alla dominazione scaligera e nel successivo codice bassanese, del 1444, viene confermato il divieto di vendemmiare prima della data fissata dal Consiglio e di far vino senza la licenza di quest’ultimo. Negli ultimi statuti comunali di Santorso, del 1491, si stabilirono le multe e le pene per coloro che causavano danni alle viti: chi tagliava una pianta di vite era condannato al pagamento di

una multa di 3 lire (Mantese, 1982). L'abbondanza di vino nella città di Vicenza durante il XVI secolo, richiamò l'attenzione delle autorità cittadine le quali vietavano di mettere nel vino il seme dell'erba ruchetta (*Eruca sativa*), che aveva proprietà aromatizzanti e conservanti (Lando, 1553).

Il Cinquecento è un secolo importante nella viticoltura e nell'enologia vicentina e da più autori viene segnalata la crescente importanza dei "broli", nelle signorili dimore di campagna, nei quali la vite trovava una coltivazione specializzata. Nel 1665 Vicenza si dota di un Estimo e così si può constatare che la coltivazione della vite si estendeva più in pianura che in collina e ciò per l'evidente maggiore facilità di condurre i lavori. Alla fine del '600 e nella prima metà del '700, la viticoltura continuava ad espandersi soprattutto in pianura, ma non sempre in modo razionale ed ordinato; le "pianità", cioè filari di viti appoggiate ad alberi tra cui l'olmo, il gelso, il ciliegio, spesso si integravano con i seminativi e si diffondeva il classico ordinamento produttivo veneto: cereali, mais, viti. In collina il paesaggio agrario era dominato da boschi e il processo di bonifica e impianto sarà più lento e legato al duro lavoro manuale. In questo periodo la viticoltura andava assumendo un ruolo importante e si cominciava, anche se lentamente, a distinguere le varietà di viti ed i relativi vini.

Con la caduta della Serenissima, sul finire del '700, la situazione della campagna veneta rivelò uno stato di arretratezza tecnica che si rifletteva in modo evidente anche nel settore vitivinicolo. La nobiltà veneziana si era interessata alle campagne come un bene rifugio per salvaguardare gli ingenti capitali con lo scopo di estendere i possedimenti senza particolari attenzioni al migliorare i sistemi di coltivazione. Inoltre, le classi economicamente più solide, si guardavano bene dall'eseguire lavori di miglorie e bonifica, evidenziando l'atteggiamento negativo di una "possidenza pigra" (Berengo, 1963).

Dalla fine del '700 e in tutta la prima metà dell'Ottocento, l'agricoltura fu molto trascurata: i maggiori possedimenti erano nelle mani dei nobili veneti e dei corpi morali religiosi.

### *Dal XIX secolo ai giorni nostri*

Le aziende vitivinicole vicentine nel 1851 erano trentanove. L'esportazione dei vini era molto ridotta: tra il 1871 ed il 1874 la provincia di Vicenza esportava in botti, per anno, da 3 a 672 ettolitri (l'intera nazione esportava 259.000 hl). L'esportazione dei vini in bottiglia era solo di 6 hl (in tutto il paese 12.373 ettolitri). I prezzi dei vini erano, per l'epoca, abbastanza sostenuti e avevano raggiunto le 40-60 lire per ettolitro. Verso la fine dell'Ottocento, la viticoltura vicentina aveva già subito i danni provocati dall'oidio e si accingeva a sopportare quelli più gravi della peronospora con una produzione di vino dalla qualità scadente. I danni furono gravissimi anche perché i viticoltori non erano sufficientemente preparati ad adottare razionali sistemi di lotta. La mancata produzione costrinse i commercianti ad importare vino pugliese e i viticoltori iniziarono la coltivazione di viti resistenti alle malattie quali il Clinton, l'Isabella ed altre varietà ottenute da ibridazioni con specie d'origine americana (Vianello e Carpenè, 1874).

Agli inizi del XX secolo la provincia di Vicenza aveva raggiunto un nuovo aspetto viticolo. La vite era diffusa già in coltura specializzata e occupava 1.500 ettari, ma gran parte della produzione, pari a 900.000 quintali, era ottenuta da coltura promiscua diffusa su 98.000 ettari dove erano coltivati vitigni autoctoni ma anche Clinton ed Isabella (Botrè, 1956). Nel Veneto, in base agli "Elenchi dei Comuni fillosserati" che il Ministero per l'Agricoltura pubblicava alla fine di ogni anno, la prima provincia ad essere colpita fu Treviso nel 1900, nel 1905 si estese a Venezia, nel 1909 a Verona e nel 1914 a Vicenza.

Nel 1914 il comune di Rossano Veneto venne dichiarato fillosserato, ma già l'infestazione era presente a Gambellara ed a Breganze e andava rapidamente estendendosi, tanto che nel 1929 tutta la provincia di Vicenza venne dichiarata "fillosserata". La produzione scese rapidamente e nel 1929 era ridotta a circa la metà di quella ottenuta nel 1910. L'opera di ricostruzione su piede americano non subì ritardi: infatti già nel 1925 era stato predisposto, sotto la guida della stazione sperimentale di Conegliano, un vigneto sperimentale e nel 1930 venne costituito un vivaio per la produzione di viti innestate. Un forte impulso all'enologia vicentina venne dato dalla costituzione di centri di conferimento delle uve e delle cantine sociali. A Gambellara venne istituito nel 1934 un primo enopolio.

Nel dopoguerra, agli inizi degli anni '50, furono costituite diverse cantine sociali. Nel 1950 a Breganze si inaugurò la Cantina Sociale di Breganze seguita nel 1951 da quella della Riviera Berica a Barbarano e quella di Lonigo. Nel 1954 fu costituita quella di Gambellara e nel 1955 la Cantina dei Colli Berici di Montecchio Maggiore. Da ultima nel 1961 iniziò ad operare la Cantina Sociale Val Leogra di Malo. Durante questi anni, sia i viticoltori sia i tecnici presero coscienza del fatto che qualcosa doveva essere rivisto se si voleva migliorare la produzione, pertanto ricorsero a programmi di riordino ampelografico con l'introduzione di vitigni di pregio e a epoche di maturazione diverse, onde poter programmare una vendemmia ed una vinificazione più razionali.

### 1.3 La zona D.O.C. di Gambellara

#### *Storia e descrizione*

Nel contesto viticolo della provincia di Vicenza, si inserisce la zona D.O.C. Gambellara. Con questo nome, secondo gli studiosi di toponomastica, era anticamente indicato un ampio territorio di colle e pianura, al limite delle province di Vicenza e Verona. Nell'etimo si è voluto scoprire il significato di "terra della vite", risalendo alla voce dialettale "*ambeli*" (da cui "ambelaria", "gambelaria" e poi "Gambellara") che deriva dal greco "*ampelos*" cioè vite. C'è chi fa discendere invece la parola da un "Campus Alarici", chi da una "Gens Camillaria", diffusa nel ravennate dove si trova un'altra Gambellara di cui forse un ramo emigrò in queste zone durante il periodo bizantino; altri, con ironia, fanno derivare Gambellara dagli effetti del vino che manda "gambe all'aria" chi ne beve più del necessario (Fossà, 1975).

La zona di produzione del vino tipico di Gambellara comprende territori di pianura e collina dei comuni di Gambellara, Montebello, Montorso e Zermeghedo con una superficie totale di 2.500 ettari, di cui 1.300 in collina e il rimanente in pianura o fondovalle. Le quote più alte della zona sono raggiunte nella parte nord nelle località Monti Alti (381 m s.l.m.), il Maso (358 m s.l.m.) mentre tutte le altre colline raggiungono altezze comprese tra 150 m e 240 m s.l.m.. Le quote più basse si hanno nella parte piana ed il limite minimo è toccato in prossimità della Strada Statale a Torri di Confine con 36 m s.l.m..

I rilievi collinari sono caratterizzati da pendici con forti pendenze che discendono in valli scoscese ed incassate per effetto dell'erosione dei piccoli corsi d'acqua che vi scorrono. Dove le pendici terminano con la pianura troviamo accumuli di terreno trasportati dalle acque.

Verso la sommità, le colline si fanno più dolci diventando pianori ondulati più o meno larghi che consentono la coltivazione di specie arboree su appezzamenti di terreno sufficientemente pianeggianti. Sui declivi esistono numerose sorgenti perenni che vengono sfruttate per l'agricoltura e che alimentano i piccoli ruscelli.

### *Le colline di Gambellara*

I colli di Gambellara costituiscono le ultime propaggini meridionali dei Lessini e sono in gran parte formati da tufi basaltici neovulcanici del terziario. In mezzo a queste rocce vulcaniche esistono tre modeste isole di materiali sedimentari superficiali spugnose e brecciole basaltiche (Milani, 1974).

Nelle zone di contatto con le rocce sedimentarie calcaree, quelle vulcaniche aumentano notevolmente il proprio contenuto in carbonato di calcio per la presenza diffusa di detriti calcarei non metamorfizzati. I terreni di queste colline di origine autoctona, hanno il manto più superficiale costituito, nella maggior parte dei casi, da tufi basaltici che derivano da rocce facilmente disgregabili dagli agenti atmosferici (erosione dell'acqua, gelo, vento), dalla vegetazione e dall'uomo. Lungo la fascia pedemontana, dove si sono accumulati i detriti di falda, si trovano terreni piuttosto profondi e più maturi dei precedenti. Questi sono caratterizzati da una buona attività microbica con conseguente presenza di composti umici, assenti o quasi nei terreni di collina.

Nel complesso, in collina, troviamo terreni in collina di buona fertilità, sciolti ed inconsistenti nelle parti più alte e mediane, più compatti nelle zone medio-basse.

### *La pianura di Gambellara*

Essa comprende la zona che si estende dalla base delle colline fino alla Strada Statale n°11. Tale territorio è formato dalle alluvioni diluviali ed è solcato da strisce che si estendono lungo e a cavallo del torrente Chiampo costituite invece dalle alluvioni recenti e grossolane dello stesso.

La dorsale collinare si divide in tre creste minori che individuano due conche, quella di Gambellara e di Selva di Montebello dove si ritrovano depositi colluviali provenienti dai versanti collinari mentre, avvicinandosi al fiume Chiampo, si incontrano i suoi depositi fluviali.

Le alluvioni diluviali sono costituite dai depositi dei fiumi provenienti dal disgelo dei grandi ghiacciai delle diverse glaciazioni, ed hanno dato origine a terreni con una notevole attinenza con quelli derivati dalle rocce vulcaniche e calcaree della zona, in quanto, le stesse alluvioni provengono dal disfacimento e dall'erosione di rocce analoghe.

Questi terreni sono molto più antichi di quelli dei colli, la frazione argillosa è più accentuata, sono più equilibrati e con una buona dotazione naturale di sostanza organica. C'è quindi una notevole fertilità chimica ed organica con uno strato terroso notevolmente profondo e fresco. I terreni sono generalmente a reazione neutra o leggermente alcalini: essi permettono il raggiungimento di risultati notevoli in termini di quantità pur conservando elevate caratteristiche di qualità (Milani, 1974).

### *Il clima della D.O.C. Gambellara*

L'area viticola del comune di Gambellara mostra essenzialmente caratteri climatici riferibili a valori temperati caldi e appartenente ai climi mesotermi. La zona collinare gode di un clima più temperato di quello

della pianura circostante: gli stessi rilievi concorrono alla formazione di questo particolare clima con la loro azione di protezione contro le freddi correnti provenienti da nord-est.

Gli altri elementi che concorrono a questo clima diverso sono l'esposizione verso sud di gran parte dei territori collinari, l'apertura a mezzogiorno delle valli più ampie, la colorazione scura-brunastra delle rocce e dei terreni. Tutti questi elementi, nelle pendici collinari ben esposte, favoriscono durante l'inverno un buon assorbimento delle radiazioni solari; il calore restituito durante la notte mitiga l'atmosfera circostante evitando danni da freddo alle piante. Da un punto di vista idrico, in collina esistono numerose sorgenti che hanno una portata sensibile anche in tempo di scarsa piovosità.

Un'altra caratteristica della zona è data dall'abbondante portata in sospensione delle acque di materiale solido sia minuto che grossolano: in caso di piogge intense, per la forte pendenza dei terreni e la scarsa permeabilità delle rocce basaltiche, questi defluiscono su letti scoscesi fino allo sbocco delle valli (Fossà, 1975).

Le precipitazioni medie annuali si aggirano intorno agli 865 mm: i mesi più piovosi sono quelli primaverili in cui cade un terzo della pioggia totale annua. Anche nel mese di novembre le precipitazioni sono buone mentre sono scarse nei mesi invernali. In termini percentuali le precipitazioni sono ripartite per il 50% nei tre mesi primaverili, 25% nei mesi di luglio-agosto ed il restante 25% nel bimestre settembre-ottobre. Per quanto riguarda le temperature la media annuale è di 13,4 °C con valori di oltre i 20 °C nel periodo estivo e di valori inferiori ai 5 °C nei mesi invernali. Il mese più freddo è gennaio con temperature medie mensili di circa 2 °C e valori delle minime intorno ad una media di - 2 °C.

Le temperature minime raggiungono i massimi valori in luglio ed agosto con valori medi mensili attorno ai 17 °C. In questi due mesi estivi si

riscontrano le temperature massime più alte con valori che superano i 30 °C raggiungendo, in giornate molto calde, la soglia dei 40 °C.

### *La coltivazione della vite*

Numerose sono le specie arboree coltivate nella zona di Gambellara come il ciliegio, l'olivo e il castagno ma la vite predomina su tutte. Tra le varietà coltivate la più diffusa è la Garganega che rientra nella D.O.C. Gambellara e in quella dei Colli Berici, di cui costituisce il 90-95% dell'uvaggio.

La coltivazione della Garganega a Gambellara risale a molti secoli fa: è accertato che si coltivava dapprima accanto all'uva "schiava", poi rapidamente la Garganega prevalse e si diffuse su tutte le colline anche delle zone limitrofe della vallata veronese dell'Alpone e nelle zone di Selva, Montebello, Montorso (Fossà, 1975). Il parroco di Gambellara, il prof. Andrea Sandri in un articolo pubblicato nel "Berico" nel novembre 1858, fece una precisa descrizione delle forme d'allevamento adottate nella zona di Gambellara: "i vigneti si sono compartiti in filari distanti due metri e mezzo l'uno dall'altro e le viti binate sono sostenute da un palo secco alla distanza di un metro da un binario all'altro. Le viti all'altezza di un metro vengono avvinte ad una pertica longitudinale, per cui tutto il filare è strettamente legato insieme. I tralci destinati a dare frutti si traggono fuori dalla pergola e si fermano ad un piccolo palo in terra, gli altri detti di posta sono avvinghiati al palo longitudinale. Questa è l'ordinaria coltivazione, nella quale i filari non si fanno ombra l'un l'altro".

Considerata la natura dei terreni, dopo l'avvento della fillossera, un tempo era utilizzata una gamma di portainnesti più ampia di quanto non sia quella attuale e così sono praticamente scomparsi il 3309, il 101-14 e la *Rupestris metallica*. Il portainnesto più utilizzato è il 420A (80%

degli impianti; il Kober 5BB per la sua scarsa affinità con la Garganega dal 1960 al 1982 ha avuto un regresso). Attualmente vengono impiegati il 140 Ruggeri, il 1103 Paulsen e l'SO4 in quanto il 420A è poco adatto ai reimpianti (Scienza e Giulivo, 1983).

#### *Breve cenni sulla Casa Vinicola Zonin di Gambellara*

La *Casa Vinicola Zonin di Gambellara* nasce a Gambellara agli inizi dell'Ottocento (1821) in cui iniziò in un primo tempo l'attività di produzione e nei primi anni del '900 anche la fase di commercializzazione. A Gambellara la superficie viticola è di circa 40 ettari dove viene coltivata principalmente la Garganega, vitigno tipico impiegato per la produzione del Gambellara Classico, Recioto e Vin Santo di Gambellara. Nella seconda metà del '900 è stata attuata una politica di acquisizione di aziende in regioni particolarmente vocate per la viticoltura di qualità (Figura 1): la prima azienda acquistata è stata la tenuta Ca' Bolani nel 1970 nella zona D.O.C. Aquileia, segue in Toscana Castello d'Albola (Radda in Chianti), Rocca di Montemassi (Roccastrada) e la Fattoria Abbazia di Monte Oliveto (S. Gimignano), in Piemonte Castello del Poggio (Asti), in Lombardia la Tenuta Il Bosco (Zenevredo), il Feudo Principi di Butera in Sicilia acquistata nel 1997, la Masseria di Altamura in Puglia ed infine la tenuta negli USA, in Virginia, Barboursville Vineyards per un totale complessivo di quasi 2000 ettari di vigneto. La Casa Vinicola Zonin è ora la principale azienda vitivinicola privata d'Italia.



Figura 1. Aziende viticole Zonin presenti in Italia e negli USA.

## 1.4 Il vitigno “Garganega”

### *Origini e cenni storici*

E' il vitigno autoctono più importante dei Colli Berici. Di origine antichissima, si può ritenere che sia derivato da un'unica famiglia di vitigni bianchi (delle quali fanno parte anche i Trebbiani), probabilmente diffusa dagli Etruschi.

Secondo Gloria, citato dal Dalmasso, le *Garganeghe* erano coltivate nel padovano e nel veneziano nel XII secolo. Alcuni statuti vicentini della fine del '200 le riportano fra le varietà presenti sui "Berici".

Pier Dé Crescenzi (Trattato di Agricoltura, Accademia della Crusca, I, Milano, 1805), nel suo trattato, parla della *Garganica*, distinguendo quella "femina", molto produttiva, da quella "mascula" quasi sterile.

Pollini (1824) e Zantedeschi (1862), citati da Costacurta e Cancellier (1999), riportano, nei loro elenchi dei vitigni diffusi nel veronese, sia la *Garganega* che la *D'oro*, vitigni dall'accertata sinonimia.

Nello stesso periodo molti documenti testimoniano la presenza della *Garganega* anche in territorio vicentino, tra cui il Bollettino del Comizio Agrario di Vicenza del 1868, che nell'elenco delle uve esposte alla pubblica mostra del 21-25 settembre, riporta la *Garganega* e nel 1877, nel "Saggio di un'ampelografia universale", il Di Rovasenda annovera la *Garganega* fra le uve della provincia di Vicenza.

Cosmo (1949) ricorda la *Garganega Bianca*, e richiamandosi anche a quanto scritto dal Marzotto (1925), conclude che tutti i diversi tipi si possono ricondurre a due vitigni fondamentali e diversi: la *Garganega Comune* o *Garganega* con le sottovarietà *biforcuta*, *frastagliata*, *Rossa*, e la *Garganega grossa* che si può identificare con la *Dorona* di Venezia. E' da sottolineare che la *Garganega* figura tra i vitigni fondamentali che Dal masso et al. prima (1931) e Cosmo poi (1954) propongono per la ricostituzione della regione collinare dei Colli Berici.

La *Garganega* è iscritta al Registro Nazionale delle Varietà di Vite al n° 92 ed è raccomandata nelle province di Campobasso, Isernia, Mantova, Matera, Padova, Perugia, Potenza, Terni, Trieste, Verona e Vicenza. E' particolarmente diffusa nelle province di Verona, dove costituisce la base dei vini di Soave, e di Vicenza, in modo particolare nella zona di Gambellara.

Le principali caratteristiche ampelografiche e fenologiche sono:

*germoglio*: ad apice mediamente espanso, cotonoso, di colore verde-biancastro con bordi bronzati e foglioline spiegate di colore verde-biancastro;

*foglia adulta*: di media grandezza o grande, pentalobata, pentagonale leggermente allungata con denti pronunciati; lembo leggermente bollosa, pagina inferiore aracnoide; il seno peziolare è a V – U più o meno aperto;

*grappolo*: di grande dimensione, lungo 20-25 cm, di forma cilindrico-piramidale, alato, abbastanza spargolo;

*acino*: di media dimensione, sferoidale o leggermente schiacciato con buccia pruinosa, poco spessa, coriacea di colore giallo-dorato; polpa sciolta a sapore semplice;

*epoca di germogliamento*: media-tardiva (15-25 Aprile);

*epoca di fioritura*: media (1-5 Giugno);

*epoca di invaiatura*: media (25 Luglio-5 Agosto);

*epoca di maturazione*: media-tardiva (20-25 Settembre).

E' un vitigno vigoroso, fornisce produzioni abbondanti e costanti, esige forme d'allevamento espanse con potatura lunga, presenta buona resistenza alle malattie soprattutto alla botrite per cui l'uva si presta all'elaborazione di vini passiti.

I vini che si ottengono sono di colore giallo paglierino con delicato profumo fruttato, di medio corpo, giusta acidità, armonico e vellutato. E' di grande ricchezza aromatica con profumi semplici, floreali, e più complessi (erbe aromatiche e minerali).

## 1.5 Il suolo e la nutrizione della vite

Il termine “pedogenesi” significa letteralmente *formazione del suolo* e rappresenta un processo evolutivo molto complesso dove, a partire dalla roccia madre, si origina un suolo che viene utilizzato dalla vegetazione come supporto e fonte di sostanze nutritive. Il suolo è costituito da tre fasi:

- Fase solida: comprende le sostanze minerali, quelle organiche e gli organismi terricoli;
- Fase liquida: rappresentata dall’acqua presente nei macro e micropori in cui sono disciolti i sali minerali;
- Fase gassosa: rappresentata dall’aria che si trova negli interstizi del terreno non occupati dall’acqua, molto più ricca in CO<sub>2</sub> rispetto a quella atmosferica.

I principali fattori che concorrono al processo di formazione del suolo sono:

- Natura della roccia madre
- Clima
- Topografia
- Organismi viventi
- Tempo

Le principali proprietà fisiche del suolo sono:

- Tessitura: rappresenta la ripartizione dimensionale delle componenti della terra fine (diametro inferiore a 2 mm) ed è uno dei caratteri più stabili in quanto non varia con il tempo;
- Porosità: esprime il volume degli spazi vuoti del terreno come rapporto percentuale sul volume totale. Questa proprietà influenza direttamente la dinamica della fase liquida ed aeriforme del terreno e, indirettamente, la fertilità;

- **Struttura:** considera la disposizione spaziale delle particelle solide del terreno e le conseguenze che derivano da tutte le possibili combinazioni del loro stato d'aggregazione;
- **Tenacità:** è la conseguenza della forza che tende ad unire fra loro le particelle di terreno. Esprime quindi la resistenza che il terreno oppone alla penetrazione degli attrezzi da lavoro;
- **Adesività:** è la proprietà che hanno le particelle di terreno di aderire alle superfici degli organi lavoranti;
- **Coesione:** forza con cui le particelle di terreno sono legate tra loro e si oppongono al distacco;

Le caratteristiche chimiche principali, invece, sono le seguenti:

- **Reazione del suolo (pH):** la reazione del suolo, acida, neutra o alcalina, è espressa dal valore di pH, inteso in termini di attività chimica degli idrogenioni. La determinazione del pH è molto importante in quanto condiziona le proprietà fisiche, chimiche, biologiche e la disponibilità degli elementi nutritivi necessari alle piante;
- **Capacità di scambio cationico (C.S.C.):** è la quantità di ioni scambiabili, espressa in meq/100g di suolo, che uno scambiatore può trattenere per scambio ionico. Lo scambio ionico è il principale meccanismo con cui il suolo mette a disposizione e trattiene gli elementi.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  adsorbiti ai minerali argillosi vengono sostituiti da altri cationi al variare della composizione della soluzione circolante del terreno;
- **Grado di saturazione in basi (G.S.B.):** esprime la percentuale di basi scambiabili ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ ) sulla C.S.C;
- **Potere tampone:** capacità del suolo di opporsi alle variazioni di pH in seguito all'aggiunta di acidi o basi;
- **Calcare totale:** è la quantità di tutti i carbonati presenti nel terreno anche se il risultato d'analisi è espresso come % di  $\text{CaCO}_3$ . Esso è

formato da elementi grossolani e se abbondante inibisce l'assorbimento del Fe e del P rendendoli insolubili;

- Calcare attivo: è la frazione di carbonati potenzialmente presenti nella soluzione circolante. E' costituito da particelle calcaree fini e reattive che interagiscono con la fisiologia dell'apparato radicale. La conoscenza di questo valore è importante per la scelta di portainnesti tolleranti;
- Carbonio organico: il contenuto di carbonio organico nel suolo è in stretta relazione con quello della sostanza organica, anche se la composizione di quest'ultima presenta un elevato grado di variabilità (0-5%).
- Azoto totale ( $N_{tot}$ ): l'  $N_{tot}$  nel terreno si trova in diverse forme ma le piante assorbono la forma nitrica  $NO_3^-$ , molto mobile nel terreno (110cm/anno), e la forma ammoniacale  $NH_4^+$  che viene più adsorbita dai colloidi e scambiata da altri cationi come il potassio.
- Rapporto C/N: esprime la tendenza alla mineralizzazione della sostanza organica. In terreni ricchi di sostanza organica ben umificata il rapporto è compreso tra 8-12 mentre nei terreni biologicamente meno attivi e con lenta mineralizzazione il valore è maggiore di 15;
- Zolfo: nel terreno si trova in forma organica (amminoacidi, S-lipidi, vitamine), inorganica (pirite, gesso, calcopirite, anidrite), adsorbito ai colloidi del terreno e in soluzione. Viene assorbito come anione solfato  $SO_4^{2-}$  e la maggior velocità d'assorbimento è a pH 6-7. Lo zolfo, una volta assorbito, viene attivato, ridotto ed inglobato negli amminoacidi (metionina e cisteina) per formare le proteine.
- Fosforo: nel suolo è presente sotto forma di ortofosfato e lo si ritrova in diverse forme: organico (P-lipidi, zuccheri, acidi nucleici), inorganico (variscite, strengite, idrossiapatite, fluoarapatite), in soluzione (liberato ad opera di enzimi) e adsorbito ai colloidi. Viene

assorbito dalle piante come ione  $\text{HPO}_4^{2-}$  a pH acidi e nella forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  a pH basici.

- Potassio: è presente per il 90-98% nei reticoli cristallini dei minerali primari (feldspati, miche) e per l'1-10% nei minerali secondari (vermiculite, montmorillonite). Il potassio è un elemento fondamentale per la vite perché influisce sulle caratteristiche qualitative: eleva l'aroma ed il profumo, migliora il sapore e la serbevolezza, aumenta il titolo zuccherino, le vitamine B<sub>1</sub> e C ma diminuisce l'acidità.
- Calcio: lo si ritrova nelle rocce eruttive (feldspati e plagioclasti) ed in quelle sedimentarie (gesso, calcite, dolomite). All'aumentare dell'acidità aumenta la sua disponibilità ma viene anche perso rapidamente per dilavamento (200-300 Kg/ha/anno). L'eccesso di questo elemento comporta, sulla vite, un'anomalia classica: la clorosi ferrica.
- Magnesio: è contenuto nei minerali ferro-magnesiaci (biotite, olivina), in quelli argillosi (illite, clorite, vermiculite, montmorillonite) e sotto forma di  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$  (dolomite). Con il calcio favorisce il trasporto e l'accumulo dei prodotti di sintesi, attiva le fosfatasi, le ATP-asi e carbossilasi inoltre è l'atomo centrale della molecola di clorofilla (25% del Mg totale della pianta) e contribuisce al mantenimento del turgore cellulare. Importante il rapporto Mg/K che deve essere compreso tra 2 e 5.
- Ferro: si trova nei minerali ferro-magnesiaci (olivina, biotite, serpentino, augite), nei silicati, negli ossidi o carbonati (ematite, siderite, magnetite), nei minerali argillosi (illite) e sotto forma di idrossido  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Il ferro viene adsorbito da composti organici, i chelati, che lo mantengono in soluzione rendendolo disponibile per l'assorbimento da parte delle radici. La sua disponibilità dipende dal pH del terreno: all'aumentare del pH la disponibilità diminuisce di mille volte per unità di

pH per cui in terreni basici si manifesteranno i sintomi di carenza (ingiallimento internervale con le nervature che rimangono verdi).

- Manganese: si trova nei minerali ferro-magnesiaci ma soprattutto negli ossidi (manganite, braussite) e viene assorbito come  $Mn^{2+}$ . La sua disponibilità diminuisce all'aumentare del pH di cento volte per cui, come il ferro, ci sarà carenza a pH basici. E' indispensabile per la sintesi dei glucidi, di alcune vitamine, per la riduzione dei nitrati ad  $NH_3$  ed è coinvolto nella reazione di Hill. Contribuisce all'aumento delle produzioni (favorendo la fertilità delle gemme e l'allegagione), della resistenza al freddo (favorisce la lignificazione dei tralci), della densità del mosto (incrementa il fruttosio), anticipa la maturazione e riduce l'acidità.

- Zinco: è presente nei minerali ferro-magnesiaci (augite, biotite), nella zinchite, smithsonite e sfalerite. Viene assorbito come catione  $Zn^{2+}$  e si lega fortemente ai gruppi carbossilici presenti nella radice infatti il 90% dello zinco totale assorbito si trova legato alle pareti cellulari. Questo elemento è importante per la permeabilità cellulare, interviene nella respirazione, nel metabolismo degli zuccheri e delle proteine, stimola la sintesi di auxina attraverso la produzione di triptofano, catalizza l'alcol deidrogenasi e l'anidasi carbonica.

- Rame: è contenuto nei silicati, nei carbonati e nei solfati. Viene assorbito come catione  $Cu^{2+}$  ed è il nutriente più immobile nel terreno infatti il 98% del rame in soluzione si trova legato a composti organici. E' coinvolto in diverse attività enzimatiche come la Cu-Zn superossido-dismutasi, l'ascorbato ossidasi, la laccasi e fenolasi, è componente della plastocianina; infine è importante per il metabolismo delle proteine e dell'acido indolacetico.

- Boro: viene assorbito sotto forma di acido borico ( $H_3BO_3$ ) ed è un microelemento molto importante in quanto è un elemento strutturale di

pareti e membrane cellulari, aumenta la germinabilità del polline, è coinvolto nel trasporto dei glucidi, favorisce la sintesi di amminoacidi e proteine, entra nella sintesi dell'acido  $\beta$ -indolacetico.

- Molibdeno: viene assorbito dalle piante come anione molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) e può venire complessato a zuccheri o amminoacidi. Viene fortemente adsorbito ai colloidi a pH acidi per cui è più disponibile a pH basici. È importante per le piante superiori perché entra nella costituzione della nitrogenasi e della nitrato-riduttasi.
- Cloro: viene assorbito come anione cloruro  $\text{Cl}^-$  ed è un elemento molto mobile nella pianta. È importante in quanto accompagna il potassio per controbilanciare le cariche positive, si trova nella reazione di Hill, stimola l'ATP-asi del tonoplasto, è un forte competitore del nitrato ed agisce da osmotico per mantenere il turgore cellulare.
- Cobalto: è indispensabile per la sintesi della clorofilla, può aumentare il titolo zuccherino e ridurre l'acidità, equilibra la crescita vegetativa ed entra nella costituzione di diversi sistemi enzimatici.
- Cadmio: in piccole dosi favorisce la sintesi del fruttosio e della vitamina C inoltre stimola l'attività enzimatica.
- Cromo: in piccole dosi ha effetti positivi sul peso e sulla qualità della produzione, sul titolo zuccherino, sulla differenziazione delle gemme e nella fecondazione; inoltre fa parte di diversi sistemi enzimatici (catalasi, perossidasi, invertasi).
- Vanadio: aumenta il titolo zuccherino ed il peso degli acini, riduce l'acidità del mosto ed in piccole dosi interviene nel potenziale di ossido-riduzione.

## 1.6 Le comunità microbiche del suolo

Il suolo è considerato la matrice con la maggiore fonte di diversità genetica per unità di volume reperibile in natura. La fase solida del suolo si compone di particelle minerali quali sabbie, limo e argille che appartengono prevalentemente alla componente inorganica, rappresentante circa il 96-97% dell'intera fase. Il restante 3-4% interessa la componente organica, della quale una piccola frazione (circa il 5%) è costituita dalla biomassa, ovvero da organismi viventi. Questa frazione si distingue per la presenza di batteri, attinomiceti, funghi, microalghe, lieviti, protozoi e vermi artropodi. Si stima che un grammo di suolo possa contenere più di 1 miliardo di cellule di microrganismi e probabilmente migliaia di differenti specie (Knietsch et al., 2003). I microrganismi svolgono funzioni chiave nel suolo e per questo sono considerati degli indicatori della qualità della matrice che li contiene. Alcune di queste funzioni riguardano la formazione e il mantenimento della struttura del suolo, la regolazione del flusso idrico, la decomposizione del materiale organico attraverso processi biodegradativi e il controllo dei cicli biogeochimici, tutti dipendenti dall'attività microbica. Per quanto riguarda il controllo dei cicli, un ruolo fondamentale è svolto dai microrganismi che presiedono alla mobilizzazione degli elementi minerali come i batteri nitrificanti, che trasformano l'ammonio in nitrato, i batteri denitrificanti, che riducono il nitrato ad azoto gassoso e i batteri coinvolti nel ciclo del carbonio e nelle trasformazioni del fosforo. Il riciclo di questi elementi è indispensabile per renderli direttamente disponibili alla pianta e quindi per il mantenimento della fertilità del suolo. La struttura e la composizione della comunità microbica sono estremamente variabili nel tempo e dipendono da numerosi fattori: la composizione e la natura

chimico-fisica del terreno in termini di umidità, pH, temperatura e nutrienti presenti, la presenza di piante e il loro relativo stadio di crescita e stato di salute, le variazioni climatiche ed antropiche e infine dall'interazione tra le singole specie che costituiscono la stessa comunità (Garbeva et al., 2004). Tutti questi fattori selezionano i microrganismi più adatti, favorendo così lo sviluppo di alcune specie microbiche rispetto ad altre (Rovira, 1965). Un habitat particolarmente idoneo per la crescita e l'attività microbica è quella porzione di suolo a diretto contatto con l'apparato radicale, definita rizosfera. In questa regione si registra il più alto tasso di crescita microbica dovuta principalmente all'abbondanza di nutrienti derivanti dalle radici. Le radici infatti, rilasciano all'esterno grandi quantità di composti organici assimilabili dai microrganismi. Ne sono un esempio i lisati radicali che derivano dalle cellule epidermiche senescenti, essudati sotto forma di zuccheri e fenoli che fuoriescono dalle cellule radicali integre e le mucillagini secrete dalle cellule periferiche della cuffia radicale (Bolton et al., 1993). Se da un lato i batteri che popolano la rizosfera, i rizobatteri, dipendono dalle piante e dai nutrienti che queste rilasciano, dall'altro sono utili alle stesse piante per una serie di attività metaboliche, non ultima la produzione di fitormoni, come le auxine, le citochinine e l'etilene che promuovono ulteriormente l'accrescimento dell'apparato radicale. Un'altra componente essenziale delle comunità microbiche del suolo è rappresentata dai funghi micorrizici che formano simbiosi mutualistiche con la maggior parte delle specie vegetali, indispensabili per la loro nutrizione, per la fertilità del suolo e per il mantenimento della stabilità e biodiversità delle comunità vegetali (Smith e Read, 1997).

## **1.7 Fertilità biologica del suolo**

La principale responsabile della fertilità del suolo, intesa come la capacità del terreno di rendere produttive le colture, è quindi la “frazione vivente” discussa nel paragrafo precedente. In assenza di essa infatti un terreno agrario risulterebbe principalmente un supporto meccanico passivo ed inerte nei confronti delle piante che dovrebbe nutrire. Più precisamente è importante sottolineare un concetto di fertilità che si discosta da quello con valenza prettamente chimico-fisica comunemente inteso: la fertilità biologica. Questa rappresenta l'espressione della vita microbica del suolo in termini di metabolismo e turnover microbico ed è strettamente dipendente dalla sostanza organica presente in esso, principale fonte di nutrienti per lo sviluppo dei microrganismi. La sostanza organica è costituita da materiale vegetale, animale e microbico proveniente da un lento processo di trasformazione, decomposizione e accumulo nel terreno. La decomposizione avviene a carico della micro e macrofauna del terreno e interessa in particolare i residui vegetali costituiti soprattutto da cellulosa e lignina. I motivi che rendono produttivo un terreno ricco in sostanza organica sono da attribuire alla capacità della stessa di favorire la stabilità strutturale del suolo, l'aerazione e il deflusso dell'acqua. E' importante sottolineare gli effetti nefasti che possono portare alcune pratiche agronomiche, come quelle intensive basate su lavorazioni profonde, monocolture e l'utilizzo di pesticidi ed erbicidi, a danno della fertilità del suolo. Tra questi effetti si può chiaramente rilevare un'alterazione della quantità di sostanza organica e della biodiversità dell'ecosistema rizosferico. La conseguenza di ciò è un decremento della fertilità biologica del terreno con relative conseguenze nella produttività delle colture. Questa destabilizzazione altera gli

equilibri strutturali della comunità microbica presente e la composizione delle varie popolazioni che compongono tale comunità (Bolton et al., 1985). Miller et al., 1999, hanno dimostrato come un terreno agrario contenga quantitativi molto inferiori di sostanza organica rispetto ad un terreno forestale o paludoso. Un depauperamento che si traduce in una ingente diminuzione del numero totale di batteri osservabili al microscopio e del contenuto di DNA totale estratto.

## **1.8 Estrazione di DNA da suolo: approccio diretto e indiretto**

L'estrazione di DNA da suolo diventa quindi fondamentale per lo studio della fertilità biologica. Le tecniche per ottenere la rottura della parete o della membrana cellulare sono numerose e possono essere di varia natura: chimica, enzimatica e fisica. I metodi chimici espongono le cellule a reagenti che intaccano l'integrità delle membrane. L'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) per esempio è un agente chelante molto utilizzato che rimuove gli ioni magnesio, responsabili di mantenere integre molte strutture cellulari o di permettere in qualità di cofattori l'attività delle nucleasi. Tra i reagenti più diffusi ci sono poi i detergenti ionici come il sodio dodecilsolfato (SDS) e il bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB) che solubilizzano le membrane e denaturano le proteine. Il CTAB facilita ulteriormente la rimozione degli acidi umici. I metodi enzimatici si avvalgono soprattutto delle capacità dell'enzima lisozima di digerire il peptidoglicano sottraendo rigidità alla parete cellulare. Nel caso l'obiettivo sia destabilizzare la parete cellulare fungina allora si impiegherà l'enzima chitinasi. Sono largamente utilizzati enzimi come la proteinasi K che degradano le proteine e inattivano le DNAasi.

I metodi fisici, infine, attuano la lisi cellulare mediante forze meccaniche quali la triturazione in presenza di azoto, l'ultrasonificazione, lo shock termico e il *bead beating* (sbattimento con sferule). Quest'ultimo è un metodo tra i maggiormente utilizzati per il suo ampio spettro d'azione, in grado infatti di lisare anche batteri più resistenti come i Gram-positivi. Il *bead beating*, nonostante possa provocare un'elevato livello di frammentazione e contaminazione da acidi umici del DNA ha un'efficienza di lisi e una resa finale di DNA molto maggiore rispetto agli altri metodi e per questo motivo è spesso preferito. I metodi fisici, chimici ed enzimatici per effettuare la lisi cellulare sono il punto cardine delle tecniche di estrazione; tali tecniche si possono basare su due approcci differenti, quello diretto e quello indiretto. Il metodo di estrazione diretta, più semplice e veloce, prevede la lisi cellulare direttamente all'interno della matrice suolo e per questo è detto anche lisi *in situ*. La maggior parte dei kit che si trovano in commercio utilizzano questa procedura. Ne sono un esempio il FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP biomedical) e il PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio).

Il metodo di estrazione indiretta invece prevede uno step di separazione delle cellule dal terreno precedente alla fase di lisi. Ne è un esempio il protocollo introdotto da Lindahl e Bakken nel 1995 (Lindahl and Bakken, 1995) che sfrutta un gradiente di densità di Nycodenz, un derivato dell'acido benzoico, per isolare le cellule dal suolo. Il metodo di estrazione diretta ottiene una quantità di DNA molto elevata che è indispensabile per avere un campione rappresentativo della biodiversità del suolo, requisito non garantito dal metodo indiretto che porta a quantità di DNA largamente inferiori (Courtois et al., 2001). Dall'altro lato il metodo di estrazione indiretta recupera DNA con un elevato grado di purezza e di dimensioni maggiori (100-200kb), rispetto ai 20-30kb di DNA altamente contaminato della tecnica diretta (Burgmann et al., 2001). Per questo motivo l'approccio indiretto risulta più facilmente

utilizzabile in analisi orientate alla costruzione di librerie metagenomiche. Le dimensioni ridotte delle molecole di DNA ottenute con la metodica diretta, causate da frammentazioni meccaniche estese, non rappresentano un problema invece per eventuali tecniche di analisi PCR-dipendenti. Quindi il metodo di estrazione indiretta, separando le cellule dalla matrice prima dell'estrazione del DNA, risolve i problemi tipici della lisi *in situ* come la coestrazione di sostanze umiche, l'assorbimento del DNA ai colloidali e la degradazione del DNA da parte di nucleasi ubiquitarie del suolo. D'altro canto però, incorre in una problematica ben più limitante dovuta alla forte adesione che intercorre tra microrganismi e particelle di suolo che porta ad una forte sottostima della diversità microbica. Sono i microrganismi stessi infatti che, producendo una varietà di *extracellular polymeric substances* (EPS), promuovono la costituzione di forti aggregati con la matrice organica del suolo (Bockelmann et al., 2003).

Il DNA estratto con l'approccio indiretto è da alcuni stimato rappresentare il 25- 30% dell'intera popolazione (Steffan et al., 1988), inoltre il numero di cellule eucariotiche rappresentate diminuisce del 40% rispetto all'estrazione diretta (Delmont et al., 2011). Il metodo indiretto in aggiunta è più dipendente dalla tipologia di suolo analizzato. L'estrazione cellulare da suoli sabbiosi porta a percentuali di recupero molto alte perché in questi suoli gli aggregati non sono molto stabili e si disgregano molto facilmente consentendo un maggiore recupero delle cellule. Mentre se si analizzano suoli argillosi si ottengono mediamente rese minori a causa di micro- e macroaggregati molto resistenti che impediscono di isolare le cellule presenti al loro interno. Un altro limite importante del metodo indiretto è stato dimostrato da un approccio (Holmsgaard et al., 2011) volto a delucidare le numerose problematiche che si riscontrerebbero se si volesse utilizzare la tecnica del *Nycodenz density Gradient* per studi di variabilità genetica del suolo. Gli autori

dimostrano che certi phyla dei Gram-positivi, come i Firmicutes e gli Actinobatteri, sono sottorappresentati dopo l'estrazione tramite Nycodenz. Questi phyla batterici infatti avrebbero una densità maggiore rispetto al Nycodenz, al contrario degli altri batteri facilmente estraibili, e questo non consentirebbe la loro separazione. Il motivo di ciò potrebbe essere la spessa parete e la loro elevata produzione di spore che in entrambi i casi aumenterebbe la densità cellulare. C'è inoltre da rilevare un *bias* molto importante comune a tutte le tecniche di estrazione e più in generale agli approcci metagenomici. Si tratta dell'incapacità di effettuare una lisi completa di tutti i microrganismi del campione ambientale analizzato che porta inevitabilmente ad una distorsione della variabilità microbica a favore dei microrganismi più fragili. Infatti non tutte le cellule vengono lisate con la stessa efficienza dai metodi di estrazione conosciuti. La lisi di batteri Gram-positivi ad esempio risulta molto più difficoltosa rispetto a quella dei batteri Gram-negativi, i primi infatti sono dotati di una parete di peptidoglicano molto più spessa e quindi resistente. Inoltre i batteri in attiva crescita, dotati per questo di una parete indebolita, sono più facilmente lisati rispetto a batteri presenti nel loro stato stazionario, caratterizzati da una maggiore tolleranza agli stress esterni. Il grado di *cross-linking* peptidico dello strato di peptidoglicano infatti è più alto nelle cellule in lenta crescita rispetto a cellule in rapida crescita ed è massimo per le cellule nel loro stato stazionario (Pisabaro et al., 1985). Anche la morfologia e la dimensione della cellula possono essere fattori discriminanti una lisi incompleta di un campione ambientale. Cellule di grandi dimensioni perciò sono lisate con più facilità rispetto a cellule più piccole (Kelemen and Sharpe, 1979). E' stato inoltre dimostrato che l'efficienza di lisi non dipende solo dalle caratteristiche intrinseche della cellula ma anche dalla composizione del suolo ed è inversamente proporzionale al contenuto in argilla (Zhou et al., 1996). Riassumendo, nel DNA

metagenomico totale estratto la porzione di DNA derivante da batteri Gram-negativi, da cellule metabolicamente attive e quindi in attiva crescita e da cellule di grandi dimensioni sarà probabilmente sovrarappresentata. L'estrazione di grandi quantità di DNA quindi non è indicativa di una grande ricchezza di specie perché esiste la possibilità che questo DNA derivi soprattutto da quei tipi cellulari facilmente lisabili sopra descritti (Stach et al., 2001). Dall'altro lato estendere la procedura meccanica di lisi, nella maggior parte dei casi effettuata tramite *bead beating*, con lo scopo di includere le cellule più resistenti, potrebbe creare il problema opposto: il DNA delle cellule più fragili potrebbe essere perso per eccessiva frammentazione. In questo ultimo caso si precluderebbe l'impiego di analisi orientate alla costruzione di librerie metagenomiche. La piccola frazione di cellule non rappresentative estratta con il metodo indiretto non potrebbe essere utilizzata in progetti di ricerca volti ad indagare la biodiversità del suolo. In questi casi quindi è di gran lunga preferibile un approccio di lisi *in situ*, valutando comunque attentamente i fattori di errore intrinseci a cui la tecnica è esposta.

## **1.9 Purificazione di DNA da suolo**

La purificazione del DNA è uno step cruciale per recuperare DNA di buona qualità per le successive analisi molecolari. Le tecniche di purificazione però devono agire sulla matrice suolo e questo complica enormemente questo passaggio. I problemi sono principalmente dovuti alla presenza di sostanze contaminanti che inibiscono le reazioni enzimatiche, come gli acidi umici, e all'adsorbimento del DNA sulla matrice suolo. Le sostanze umiche, composti eterociclici aromatici legati tramite gruppi etere ed etossi, si trovano nel terreno grazie all'azione di

decomposizione della materia organica da parte di microrganismi. A causa del loro alto peso molecolare e alla loro natura polianionica non vengono spesso distinte dal DNA durante le fasi di purificazione. Questo porta inevitabilmente ad una loro coestrazione che ha un risvolto molto negativo per le successive analisi del DNA. Le sostanze umiche infatti chelano gli ioni magnesio durante la PCR e quindi indirettamente influenzano l'attività della Taq DNA polimerasi (Tsai et al., 1992). La stessa attività inibitoria si può notare in numerose altre reazioni enzimatiche come la digestione con enzimi di restrizione, la trasformazione e la ligazione. Inoltre il legame dei gruppi fenolici agli ammidici del DNA porta ad una sua denaturazione. Infine gli acidi umici interferiscono nella quantificazione del DNA poiché assorbono a lunghezze d'onda molto prossime a quelle dell'acido desossiribonucleico (260nm). I contaminanti più comuni come le proteine sono facilmente rimossi grazie all'azione delle proteinasi K, di solventi organici come il fenolo e il cloroformio o tramite precipitazioni in acetato di potassio o cloruro di cesio. Nel caso i contaminanti siano polisaccaridi invece si usano semplici precipitazioni in presenza di polietilene glicole (PEG).

I metodi sopra citati sono utilizzati anche per estrarre gli acidi umici, ma spesso si preferisce complessarli e rimuoverli introducendo nella soluzione dei composti come il polivinilpolipirrolidone (PVPP), il *powdered activated charcoal* (PAC) (Digvijay and Satyanarayana, 2011) o il CTAB. In ogni caso la rimozione degli acidi umici non avviene mai completamente e per questo si è soliti ricorrere alla diluizione del DNA prima di effettuare una reazione enzimatica (Moreira,1998). Tale diluizione però porterà inevitabilmente alla perdita del DNA meno abbondante introducendo un *bias* importante nell'analisi della biodiversità microbica del suolo (Tsai e Olson, 1992).

L'adsorbimento del DNA sulla matrice suolo, fenomeno che complica le fasi di recupero e purificazione dell'acido nucleico, è dipendente dalla composizione del terreno in termini di particelle minerali, cationi inorganici e dal pH della matrice.

La fase solida del suolo comprende diverse particelle minerali distinte in: sabbie, limo e argille. La superficie specifica, massima per le argille e minima per le sabbie, è intesa come il rapporto tra l'area superficiale e la massa di una particella. Un rapporto direttamente proporzionale alla capacità d'interazione della particella con le molecole circostanti. L'elevata area di superficie specifica rende i minerali argillosi substrati ideali per l'adsorbimento di diverse molecole come cationi inorganici e acidi nucleici. Quando si affronta il problema dell'adsorbimento di DNA la principale caratteristica mineralogica del suolo che viene valutata è il suo contenuto in argille, in quanto le sabbie sono considerate particelle inerti. Il processo di adsorbimento fra gli acidi nucleici e le particelle di argilla è dipendente dalla presenza di cationi e dal pH dell'ambiente (Franchi et al., 2003). I cationi possono agire da ponti per mediare l'interazione tra due substrati carichi negativamente, il DNA e la superficie delle particelle di argilla. E' da considerare inoltre che nel caso il pH della soluzione si trovasse al di sotto del punto isoelettrico del DNA, quindi ad un pH inferiore a 5, l'adsorbimento sarebbe ulteriormente facilitato. Il DNA infatti, trovandosi protonato nei gruppi fosfato e quindi carico positivamente, interagirebbe molto più facilmente, senza mediazioni cationiche, con le superfici delle particelle di argilla. Per questo motivo l'adsorbimento del DNA ai minerali argillosi, un forte ostacolo per gli steps di purificazione, aumenta incrementando la concentrazione e la valenza dei cationi introdotti, ma anche diminuendo il pH della soluzione (Pietramellara et al., 2001). Fattori che possono essere variati quindi per ottimizzare una metodica di purificazione del DNA. Per ovviare al problema della coestrazione degli

acidi umici e alla perdita di DNA per adsorbimento si è spesso optato per un approccio di estrazione indiretto, come ad esempio il protocollo che sfrutta il gradiente di densità del composto Nycodenz, nonostante porti ad una forte sottostima della biodiversità presente nel suolo come già discusso nel paragrafo precedente.

### **1.10 Limiti delle tecniche tradizionali di analisi di comunità microbiche del suolo**

Le comunità microbiche del suolo sono state a lungo studiate con varie finalità che vanno dalla definizione del ruolo ecologico e della funzione dei microrganismi che ne fanno parte, all'identificazione di specie con attività metaboliche di particolare interesse in campo biotecnologico (Benedetti et al., 2006). Tra le varie finalità, lo studio del livello di diversità genetica esistente in un determinato suolo ha riscosso notevole interesse in questi ultimi tempi. La conoscenza della biodiversità del suolo, intesa come varietà di specie, ma anche come variabilità genetica all'interno della stessa specie, rappresenta un elemento chiave per il mantenimento della produttività agronomica, in quanto è dalla diversità microbica che dipendono lo stato di salute e la fertilità di un ambiente (Colwell, 1997). I metodi più tradizionali di analisi di comunità microbiche del suolo si focalizzano soprattutto sulla misura della biomassa, del tasso di respirazione e sulle attività enzimatiche. Questi metodi non possono però ambire ad una vera caratterizzazione della comunità microbica (Nannipieri et al., 2000). Le tecniche microbiologiche tradizionali, volte ad identificare e caratterizzare batteri del suolo, sono basate sull'isolamento e la coltivazione in laboratorio. Le forti limitazioni di queste metodiche di coltivazione dipendono dal fatto che la porzione di cellule coltivabili è stata stimata essere inferiore

all'1% della popolazione totale (Knietsch et al., 2003). La non-coltivabilità può essere dovuta alla difficoltà di riprodurre in vitro le condizioni ambientali ottimali per la proliferazione microbica, ma può anche dipendere dalla presenza nel suolo di batteri in un particolare stato metabolico chiamato "Viable but non culturable" (VBNC) (Xu et al., 1982). I batteri entrano nello stato VBNC quando sono sottoposti a stress ambientali come per esempio variazioni della temperatura, della salinità, del pH. Pur essendo vitali questi batteri non sono in grado di dividersi sufficientemente per formare colonie visibili nei convenzionali terreni colturali (Oliver, 2005). Altre cause di non coltivabilità sono dovute alla coltivazione, in terreni ricchi di nutrienti, di specie "r-strateghe", spesso in numero inferiore ma con elevate velocità di crescita, e "k-strateghe", che possiedono un'elevata affinità per il substrato ma bassi tassi di crescita. Le specie "r-strateghe" si moltiplicano più velocemente mettendo fuori competizione le "k-strateghe" che per questo non superano la soglia di rilevabilità dei metodi di selezione e isolamento (Dunbar et al., 1996). Per eludere le problematiche intrinseche alle metodiche di coltivazione sono stati sviluppati degli approcci più moderni che prevedono l'analisi del DNA direttamente estratto dai campioni ambientali con lo scopo di esplorare l'intera comunità microbica (Nordgard et al., 2005). Si parla quindi di un approccio metagenomico, l'unico in grado di studiare i genomi di batteri non coltivabili. Per DNA metagenomico quindi si intende il DNA totale estratto che rappresenta tutti gli organismi presenti in quel suolo.

Non esiste ancora un protocollo per l'estrazione in maniera automatizzata del DNA dalla matrice suolo. La messa a punto di tale metodo appare necessaria non solo per rendere più omogenea la resa quali-quantitativa dell'estratto ma anche per consentire (i) l'aumento della processività in termini di numero di campioni estraibili per unità di tempo e (ii) la riduzione del costo a campione.

## **1.11 Metodi di analisi molecolari per lo studio dei microrganismi del suolo**

Le tecniche molecolari utilizzate per studiare le comunità microbiche a partire da DNA estratto dal suolo sono numerose e variano a seconda dello scopo dell'analisi. Se il progetto di ricerca si propone di confrontare la diversità microbiche di campioni di suolo differenti e quindi individuare variazioni spazio temporali nella composizione delle comunità microbiche, allora la tecnica più consigliata prevede la coibridazione tra il DNA-sonda di un campione, opportunamente marcato, e il DNA-target di un altro campione. Il livello di ibridazione sarà proporzionale al grado di similarità tra le comunità microbiche dei due campioni presi in esame. Se invece lo scopo dell'analisi è individuare le varie specie microbiche che compongono una comunità e quindi fare un'attenta disamina della biodiversità del suolo allora la tecnica più adatta è la polymerase chain reaction (PCR). Le sequenze più diffusamente amplificate sono i geni dell'operone ribosomale, in particolare il gene *rrs* (16S rDNA per i batteri e 18S rDNA per gli eucarioti) e la regione compresa tra i geni *rrs* e *rrl* (23S rDNA per i batteri e 28S rDNA per gli eucarioti) nota come intergenic spacer (IGS). Questi geni rappresentano "orologi" molecolari dell'evoluzione delle singole specie e sono particolarmente utili per effettuare analisi filogenetiche perché alternano regioni altamente conservate, sulle quali si appaiano i primers universali utilizzati per l'amplificazione, a regioni ipervariabili che consentono la classificazione microbica. I risultati della PCR possono essere analizzati tramite due metodi. Il primo metodo, più costoso sia in termini di tempo che di costi, consiste in un clonaggio dei singoli frammenti di 16S rDNA, il marker molecolare comunemente utilizzato per studiare le relazioni filogenetiche nei procarioti, in maniera

da ottenere una libreria di cloni, ciascuno dei quali viene successivamente sequenziato per la comparazione con le sequenze presenti in banca dati. Il secondo metodo è definito genetic fingerprinting ed è caratterizzato da una semplice e veloce analisi elettroforetica degli amplificati o di loro prodotti di digestione, che fornisce un quadro globale della complessità genetica delle comunità microbiche. In questo caso è possibile associare ad ogni determinata "impronta molecolare" una comunità microbica, grazie al differente profilo di migrazione nel gel dei vari amplificati di dimensioni diverse. Le tecniche che più rappresentano questo approccio sono ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).

La tecnica ARDRA si basa su un'analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sul 16S rDNA amplificato tramite PCR. Le varie bande presenti nel gel di agarosio dopo l'elettroforesi sono i frammenti di digestione degli enzimi di restrizione e il profilo elettroforetico indica la composizione della comunità. Questa tecnica è impiegata per analizzare la dinamicità della struttura genetica di una comunità microbica nel tempo e nello spazio attraverso una semplice comparazione tra profili di restrizione, ma presenta alcuni limiti nel caso la si voglia utilizzare per descrivere la composizione di una comunità. Questo perché le sequenze del 16S rDNA sono molto conservate e spesso ceppi appartenenti alla stessa specie presentano sequenze 16S rDNA identiche e per questo anche profili ARDRA identici.

La tecnica RAPD, una delle più semplici e veloci, si prefigge di amplificare segmenti ignoti del genoma microbico sfruttando le condizioni di bassa stringenza alle quali avverrà l'annealing di un unico

primer, rappresentato da un oligonucleotide di sequenza arbitraria. Le condizioni di bassa stringenza e quindi le basse temperature di annealing permettono al primer di appaiarsi anche a sequenze bersaglio non esattamente complementari. Questo porta alla generazione di una serie di amplificati di diversa lunghezza che caratterizzano un determinato profilo elettroforetico. Lo svantaggio più importante di questa metodica è la bassa riproducibilità dei profili di amplificazione prodotti, troppo dipendenti dalle condizioni in cui si effettua la PCR.

ARISA è una tecnica di fingerprinting molecolare molto utilizzata per caratterizzare le strutture delle comunità del suolo (Figura. 2). Il principio base è la creazione di diversi profili di amplificazione sfruttando i polimorfismi di lunghezza delle regioni spaziatriche comprese tra i geni codificanti l'rRNA 16S e l'rRNA 23S per i batteri e i geni codificanti l'rRNA 18S e rRNA 28S per i funghi. La regione intergenica, amplificata tramite primers marcati in fluorescenza, può avere una dimensione che varia dalle 50 bp alle 1,5 kb a seconda della specie e per questo può essere impiegata per discriminare ceppi appartenenti alla stessa specie o specie filogeneticamente molto vicine. Questa alta variabilità porta ad una tipizzazione tassonomica molto più accurata di quella ottenuta analizzando le sequenze 16S rDNA. Gli amplificati vengono successivamente denaturati e separati su gel di poliacrilamide tramite un sequenziatore automatico di DNA che effettua un'elettroforesi capillare. Questo consente di ottenere profili altamente riproducibili in breve tempo e inoltre aumentare la sensibilità del metodo, in grado di distinguere differenze anche di un solo nucleotide.

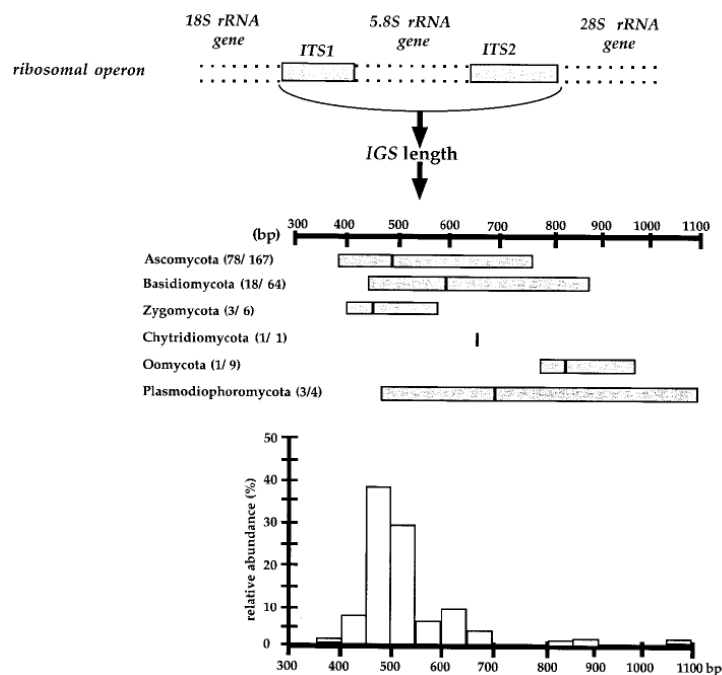


Figura 2. Distribuzione della lunghezza della regione ITS1-5.8S - ITS2 all'interno di differenti gruppi fungini (104 generi e 251 specie).

## 1.12 La diagnostica fogliare

Il principio della diagnostica fogliare consiste nel dedurre dall'analisi del lembo il livello effettivo d'assorbimento dei vari elementi nutritivi e nello stimare gli apporti di concime da effettuare allo scopo di migliorare la qualità delle uve. L'analisi delle foglie è stata messa a punto per la prima volta nel 1923, proprio sulla vite, dai francesi Lagatu e Maume. I contenuti degli elementi delle foglie rispecchiano la fertilità del terreno con i suoi fenomeni fisici, chimici e biologici, l'andamento climatico, la capacità d'assorbimento radicale, la produttività e il vigore della vite. Una volta conosciuto lo stato nutrizionale del vigneto, è possibile impostare nel modo migliore la strategia di concimazione evitando la somministrazione degli elementi già presenti in quantità sufficienti e concentrandosi su quelli più carenti. L'esistenza di una significativa

serie di dati storici sul contenuto fogliare dei principali nutrienti rende possibile l'individuazione di *range* ottimali a cui ci si può riferire.

L'esattezza del risultato dipende dall'esecuzione del campionamento: ogni campione deve contenere foglie prelevate da ceppi della stessa varietà, portainnesto e forma dall'allevamento. Inoltre, bisogna evitare di raccogliere le foglie danneggiate o che presentano colorazioni anomale. L'analisi delle foglie viene applicata in due settori della viticoltura: quello scientifico e quello pratico. Nel primo caso è sfruttata per studiare le carenze di macro- e micro-elementi mentre nel secondo caso è adottata per indirizzare le concimazioni di produzione della vite in combinazione con l'analisi del terreno. Attraverso l'analisi dei dati derivanti dalla diagnostica fogliare e con opportuni interventi si può quindi migliorare la produzione e di conseguenza la qualità delle uve e si possono evitare apporti inutili o dannosi per le piante ma anche per l'ambiente. La diagnostica fogliare non può essere vista come uno strumento di diagnosi valida nel lungo periodo e va ripetuta a intervalli regolari e possibilmente brevi in modo da praticare una concimazione sempre più mirata alla fisiologia ed ai fabbisogni della pianta in quanto esiste grande variabilità nella composizione chimica degli organi della vite.

### **1.13 Aspetti molecolari della nutrizione della vite**

Gli stress ambientali riducono significativamente la produzione qualitativa della vite e, fra questi, le carenze idrico-nutrizionali e le patologie fungine sono i più deleteri. L'elevato impiego di mezzi tecnici e chimici per attenuare tali condizioni avverse non è più possibile per ragioni di ordine economico ed ambientale. L'obiettivo che oggi ci si pone è quello di sviluppare tecniche agronomiche e tecnologie sostenibili che, da un lato, garantiscano la produzione delle colture e,

dall'altro, rispettino l'ambiente. Nella comprensione dei meccanismi di adattamento delle piante alle avversità ambientali, gli studi di espressione genica si stanno dimostrando fondamentali. Le più recenti metodologie di analisi molecolare hanno permesso di evidenziare che la risposta adattativa delle piante alle variazioni ambientali si basa su complesse modificazioni biochimiche e fisiologiche, controllate a cascata da reti molecolari che coinvolgono contemporaneamente l'espressione di più geni (Filleur et al., 2005). Pertanto, è risultato evidente che le modificazioni che si osservano a livello fenotipico nelle piante in risposta alle variazioni ambientali dipendono da vere e proprie alterazioni della funzionalità del genoma. A sostegno di questa tesi, vi sono numerose evidenze sperimentali fra cui ad esempio i risultati ottenuti da Soar et al. (2006) che hanno dimostrato la sovra-espressione del gene *V.v.nced1* responsabile della biosintesi dell'ormone acido abscissico, in piante di vite sottoposte a carenza idrica. Altre evidenze sperimentali indicano che i meccanismi delle piante deputati alla percezione e al superamento degli stress biotici ed abiotici sono spesso associabili e possono condividere analoghe basi genetiche (Balconi et al., 2010). Studi condotti in vite hanno evidenziato che l'aumento dell'espressione dei geni *STS1* e *PAL*, codificanti rispettivamente per enzimi chiave della via biosintetica dei stilbeni e dei fenilpropanoidi e implicati nei meccanismi di difesa della vite a stress biotici da funghi e virus, avviene anche in piante sottoposte a stress da freddo, da raggi UV e stress idrico (Sanchez-Ballesta et al., 2006; Vezzulli et al., 2007). Fra gli stilbeni, il resveratrolo svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi di resistenza della vite all'attacco di funghi e rappresenta il principale metabolita accumulato in risposta a questo tipo di stress (Jandet et al., 2002). Lavori recenti indicano, inoltre, il ruolo chiave di geni che codificano per fattori di trascrizione del tipo *WRKY* nei pattern di espressione in risposta a stress abiotici e a

infezione con patogeni (Laquitaine et al., 2006; Marchive et al., 2007). Un altro gene chiave fortemente coinvolto nei meccanismi di difesa della vite è il gene *SuSy* che codifica per la saccarosio-sintasi, enzima appartenente alla classe delle transferasi e deputato alla scissione del saccarosio in glucosio e fruttosio. Questo gene viene sovraespresso dalle piante in condizioni di stress abiotici quali basse temperature (Roubelakis-Angelakis, 2009) e biotici come ad esempio l'infezione da micoplasmi (Hren et al., 2009). L'identificazione di specifici geni, la cui espressione risulta alterato e/o indotta in vite in condizioni di carenza nutrizionale potrebbe portare allo sviluppo di innovative tecniche biomolecolari per la diagnosi e il superamento delle carenze nutrizionali in viticoltura.

## 2 SCOPO DEL LAVORO

Nel presente lavoro di tesi, ci si è proposti di identificare indicatori innovativi dello stato nutrizionale della vite. Il lavoro è stato sviluppato in due fasi. La prima ha avuto come scopo quello di studiare la relazione fra la produttività, la fertilità del suolo, la dotazione dei principali macro- e micronutrienti nelle foglie e la biodegradazione di filamenti di natura vegetale (cotone) e animale (lana e seta). Ci si è proposti, inoltre, di valutare la diversità microbica di suoli vitati attraverso analisi molecolari sempre al fine di identificare nuovi indicatori della fertilità microbica del suolo. A tale scopo, è stato messo a punto un metodo per l'estrazione automatizzata del DNA da suolo su cui successivamente sono state eseguite analisi molecolari ARISA (*Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) per la stima della biodiversità delle comunità microbiche presenti nei siti vitati. Nella seconda fase, sul tessuto fogliare di piante di vite allevate su suoli caratterizzati da alta e bassa disponibilità nutrizionale, è stata valutata l'espressione genica (*Real Time PCR*) dei geni *STS1*, *PAL*, *SuSy* e *WRKY* la cui espressione potrebbe risultare alterata e/o indotta in vite in condizioni di carenza nutrizionale.

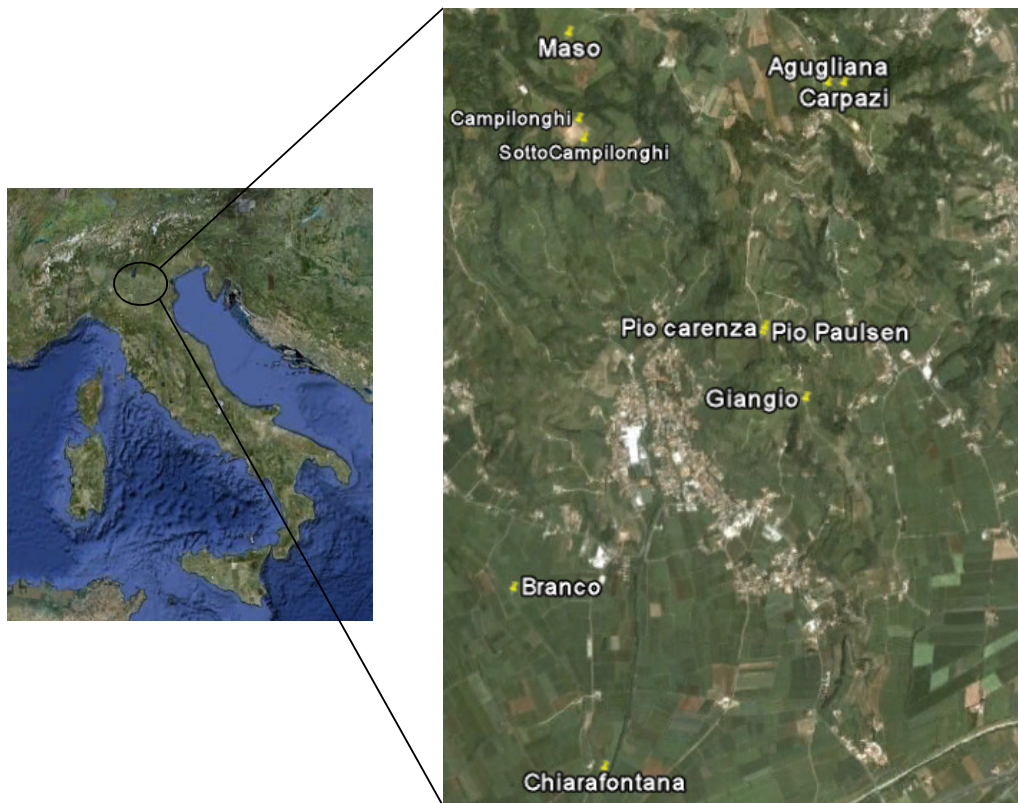
## **3 MATERIALI E METODI**

### **3.1 Campionamento del suolo**

I vigneti che sono stati individuati a Gambellara per le analisi chimico-fisiche e biologiche del terreno e per la diagnostica fogliare sono dieci. In tutti i vigneti viene coltivata la Garganega, vitigno tipico della D.O.C. Gambellara, innestata rispettivamente sul portainnesto SO4 e 1103 Paulsen. Otto di questi vigneti si trovano in collina appena sopra Gambellara, all'Agugliana e nella località Faldeo mentre gli altri due (Branco e Chiarafontana) in pianura. I vigneti sono stati così contrassegnati:

vigneto n° 1: Chiarafontana;  
vigneto n° 2: Branco;  
vigneto n° 3: Giangio;  
vigneto n° 4a: Pio Paulsen;  
vigneto n° 4b: Pio Carezza;  
vigneto n° 5a: Agugliana;  
vigneto n° 5b: Carpazi;  
vigneto n° 6: Maso;  
vigneto n° 7: Campilonghi;  
vigneto n° 8: Sotto-Campilonghi.

Nella Figura 3 sono indicate le ubicazioni dei 10 vigneti analizzati nella presente tesi (Google Earth).



*Figura 3. Ubicazione dei 10 vigneti analizzati nella tesi (Google Earth).*

I campioni di suolo sono stati prelevati il 30 aprile 2010: per ogni vigneto sono stati scelti due punti in cui effettuare il carotaggio con la trivella: il primo nella parte bassa dell'appezzamento e l'altro nella parte alta. Il terreno è stato raccolto ad una profondità di 0-30 cm e 30-60 cm per ogni punto. Ogni campione è stato imbustato separatamente per un totale di 40 campioni. Nel punto in cui è stato prelevato il campione sono state prese le coordinate GPS in modo tale da tornare nello stesso punto per il prelievo delle foglie.

### 3.2 Analisi fisico-chimiche del suolo

Le analisi chimico fisiche dei terreni sono state eseguite seguendo le procedure indicate nel Decreto Ministeriale del 13 settembre 1999: Approvazione dei “Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale il 21 ottobre 1999 dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. I campioni dopo essere stati raccolti sono stati essiccati all'aria e successivamente pestellati con un mortaio allo scopo di ottenere la terra fine.

Per prima cosa il campione, dopo essere stato mescolato ed omogeneizzato su un vassoio pulito, è stato setacciato dapprima con un setaccio a maglie di 2 mm e poi con uno da 500  $\mu\text{m}$ .

Successivamente sono stati pesati 100 g di terra fine che è stata posta in appositi contenitori per le successive analisi.

#### *pH*

Il pH è stato determinato per via potenziometrica, secondo il metodo “III.1 - Determinazione del grado di reazione (pH)”, dopo taratura del sistema di misura, su sospensione di suolo-acqua. I valori ottenuti non rispecchiano fedelmente il valore dei pH in campo, ma sono indicativi del grado di reazione del sistema.

Il pH-metro è stato tarato utilizzando due soluzioni a pH noto: la prima con pH pari a 4,00 e la seconda a pH 7,00. Per ogni campione sono stati pesati 10 g di terra setacciata a 2 mm a cui sono stati aggiunti 25 mL di acqua ultra pura: il tutto è stato mescolato e si è lasciato riposare per mezz'ora per poi procedere con la lettura.

Il grado di reazione è stato espresso come unità di pH, con due cifre decimali.

Successivamente si è determinato anche il pH in KCl: per prima cosa è stata preparata la soluzione di KCl facendo sciogliere in un matraccio da 1000 mL, 74,6 g di cloruro di potassio portando poi a volume con acqua ultra pura. Il procedimento è stato lo stesso solo che al posto dell'acqua sono stati aggiunti 25 mL di cloruro di potassio.

#### *Determinazione della tessitura con il metodo del densimetro di Bouyoucos*

La determinazione della tessitura è stata eseguita seguendo il protocollo "II.6 - Determinazione della granulometria per setacciatura ad umido e con l'impiego dell'idrometro".

Il principio si fonda sull'impiego dell'idrometro per misurare la massa volumica della sospensione suolo-acqua dopo un tempo di sedimentazione prestabilito, risalendo successivamente alla distribuzione delle particelle elementari di dimensione diverse. Per prima cosa è stata preparata la soluzione di sodio esametafosfato: in un bicchiere di vetro da 500 mL sono stati aggiunti 250 mL di acqua ultra pura, 40 g di sodio esametafosfato e 10 g di sodio carbonato. La soluzione è stata posta su un agitatore elettromagnetico fino a completa solubilizzazione dei reagenti ed il tutto è stato trasferito in un matraccio da 1000 mL portando la soluzione a volume.

Per ogni campione si è seguita la seguente procedura: sono stati pesati 50 g di terra fine a cui sono stati aggiunti 100 mL di soluzione di Calgon al 5% (esametafosfato): il tutto è stato frullato per dieci minuti alla massima velocità. La soluzione ottenuta è stata immediatamente versata in un cilindro per granulometria portando a volume con acqua di lavaggio fino alla tacca 1130 mL. Il cilindro è stato chiuso con l'apposito tappo ed è stato capovolto per venti volte per amalgamare la soluzione. Quindi è stato immerso il densimetro e dopo quattro minuti si è

effettuata la prima lettura che sarà data dalla somma del limo e dell'argilla in sospensione in quanto la sabbia precipita subito. Dopo due ore, tempo necessario affinché il limo precipiti, è stata eseguita la seconda lettura che è data dalla componente argillosa rimasta in sospensione. E' stato preparato anche un bianco (acqua e soluzione di Calgon) facendo sempre le due letture a quattro minuti e due ore: i valori sono stati sottratti dalle misure della sospensione del suolo. Inoltre con un datalogger è stata registrata la temperatura in modo da applicare le relative correzioni per il calcolo delle percentuali delle componenti elementari.

Per determinare i valori di argilla, limo e sabbia sono state utilizzate le seguenti formule:

- ARGILLA=[lettura 2 ore – bianco + correz. °T] x 2= %
- LIMO=[ lettura 4 min. – bianco + correz. °T] x 2= %
- SABBIA= 100- [argilla + limo]= %

Infine, inserendo i valori ottenuti nel Triangolo della Tessitura, si sono determinate le classi d'appartenenza dei campioni di suolo.

#### *Determinazione del Carbonio Organico (metodo Walkley-Black)*

Il carbonio organico è stato analizzato anche con il metodo Walkley-Black: il procedimento prevede che il carbonio organico venga ossidato ad anidride carbonica, in condizioni standardizzate, con una soluzione di potassio bicromato in presenza di acido solforico. La velocità della reazione viene favorita dall'innalzamento della temperatura conseguente alla brusca diluizione dell'acido. Dopo un tempo stabilito, la reazione viene interrotta per l'aggiunta di un' opportuna quantità di acqua ultra pura ed il potassio bicromato che non ha reagito viene determinato per titolazione con una soluzione di ferro

(II) solfato eptaidrato. Il punto finale della titolazione viene accertato con l'aggiunta di un opportuno indicatore di ossidoriduzione. Il campione è stato preparato trasferendo in un matraccio da 250 mL 0,5 g di suolo e setacciato a 500  $\mu\text{m}$ .

Con una buretta di precisione sono stati trasferiti nel matraccio conico 10 mL della soluzione ( $0,1667 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ) di potassio bicromato ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e successivamente sono stati aggiunti 20 mL di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [96% ( $\rho = 1,835$ )], facendoli percolare lentamente lungo le pareti interne del matraccio conico per non sovra riscaldare la miscela. I matracci sono stati agitati con cautela evitando che particelle di suolo aderissero alle pareti del contenitore. I campioni sono stati coperti con un vetro e lasciati a riposo per 30 minuti.

La reazione è stata interrotta aggiungendo 200 mL di acqua ultra pura preventivamente raffreddata in frigorifero e la titolazione volumetrica è stata effettuata aggiungendo nel matraccio conico di Erlenmeyer, 10 mL di acido fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) [85% ( $\rho = 1,695$ )] e 0,5 mL dell'indicatore oxred. Il matraccio è stato sistemato sull'agitatore magnetico ed il tutto è stato titolato con la soluzione ( $0,5 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ) di ferro (II) solfato eptaidrato ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) fino al viraggio, da blu al verde.

Le soluzioni di sali ferrosi non sono stabili a causa dell'ossidazione del ferro (II) da parte dell'ossigeno. Tale processo di ossidazione si verifica, seppur lentamente, anche sul sale allo stato solido. Pertanto, per ogni serie di analisi, è stato necessario controllare il titolo esatto della soluzione ( $0,5 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ) di ferro (II) solfato.

Il metodo prevede di trattare una quantità nota della soluzione di bicromato allo stesso modo del campione per effettuare contemporaneamente la correzione relativa alla possibile parziale decomposizione del bicromato a caldo ed il controllo che tale decomposizione non sia stata eccessiva.

Sono stati quindi prelevati, con buretta di precisione e trasferiti in matraccio conico di Erlenmeyer a collo largo da 250 mL, 10 mL della soluzione ( $0,1667 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ) di potassio bicromato ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

Successivamente sono stati aggiunti 20 mL di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [96% ( $\rho = 1,835$ )], facendoli percolare lentamente lungo le pareti interne del matraccio conico per non sovra riscaldare la miscela. I matracci sono stati coperti con un disco di vetro e lasciati a riposo per 30 minuti.

La reazione è stata interrotta aggiungendo 200 mL di acqua ultra pura preventivamente raffreddata in frigorifero e, in successione, sono stati aggiunti 10 mL di acido fosforico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) [85% ( $\rho = 1,695$ )] e 0,5 mL dell'indicatore oxred. Il matraccio è stato sistemato sull'agitatore magnetico e la titolazione è stata effettuata con la soluzione ( $0,5 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ) di ferro (II) solfato eptaidrato ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) fino a viraggio, dal blu al verde.

Il contenuto di carbonio organico è espresso in  $\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ . Per il calcolo è stata utilizzata la formula:

$$C = \frac{3}{2} \times \frac{(B-A)}{1000} \times \frac{M \text{ Fe(II)}}{6} \times 12 \times \frac{1000}{M} \times 1,30$$

dove:

C= contenuto di carbonio organico, espresso in  $\text{g} \times \text{kg}^{-1}$ ;

3/2: rapporto molare della reazione di ossidoriduzione (2 moli di potassio bicromato reagiscono con 3 moli di C);

B= volume della soluzione di ferro (II) solfato utilizzato nella titolazione della prova in bianco, espresso in mL;

A= volume della soluzione di ferro (II) solfato utilizzato nella titolazione della soluzione del campione, espresso in mL;

M Fe(II) = molarità effettiva della soluzione di ferro (II) solfato;

12= massa atomica del carbonio, espressa in  $\text{g} \times \text{mole}^{-1}$ ;

1,30= fattore di correzione empirico che tiene conto della parziale ossidazione (70 %) del carbonio organico;

M = massa del campione di suolo, espressa in grammi.

#### *Determinazione del fosforo assimilabile (Metodo Olsen)*

Il metodo si può applicare sia ai suoli acidi che a quelli caratterizzati dalla presenza di  $\text{CaCO}_3$ . La presenza in soluzione di sodio bicarbonato, di ioni carbonato e di ossidrili abbassa l'attività del  $\text{Ca}^{2+}$  e dell'  $\text{Al}^{3+}$  con conseguente incremento della solubilità del fosforo. Il contenuto di fosforo dei terreni viene determinato per spettrofotometria con il metodo dell'acido ascorbico.

Per prima cosa sono state preparate tutte le soluzioni necessarie per l'estrazione del fosforo:

- Soluzione di acido solforico ( $2,5 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ): si sono aggiunti in un matraccio tarato da 1000 mL, contenete 500 mL di acqua ultra pura, 140 mL di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [96% ( $\rho = 1,893$ )] e si è portato a volume dopo raffreddamento sempre con acqua ultra pura;
- Soluzione di sodio idrossido ( $1 \text{ mole} \times \text{L}^{-1}$ ): si sono sciolti 40 g di sodio idrossido in un matraccio tarato da 1000 mL e dopo raffreddamento si è portato a volume con acqua ultra pura;
- Soluzione di sodio bicarbonato ( $0,5 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ): in un bicchiere contenete 900 mL di acqua ultra pura sono stati aggiunti 42 g di  $\text{NaHCO}_3$  e si è portato il pH al valore di 8,5 aggiungendo goccia a goccia la soluzione di sodio idrossido ed infine si è trasferito il tutto in un matraccio da 1000 mL e si è portato a volume con acqua ultra pura;
- Carbone attivo: è opportuno controllare la purezza del reagente effettuando un'estrazione con la soluzione di sodio bicarbonato. In

presenza di fosforo si deve lavare più volte con la stessa soluzione fino a livelli di P non rilevabili per spettrofotometria;

- Soluzione di p-nitrofenolo (0,25%): in un matraccio tarato da 100 mL sono stati sciolti, in acqua ultra pura, 0,25 g di p-nitrofenolo ( $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ );
- Soluzione di ammonio molibdato ( $40 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ): sono stati pesati 40 g di ammonio molibdato [ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ ] e sono stati sciolti in acqua in un matraccio tarato da 1000 mL portando poi a volume;
- Soluzione di antimonio potassio tartrato ( $1 \text{ mg di Sb} \times \text{mL}^{-1}$ ): si sono sciolti in acqua ultra pura, in un matraccio tarato da 100 mL, 0,2728 g di antimonio potassio tartrato [ $(\text{K}(\text{SbO}) \times \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 1/2\text{H}_2\text{O})$ ] portando il tutto a volume;
- Soluzione di acido ascorbico ( $0,1 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ): sono stati sciolti in acqua ultra pura, in un matraccio da 100 mL, 1,76 g di acido ascorbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) portando sempre a volume (la soluzione va preparata al momento dell'uso);
- Reagente solfomolibdico: è composto da 50 mL della soluzione di acido solforico ( $2,5 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ), 15 mL della soluzione di ammonio molibdato ( $40 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ ), 30 mL della soluzione di acido ascorbico ( $0,1 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ) e 5 mL della soluzione di antimonio potassio tartrato ( $1 \text{ mg di Sb} \times \text{mL}^{-1}$ );
- Soluzione standard di fosforo ( $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ ): in un matraccio tarato da 1000 mL, contenente 500 mL di acqua ultra pura, sono stati versati 4,3938 g di potassio diidrogeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) essiccato in stufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dopo la solubilizzazione del sale la soluzione è stata portata a volume sempre con acqua ultra pura;
- Soluzione standard diluita di fosforo: con una buretta di precisione sono stati prelevati 2 mL della soluzione di fosforo ( $1000 \text{ mg}$

$\times L^{-1}$ ): sono stati trasferiti in un matraccio da 1000 mL e si è portato a volume ( $[P]= 2 \text{ mg} \times L^{-1}$ ).

Per quanto riguarda l'estrazione vera e propria si inizia trasferendo 2 g del campione di terra fine in un tubo Falcon da 50 mL aggiungendo 40 mL ( $V_1$ ) della soluzione di sodio bicarbonato ( $0,5 \text{ moli} \times L^{-1}$ ) a pH 8,5 e 0,5 g di carbone attivo: il tutto è stato mantenuto in agitazione per 30 minuti e si è filtrato con carta Whatman® n°4 raccogliendo il filtrato per la successiva lettura all'ICP. Allo stesso modo è stato preparato un bianco omettendo il campione di terreno.

Per la determinazione colorimetrica è stata prelevata, con una buretta di precisione, un'aliquota della soluzione limpida ( $V_2$ ) e sono state aggiunte cinque gocce della soluzione di p-nitrofenolo ed alcune gocce della soluzione di acido solforico, facendole scorrere lungo le pareti del matraccio, fino a scomparsa del colore giallo dell'indicatore.

Quindi si è diluito a 25 mL con acqua e sono stati aggiunti 8 mL del reagente solfomolibdico portando il tutto a volume con acqua ultra pura. Dopo dieci minuti è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 882 nm contro un bianco che conteneva tutti i reagenti esclusa la soluzione di fosforo.

Per la determinazione della retta di taratura si è proceduto nella seguente maniera: sono stati prelevati con una buretta di precisione e trasferiti in sei matracci tarati da 50 mL rispettivamente 0, 5, 10, 15, 20 e 25 mL della soluzione standard diluita ( $2 \text{ mg} \times L^{-1}$ ) di fosforo. Si è diluito a 25 mL con acqua ultra pura, sono stati aggiunti 8 mL del reagente solfomolibdico e si è portato a volume. In ognuna delle sei soluzioni la concentrazione di fosforo è 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 e  $1 \text{ mg} \times L^{-1}$ . Dopo dieci minuti è stata fatta la lettura con lo spettrofotometro ( $\lambda= 882 \text{ nm}$ ) contro un bianco contenente tutti i reagenti esclusa la soluzione di fosforo.

Il contenuto di fosforo, estratto con la soluzione di sodio bicarbonato dai campioni di suolo, viene espresso in  $\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$  senza cifre decimali.

I valori del fosforo sono stati ottenuti utilizzando la seguente formula:

$$C = (A-B) \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{50}{M}$$

dove

C= contenuto di fosforo assimilabile presente nel suolo, espresso in  $\text{mg} \times \text{Kg}^{-1}$ ;

A= concentrazione di P nella soluzione del campione, espressa in  $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ ;

B= concentrazione di P nella soluzione della prova in bianco, espressa in  $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ ;

$V_1$ = volume dell'estratto (40 mL);

$V_2$ = volume della soluzione del campione utilizzata per la determinazione colorimetrica;

M= massa del campione di suolo, espressa in grammi.

#### *Determinazione della capacità di scambio cationico con bario cloruro e trietanolamina*

La capacità di scambio cationico è stata determinata con bario cloruro e trietanolamina seguendo il metodo "XIII.2 – Determinazione della capacità di scambio cationico con bario cloruro e trietanolamina".

Il campione di suolo è stato monosaturato con la soluzione di bario cloruro tamponata a pH 8,2. Successivamente, al campione Ba-saturato è stata aggiunta più volte una quantità definita di una soluzione a titolo noto di magnesio solfato. La reazione porta alla formazione di bario solfato insolubile e, quindi, allo scambio completo Ba/Mg. L'eccesso di magnesio in soluzione è stato determinato per titolazione

complessometrica. Calcolata la quantità di magnesio adsorbito, che corrisponde alla quantità di bario scambiato, si è accertato il valore della capacità di scambio cationico.

I reagenti preparati per questa determinazione sono:

- Soluzione di ammonio idrossido [30% ( $\rho=0,892$ )];
- Soluzione ( $1 \text{ mole} \times \text{L}^{-1}$ ) di acido cloridrico preparata aggiungendo in un matraccio tarato da 1000 mL, 400 mL di H<sub>2</sub>O ultra pura, 83 mL di acido cloridrico (HCl) [37% ( $\rho= 1,186$ )]. Si è mescolato e, dopo il raffreddamento, si è portato a volume con H<sub>2</sub>O ultra pura;
- Soluzione di bario cloruro tamponata a pH 8,2 preparata trasferendo in un becher da 1000 mL, contenente 800 mL di H<sub>2</sub>O ultra pura, 100 g di bario cloruro (BaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) e 22,5 mL di trietanolamina [N(CH<sub>2</sub>OHCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>] [98%( $\rho=1,124$ )]. Si è agitato fino a completa solubilizzazione del sale e si è portato il valore di pH a 8,2 per aggiunta della soluzione ( $1 \text{ moli} \times \text{L}^{-1}$ ) di acido cloridrico. La soluzione è stata poi trasferita in matraccio tarato da 1000 mL e portata a volume con H<sub>2</sub>O ultra pura;
- soluzione ( $5 \text{ cmoli} \times \text{L}^{-1}$ ) di magnesio solfato preparata sciogliendo in H<sub>2</sub>O ultra pura, in un matraccio tarato da 1000 mL, 12,324 g di magnesio solfato (MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O) e portando a volume con H<sub>2</sub>O ultra pura;
- soluzione ( $2,5 \text{ cmoli} \times \text{L}^{-1}$ ) di sale bisodico dell'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) ottenuta sciogliendo sempre in H<sub>2</sub>O ultra pura, in matraccio tarato da 1000 mL, 9,305 g di sale bisodico dell'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) e portando a volume con H<sub>2</sub>O ultra pura;
- soluzione tampone a pH 10 ottenuta sciogliendo in un matraccio tarato da 1000 mL, contenente 500 mL di H<sub>2</sub>O ultra pura, 54 g di ammonio cloruro. E' stato aggiunto 350 mL di soluzione di ammonio

idrossido [30% ( $\rho=0,892$ )] e portato a volume sempre con H<sub>2</sub>O ultra pura;

- indicatore preparato omogeneizzando, in un mortaio di porcellana, 20 g di sodio cloruro e 0,2 g di nero eriocromo T (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>S).

La procedura è stata condotta nel seguente modo: si sono trasferiti 2 g del campione di terra fine in un tubo da centrifuga da 50 mL con tappo a vite ed è stata misurata la massa del tubo più quella del campione (peso A). Si sono aggiunti 25 mL della soluzione di bario cloruro (BaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) tamponata pH 8,2 e si è lasciato agitare per un'ora. Dopo aver centrifugato a 5000 giri x 6 minuti si è ripetuto il trattamento altre due volte eliminando ogni volta il surnatante.

Il campione è poi stato lavato con 25 mL di H<sub>2</sub>O, centrifugato, e, dopo avere scartato il surnatante, è stata misurata nuovamente la massa del tubo più quella del campione (peso B).

Successivamente si è prelevato con buretta di precisione e trasferito nel tubo da centrifuga 25 mL della soluzione (5 cmoli x L<sup>-1</sup>) di magnesio solfato. A questo punto la soluzione è stata tenuta in agitazione per 2 ore ed infine centrifugata sempre a 5000 giri per 6 minuti.

Si è prelevato e trasferito in matraccio conico di Erlenmeyer da 250 mL, 10 mL della soluzione limpida, sono stati aggiunti 100 mL di H<sub>2</sub>O ultra pura, 10 mL della soluzione tampone a pH 10 ed una punta di spatola di indicatore.

Si è preparata la soluzione della prova in bianco trasferendo in matraccio conico di Erlenmeyer da 250 mL, 100 mL di H<sub>2</sub>O ultra pura, 10 mL della soluzione (5 cmoli x L<sup>-1</sup>) di magnesio solfato, 10 mL della soluzione tampone a pH 10 e una punta di spatola dell'indicatore.

E' stata titolata infine la soluzione della prova in bianco e quella del campione con la soluzione (2,5 cmoli x L<sup>-1</sup>) di EDTA fino a colorazione azzurra.

La capacità di scambio cationico (CSC) viene espressa in millequivalenti per 100 g di suolo ( $\text{meq} \times 100 \text{ g}^{-1}$ ), con una cifra decimale.

Per il calcolo è stata utilizzata la formula:

$$C = \frac{(V_B - V_T) \times 0,25 \times (25 + B - A) \times 2}{m}$$

che deriva da

$$C = \frac{(V_B - V_a) \times M \times 1000}{m \times 1000} \times \frac{25}{10} \times \frac{(25 + B - A)}{25} \times 2$$

dove:

C = capacità di scambio cationico, espressa in  $\text{meq} \times 100 \text{ g}^{-1}$ ;

VA= volume della soluzione di EDTA utilizzato per la titolazione della soluzione del campione, espresso in millilitri;

VB= volume della soluzione di EDTA utilizzato per la titolazione della soluzione della prova in bianco, espresso in millilitri;

A= massa del tubo da centrifuga più il campione, espressa in grammi;

B= massa del tubo da centrifuga più il campione dopo saturazione con soluzione di bario cloruro e lavaggio con  $\text{H}_2\text{O}$ ;

25 mL/10 mL = rapporto volumetrico;

M= concentrazione della soluzione di EDTA, espressa in  $\text{cmol} \times \text{L}^{-1}$ ;

m = massa del campione utilizzata, espressa in grammi.

### *Determinazione delle basi scambiabili (Ca, Mg, K e Na)*

Per la determinazione delle basi scambiabili sono state preparate le soluzioni di bario cloruro a pH 8,2 e quella di acido cloridrico seguendo la stessa procedura utilizzata per la capacità di scambio cationico quindi sono stati trasferiti in un tubo Falcon da 50 mL 1,25 g di terra fine a cui sono stati aggiunti 25 mL della soluzione di bario cloruro a pH 8,2. Il tutto è stato mantenuto in agitazione per un'ora e tutti i campioni sono stati centrifugati a 4000 giri per un minuto per procedere alla successiva diluizione 1:10 per la lettura all'ICP. Per ogni campione è stata preparata la rispettiva replica.

### *La strumentazione impiegata per le analisi: CNS (VARIO MACRO, ELEMENTAR) ed ICP/OES*

L'analisi per la determinazione del carbonio organico ed inorganico, azoto e zolfo è stata realizzata anche con il CNS (VARIO MACRO, ELEMENTAR) il cui funzionamento si basa sul metodo Dumas (1831). 300 mg di terreno setacciato a 500 µm sono stati pesati in capsule di alluminio che sono state chiuse e introdotte automaticamente nello strumento dopo eliminazione dell'aria. Nello strumento avvengono le seguenti reazioni: a livello del tubo di combustione le alte temperature (1150 °C) e la presenza di O<sub>2</sub> (30 mL/min per 30" e 100 mL/min per 120") portano all'incenerimento del campione. Grazie anche al successivo passaggio su catalizzatore nel tubo di post combustione (contenente CuO e Pt come catalizzatore) si ha una completa ossidazione del campione con la trasformazione di tutte le sostanze organiche e inorganiche in prodotti gassosi (NO<sub>x</sub>, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>). Questi sono trasportati da un flusso di He, utilizzato come gas carrier, fino al detector. La separazione di NO<sub>x</sub>, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, resa necessaria dall'utilizzo

di un detector a conducibilità termica non specifico, è effettuata “bloccando” la CO<sub>2</sub> e la SO<sub>2</sub> per adsorbimento a livello di specifiche colonne riscaldabili mentre i NO<sub>x</sub> vengono rilevati dal detector (primo picco). In seguito la colonna della CO<sub>2</sub> è riscaldata a 230 °C provocando la liberazione del composto che può essere quindi rilevato dal detector (secondo picco). Segue il riscaldamento della colonna della SO<sub>2</sub> a 210 °C che rilascia la molecola che, rilevata dal detector, produrrà il terzo picco. La quantificazione è effettuata grazie alla creazione di una apposita retta di calibrazione generata dall'impiego di sulfanilamide (N= 16,23%; C= 41,62% e S= 18,61%). Il valore di C ottenuto rappresenta il carbonio totale al quale va sottratto il Carbonio Inorganico misurato tramite analisi elementare del campione trattato in muffola a 600 °C per 3 ore. Dopo tale passaggio tutta la sostanza organica è stata distrutta e resta solamente il carbonio inorganico (calcare). La differenza tra il carbonio totale e il carbonio inorganico fornisce il dato relativo al carbonio organico. Moltiplicando il valore del carbonio organico ottenuto per il fattore 1,724 si ottiene il corrispondente valore percentuale della sostanza organica.

Per la determinazione delle basi scambiabili e degli elementi nutritivi contenuti nelle foglie è stato utilizzato invece uno spettrometro ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*, SPECTRO CIROS VISION (Spectro Analytical Instruments, Kleve D). Lo strumento permette di rilevare assialmente e simultaneamente con precisione e sensibilità variabile tutti gli elementi compresi tra litio e uranio ad eccezione di ossigeno, fluoro, gas nobili. La parte caratterizzante lo spettrometro ad emissione atomica di plasma è il plasma stesso che è costituito da gas Argon ad elevato grado di ionizzazione e ad elevatissima temperatura (da 6000 a 8000 °C a seconda dell'analisi), prodotto dalla ionizzazione del gas che viene

continuamente flussato all'interno del sistema. L'ICP è costituito da quattro parti:

- Sistema di introduzione campione. Il campione liquido è aspirato dalle provette attraverso una pompa peristaltica la cui azione è congiunta con un nebulizzatore. Il liquido sfoga all'interno della camera di nebulizzazione. Lo scopo è quello di trasformare la soluzione del campione e l'Argon in un aerosol formato da goccioline con diametro inferiore a 10  $\mu\text{m}$ . I nebulizzatori e le camere di nebulizzazione possono essere molto diverse a seconda delle esigenze dell'analisi (precisione, tipo di campione, volume, etc.).
- Generatore di radiofrequenza e torcia: una corrente elettrica di radiofrequenza a 27,12 MHz crea un campo magnetico che passa lungo l'asse della torcia nella quale l'energia prodotta dal generatore si trasferisce dagli elettroni al gas e per collisione il gas si riscalda. L'innesco del plasma è garantito da un iniettore e il plasma è confinato all'interno della torcia da un sistema magnetico toroidale. Si ha così una specie di "noce" di plasma dove viene iniettato l'aerosol contenente il campione. L'azione del campo magnetico prodotto dal generatore di radiofrequenze riscalda il plasma eccitando gli atomi degli elementi da analizzare. Questi atomi, ritornando allo stato d'energia inferiore, emettono radiazioni spettrali (spettri di emissione). La torcia inoltre è raffreddata da più flussi di Argon per impedire rotture.
- Banco ottico e rilevatori: le radiazioni emesse vanno a collimare su un sistema fisso di 2 reticoli di diffrazione che provvedono a separarle a "ventaglio" tra 125 e 770 nm. I fasci monocromatici separati sono inviati in modo diretto su 22 rivelatori a semiconduttore CCD disposti e fissati a semicerchio (cerchio di Rowland). La radiazione primaria quindi viene analizzata in modo simultaneo senza perdita di energia. In questa maniera si possono determinare contemporaneamente gli elementi su

tutte le loro righe di emissione. Il cuore del sistema di lettura è rappresentato dai rilevatori CCD attraverso i quali è possibile misurare in continuo tutte le lunghezze d'onda comprese tra 125 e 770 nm. Nel caso particolare dell'ICP utilizzato, il rilevatore è costituito dall'unione di due reticoli di diffrazione ad alta risoluzione Paschen-Runge che permettono di ovviare agli inconvenienti che solitamente sono associati all'utilizzo della tecnologia CCD. Il segnale in arrivo al CCD è rielaborato sul CCD stesso, inviato a 3 schede elettroniche sull'ICP e quindi, una volta "pulito", inviato al PC che controlla lo strumento con protocollo TCP/IP, lo stesso usato nelle reti intra/internet.

- Software: il controllo del sistema è affidato ad un computer che, attraverso uno specifico programma, permette di rendere lo strumento più facilmente utilizzabile e di ridurre in molti casi l'intervento dell'operatore alla sola scelta e ottimizzazione del metodo.

Per procedere all'analisi dei campioni è stato necessario scegliere la lunghezza o le lunghezze d'onda più opportune (ogni elemento emette a più frequenze). La scelta delle linee relative è stata effettuata in modo tale da evitare che il picco di emissione di ciascun elemento interferisse con i picchi di altri elementi con emissioni su frequenze simili. I campioni inseriti all'interno dei tubi Falcon venivano prelevati attraverso un autocampionatore che consentiva di automatizzare tutto il procedimento analitico. Ogni dieci campioni è stato inserito uno standard di controllo con tolleranza +/- 10%. Prima della lettura di ciascun campione, lo strumento provvedeva al lavaggio del sistema attraverso l'aspirazione e il flussaggio di acqua demineralizzata per 30 secondi attraverso tutte le parti della macchina a contatto con il campione seguito dall'aspirazione e il flussaggio del campione per 60 secondi.

### **3.3 Analisi microbiche del suolo**

#### **3.3.1 Analisi biodegradativa della sostanza organica**

Un nuovo metodo per ottenere informazioni sul tipo e sull'attività dei microrganismi presenti nel terreno (attività biodegradative), senza dover affrontare le difficoltà di coltura e sviluppo dei microrganismi su substrati artificiali, prevede l'utilizzo di uno strumento, definito fertimetro (Patent Cooperation Treaty PCT/IB2012/001157, June 13, 2012, Squartini, Concheri, Tiozzo), costituito da 3 filamenti di diverso materiale tenuti fermi agli apici da nastro adesivo con la funzione di etichetta identificativa del sito di posizionamento (Figura 4).

Le fibre costituenti i filamenti utilizzati durante questa sperimentazione sono di natura vegetale (cotone) e animale (lana e seta); l'utilizzo di questi substrati ha consentito la valutazione delle attitudini cellulolitiche (per il cotone) o proteolitiche (per lana e seta) delle popolazioni microbiche presenti nei suoli analizzati.

I filamenti impiegati in questa tesi sono:

COTONE: Tre Stelle, n. 16, colore bianco;

LANA: Lane Monterosa, lana merino, zephir 2/25, colore giallo;

SETA: Tre Stelle, Bozzolo Reale, titolo n24, colore celeste 342.



Figura 4. Filamenti impiegati per la stima dell'attività dei microrganismi presenti nel suolo (attività biodegradative).

Per poter valutare eventuali limitazioni alla vita microbica legate alla bassa concentrazione o alla mancanza di alcuni macronutrienti, oltre ai campioni costituiti da fili di 30 cm di lunghezza tal quali (identificati dallo scotch *giallo*), due ulteriori set sono stati impregnati con una soluzione di azoto (3 g/L di  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; scotch *rosso*) o con una soluzione contenente fosforo e potassio (6 g/L di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 3 g/L di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; scotch *verde*) (Figura 4). Il trattamento è avvenuto immergendo le fibre nelle rispettive soluzioni per 15 minuti e lasciandole successivamente asciugare all'aria. Per i fili di cotone, il trattamento con azoto risulta un arricchimento notevole rispetto al controllo (Tabella 1).

Tabella 1. Composizione percentuale in N, C, S dei filamenti non trattati e non interrati.

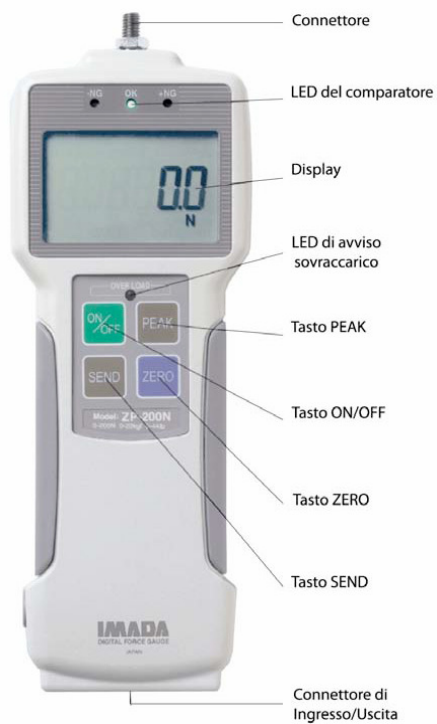
Filamento	N %	C %	S %
Cotone	0,04	41,54	0,29
Lana	14,56	44,86	0,15
Seta	16,51	45,36	0,31

Le fibre di natura proteica (lana e seta) invece si distinguono da quelle costituite prevalentemente da cellulosa (cotone) per il contenuto percentuale di azoto molto più elevato; mentre la seta e la lana differiscono tra loro per la quantità percentuale di zolfo. Infatti le fibre di seta sono caratterizzate dalla presenza di due proteine (sericina e fibrina) con una composizione aminoacidica diversa rispetto a quella della cheratina, la proteina presente nei fili di lana.

L'interramento è stato effettuato in due periodi (22 aprile 2010 e 14 ottobre 2010) e si è protratto per una settimana, trascorsa la quale si è proceduto a recuperare i fili e ad asciugarli all'aria al fine di bloccare l'attività microbica.

In ciascun vigneto studiato i filamenti sono stati posizionati in una fenditura del terreno a 20 cm dalla fila fino ad una profondità di 15 cm. Una volta inseriti si è provveduto a richiudere la fenditura operando una pressione sul terreno scalzato. In ogni vigneto sono stati posizionati in due siti 3 serie di filamenti, uno per tipo (non trattato, trattato con azoto, trattato con fosforo) per un totale di 18 filamenti interrati (2 ripetizioni x 3 trattamenti x 3 tipologie di materiale).

Per poter valutare il grado di digestione avvenuta a carico dei filamenti e quindi la degradazione che queste fibre avevano subito, sono stati confrontati i valori di rottura dei fili non interrati (Tabella 2) con quelli interrati nei vigneti. L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando un dinamometro digitale (IMADA ZP, ELIS Electronic Instruments and Systems, Roma) (Figura 5): ogni filamento è stato diviso in due parti tagliandolo rispettivamente a 3,5 cm ed a 7 cm (i valori ottenuti sono stati mediati). Ciascun filamento è stato agganciato a due anelli e quest'ultimi sono stati collegati a due ganci opposti l'uno all'altro: facendo girare una manovella si è provocato la rottura del filamento e il rispettivo valore è apparso nel display dello strumento.



*Figura 5. Dinamometro utilizzato per la misurazione della resistenza alla rottura dei filamenti e particolare del banco dinamometrico.*

Attraverso la seguente formula è stata calcolata la resistenza dei filamenti:

$$\%R = (R_i / R_{ni}) \times 100$$

dove:

%R = resistenza

$R_i$  = valore di rottura del filamento interrato;

$R_{ni}$  = valore di rottura del filamento non interrato;

A questo punto è stata calcolata anche la degradazione sottraendo a 100 il valore percentuale di resistenza.

$$\% \text{ di degradazione riscontrata} = 100 - \% \text{ Resistenza}$$

*Tabella 2. Resistenze medie di riferimento dei filamenti non interrati.*

Filamento	Resistenza (in Kg)		
	Cotone	Lana	Seta
Standard Non Trattato	2,70	0,58	2,26
Standard Azoto	3,06	0,59	2,20
Standard Fosforo	2,84	0,58	2,33

Inoltre si sono calcolati la loro deviazione standard e il coefficiente di variazione percentuale (Tabella 3).

*Tabella 3. Deviazione standard e coefficiente di variazione percentuale dei filamenti non interrati.*

Filamento	Deviazione Standard			Coeff. di variazione %		
	Cotone	Lana	Seta	Cotone	Lana	Seta
Standard Non Trattato	0,244	0,061	0,114	9,043	10,384	5,036
Standard Azoto	0,109	0,080	0,102	3,550	13,660	4,651
Standard Fosforo	0,181	0,065	0,137	6,380	11,118	5,873

### **3.3.2 Messa a punto di un metodo automatizzato di estrazione di DNA da suolo**

#### *Campionamento e conservazione*

Per lo studio delle diverse metodologie e la messa a punto di un nuovo protocollo di estrazione automatizzata di DNA da suolo sono stati utilizzati differenti tipi di suolo:

- 1- un campione di suolo trattato con urea per favorire la crescita dei batteri nitrificanti (A);
- 2- un campione di suolo coltivato a prato (P);

- 3- un campione di suolo coltivato a frutteto (SF);
- 4- due tipi di torbe inoculate con specie batteriche patogene (To1 e To2);
- 5- due substrati colturali commerciali per giardinaggio (S1 e S2);
- 6- un campione di suolo impoverito derivato dalla azienda Landlab (T);
- 7- un campione di suolo boschivo (B);
- 8- un campione derivato da un Rain Garden attivo presso Agripolis (R);
- 9- un campione derivato da un fossato (TF);
- 10- un campione derivato da una faggeta alpina (FA);
- 11- un campione derivato da una pecceta alpina nello stadio di perticaia (ER);
- 12- un campione derivato da una pecceta alpina nello stadio di maturità (VE);
- 13- un campione derivato da una pecceta alpina nello stadio di rinnovazione (RI).

I campioni di suolo sono stati utilizzati immediatamente dopo il campionamento oppure, nel caso fosse necessaria la loro conservazione, congelati a -80°C. Si è cercato di evitare il ripetitivo congelamento e scongelamento dei campioni di suolo conservati per non compromettere la qualità del DNA estratto.

#### *Protocolli utilizzati*

Per l'estrazione del DNA da suolo sono stati posti a confronto due kit per l'estrazione manuale (PowerSoil® DNA Isolation Kit - MoBio Inc. Solana Beach CA, USA e FastDNA® SPIN Kit for Soil - MP Biomedical) con un kit per l'estrazione automatizzata (BioSprint® 96 DNA Blood Kit - Qiagen).

### *Protocollo PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio)*

Il primo step del PowerSoil® DNA Isolation Kit consiste in una omogeneizzazione di 0,25 g di suolo in presenza di un *PowerBead Buffer* e di una soluzione C1. Il tampone è indispensabile per proteggere gli acidi nucleici dalla degradazione e la soluzione C1 è una soluzione di lisi contenente il detergente anionico SDS. La fase di lisi cellulare che accompagna l'omogeneizzazione è in parte meccanica, tramite il *bead beating*, e in parte mediata da agenti chimici introdotti dalla soluzione di lisi C1. In seguito ad una centrifugazione a 10.000 g per 30 secondi, si ottiene un surnatante più o meno scuro a seconda del tipo di suolo utilizzato. La componente organica e non organica come gli acidi umici, i detriti cellulari e le proteine viene efficacemente rimossa sottoponendo il surnatante a lavaggi con tamponi brevettati (*Inhibitor Removal Technology®*, IRT).

A questo punto il DNA viene purificato utilizzando degli *Spin Filters* e quindi sfruttando il forte legame che si instaura tra DNA e le membrane di silice in presenza di alte concentrazioni di sali. Il DNA legato alla membrana di silice viene successivamente lavato tramite tamponi opportuni contenenti etanolo. Infine il DNA viene eluito tramite l'impiego di tamponi privi di sali che consentono il rilascio dell'acido nucleico dalla membrana.

### *Protocollo FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedical)*

Il FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedical) richiede una quantità di suolo di 0,25g. L'omogeneizzazione e il *bead beating* avvengono in presenza dei tamponi "*MT Buffer*", "*Sodium Phosphate Buffer*" e "*Lysis Matrix E*", composta da una miscela di particelle di silice e di ceramica. I primi due tamponi evitano la degradazione del DNA e solubilizzano la

componente proteica. Segue una centrifugazione 14.000 g per 10 minuti e numerosi passaggi di purificazione del DNA che prevedono l'utilizzo di *Spin Filters* fino all'aggiunta del buffer di eluizione che comporta il rilascio del DNA dalla silice.

#### *Protocollo BioSprint® 96 DNA Blood Kit (Qiagen)*

Il BioSprint® 96 DNA Blood Kit (Qiagen) è un kit di estrazione automatizzata di DNA previsto nell'utilizzo della stazione robotizzata BioSprint 96 (Qiagen) (Figura 6). Questo kit permette di estrarre DNA da sangue, cellule in coltura e tessuti animali ed è stato preso come riferimento in questo lavoro per sviluppare un protocollo che permettesse l'estrazione automatizzata di DNA da suolo.

Tutti i passaggi del BioSprint® 96 DNA Blood Kit vengono effettuati attraverso l'uso di otto piastre da 96 pozzetti. Inizialmente 200 µL del campione da processare vengono miscelati con 20 µL di Proteinasi K e 200 µL del tampone di lisi AL, contenente SDS, EDTA e sali caotropici. Le cellule vengono lisate mediante un unico passaggio di lisi chimica, coadiuvata dall'incubazione immediatamente successiva a 70°C per 10 minuti. Si può notare l'assenza di omogeneizzazioni e lisi meccaniche tramite *bead beating*, utilizzate tipicamente in metodiche di estrazione da suolo. In questa stessa piastra, in seguito all'incubazione, verranno aggiunti 200 µL di isopropanolo e 30 µL di *MagAttract Suspension G*, una sospensione che include delle particelle magnetiche ricoperte di silice.

Nelle rimanenti sette piastre si dispongono i vari tamponi di lavaggio e in una di queste, la piastra che conterrà il DNA purificato e utilizzabile poi in varie applicazioni a valle, il tampone di eluizione.

Le particelle magnetiche interagiscono con il DNA tramite la loro copertura in silice e vengono poi trasferite in piastre contenenti soluzioni

differenti grazie all'intervento di magneti in grado di penetrare all'interno di ogni pozzetto. Le particelle magnetiche fungono da vettori di trasporto per tutti gli acidi nucleici, per questo motivo, nel caso le analisi a valle lo richiedano, l'RNA copurificato deve essere degradato tramite l'aggiunta di 4  $\mu\text{L}$  di RNasi A (100 mg/ml) per raggiungere una concentrazione finale di 2 mg/ml di enzima.



Figura 6. Stazione robotizzata BioSprint 96 (Qiagen).

#### *Variazione del protocollo BioSprint® 96 DNA Blood Kit (Qiagen)*

In questo lavoro di tesi è stata messa a punto una metodica di estrazione automatizzata di DNA da campioni di suolo, apportando delle variazioni al protocollo BioSprint® 96 DNA Blood Kit (Qiagen).

Il kit BioSprint® 96 DNA Blood sottopone il campione immediatamente ad una lisi chimica mediante proteinasi K e buffer di lisi AL contenente il detergente SDS e il chelante EDTA, e una successiva incubazione a 70°C per 10 min. La variante del protocollo elaborata in questo lavoro prevede una serie di passaggi precedenti alla lisi chimica e all'incubazione standard che sono riportati qui di seguito.

Il primo step prevede l'aggiunta di 750 µL di buffer di lavaggio in un tubo eppendorf contenente 0.25 g di suolo. Questo buffer, contenente guanidinio isotiocianato 121 mM e sodio fosfato bibasico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 181 mM, ha il compito di promuovere la dispersione delle particelle di suolo, evitare la degradazione del DNA e dissolvere parte degli acidi umici presenti.

Il secondo step comporta l'omogeneizzazione del campione diluito sottoponendolo ad un *bead beating* nell'omogeneizzatore TissueLyser (Qiagen) alla massima frequenza per due minuti. L'utilizzo del TissueLyser (Qiagen) ha lo scopo di omogeneizzare il campione di suolo diluito nel buffer di lavaggio e di compiere una prima lisi meccanica delle cellule grazie allo sbattimento di biglie di tungsteno inserite nel tubo eppendorf. L'omogeneizzazione favorisce la rottura degli aggregati colloidali liberando così le cellule microbiche per la successiva estrazione. Inoltre l'intensità del *bead beating* applicato compromette l'integrità delle pareti anche delle cellule più resistenti come i batteri Gram positivi e le cellule fungine, per i quali spesso una lisi chimica non è sufficiente.

Il terzo e ultimo step introdotto nella variante del protocollo di estrazione è stata una centrifugazione LSC (low speed centrifugation) (3000 rpm per 5 min) che separa le cellule e le particelle di suolo in base alle differenze delle loro velocità di sedimentazione. Una volta introdotti questi tre passaggi fondamentali il protocollo standard BioSprint® 96 DNA Blood può essere applicato fedelmente a partire dal surnatante ottenuto dalla centrifugazione LSC del terzo step. Sarà questo stesso surnatante infatti e non il campione totale ad essere sottoposto successivamente alla lisi chimica mediante proteinasi K, SDS, EDTA e infine all'incubazione. Il DNA estratto con i diversi protocolli è stato conservato a -20°C o utilizzato immediatamente per le analisi molecolari (PCR e ARISA).

### *Quantificazione del DNA estratto*

Per la quantificazione del DNA sono state utilizzate le metodiche PicoGreen e NanoDrop. Il reagente PicoGreen (Molecular Probes Inc.) è una sonda fluorescente che agisce da marker specifico per il DNA a doppio filamento (dsDNA) ed è alla base della tecnica di quantificazione fluorimetrica proposta da Sandaa et al. (1998). Il fluoroforo PicoGreen, infatti, aumenta la sua emissione di fluorescenza di circa 200 volte quando si trova legato al doppio filamento. L'unico accorgimento importante da tenere presente è l'eliminazione dell'RNA eventualmente presente nel campione estratto perché potrebbe interferire con il fluoroforo e influenzare di conseguenza la misurazione. Questa tecnica si addice particolarmente alla quantificazione di dsDNA estratto da suolo in quanto non è influenzata dall'interferenza degli acidi umici. Questi contaminanti, infatti, contribuiscono significativamente all'assorbanza totale a 260 nm, la lunghezza d'onda corrispondente al picco di assorbimento del DNA, compromettendo così una corretta quantificazione.

Il NanoDrop (Thermo Scientific) è uno spettrofotometro UV-VIS in grado di quantificare microvolumi di DNA. Rispetto ai normali spettrofotometri non necessita dell'uso di cuvette perché il campione viene pipettato direttamente sulla superficie di misura. La goccia di campione infatti, posizionata sull'apposita piastra di lettura, crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche. La quantificazione è ulteriormente velocizzata dalla mancanza di passaggi di diluizione del campione.

### *Polymerase chain reaction (PCR)*

La reazione a catena della polimerasi è una tecnica usata in biologia molecolare che permette di amplificare sequenze specifiche di DNA sfruttando l'attività di sintesi della DNA polimerasi. Questa reazione esponenziale richiede la presenza di due oligonucleotidi specifici, chiamati primers, che si appaiono ai due filamenti complementari del DNA stampo precedentemente denaturato fiancheggiando la regione da amplificare. Durante la fase di allungamento i primers vengono utilizzati come inneschi per avviare la polimerizzazione del DNA a partire dal DNA stampo a singolo filamento. La fase di denaturazione, annealing e allungamento vengono ripetute numerose volte e scandite da variazioni di temperatura opportunamente programmate in un termociclatore.

La reazione di PCR utilizzata per rilevare la presenza di specie fungine utilizza i primers ITS1F e ITS4 (Tabella 4) (Figura 7). La miscela di reazione era così costituita (25  $\mu$ L):

18,6  $\mu$ L di acqua sterile

2,5  $\mu$ L di 10x DreamTaq Buffer (20 mM MgCl<sub>2</sub>)

1  $\mu$ L di dNTP mix (10 mM)

0,2  $\mu$ L Forward Primer ITS1F (1 pmol/ $\mu$ L)

0,2  $\mu$ L Reverse Primer ITS4 (1 pmol/ $\mu$ L)

0,5  $\mu$ L della DNA polimerasi DreamTaq (5U/ $\mu$ L)

2  $\mu$ L di DNA

Il profilo termico per questa reazione è:

94 °C per 5 minuti

seguiti da 39 cicli a 94 °C per 1 minuto, 56 °C per 1 minuto, 76 °C per 2 minuti

e 72°C per 7 minuti.

Tabella 4. Sequenze dei primers utilizzati

Nome del Primer	Sequenza (5'→3')
ITS1 modified	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGC ACGGGGGGCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

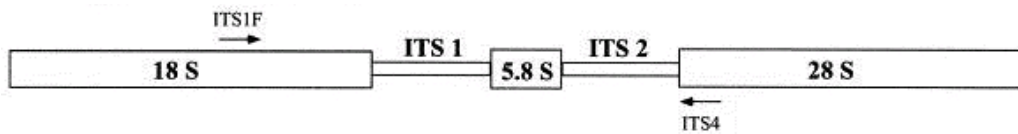


Figura 7. L'operone ribosomiale fungino composto dai geni codificanti l'rRNA 18S, l'rRNA 28S e l'rRNA 5.8S e le regione spaziatrici ITS1 e ITS2. I primers fungini ITS1F e ITS4 sono rappresentati da frecce.

La PCR è stata largamente utilizzata in questo lavoro non solo perché è alla base dell'analisi ARISA, ma anche per valutare la qualità del DNA estratto. Più la PCR si dimostra efficiente nell'amplificazione e meno il campione totale su cui agisce risulterà contaminato dai vari inibitori della DNA polimerasi presenti nel suolo. Inoltre la PCR è in grado di rilevare molto velocemente la presenza o meno di determinate specie microbiche, un fattore molto spesso dipendente dal particolare protocollo di estrazione che viene impiegato.

#### *DNA elettroforesi su gel di agarosio*

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica largamente diffusa per separare ed analizzare frammenti di DNA di differente lunghezza. Il DNA carico negativamente migra all'interno di un campo elettrico. La

velocità di migrazione degli acidi nucleici dipende dalle loro dimensioni e dalla concentrazione di agarosio del gel. Se l'obiettivo è separare DNA genomico si preferisce utilizzare gel con una concentrazione di agarosio intorno all'0.8%. Se invece la gel elettroforesi è rivolta verso l'analisi di amplificati ottenuti da una PCR, quindi frammenti di DNA molto più ridotti in dimensione, allora una corretta separazione e risoluzione delle diverse bande è ottenuta incrementando la concentrazione dell'agarosio fino all'1 - 1,5 %. Per visualizzare l'acido nucleico all'interno del gel e quindi poter seguire la sua migrazione è stato aggiunto direttamente nel gel l'intercalante etidio bromuro. Questo colorante infatti emette luce fluorescente se esposto a luce ultravioletta. Le corse elettroforetiche sono state effettuate con un voltaggio di 100V per 1 ora e 30 minuti. La DNA elettroforesi su gel di agarosio è stata utilizzata in questo lavoro di tesi principalmente come test per verificare la riuscita delle varie estrazioni di DNA da suolo e delle varie reazioni di amplificazione. E' stata inoltre fondamentale per stimare approssimativamente la qualità del DNA estratto in termini di frammentazione dell'acido nucleico.

### **3.3.3 Analisi della biodiversità microbica (analisi ARISA)**

La tecnica ARISA (*Amplified Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) è utilizzata per stimare la diversità microbica all'interno di un campione ambientale e si basa sull'utilizzo di primers marcati fluorescenti per l'amplificazione della regione intergenica ITS dell'operone ribosomale (*intergenic spacers*). I primers forward utilizzati nella PCR ARISA sono marcati al 5' con il fluorocromo fosforamidite (6-FAM) adatto per la rilevazione al sequenziatore automatico. Nell'analisi effettuata in questo lavoro di tesi l'analisi ARISA è stata effettuata solo per le comunità batteriche utilizzando i primers ITSf e ITSReub (Tabella 5).

La concentrazione di DNA da amplificare è di 10 ng, ma può aumentare fino a 300 ng a seconda del campione analizzato. La miscela di reazione comprende 1x PCR buffer, 200 µM per ogni dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µM per ogni primer e 1,5 unità di Taq DNA polimerasi, per un volume totale di 25 µL (Cardinale et al., 2004). Il profilo termico della PCR ARISA è il seguente:

94 °C per 3 minuti (initial denaturation)

seguiti da 30 cicli a 94 °C per 45 secondi (denaturation), 55 °C per 1 minuto (anealling), 72 °C per 2 minuti (elongation)

e 72°C per 7 minuti (final extension).

Gli ampliconi risultanti, una volta sottoposti a una DNA gel elettroforesi per verificare la riuscita della reazione, vengono denaturati in presenza di formammide. La denaturazione avviene all'interno di un termociclatore per 3 minuti a 95°C. La miscela di denaturazione comprende 0,6 µL di ROX, un ladder marcato con una sonda fluorescente, 18,9 µL di formammide che agisce come agente denaturante e 1 µL di DNA alla concentrazione di 1,2 ng/µL per un volume totale di 20,5 µL. Una volta denaturati i campioni sono posti subito in ghiaccio e successivamente sono introdotti nel sequenziatore che effettua un elettroforesi capillare automatizzata che garantisce un'alta riproducibilità alla tecnica. Gli ampliconi che migrano nel capillare sono rilevati da un sistema laser dipendente che riconosce la fluorescenza degli acidi nucleici marcati. Ogni rilevamento viene registrato sottoforma di picco in un elettroferogramma che alla fine della analisi verrà tradotto in un complesso profilo elettroforetico, una sorta di *fingerprinting* della struttura di una comunità microbica. La sensibilità del metodo è molto elevata grazie alla capacità risolutiva del sistema di elettroforesi capillare in grado di distinguere differenze di un solo

nucleotide. I *fingerprint* ARISA generati sono stati analizzati usando il software GeneMapper versione 4 (Life Technologies, UK).

*Tabella 5. Sequenze dei primers utilizzati per l'analisi ARISA.*

Nome del Primer	Sequenza (5'→3')	Dye
ITSF	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	6-FAM
ITSReub	GCCAAGGCATCCACC	

### **3.4 Analisi fogliare**

#### **3.4.1 Diagnostica fogliare**

All'allegagione ed all'invasatura, per ciascun vigneto, sono stati prelevati i campioni di foglie in prossimità dei punti in cui sono stati raccolti i campioni di suolo. Per ogni vigneto sono state raccolte 20 foglie, quelle opposte al grappolo: per i vigneti a Pergola veronese si sono prelevate le foglie del germoglio intermedio del capo a frutto posto al centro mentre nel Guyot sono state raccolte le foglie del germoglio inserito sul capo a frutto in posizione intermedia o mediana (Fregoni, 2009). Le foglie, dopo aver eliminato il picciolo, sono state pesate per determinare il peso fresco quindi sono state lavate con acqua ultra pura, asciugate e poste in stufa ad 80°C per 16 ore allo scopo di determinare il peso secco. Quindi è stata presa un'aliquota di foglie secche ed è stata pestellata in un mortaio dopo l'aggiunta di azoto liquido. Successivamente si è pesato 1,5 g di foglie per ogni campione ed è stata caricata la muffola a 550°C per 2 ore con tutti i rispettivi crogioli.

Le ceneri fogliari ottenute sono state inserite su tubi Falcon da 50 mL dove si è aggiunto 1 mL di HCl al 30% e portato a volume di 10 mL con acqua ultra pura; infine è stata effettuata una diluizione prelevando 1 mL dal tubo Falcon, portandolo poi a volume sempre con acqua ultra pura, per la determinazione dei contenuti degli elementi nutritivi tramite ICP/OES. Inoltre è stato effettuato un terzo prelievo in data 14 settembre per valutare il contenuto di elementi nutritivi alla maturazione in modo da poter osservare le variazioni di ciascun elemento durante il periodo estivo ma anche per avere materiale fresco per l'analisi molecolare effettuata presso il laboratorio del CRA di Conegliano Veneto. Di tutti i prelievi sono state preparate dei campioni per valutare il contenuto di azoto fogliare tramite lettura CNS.

### **3.4.2 Analisi di espressione genica**

E' stata valutata mediante analisi Real Time PCR l'espressione dei seguenti geni coinvolti nei meccanismi di difesa della vite a condizioni ambientali avverse (stress idrico-nutrizionali, fitopatie ecc.):

- Stilbene sintasi 1 (*STS1*) e Fenil alanina ammonio liasi (*PAL*): enzimi chiave della via biosintetica dei fenilpropanoidi;
- Saccarosio sintasi (*SuSy*): enzima coinvolto nella ripartizione del saccarosio;
- Fattore di trascrizione *WRKY1* (*WRKY*).

La procedura di analisi si può suddividere in 3 fasi:

#### *1) Estrazione RNA totale*

L'RNA totale è stato estratto da 100 mg di tessuto fogliare macinati in azoto liquido con l'ausilio di mortaio e pestello sterili. Per l'estrazione

dei campioni è stato utilizzato il metodo descritto da MacKenzie et al. (1997), che si avvale di una serie di colonnine contenenti un gel di silice con alta affinità per gli acidi nucleici (RNeasy kit, Qiagen, Germania). La procedura RNeasy combina le proprietà selettive dei legami della membrana di gel di silice con la velocità con la quale vengono effettuate le varie centrifughe nei diversi passaggi del protocollo. I campioni polverizzati sono stati trasferiti in tubi da 2 mL sui quali sono stati aggiunti successivamente 700  $\mu$ L della soluzione di lisi fornita dal kit. Dopo aver centrifugato il lisato per 3 minuti a 12000 rpm, il surnatante è stato trasferito in tubi da 2 mL nei quali sono stati aggiunti 700  $\mu$ L di etanolo (70%). Il campione è stato quindi inserito in minicolonne provviste di una membrana di silicio e poste all'interno di tubi di raccolta da 2 mL. La purificazione dell'RNA è stata ottenuta attraverso lavaggio della minicolonna con 700  $\mu$ L della soluzione di lavaggio fornita dal kit mediante centrifugazione per 1 minuto a 12000 rpm. Tale operazione è stata ripetuta tre volte. Il DNA contaminante è stato eliminato, tra la prima e la seconda centrifugazione, mediante l'aggiunta dell'enzima DNasi fornito dal kit. L'RNA è stato infine eluito con 40  $\mu$ L di acqua sterile e quantificato per via spettrofotometrica (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany).

## *2) Sintesi cDNA*

Per la sintesi del cDNA è stato utilizzato il kit SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, California) che consente, per mezzo di amplificazione con PCR, di ottenere cDNA a doppio filamento di alta qualità. Il protocollo adottato è stato quello suggerito dalla Clontech. Tutte le reazioni di PCR sono state condotte utilizzando il termociclatore Bio-Rad PTC-200.

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA. Per la sintesi del primo filamento è stata utilizzato l'enzima trascrittasi inversa (PowerScript™ Reverse Transcriptase, Clontech) Tale reazione si basa sulla capacità dell'enzima di sintetizzare un filamento di DNA. Questo enzima opera su un singolo filamento di mRNA, generando il DNA complementare basandosi sull'appaiamento delle basi azotate dell'RNA (A, U, G, C) con quelle del DNA (A, T, G, C).

La miscela di reazione era costituita da:

3 µL di campione di RNA

1 µL di primer 3' SMART CDS Primer II A (12 µM)

1 µL di primer 5' SMART II A Oligonucleotide (12 µM)

Dopo incubazione a 70 °C per 2 minuti, alla miscela è stata aggiunta la seguente soluzione:

2 µL di tampone

1 µL ditione di DTT (20 mM)

1 µL deossinucleotide trifosfato - dNTP (10 mM)

1 µL di trascrittasi inversa (PowerScript™ Reverse Transcriptase, Clontech).

Il tampone era costituito da: Tris-HCl pH 8.3 (250 mM), KCl (375 mM), MgCl<sub>2</sub> (30 mM). La miscela così ottenuta è stata sottoposta ad ulteriore incubazione per 1 ora a 42 °C; successivamente si è provveduto ad aggiungere il tampone TE [Tris HCl pH 8 (10mM), EDTA (1mM)] ed il campione è stato riscaldato a 72 °C per 7 minuti al fine di indurre la reazione di sintesi del cDNA a singolo filamento. L'RNA ibrido ha fornito lo stampo per la sintesi del secondo filamento, catalizzata dall'enzima Taq polimerasi (TITANIUM™ Taq DNA Polymerase, Clontech).

A 10 µL prelevati dalla reazione precedente, è stata aggiunta la seguente soluzione:

2 µL PCR Primer [5' PCR Primer II A (12 µM)]

2 µL Taq polimerasi (TITANIUM™ Taq DNA Polymerase, Clontech)

10  $\mu\text{L}$  di tampone PCR (10X Advantage 2 PCR Buffer)

2  $\mu\text{L}$  deossinucleotide trifosfato - dNTP (10mM)

74  $\mu\text{L}$  di acqua deionizzata

I campioni sono stati amplificati seguendo il ciclo di temperature riportato:

95 °C per 15 secondi

65 °C per 30 secondi

68 °C per 6 minuti

Sono stati effettuati 21 cicli di amplificazione.

Il contenuto di cDNA a doppio filamento così ottenuto è stato valutato per via spettrofotometrica (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germania).

### 3) *Real-time PCR*

La verifica della espressione genica è avvenuta utilizzando la metodologia *Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)* su cDNA a singolo filamento ottenuto dalla retrotrascrizione di RNA totale secondo la procedura precedentemente descritta. L'amplificazione è stata condotta utilizzando il kit DyNAmo™ HS SYBR® Green qPCR Kit (Finnzymes, Espoo, Finlandia). Per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la seguente miscela di reazione (30  $\mu\text{L}$ ):

1  $\mu\text{L}$  di cDNA

15  $\mu\text{L}$  di master mix fornito dal kit contenente Taq polimerasi e tampone PCR

1  $\mu\text{L}$  di Forward Primer (10  $\mu\text{M}$ )

0.5  $\mu\text{L}$  di Reverse Primer (10  $\mu\text{M}$ )

12.5  $\mu\text{L}$  di acqua sterile

I campioni sono stati amplificati secondo il seguente ciclo di temperature:

50 °C per 2 minuti

95 °C per 10 minuti

seguiti da 40 cicli a 95 °C per 15 secondi

e 60 °C per 1 minuto.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte utilizzando lo strumento 7500 Fast Real time PCR (Applied Biosystems).

#### *Allevamento delle piante in serra*

I profili di espressione genica sono stati validati in piante allevate in serra in carenza di azoto (Figura 8).

Barbatelle di vite Gargenega innestata su SO4 e Paulsen1104 sono state trapiantate in contenitori da 8 litri contenente sabbia quarzifera. I contenitori sono stati posti in serra alla temperatura di 25 °C e mantenuti per 6 mesi a partire dal 31 gennaio 2010. Su ogni contenitore è stata distribuita in maniera automatizzata a intervalli di due ore 200 mL di una soluzione idroponica areata di Arnon e Hoagland (1940) modificata per ottenere la carenza di azoto (Tabella 6). Nella tesi di controllo è stata distribuita invece una soluzione nutritiva completa. 6 piante sono state allevate per ciascuna tesi sperimentale. Per la determinazione dell'espressione genica, effettuata secondo il protocollo riportato sopra, sono state prelevate alla fine del sesto mese di allevamento 6 foglie per pianta.

*Tabella 6. Soluzione nutritiva di Arnon e Hoagland (1940) modificata.*

Macroelementi		Microelementi	
	$\mu\text{moli Litro}^{-1}$		$\mu\text{moli Litro}^{-1}$
$\text{CaCl}_2$	200	$\text{FeNaEDTA}$	10,0
KCl	200	$\text{H}_3\text{BO}_3$	4,6
$\text{MgSO}_4$	200	$\text{MnCl}_2$	0,91
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	40	$\text{ZnCl}_2$	0,086
		$\text{CuCl}_2$	0,036
		$\text{NaMoO}_4$	0,011



*Figura 8. Allevamento delle barbatelle in serra a tre mesi del trapianto.*

### **3.5 Analisi statistica dei dati**

L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando i pacchetti statistici e grafici del software Statistica 9 (StatSoft Inc., USA). La normalità dei dati è stata analizzata tramite il test di Shapiro-Wilk. Le medie sono state confrontate mediante il test di Duncan ai livelli di probabilità  $p < 0,05$ . È stata inoltre effettuata l'analisi dei componenti principali (Principal Component Analysis, PCA) mediante l'utilizzo della funzione di analisi esplorativa multivariata contenuta nel software. La PCA consente di descrivere il sistema d'interesse mediante un numero di componenti inferiore al numero di variabili misurate. Con questa analisi i siti vitati sono stati raggruppati in relazione alla loro maggiore o minore similarità per le variabili considerate. Per valutare la struttura genetica delle comunità microbiche dei siti vitati e per definire il numero di cluster presenti usando un metodo di clustering non gerarchico, basato sui dati ARISA, è stato applicato il software STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al., 2000). Dato un valore per il numero di classi, questo metodo assegna i campioni a diversi cluster. La scelta del numero di cluster ( $K$ ) più probabile viene fatta calcolando il  $\Delta K$ , basato sul tasso di cambiamento della log probability tra successivi valori di  $K$ , come descritto da Evanno et al. (2005).

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Analisi fisico-chimiche del suolo

La tabella 7 riassume i risultati relativi alle analisi dei campioni di suolo prelevati, alla profondità di 0-30 cm, nelle dieci differenti località che costituiscono l'azienda viticola.

I suoli sono caratterizzati da una ampia variabilità di pH che va da 5,6 a 8,0, da una tessitura che varia da argillosa a franco-sabbioso-argillosa e da una elevata capacità di scambio cationico (C.S.C.) con l'eccezione dei vigneti di Sottocampilonghi (franco sabbioso e C.S.C. di 14,7 meq/100 g) e Agugliana (sabbioso franco e C.S.C di 9,2 meq/100 g). Media o sufficiente è la dotazione di sostanza organica eccettuate le località Campilonghi e Sottocampilonghi dove è insufficiente (1,3%). Invece, i siti Sottocampilonghi, Campilonghi, Agugliana, Giangio, Pio Carenza e Pio Paulsen hanno evidenziato un basso rapporto C/N inferiore a 8. Ciò indica una elevata attitudine di questi suoli a una rapida mineralizzazione e impoverimento della sostanza organica con effetti negativi sulla loro fertilità. La ridotta dotazione di sostanza organica e il basso rapporto C/N potrebbero essere attribuibili non solo a cause naturali (es. fenomeni erosivi) ma anche all'impiego di pratiche agronomiche come lo scasso del suolo e/o sbancamenti. Pertanto, il rifornimento di sostanza organica e il rispetto dell'architettura biologica del suolo è sempre più considerato un pre-requisito indispensabile per l'equilibrio vegeto-produttivo del vigneto (Fregoni, 2010). Per attenuare questo processo e favorire la formazione di humus-stabile, è necessario apportare materiali ricchi di cellulosa e lignina con rapporto C/N elevato (almeno 10-20): il letame maturo può rappresentare una scelta senz'altro valida, pur essendo oggi di difficile reperimento, ma meglio

ancora sarebbe l'uso di compost derivato da residui di potatura (tralci e sarmenti), da vinacce e da paglia (Costantini, 2009).

Tutti i vigneti sono caratterizzati da dotazioni mediamente elevate di fosforo assimilabile, ad eccezione del sito Pio carenza che presenta valori di sufficienza. Buone sono le dotazioni delle basi di scambio (potassio, magnesio e calcio). Tuttavia, il rapporto Mg/K risulta subottimale ( $<2$ ) nella metà dei vigneti esaminati (Maso, Sottocampilonghi, Campilonghi, Agugliana e Pio Paulsen). I suoli hanno evidenziato dotazioni di calcare inferiori al 2,5% e, pertanto, possono essere classificati come non calcarei ad eccezione del sito di Agugliana che può essere considerato come lievemente calcareo.

*Tabella 7. Caratteristiche fisico-chimiche dei campioni di suolo prelevati alla profondità di 0-30 cm.*

Sito vitato	Produttività (t/ha)	Profondità (cm)	pH in H <sub>2</sub> O	pH in KCl	Sabbia	Limo	Argilla	Tessitura	CSC (meq/100 g)	Carbonio organico (%)	Sostanza organica (%)	N (g/kg)	Rapporto C/N	P ass (mg/kg)	K scamb (mg/kg)	Mg scamb (mg/kg)	Rapporto Mg/K	Ca scamb (mg/kg)	Calcare totale (%)
Chiarafontana	17,2	0-30	7,25	5,7	42	20	38	Franco-argilloso	29,5	1,3	2,2	0,131	9,8	47	490	2558	5,2	7993	0,33
Branco	17,9	0-30	6,92	5,37	56	14	30	Franco sabbioso-argilloso	26,7	1,7	2,9	0,131	12,8	52	613	2198	3,6	7903	0,42
Giangio	12,0	0-30	7,3	6,29	40	18	42	Argilloso	30,8	1,1	1,9	0,171	6,3	59	482	1677	3,5	10331	0,91
Pio Paulsen	10,5	0-30	7,92	6,76	52	20	28	Franco sabbioso-argilloso	22,6	1,1	1,9	0,162	7,0	28	812	1177	1,4	11750	1,82
Pio Carenza	10,6	0-30	8,03	6,85	36	20	44	Argilloso	32,1	1,1	1,9	0,166	6,6	16	859	1652	1,9	13288	2,54
Carpazi	13,5	0-30	7,29	6,2	46	22	32	Franco sabbioso-argilloso	26,1	1,3	2,3	0,154	8,7	71	611	1383	2,3	10051	0,72
Agugliana	12,5	0-30	8,04	7,02	78	15	7	Sabbioso franco	9,2	1,0	1,7	0,134	7,2	26	606	293	0,5	10960	3,93
Maso	13,9	0-30	7,18	6,04	48	18	34	Franco sabbioso-argilloso	30,7	2,0	3,4	0,155	12,9	83	917	776	0,8	4696	0,47
Campilonghi	13,2	0-30	5,61	4,08	46	21	33	Franco sabbioso-argilloso	23,8	0,8	1,3	0,162	4,8	95	610	792	1,3	3407	0,54
Sottocampilonghi	13,4	0-30	6,91	4,77	56	26	18	Franco-sabbioso	14,7	0,8	1,3	0,127	5,9	41	785	1102	1,4	4486	0,30

Nella tabella 8 sono riportati i risultati delle analisi del suolo relativi ai campioni raccolti alla profondità di 30-60 cm. Il pH, la tessitura, la C.S.C., i valori di fosforo assimilabile e quelli relativi al calcare mostrano valori simili a quelli riscontrati nella parte superiore (0-30 cm). Lo strato più profondo (30-60 cm) presenta, come atteso, dotazioni di sostanza organica, rapporto C/N e basi di scambio (potassio, magnesio e calcio) inferiori rispetto allo strato più superficiale (0-30 cm). Fra i 10 siti vitati, è da mettere in evidenza che ben 8 località (Branco, Carpazi, Sottocampilonghi, Campilonghi, Agugliana, Giangio, Pio Carenza e Pio Paulsen) mostrano una bassa dotazione di sostanza organica e un rapporto C/N subottimale inferiore a 8.

La produttività dei vigneti è risultata significativamente correlata con il rapporto C/N dei campioni di suolo prelevati sia a 0-30 cm ( $r = 0,668$ ;  $p < 0,05$ ) che alla profondità di 30-60 cm ( $r = 0,789$ ;  $p < 0,01$ ). L'alta significatività riscontrata alla profondità di 30-60 cm sta a indicare un elevato contributo di questa parte del suolo alla nutrizione e alla produttività della vite. Si conferma, pertanto, l'utilità del campionamento dei suoli fino alla profondità raggiunta dalle radici per una corretta stima della loro fertilità (Biancardi et al., 2008). Ai fini della nutrizione della vite e al miglioramento della produzione quali-quantitativa, appaiono fondamentali sia il contributo dello strato superficiale dove, grazie all'attività degradativa della microfauna e microflora, vi è l'accumulo di humus, sia dello strato profondo dove si verifica in gran misura, data la maggiore ricchezza di acqua durante i periodi siccitosi, l'assorbimento radicale dei nutrimenti (Bucelli e Costantini, 2006).

*Tabella 8. Caratteristiche fisico-chimiche dei campioni di suolo prelevati alla profondità di 30-60 cm.*

Sito vitato	Produttività (t/ha)	Profondità (cm)	pH in H <sub>2</sub> O	pH in KCl	Sabbia	Limo	Argilla	Tessitura	CSC (meq/100 g)	Carbonio organico (%)	Sostanza organica (%)	N (g/kg)	Rapporto C/N	P ass (mg/kg)	K scamb (mg/kg)	Mg scamb (mg/kg)	Rapporto Mg/K	Ca scamb (mg/kg)	Calcare totale (%)
Chiarafontana	17,2	30-60	7,31	5,7	40	20	40	Franco-argilloso	30,2	1,2	2,1	0,134	9,0	41	294	2568	8,7	7983	0,33
Branco	17,9	30-60	7,09	5,43	54	16	30	Franco sabbioso-argilloso	22,6	0,9	1,5	0,122	7,4	24	128	2098	16,4	7413	0,44
Giangio	12,0	30-60	7,45	6,18	42	18	40	Argilloso	27,0	0,6	1,0	0,132	4,5	29	145	1588	10,9	9931	0,74
Pio Paulsen	10,5	30-60	7,9	6,82	52	16	32	Franco sabbioso-argilloso	22,0	0,6	0,9	0,169	3,3	12	131	1102	8,4	11680	1,79
Pio Carenza	10,6	30-60	8,17	7,01	38	20	42	Argilloso	27,3	0,4	0,7	0,145	2,9	8	120	1392	11,6	13268	2,50
Carpazi	13,5	30-60	7,24	5,78	44	20	36	Franco-argilloso	25,0	0,7	1,1	0,128	5,2	54	254	1570	6,2	10850	0,73
Agugliana	12,5	30-60	8,06	7,1	66	21	13	Franco-sabbioso	9,5	0,3	0,6	0,144	2,2	28	127	146	1,2	11530	4,38
Maso	13,9	30-60	6,89	5,8	48	16	36	Argilloso-sabbioso	30,1	1,6	2,8	0,200	8,2	74	378	752	2,0	3897	0,59
Campilonghi	13,2	30-60	5,46	4,14	64	11	25	Franco sabbioso-argilloso	18,6	0,7	1,2	0,155	4,4	100	390	891	2,3	3827	0,64
Sottocampilonghi	13,4	30-60	6,45	4,58	54	28	18	Franco-sabbioso	12,8	0,4	0,7	0,136	2,8	40	349	1125	3,2	4526	0,31

Ad ogni sito di campionamento sono state attribuite coordinate geografiche di latitudine e longitudine al fine di posizionare ogni suolo analizzato sulla Carta Pedopaesaggistica della D.O.C. Gambellara (Tomasi et al., 2008).

In tal modo si è riusciti a confrontare i risultati delle analisi del suolo, ottenuti durante il lavoro di tesi, con la loro classe d'appartenenza che è contraddistinta da un valore numerico ed accanto a questo viene riportata una breve descrizione delle sue caratteristiche. Da questo confronto è emersa una buona corrispondenza fra i risultati analitici e le caratteristiche riportate sulla Carta Pedopaesaggistica.

Qui di seguito vengono elencati i tratti più rilevanti dei suoli oggetti di studio.

I due vigneti di pianura, *Chiarafontana* e *Branco*, hanno un'altitudine di circa 30 m e si trovano rispettivamente nella zona 15 e 16 (Carta Pedopaesaggistica dell'area D.O.C. Gambellara): sono aree a substrato costituito da alluvioni torrentizie e fluviali. Per il primo vigneto i suoli si presentano moderatamente profondi limitati da orizzonti anossici, a tessitura franco-argillosa, scheletro scarso, a reazione subalcalina, non calcarei e a drenaggio difficoltoso. Il secondo vigneto, invece, riporta le seguenti caratteristiche: suoli profondi a tessitura franco argilloso-limosa con poco scheletro, a reazione subacida in superficie ad alcalina in profondità, non calcarei in superficie e a drenaggio buono. Il terzo vigneto, localizzato in località *Giungio* ad un'altitudine di circa 150 m, ed il quinto, ovvero *Pio carenza*, ricadono nella zona 12. Anche i due vigneti denominati *Carpazi* e *Agugliana* rientrano nella zona 12: area a substrato costituito da rocce calcaree stratificate a tessitura franco sabbioso-argillosa, a reazione alcalina, a drenaggio buono e moderatamente rapido.

Il vigneto nominato *Pio Paulsen*, invece, si trova nella zona 4 cioè in un'area costituita da rocce vulcaniche (basalti e brecce basaltiche), i

terreni hanno una tessitura franco sabbiosa-argillosa, a reazione neutra, non calcarei, a drenaggio rapido con versanti moderatamente ripidi (20-30%).

Il vigneto in località *Maso*, che presenta un'altitudine di 358 m, si trova nella zona 6 interessata sempre da rocce vulcaniche (in modo particolare dal tufo), a tessitura franco sabbiosa con scarso scheletro, non calcareo e a drenaggio discreto.

Gli ultimi due vigneti, *Campilonghi* e *Sottocampilonghi*, ricadono nella zona 7 caratterizzata anch'essa da rocce vulcaniche e brecce basaltiche: i suoli sono moderatamente profondi limitati dalla roccia, a tessitura franco sabbioso-argillosa, a reazione acida - subacida, non calcarei e di buon drenaggio.

## **4.2 Analisi microbiche del suolo**

### **4.2.1 Analisi biodegradativa della sostanza organica**

La tabella 9 riporta i valori medi di degradazione (%) raggruppati per località, per materiale (cotone e seta) e per trattamento imposto (azoto e fosforo). I dati riguardanti i filamenti di lana non sono stati riportati in quanto è stata riscontrata una loro limitata degradazione in tutti i siti vitati esaminati in accordo con quanto precedentemente osservato da Marini (2010). Differenze significative ( $p < 0,05$ ) sono state rilevate fra i 10 siti di campionamento, i 2 materiali impiegati (cotone e seta) e i due trattamenti imposti ai filamenti (azoto e fosforo) rispetto al controllo. La degradazione dei filamenti di seta è risultata significativamente superiore ( $p < 0,05$ ) rispetto a quella dei filamenti di cotone. Ciò è indice di una intensa attività proteolitica della biomassa microbica (Squartini, comunicazione personale) probabilmente dovuta alla ricorrente distribuzione di letame pellettato nei siti esaminati. Questa pratica agronomica notoriamente favorisce l'instaurarsi di comunità microbiche proteolitiche piuttosto che cellulosolitiche (Florenzano, 1986).

Tabella 9. Valori medi di degradazione (%) raggruppati per tipo di filamento (cotone e seta) e trattamento imposto (C: controllo; N: azoto; P: fosforo). Lettere diverse indicano differenze significative al test di Duncan ( $p < 0,05$ ).

Sito vitato	Produttività (t/ha)	Degradazione cotone (%)			Degradazione seta (%)		
		C	N	P	C	N	P
Branco	17.9	10 a	21 a	9 a	31 a	31 a	43 ab
Chiarafontana	17.2	11 a	23 a	7 a	30 a	29 a	42 ab
Maso	13.9	-10 ab	15 ab	2 ab	27 ab	16 b	16 c
Carpazi	13.5	0 ab	5 b	-2 b	26 ab	31 a	49 a
Sottocampilonghi	13.4	-10 ab	10 b	18 a	22 b	25 ab	34 bc
Campilonghi	13.2	-6 ab	13 ab	2 ab	22 b	32 a	17 c
Agugliana	12.5	-2 ab	9 b	-1 b	23 b	26 ab	28 bc
Giangio	12.0	-18 b	10 b	-4 b	18 b	24 ab	33 bc
Pio Carezza	10.6	-10 b	-1 b	-2 b	21 b	16 b	17 c
Pio Paulsen	10.5	-13 b	9 b	1 b	20 b	12 b	19 c
<i>Media</i>	<i>13</i>	<i>-5</i>	<i>11</i>	<i>3</i>	<i>24</i>	<i>24</i>	<i>30</i>

In tabella 10 sono riportate le correlazioni dei valori di biodegradazione dei filamenti con la sostanza organica, il rapporto C/N e la produttività. La dotazione di sostanza organica a 0-30 cm risulta correlata con la degradazione del filamento di seta controllo mentre quella a 30-60 cm presenta correlazioni significative sia con la degradazione del cotone trattato con azoto che con la seta controllo. Anche il rapporto C/N a 0-30 cm risulta correlato con la degradazione della seta controllo mentre quello relativo allo strato 30-60 cm mostra correlazioni significative con la degradazione del cotone trattato con azoto e con la seta controllo. La produttività è risultata correlata con la degradazione del cotone e della

seta nelle tesi controllo e del cotone trattato con azoto. I coefficienti di correlazione più elevati sono stati rilevati fra il rapporto C/N a 30-60 cm con la degradazione della seta nella tesi controllo.

*Tabella 10. Correlazioni tra attività microbica (% di degradazione dei filamenti), sostanza organica, rapporto C/N e produttività (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns: non significativo).*

	Degradazione cotone			Degradazione seta		
	Controllo	Azoto	Fosforo	Controllo	Azoto	Fosforo
Sostanza organica (0-30 cm)	n.s.	n.s.	n.s.	0,650*	n.s.	n.s.
Sostanza organica (30-60 cm)	n.s.	0,667*	n.s.	0,706*	n.s.	n.s.
Rapporto C/N (0-30 cm)	n.s.	n.s.	n.s.	0,747**	n.s.	n.s.
Rapporto C/N (30-60 cm)	n.s.	0,733**	n.s.	0,803**	n.s.	n.s.
Produttività	0,774**	0,697*	n.s.	0,792**	n.s.	n.s.

Dall'analisi complessiva di questi risultati, appare che la degradazione sia della seta che del cotone possa diventare un utile indice della fertilità del suolo.

In Figura 9 è riportata l'analisi dei componenti principali (PCA) effettuata sui parametri fisico-chimici e microbiologici (attività degradativa dei filamenti) dei suoli esaminati. L'analisi ha consentito di ottenere una buona discriminazione dei siti vitati. Fra i parametri che hanno il maggior potere discriminante vi è la produttività, la capacità degradativa dei filamenti, la sostanza organica e il rapporto C/N. Pertanto, i siti più produttivi Branco e Chiarafontana sono raffigurati più a destra e facilmente distinguibili rispetto a quelli meno produttivi come Pio Paulsen e Pio Carenza.

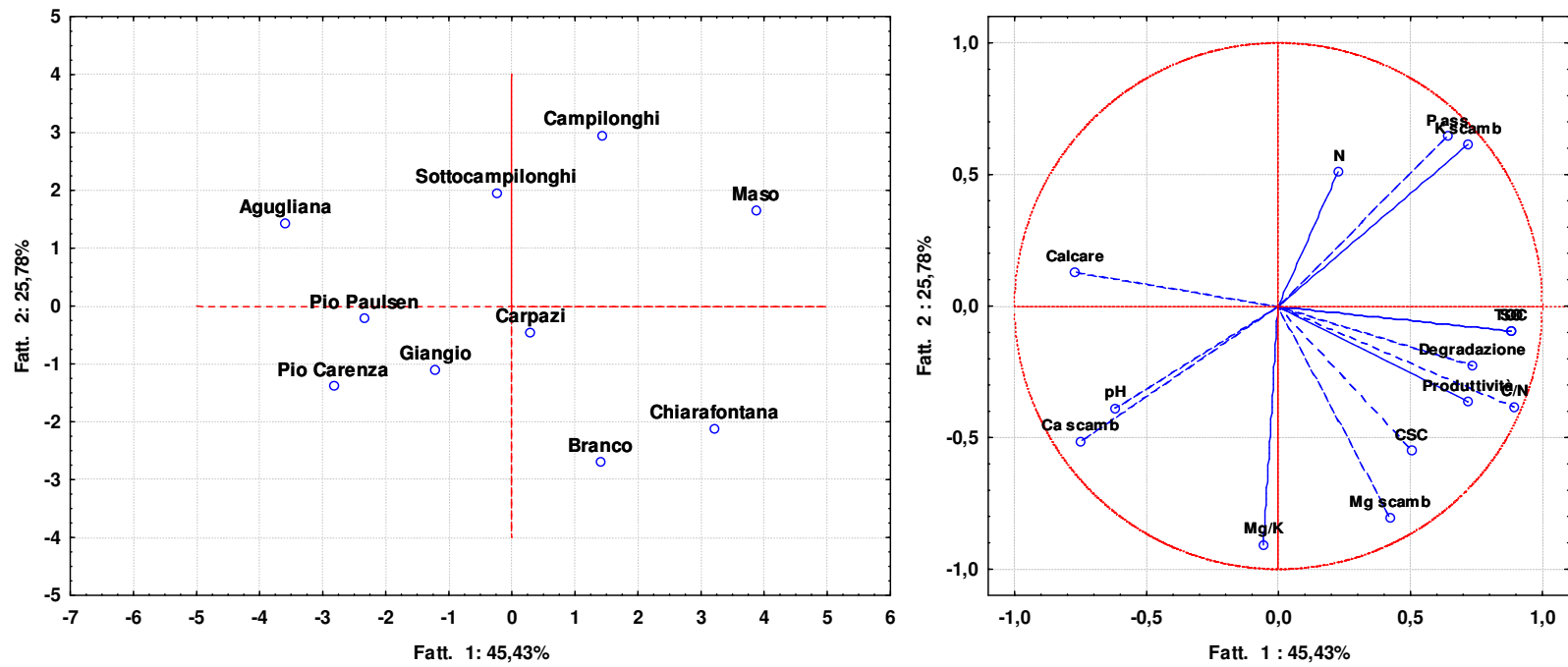
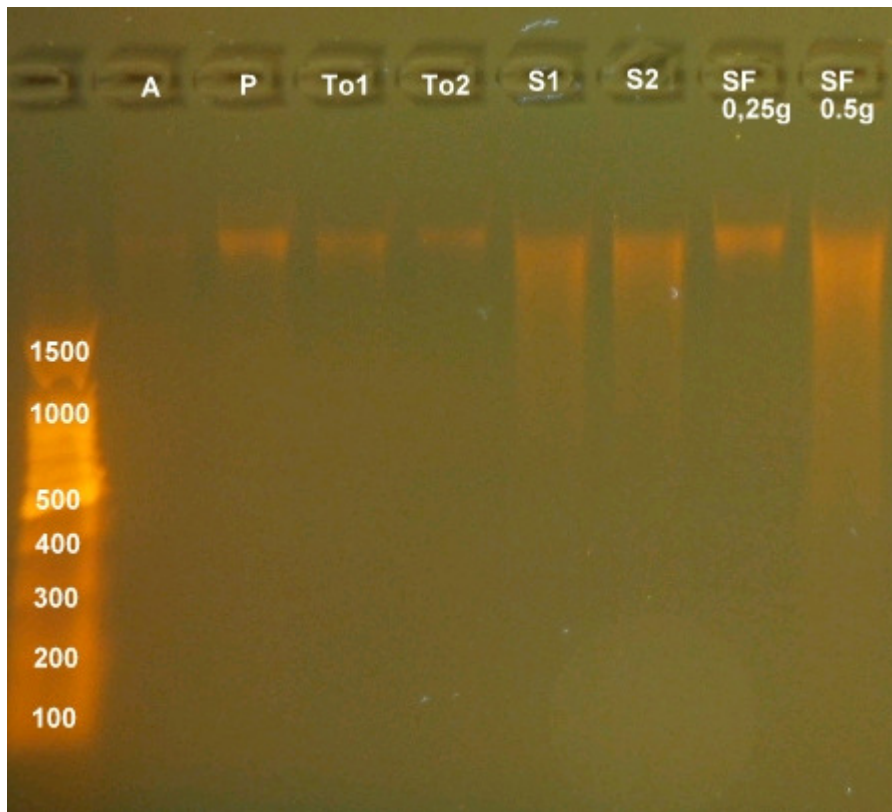


Figura 9. Analisi dei componenti principali effettuata sui parametri fisico-chimici e microbiologici (dati fertimetri) dei suoli esaminati.

#### **4.2.2 Messa a punto di un metodo automatizzato di estrazione di DNA da suolo**

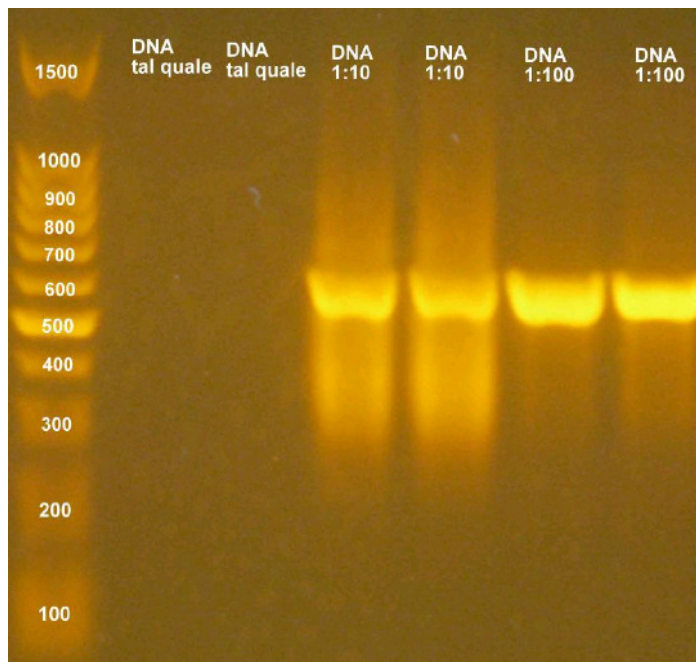
Le modifiche apportate nelle fasi iniziali della metodica di estrazione automatizzata BioSprint® 96 DNA Blood (Qiagen) hanno consentito di estendere la capacità estrattiva del metodo anche a campioni di suolo. La qualità del DNA estratto da diversi tipi di suolo (suolo trattato con urea per favorire la crescita dei batteri nitrificanti, suolo coltivato a prato, suoli ad alto contenuto di sostanza organica come le torbe, substrati colturali per giardinaggio e suoli coltivati a frutteto) è stata valutata attraverso gel elettroforesi. La variante del protocollo automatizzato è stata in grado di estrarre con successo DNA proveniente da tipi molto differenti di suolo, seppure con rese diverse. La tipologia di suolo infatti ha influenzato significativamente la qualità dell'estratto (Figura 10). In particolare, dai suoli S1 e S2 è stato ottenuto DNA con la maggiore frammentazione. Anche la quantità di materiale di partenza utilizzato per l'estrazione ha inciso sulla qualità del DNA estratto. Il campione di DNA ottenuto da 0.5 g di suolo SF infatti ha prodotto un maggiore livello di frammentazione rispetto al campione SF da 0.25 g di suolo (Figura 10).



*Figura 10. Gel elettroforesi di DNA estratto da diversi tipi di suolo tramite la variante del protocollo automatizzato.*

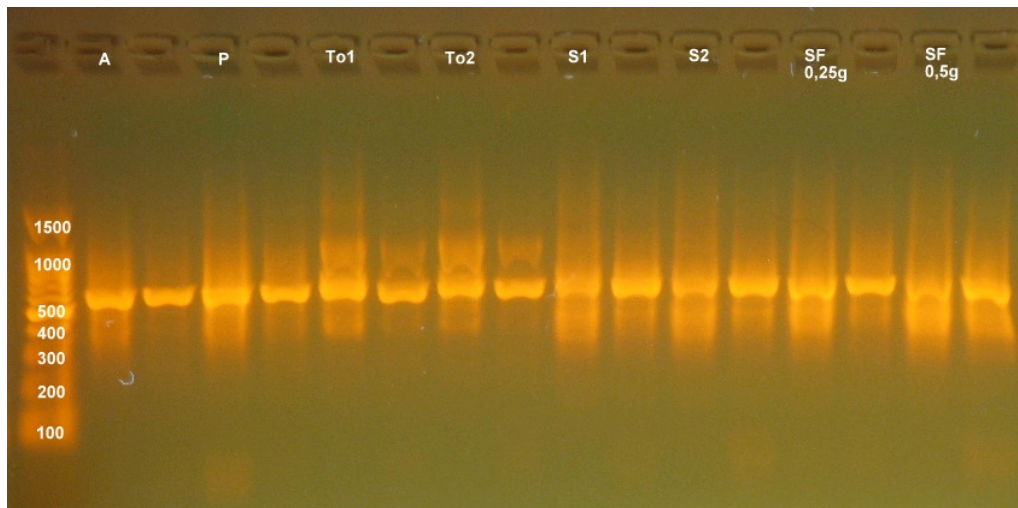
Il successo della reazione di PCR è un criterio molto comune utilizzato per valutare indirettamente la qualità del DNA estratto. A questo fine è stata effettuata una PCR di campioni di DNA provenienti da suolo SF, con lo scopo di verificarne l'amplificabilità (Figura 11). Per la reazione di PCR sono stati utilizzati i primers batterici ARISA ITSF e ITSReub e un DNA template non diluito, diluito 1:10 e 1:100. Prodotti di amplificazione sono stati ottenuti con i campioni diluiti 1:10 e 1:100. I campioni con DNA non diluito invece non sono stati amplificati. La necessità di effettuare delle diluizioni per ottenere delle amplificazioni funzionali è sintomo di una contaminazione da acidi umici (Tsai e Olson, 1992). Gli acidi umici infatti possono competere con il DNA nell'interazione con la

silice che ricopre le particelle magnetiche *MagAttract* e in questo modo vengono coestratti. Questi contaminanti che permangono dopo la fase di purificazione, chelando il cofattore  $Mg^{2+}$  indispensabile per l'attività della DNA polimerasi, inibiscono la reazione della PCR (Zhou et al., 1996). Se da un lato la diluizione del campione risolve il problema degli inibitori della polimerasi, dall'altro può portare alla perdita del DNA rappresentante le specie microbiche meno abbondanti, riducendo significativamente la sensibilità della reazione (Tsai e Olson, 1992). Pertanto, la diluizione 1:100 potrebbe non essere adatta per proseguire nell'analisi della biodiversità del suolo tramite analisi ARISA.



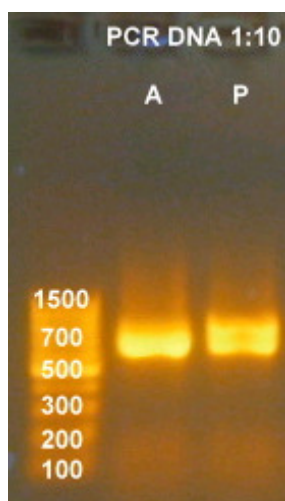
*Figura 11. Gel elettroforesi dello stesso campione di DNA estratto (variante del protocollo automatizzato) da suolo SF e amplificato in una PCR con primers ARISA ITSF e ITSReub. Prima dell'amplificazione il DNA è stato mantenuto tal quale, diluito 1:10 e diluito 1:100, sempre in doppia replica.*

La stessa reazione di PCR con primers batterici di DNA è stata effettuata nelle diluizioni 1:10 e 1:100 su altri campioni (Figura 12). I risultati di amplificazione ottenuti confermano la capacità della variante del protocollo automatizzata di estrarre DNA batterico amplificabile da diversi tipi di suolo. È stato dimostrato quindi che il diverso livello di frammentazione del DNA non influisce significativamente sull'efficienza della PCR (Figura 12). Se il DNA estratto deve essere successivamente amplificato ed utilizzato per una analisi ARISA il livello di frammentazione del DNA non è un fattore limitante quanto la quantità totale di DNA estratto (Miller et al., 1999). A tale scopo è preferibile quindi intensificare la fase di lisi meccanica nel TissueLyser, aumentando la frammentazione del DNA ma nello stesso tempo creando un pool di DNA rappresentativo della comunità microbica presente nel suolo.



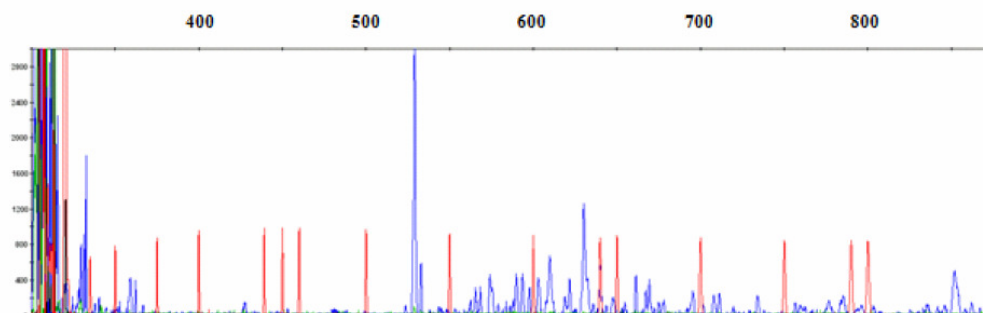
*Figura 12. Gel elettroforesi di DNA estratto da diversi suoli tramite la variante del protocollo automatizzato e in seguito amplificato in una PCR con primers ARISA ITSF e ITSReub. Prima dell'amplificazione il DNA è stato diluito rispettivamente 1:10 e 1:100 per ogni suolo.*

Successivamente, per verificare l'amplificabilità di DNA fungino nell'estratto dei suoli A e P è stata effettuata una PCR con primers ITS1F e ITS4. Nella figura 13 è riportata la corsa elettroforetica dei prodotti di PCR. Sono stati ottenuti ampliconi con la dimensione attesa (700 bp). Pertanto, è stato dimostrato che il protocollo sviluppato in questo lavoro di tesi consente di estrarre anche DNA fungino amplificabile. Questo risultato appare di particolare interesse se si considerano le difficoltà tecniche usualmente incontrate per ottenere DNA fungino da suolo. Ciò si attribuisce alla nota difficoltà di lisare la parete cellulare dei funghi (Tien et al., 1999). Inoltre, si stima che il DNA estratto dai funghi del suolo sia circa un decimo di quello batterico, il che indica una notevole difficoltà nel rilevarlo opportunamente (Harris, 1994).



*Figura 13. Gel elettroforesi di DNA diluito 1:10 estratto tramite la variante del protocollo automatizzato e in seguito amplificato tramite una PCR con primers ITS1F e ITS4.*

Un tratto caratteristico dei prodotti di amplificazioni osservati nelle figure 11, 12 e 13 è la presenza di strisciata (*smear*). L'assenza di bande ben distinte è un risultato frequente che si ottiene quando frammenti di DNA migrano a diverse velocità in base al loro peso molecolare. Spesso questo fenomeno è associato a degradazione di DNA o a contaminazioni proteiche, ma in questo caso è in accordo con il risultato atteso da una PCR ARISA. La regione *intergenic spacer* amplificata è infatti estremamente variabile in lunghezza a seconda della specie (Cardinale et al., 2004). Un campione di suolo con un'elevata diversità di specie microbiche è convertito, in seguito ad una PCR ARISA, in un pool eterogeneo di prodotti di amplificazione con diverse velocità di migrazione. L'elettroferogramma relativo al campione di DNA estratto da suolo SF mostra la presenza di picchi ARISA distinguibili in un intervallo variabile fra 400 e 800 paia di basi (Figura 14). A ogni picco corrisponde un microrganismo di una determinata specie. L'abbondanza di ciascuna specie è rappresentata dall'altezza del picco relativo. Il risultato della PCR ARISA visualizzato nella elettroforesi in gel di agarosio di figura 10, sebbene ad una risoluzione molto più ridotta, è in accordo con il profilo ARISA ottenuto in seguito al sequenziamento (Figura 14).



*Figura 14. Elettroferogramma ottenuto dall'analisi ARISA di DNA estratto da suolo SF. I picchi rossi si riferiscono al ladder marcatore di lunghezza, quelli blu al campione di DNA in esame. L'asse delle ascisse rappresenta le paia di basi (bp). A sinistra sono presenti i primers.*

Il motivo principale per cui il protocollo modificato messo a punto con il lavoro di tesi porta a dei risultati di estrazione soddisfacenti può essere individuabile nella presenza di due passaggi di lisi cellulare. In principio, una lisi meccanica direttamente nel suolo e successivamente una lisi chimica della porzione cellulare estratta. Le cellule che non vengono lisate nella prima fase all'interno della matrice suolo vengono indebolite e lisate nella fase di lisi chimica successiva. In questo modo l'efficienza di lisi cellulare subisce un forte miglioramento. I vantaggi dei due approcci di estrazione diretta e indiretta quindi si sommano con lo scopo di creare una metodica semplice e veloce in grado di estrarre DNA proveniente da comunità batteriche e fungine nello stesso tempo.

*Analisi comparativa fra la metodica automatizzata e manuale per l'estrazione di DNA da suolo*

Nel lavoro di tesi, sono stati messi a confronto tre protocolli di estrazione di DNA da suolo: la variante del protocollo BioSprint® 96

DNA Blood Kit (Qiagen), il PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio) e successivamente il FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedical). Per ciascuna metodica sono state valutate la resa di estrazione in termini sia di quantità che di qualità di DNA totale estratto. Le metodiche di quantificazione del DNA utilizzate sono state due: la prima si basa sull'utilizzo dell'intercalante fluorimetrico Picogreen (Molecular Probes Inc.) e la seconda utilizza lo spettrofotometro UV-Visibile NanoDrop (Thermo Scientific). La quantificazione del DNA con il NanoDrop mostra valori mediamente superiori rispetto a quella con la metodica Picogreen (Figura 15). Le misurazioni ottenute col NanoDrop non sono solo generalmente superiori, ma corrispondono a valori eccessivamente elevati nel caso di suoli estratti con il protocollo automatizzato (Figura 15).

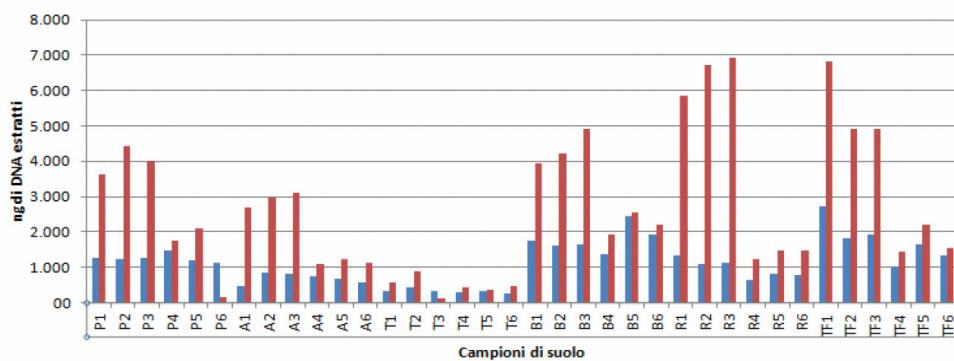


Figura 15. Quantificazione del DNA tramite la tecnica Picogreen (barre blu) e NanoDrop (barre rosse). Ad ogni lettera corrisponde un diverso tipo di suolo. Le repliche 1, 2 e 3 si riferiscono all'estrazione automatizzata mediante il protocollo BioSprint® 96 modificato e le repliche 4, 5 6 all'estrazione manuale PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio).

Questi risultati sono importanti per comprendere quanto possa essere inadeguata, nel caso di estrazioni da suolo, una tecnica di quantificazione basata sulla spettroscopia UV-VIS, come il NanoDrop. Infatti, gli acidi umici, componente spesso abbondante all'interno di campioni di DNA estratto da suolo, possono contribuire fortemente all'assorbimento totale a 260 nm. Se la stima della concentrazione di DNA nell'eluato finale viene calcolata basandosi sul valore di assorbanza a 260 nm, il picco di assorbimento del DNA, la contaminazione in acidi umici porta ad una sovrastima della reale concentrazione del DNA. La tecnica Picogreen invece non è influenzata da nessuna componente contaminante in quanto misura l'emissione di fluorescenza a 520 nm della sonda Picogreen, intercalante specifico del DNA a doppio filamento. Alla luce di ciò, la spettroscopia UV-VIS è risultata inadatta per analizzare estratti di suolo, ma si possono comunque trarre delle utili considerazioni da questi risultati. Si può, infatti, affermare che la sovrastima della concentrazione reale di DNA è tanto più alta quanto più elevata sarà la contaminazione in acidi umici. Quindi, il motivo per cui le misurazioni col NanoDrop forniscono valori così eccessivamente elevati per i campioni estratti con la procedura automatizzata è indice di una maggiore contaminazione in acidi umici dei campioni estratti con questa metodica. Per quanto riguarda la qualità del DNA estratto, il protocollo PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio) ha consentito di ottenere DNA di qualità ottimale. Infatti, i valori dei rapporti A260/A280 e A260/A230 ottenuti con questo protocollo si attestano rispettivamente attorno a 1,8 e a 1,6. Nel caso dell'estrazione automatizzata i valori di questi rapporti risultano poco informativi a causa della ragguardevole distorsione dei valori di assorbanza a 260 nm. I dati ottenuti tramite la tecnica Picogreen sono stati separati in due gruppi distinti a seconda della metodica di estrazione utilizzata. In questo modo si è potuto osservare che il protocollo automatizzato

estrae quantità di DNA non significativamente diverse da quelle del protocollo manuale MoBio (Figura 16).

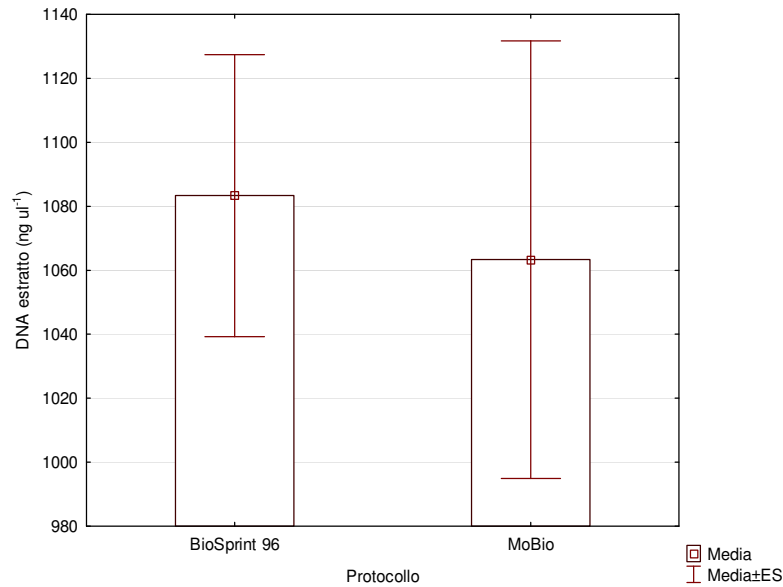
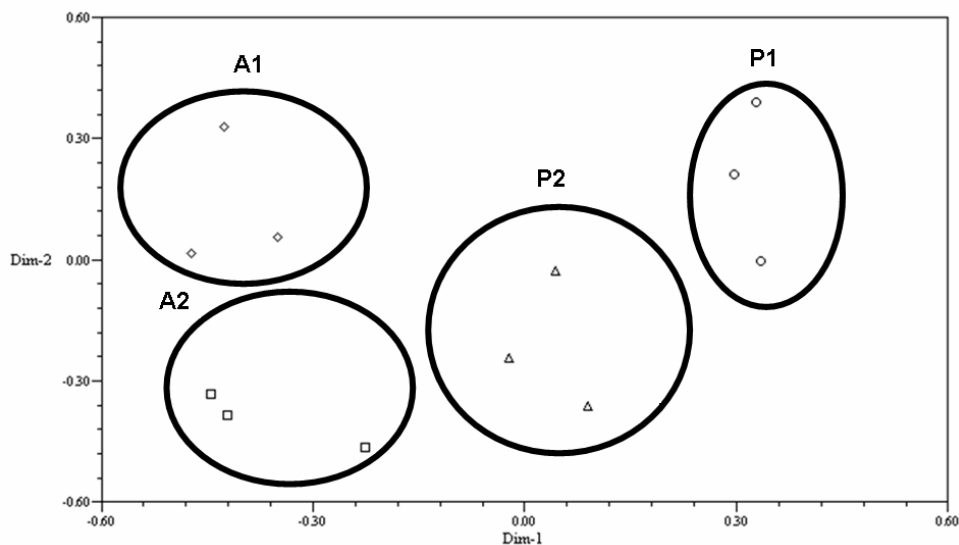


Figura 16. Quantità di DNA (ng) estratto nella metodica automatizzata e manuale.

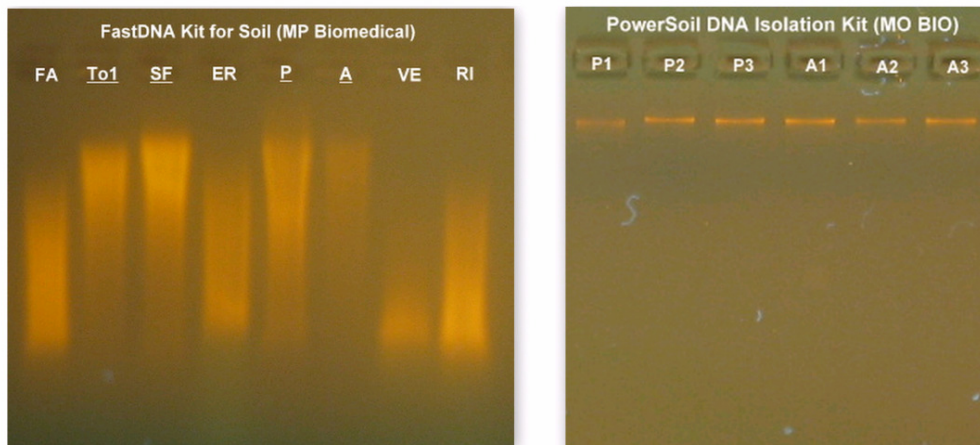
Per approfondire ulteriormente l'analisi comparativa sono state effettuate analisi ARISA di campioni di DNA estratti da suoli A e P con le due metodiche. Sono state raccolte tre repliche di suolo A e tre di suolo P. Queste stesse repliche sono state utilizzate prima per l'estrazione automatizzata e poi per quella manuale. I profili ARISA A1 e P1 rappresentano comunità batteriche derivanti rispettivamente dai suoli A e P e estratte utilizzando il protocollo automatizzato messo a punto in questo lavoro di tesi. I profili ARISA A2 e P2 derivano dagli stessi suoli A e P, ma sono stati ricavati da DNA estratto con il protocollo manuale MoBio. Come si osserva nella figura 17 i profili ARISA ottenuti sono stati messi a confronto tramite una analisi PCA (*Principal Component Analysis*). Le tre repliche dei campioni di suolo in ciascuno dei quattro casi hanno presentato delle comunità batteriche

molto simili che sono state raggruppate insieme nell'analisi PCA. Questo primo risultato dimostra che la riproducibilità del metodo automatizzato è comparabile a quella del metodo manuale MoBio. Inoltre, i campioni derivanti dal suolo P estratto tramite le due metodiche (campioni P1 e P2) hanno presentato delle comunità batteriche significativamente differenti da quelle derivanti dal suolo A. Questo dimostra che i profili ARISA ottenuti applicando la metodica automatizzata e manuale sugli stessi campioni sono risultati simili. Si può quindi affermare che la capacità del protocollo automatizzato di stimare correttamente la biodiversità batterica è paragonabile a quella del protocollo manuale.



*Figura 17. Analisi PCA di comunità batteriche ARISA derivanti dal suolo A (campioni A1 e A2) e dal suolo P (campioni P1 e P2). I numeri 1 e 2 rappresentano rispettivamente campioni di suolo estratti tramite il metodo di estrazione automatizzata e quello manuale MoBio. L'analisi è basata sul coefficiente di similarità di Jaccard.*

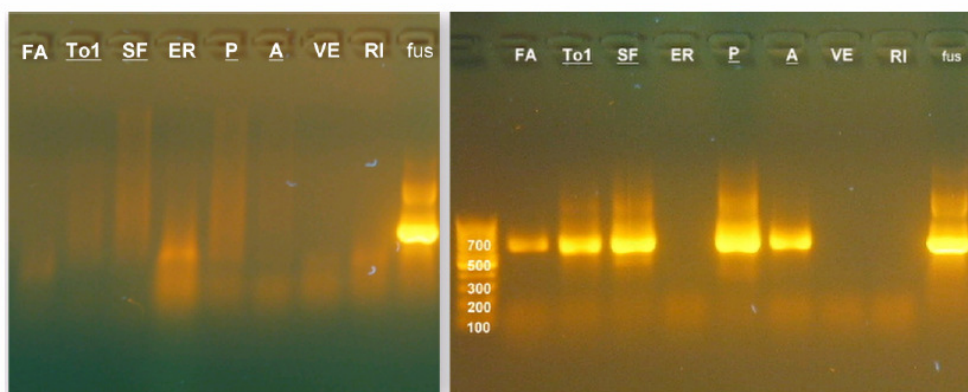
In fine i due metodi di estrazione sopra descritti sono stati messi a confronto con il metodo di estrazione manuale FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedical). Riferendosi ai campioni A e P, nella figura 17 si osserva che il DNA estratto risultante da questo protocollo mostra un livello di frammentazione più elevato sia rispetto a quello ottenuto dal protocollo automatizzato BioSprint 96 (Figura 10) che dal protocollo manuale MoBio (Figura 18). L'elevata frammentazione del DNA risultante con il FastDNA® SPIN Kit for Soil potrebbe essere legata a nucleasi ubiquitarie del suolo e/o alla fase di lisi meccanica. Il protocollo della MP Biomedical, infatti, utilizza per il *bead beating* una miscela di particelle di ceramica e silice che compiono la lisi cellulare molto più efficacemente per via delle dimensioni ridotte se confrontate alle particelle utilizzate dagli altri due metodi. Lo *smear* osservato in figura 18 potrebbe essere causato anche da una notevole quantità di contaminanti, quali proteine. Il protocollo PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio), invece, rispetto agli altri due metodi, estrae un DNA estremamente integro. Si può notare, infatti, come le bande siano uniformi e ben distinte, indice di una migliore qualità del DNA, sia in termini di frammentazione che di purezza (Figura 18).



*Figura 18. Le due immagini mostrano gel elettroforesi di DNA estratto tramite rispettivamente il protocollo FastDNA® SPIN Kit for Soil (foto a sinistra) e il protocollo PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio)(foto a destra). Quest'ultimo è stato applicato ai due campioni di suolo P e A, ciascuno replicato tre volte.*

Il protocollo della MP Biomedical se da un lato estrae grandi quantità di DNA, dall'altro ricava un DNA altamente contaminato, caratteristiche che rendono le sue prestazioni molto più simili alla metodica di estrazione automatizzata. Questa considerazione è confermata dai valori dei rapporti  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$ , che indicano una considerevole presenza di contaminanti proteici, saccaridici e umici. Il successo della reazione di PCR è stato il criterio utilizzato per valutare indirettamente la qualità del DNA estratto. Infatti, più alta è la diluizione che si rende necessaria per ottenere una corretta amplificazione e più elevata è la concentrazione di proteine e acidi umici contaminanti. Il DNA estratto dal protocollo MoBio può essere amplificato direttamente senza bisogno di diluizioni (immagine non mostrata) a dimostrazione del fatto che la rimozione delle sostanze inibitorie della PCR è molto efficace. Per il protocollo della MP Biomedical invece, del tutto

similmente a quanto già discusso per la metodica automatizzata (Figura 11), si rende indispensabile una diluizione per rendere effettiva la reazione di amplificazione (Figura 19). I campioni di DNA non diluiti infatti non sono stati amplificati, mentre nel caso della diluizione 1:30 si sono ottenuti prodotti di amplificazione delle dimensioni attese (700 bp).



*Figura 19. DNA gel elettroforesi di campioni di DNA estratti con il protocollo FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedical) e successivamente amplificati in una PCR con primers ITS1F e ITS4. Nella foto a sinistra il DNA estratto non è stato diluito prima dell'amplificazione, nella foto a destra è stato diluito 1:30. Il DNA di Fusarium (fus) è stato utilizzato come controllo positivo.*

Le modifiche essenziali introdotte nella fase iniziale del protocollo di estrazione automatizzata hanno permesso a tale metodica di poter validamente competere con i protocolli manuali già presenti in commercio. L'introduzione di uno step di lavaggio con un tampone contenente guanidinio isotiocianato e sodio fosfato bibasico ha preservato il DNA dalla degradazione e dall'adsorbimento, facilitando inoltre il suo legame alla silice delle particelle *MagAttract*. Questa variazione, insieme all'aggiunta di una ulteriore lisi meccanica precedentemente a quella chimica, ha consentito l'estrazione di un pool

di DNA il più rappresentativo possibile della comunità microbica presente in un determinato suolo. Ciò rende il protocollo automatizzato sviluppato in questo lavoro di tesi facilmente applicabile in analisi della biodiversità microbica del suolo.

#### *Analisi delle tempistiche e dei costi*

Infine, è stato messo a confronto il costo di estrazione relativamente ai materiali di consumo impiegati con le tre tecniche di estrazione. Il protocollo automatizzato è quello più vantaggioso in quanto il costo a campione è pari a 1 euro rispetto a circa 5 euro per gli altri due metodi. Inoltre, il metodo automatizzato consente di ridurre notevolmente i costi di manodopera in quanto opera su piastre da 96. Il protocollo effettua corse di durata inferiore a 30 minuti consentendo di ottenere una superiore processività di estrazione rispetto agli altri due metodi.

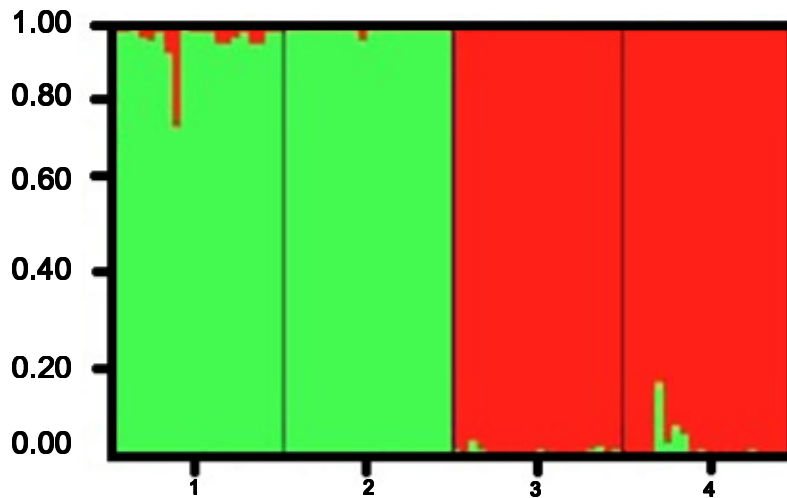
Riassumendo, il protocollo di estrazione automatizzato messo a punto in questo lavoro di tesi consente di migliorare il raggio di operatività della stazione robotizzata BioSprint 96, fino ad ora specializzata nell'estrazione di DNA da tessuti, sangue, cellule in coltura, ma non da suolo. La particolarità che rende la matrice suolo un difficile substrato per l'estrazione di DNA è l'ingente quantità di contaminanti presenti che compromettono le fasi di purificazione del DNA e inibiscono molte reazioni enzimatiche a valle. Per ovviare a queste problematiche il protocollo BioSprint® 96 DNA Blood è stato modificato introducendo all'inizio della procedura di estrazione una fase di lavaggio con un tampone sodio fosfato contenente sali caotropici e una ulteriore fase di lisi meccanica, oltre a quella prevista dal protocollo di riferimento.

I risultati dimostrano che questo protocollo automatizzato è in grado di estrarre DNA sia batterico che fungino amplificabile in tempistiche e

costi molto ridotti rispetto a metodi di estrazione di DNA da suolo presenti in commercio. Dall'analisi comparativa è risultato che il protocollo automatizzato estrae un quantitativo di DNA paragonabile a quello ottenuto con il protocollo manuale di estrazione da suolo PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio). L'unico limite del protocollo automatizzato, che lo allontana in parte dalle prestazioni di quello manuale, è la qualità del DNA estratto che appare molto contaminato in acidi umici e proteine. Questa problematica, comune anche a protocolli di estrazione manuale come il FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedical), ha risvolti negativi nelle reazioni enzimatiche a valle, ma è facilmente risolvibile effettuando diluizioni del campione di DNA estratto. E' stata infine osservata la stretta similarità di profili ARISA derivanti dallo stesso campione di suolo estratto con il protocollo automatizzato e MoBio. Questo ha dimostrato l'affidabilità della tecnica messa a punto in questo lavoro di tesi, in grado quindi di stimare la biodiversità microbica similmente ai protocolli manuali di estrazione.

#### **4.2.3 Analisi della biodiversità microbica (analisi ARISA)**

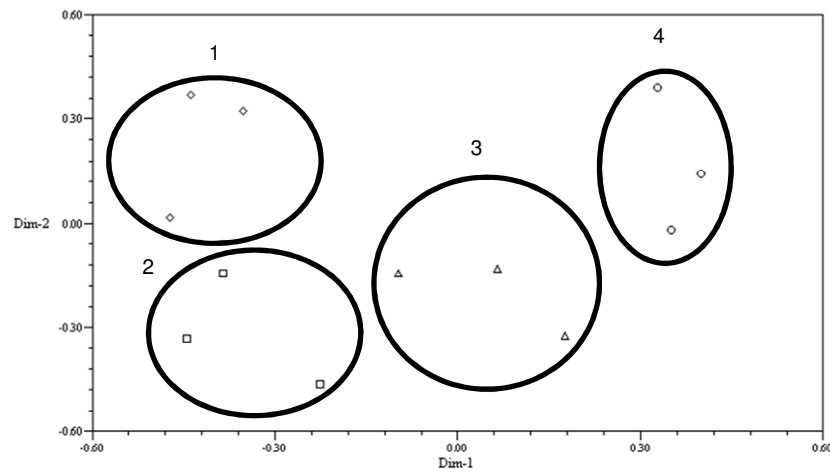
L'analisi ARISA è stata eseguita, inoltre, su campioni di DNA estratto da suolo in maniera automatizzata grazie alla messa a punto del nuovo protocollo sui siti vitati Pio Paulsen, Pio Carenza, Chiarafontana e Branco. L'analisi ha evidenziato che i siti Pio Paulsen e Pio Carenza, caratterizzati da bassa attività biodegradativa della sostanza organica, hanno una ridotta similarità genetica rispetto ai siti Chiarafontana e Branco caratterizzati viceversa da pronunciata attività biodegradativa. Inoltre, il numero di picchi ARISA, indice della numerosità delle specie batteriche presenti nel suolo, è risultato statisticamente inferiore ( $p < 0,05$ ) nei siti Pio Paulsen e Pio Carenza rispetto ai siti Chiarafontana e Branco (23 e 26 vs. 56 e 52, rispettivamente).



*Figura 20. Analisi cluster dei dati ARISA (1: Pio Paulsen; 2: Pio Carenza; 3: Chiarafontana; 4; Branco).*

Nella figura 21, sono riportati i risultati dell'analisi dei componenti principali PCA effettuata sui dati relativi alle analisi fisico-chimiche e ARISA dei suoli vitati. Entrambe le analisi hanno evidenziato raggruppamenti ben distinti fra i siti 1 (Pio Paulsen) e 2 (Pio Carenza), caratterizzati da ridotta capacità biodegradativa della sostanza organica, e i siti 3 (Chiarafontana) e 4 (Branco), caratterizzati viceversa da pronunciata attività biodegradativa degli stessi.

### PCA: Proprietà fisico-chimiche



### PCA: ARISA

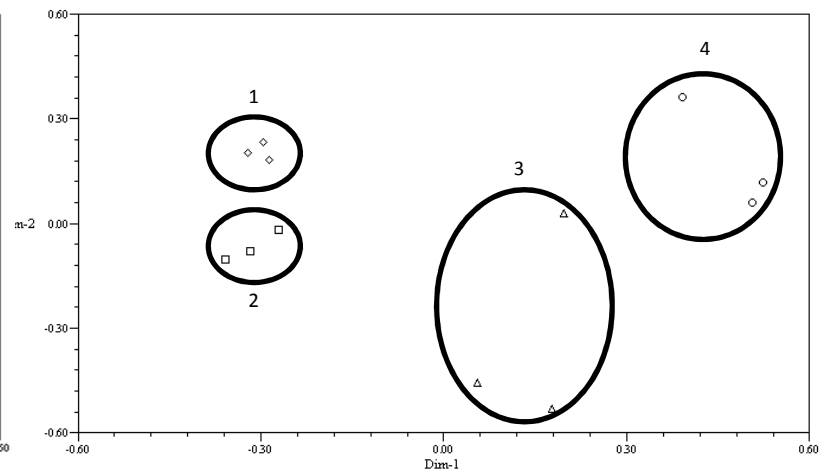


Figura 21. Analisi dei componenti principali effettuata sui parametri fisico-chimici e microbiologici (dati ARISA) dei vigneti 1 (Pio Paulsen), 2 (Pio Carenza), 3 (Chiarafontana) e 4 (Branco).

## **4.3 Analisi fogliare**

### **4.3.1 Diagnostica fogliare**

La tabella 11 mostra i risultati relativi all'analisi fogliare effettuate su campioni raccolti all'allegagione (24 giugno) e all'invaiaitura (22 luglio). Si evidenzia nella generalità dei casi:

- una buona dotazione di elementi nutritivi in entrambe le epoche di rilievo ad eccezione degli elementi boro e zinco;
- un calo dall'allegagione all'invaiaitura della dotazione dei macronutrienti azoto, fosforo e potassio e dei micronutrienti zinco e boro in accordo con quanto precedentemente osservato da Fregoni (2009).

La carenza di boro è stata rilevata in tutti i siti esaminati e in entrambe le epoche di rilievo. Tuttavia, non sono stati riscontrati sintomi visibili di boro-carenza nelle piante. Anche lo zinco mostra valori generalmente vicini alla soglia critica o subottimali come nel sito Pio Carenza all'allegagione e nei siti Chiarafontana, Sottocampilonghi e Agugliana all'invaiaitura. La bassa dotazione di zinco potrebbe essere dovuta ai pH basici e/o all'elevato contenuto di fosforo assimilabile riscontrato nei suoli (Mengel e Kirby, 2001). I contenuti fogliari di ferro risultano inversamente relazionati con il pH dei rispettivi suoli vitati (Marscher, 1995). In particolare, i siti Agugliana e Pio Carenza sono quelli che mostrano una minore dotazione di ferro nelle foglie e i maggiori valori di pH nel suolo. Fra gli interventi possibili per limitare o evitare gli effetti negativi legati alle suddette dotazioni subottimali di microelementi, vi è il ricorso alle concimazioni fogliari. Secondo Fregoni (2010), l'adozione di questo strumento consente non solo di ridurre dell'80% l'input di

fertilizzanti in vigneto ma anche di aumentare le resistenze agli stress abiotici e biotici migliorando di conseguenza la produzione e la qualità.

Tabella 11. Risultati delle analisi fogliari sui campioni raccolti all'allegazione e all'invaiaatura.

### Allegazione

Valori normali (Fregoni)		N	S	P	K	Mg	Ca	Fe	Mn	Zn	B
		%	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.	mg/kg s.s.
		1,60-2,65		1500-3800	6500-17000	1800-4500	17000-38000	65-300	50-500	20-250	20-70
Sito vitato	Produttività t/ha	N %	S mg/kg s.s.	P mg/kg s.s.	K mg/kg s.s.	Mg mg/kg s.s.	Ca mg/kg s.s.	Fe mg/kg s.s.	Mn mg/kg s.s.	Zn mg/kg s.s.	B mg/kg s.s.
Branco	17,9	2,62	1833	1660	8965	3297	27163	110	112	24	9,0
Chiarafontana	17,2	2,47	1617	1749	8764	2649	24831	117	72	28	9,0
Maso	13,9	2,90	2431	2066	9180	3962	18494	124	271	28	7,0
Carpazi	13,5	2,73	2018	1732	7898	1908	25053	112	181	27	8,0
Sottocampilonghi	13,4	2,69	2048	2068	9359	2228	18184	108	221	26	9,0
Campilonghi	13,2	2,64	1814	2184	9548	2890	15879	125	389	28	7,4
Agugliana	12,5	3,04	1980	2000	8438	2279	27441	93	179	22	9,0
Giangio	12,0	2,35	2040	2216	8558	2594	32109	153	140	29	10,2
Pio carenza	10,6	2,71	2153	1543	8792	2007	20304	97	105	19	10,1
Pio Paulsen	10,5	2,70	2087	1968	7878	2955	27689	98	126	20	10,0

### Invaiaatura

Sito vitato	Produttività t/ha	N %	S mg/kg s.s.	P mg/kg s.s.	K mg/kg s.s.	Mg mg/kg s.s.	Ca mg/kg s.s.	Fe mg/kg s.s.	Mn mg/kg s.s.	Zn mg/kg s.s.	B mg/kg s.s.
Branco	17,9	2,05	2637	1505	7824	3606	26701	112	100	21	7,6
Chiarafontana	17,2	1,75	2336	1736	8264	3132	25391	134	86	19	8,3
Maso	13,9	2,52	2315	1602	9161	3441	20255	161	262	20	7,7
Carpazi	13,5	1,97	2198	1469	8760	1855	24880	113	143	21	8,1
Sottocampilonghi	13,4	1,99	2085	1472	8392	1708	17716	106	224	18	8,7
Campilonghi	13,2	2,34	2059	1396	8228	3135	16224	106	177	22	7,9
Agugliana	12,5	2,35	2798	1732	9458	2141	28309	110	160	19	9,1
Giangio	12,0	2,07	2252	1932	7563	2889	33219	209	146	25	8,1
Pio carenza	10,6	2,18	2839	1641	10650	3178	29954	119	114	22	10,9
Pio Paulsen	10,5	2,22	3004	1812	8360	2864	25347	142	134	22	10,2

### 4.3.2 Analisi di espressione genica

Al manifestarsi di sintomi di carenza nutrizionale (clorosi fogliare), sul sito Campilonghi è stata effettuata una terza analisi fogliare in data 14 agosto 2010 utilizzando come confronto il vigneto Pio Paulsen sempre di Garganega sullo stesso portainnesto 1103 Paulsen.

L'analisi fogliare, ha evidenziato un inferiore contenuto di azoto, zolfo e zinco nelle piante del sito di Campilonghi rispetto a quelle di Pio Paulsen (Tabella 12). Questa situazione di carenza potrebbe essere attribuibile sia alla scarsa dotazione di sostanza organica che alla minore disponibilità di zolfo dovuta anche ad un suo maggiore adsorbimento ai collodi a causa del pH fortemente acido (Mengel e Kirby, 2001) e anche al deficit idrico verificatosi nel sito di Campilonghi rispetto a quello di Pio Paulsen.

*Tabella 12. Risultati delle analisi fogliari sui campioni raccolti il 14 agosto 2010.*

Sito vitato	Prod.tà t/ha	N %	S mg/kg s.s.	P mg/kg s.s.	K mg/kg s.s.	Mg mg/kg s.s.	Ca mg/kg s.s.	Fe mg/kg s.s.	Mn mg/kg s.s.	Zn mg/kg s.s.	B mg/kg s.s.
Pio Paulsen	10,5	2,38	3163	2600	14167	4540	25100	156	160	38	12
Campilonghi	13,2	1,34	1350	2103	10567	3310	17200	151	236	20	11

Pertanto, ci si è proposti di valutare nelle viti dei due siti l'espressione di alcuni geni coinvolti nei meccanismi di difesa a condizioni ambientali avverse e che potrebbero essere indici dello stato nutrizionale della vite. La figura 22 mostra i valori di espressione relativa per i quattro geni (*WRKY*, *SuSy*, *PAL* e *STS1*) esaminati rispetto al gene costitutivamente espresso gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (*GPDH*). I quattro geni mostrano valori di espressione significativamente ( $p < 0,05$ ) più alti nelle

piante campionate nel sito Campilonghi rispetto a quelli delle piante del sito Pio Paulsen.

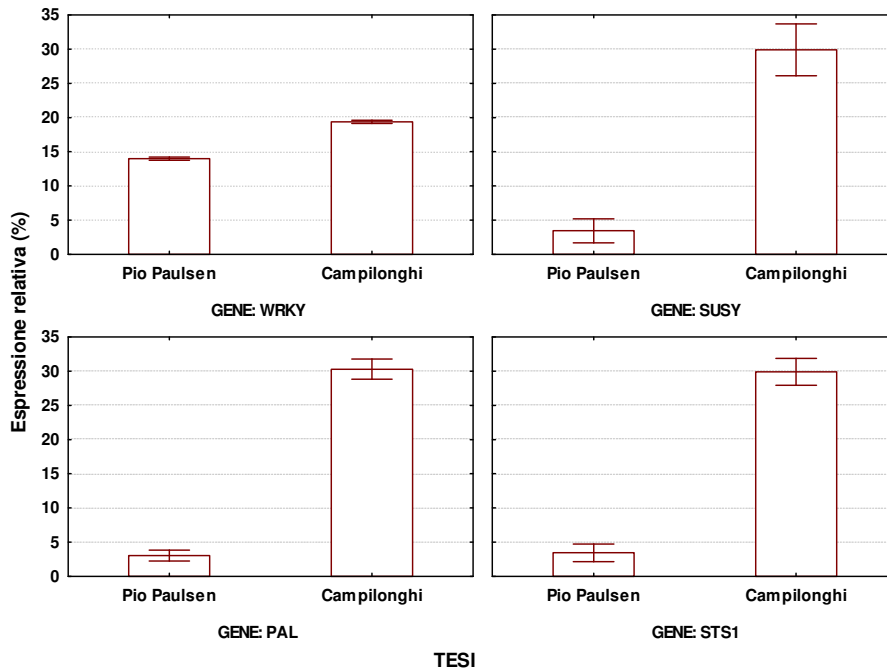


Figura 22. Espressione relativa dei geni *WRKY*, *SuSy*, *PAL* e *STS1* ottenuta mediante Real Time PCR.

Queste alterazioni di espressione genica potrebbero essere ascrivibili alle forti carenze di azoto e zolfo riscontrate. Queste modificazioni a livello molecolare potrebbero avere un ruolo cruciale nelle strategie di adattamento della vite in presenza di stress nutrizionale.

In accordo con quanto riportato da Fregoni (2010), il rafforzamento delle difese endogene della vite, a seguito di moderati stress ambientali che comportano la sovraespressione di geni che codificano per molecole di resistenza quali il resveratrolo, potrebbe contribuire all'innalzamento qualitativo dei vini. Pertanto, lo sviluppo ulteriore di questa ricerca potrebbe essere quello approfondire le relazioni fra le alterazioni

genetiche riscontrate nel vigneto di Campilonghi ed eventuali modificazioni apprezzabili a livello organolettico.

I profili di espressione genica sono stati validati in piante allevate in serra in carenza di azoto. In particolare, è stata ottenuta, mediante Real Time PCR, una significativa sovraespressione dei geni *WRKY*, *SuSy*, *PAL* e *STS1* su foglie con un contenuto di azoto inferiore del 60% rispetto alle piante di controllo.

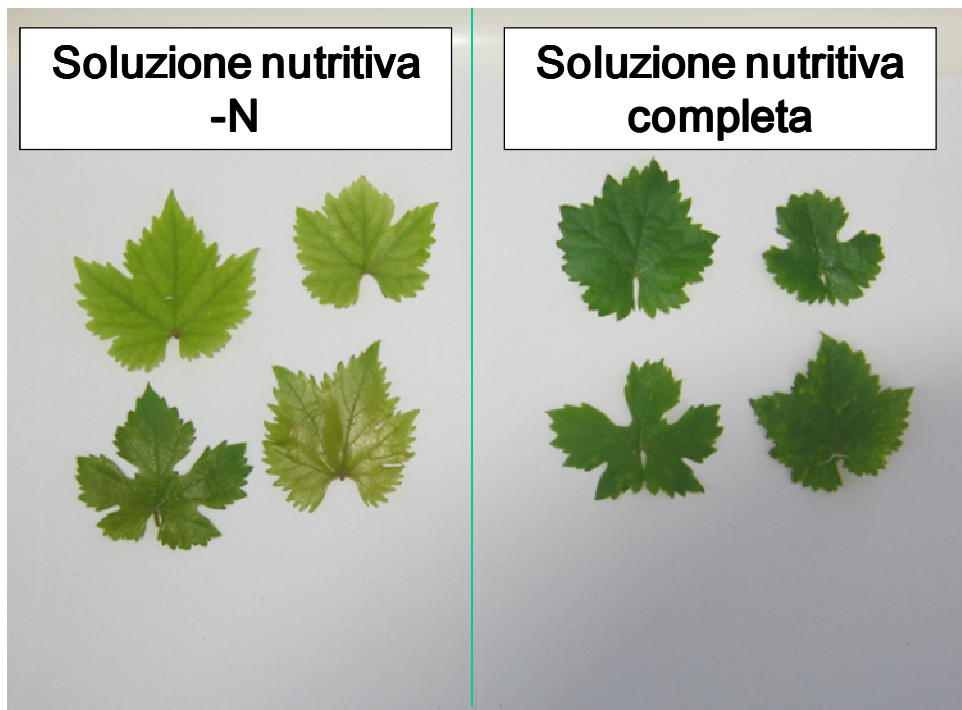


Figura 23. Sintomi di carenza nutrizionale (-N) su piante allevate in serra per la validazione dei profili di espressione genica.

## 5 CONCLUSIONI

Dall'analisi complessiva dei risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi emerge che i vigneti caratterizzati da maggiore produttività sono quelli che evidenziano valori di pH neutro, buona dotazione di sostanza organica e un adeguato rapporto C/N. Questi suoli presentano, inoltre, elevata capacità degradativa dei filamenti che si prefigura come un innovativo indice dell'attività microbica del suolo. L'analisi ARISA, eseguita sui campioni di DNA da suolo, isolato in maniera automatizzata grazie alla messa a punto di un nuovo protocollo, ha consentito di descrivere il livello di similitudine fra le comunità batteriche dei siti vitati e ha evidenziato una stretta relazione fra la capacità biodegradativa della sostanza organica determinata in base alla degradazione dei fili immessi nel suolo e la numerosità dei picchi ARISA. Sul vigneto di Campilonghi, caratterizzato da ridotta attitudine produttiva e da valori subottimali per i suddetti parametri, sono stati riscontrati sintomi a livello fogliare di carenza di azoto e zolfo associati alla sovra-espressione di 4 geni *WRKY*, *SuSy*, *PAL* e *STS1* che sembrano pertanto strettamente dipendenti dallo stato di stress fisiometabolico delle piante. In conclusione, la capacità degradativa dei filamenti e l'espressione dei suddetti geni testati sembrano essere validi indicatori dello stato nutrizionale della vite. Ci si propone dunque di approfondire lo studio di questi indicatori della fertilità del suolo in altri siti vitati.

## 6 APPENDICE

### **Caratterizzazione quali-quantitativa della risorsa idrica nella porzione superficiale del suolo, con particolare riferimento ai suoli coltivati a vigneto.**

La borsa di dottorato è stata cofinanziata dal Servizio Suoli dell'Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione Ambientale del Veneto (ARPAV) di Treviso.

L'attività di ricerca prevista dalla collaborazione con ARPAV ha comportato la partecipazione in particolare ai lavori di rilevamento pedologico per la stesura della carta dei suoli in scala 1:50.000 della provincia di Rovigo mediante l'esecuzione di rilievi (descrizione di profili e di trivellate) e la validazione di alcune pedofunzioni per la stima della permeabilità e per la determinazione del contenuto idrico dei suoli. Un primo resoconto sullo studio della permeabilità è stato pubblicato sul sito dell'ARPAV (<http://www.arpa.veneto.it>) in un elaborato (file pdf) dal titolo *Relazione\_permeabilita\_Gruppo\_Idrologico\_giu2011.pdf*.

#### *Introduzione*

Il suolo è costituito da tre fasi: i) fase solida: costituita da sostanze minerali, organiche e organismi terricoli; ii) fase liquida: rappresentata dall'acqua presente nei macro e micropori in cui sono disciolti i sali minerali; iii) fase gassosa: rappresentata dall'aria che si trova negli interstizi del terreno non occupati dall'acqua.

Le principali minacce per il suolo sono: l'erosione, la diminuzione di sostanza organica, la contaminazione, la cementificazione, la compattazione, la diminuzione di biodiversità, la salinizzazione e i rischi

idrogeologici. Tali fenomeni influenzano la dinamica dell'acqua dei suoli ed i processi chimici, fisici e biologici che si verificano nel suolo. Lo studio delle caratteristiche idriche del suolo è importante per descrivere i movimenti dell'acqua nel suolo e le relazioni suolo-pianta.

### *Attività svolta*

L'attività ha interessato uscite in campo per rilievi pedologici (profili e trivellate) nelle province di Padova, Vicenza e Rovigo, operazioni previste nel lavoro di cartografia dei suoli a scala 1:50.000. Durante queste attività sono stati prelevati campioni di terreno da sottoporre ad analisi di laboratorio. I dati raccolti sono stati inseriti nel database dei suoli del Veneto del Servizio Suoli.

La metodologia di rilevamento e cartografia dei suoli acquisita ha consentito di approfondire lo studio delle caratteristiche pedologiche delle aree interessate da suoli vitati in zona D.O.C. di Gambellara.

E' stata inoltre avviata un'attività di studio delle caratteristiche idrologiche dei principali suoli del Veneto mediante la valutazione delle misure riguardanti densità apparente, conducibilità idrica satura ( $K_{sat}$ ) e curve di ritenzione idrica raccolte in precedenza dal Servizio Suoli nelle unità tipologiche di suolo più diffuse. Per estendere la caratterizzazione idrologica a più suoli del Veneto, e in particolare dell'area D.O.C. di Gambellara, sono state valutate alcune pedofunzioni, che consentono, a partire da caratteri del suolo facilmente misurabili (tessitura e carbonio organico), l'ottenimento dei parametri idrologici suddetti la cui misura diretta risulterebbe difficoltosa e costosa.

Nell'ambito dello studio della dinamica dell'acqua e dei soluti nel suolo sono stati preliminarmente considerati alcuni modelli quali: il MACRO

per la simulazione del bilancio idrico, il SOIL-N per il bilancio azotato, il CRITERIA per la lisciviazione dei nutrienti, il PELMO (Pesticide Leaching Model) ed il SuSAP (Supplying Sustainable Agriculture Production) per la lisciviazione dei fitofarmaci.

Inoltre, sono state eseguite le prime simulazioni con il modello SuSAP Veneto per la valutazione della lisciviazione dei fitofarmaci nei suoli coltivati a vite. I primi risultati hanno evidenziato l'importanza della ricerca che dovrà essere sviluppata in futuro con specifici fondi e personale in quanto necessita di complessi approfondimenti circa l'affinamento dei dati pedologici e colturali (fitofarmaci prevalentemente distribuiti) da utilizzare.

#### *Le pedofunzioni*

In alternativa alle misure dirette di difficile esecuzione e costose, sono state sviluppate diverse pedofunzioni di trasferimento (PTF) le quali, a partire da caratteristiche rilevate routinariamente durante il rilevamento dei suoli in campagna (argilla, sabbia, carbonio organico, densità apparente), consentono di stimare la conducibilità idrica satura (Ksat) e il contenuto idrico dei suoli a diversi potenziali.

Per la stima della Ksat sono state implementate le seguenti PTF:

- CNR 2003 funzione di argilla, sabbia, carbonio organico Walkley-Black, densità apparente, elaborate da F. Ungaro del CNR a partire dai dati misurati di ARPAV;
- PTF Saxton *et al.* (1986), funzione di argilla, sabbia; *range* di validità: (sabbia 5-30% con argilla 8-58%) oppure (sabbia 30-95% con argilla 5-60%);
- PTF Brakensiek *et al.* (1984), funzione di argilla, sabbia, densità apparente, utilizzate da USDA;

- PTF Jarvis *et al.* (2002), funzione di argilla, limo, densità apparente, struttura, *thetas*, *thetar*, *PSle*, *lambda*, questi ultimi sono i parametri della curva pF.

L'affidabilità delle varie PTF è stata valutata, mediante test statistici (T-test) e il calcolo di opportuni indici di errore (*mean prediction error*, *mean square prediction error*, *standard deviation of the prediction error* and *root mean square prediction error*) (Ungaro, 2007), sia nei confronti di 59 misure dirette e sia di 475 stime d'esperto fatte sugli orizzonti delle unità tipologiche di suolo (dati forniti dal Servizio Suolo dell'ARPAV).

Tali indici sono risultati ridotti per le PTF CNR, Saxton e Brakensiek ed elevati per la PTF di Jarvis. Le PTF CNR e Brakensiek tendono a sottostimare il valore di Ksat (valore negativo di MPE), mentre Saxton a sovrastimarli.

Pertanto è stato deciso di utilizzare la PTF CNR per il *range* di tessitura: sabbia totale <50% e argilla <49%, per i suoli di pianura. Al di fuori di questo *range* è stato scelto di utilizzare la PTF Brakensiek, che non ha i limiti di Saxton nel *range* di tessiture in *input*, e, da prove fatte, fornisce ottimi risultati anche sui suoli di montagna.

### *Sviluppi futuri*

La validazione delle pedofunzioni proposte sarà oggetto di futuri approfondimenti mediante il confronto tra il rilevamento diretto dei valori di contenuto idrico misurati a vari pF su 70 orizzonti e la stima del contenuto idrico mediante l'utilizzo delle suddette pedofunzioni a partire dai dati di input di 1250 orizzonti di suolo della Regione Veneto (database Servizio Suoli-ARPAV). Importante potrà essere la valutazione, tra i vari dati di input, dell'influenza del contenuto di carbonio sul risultato delle diverse PTF.

Il completamento della ricerca porterà alla realizzazione di una cartografia tematica sulle caratteristiche idrologiche (Ksat e AWC) dei suoli veneti con particolare riferimento ai suoli vitati.

### *Bibliografia*

Brakensiek D. L., Rawls, W. J., Stephenson G. R. 1984 . Modifying SCS hydrologic soil groups and curve numbers for rangeland soils. – ASAE Paper No. PNR-84-203; St. Joseph/ Michigan.

Jarvis, N., and Stenemo.F. (2002) - Guidance document and manual for the use of MACRO\_DB V.2.0,  
<http://www.mv.slu.se/bgf/macrohtm/macro.htm>.

Saxton K. E., Rawls W. J., Romberger J. S., Papendick R. I. 1986.  
Estimating generalized soil-water characteristics from texture. Soil Sci. Soc. Am. J., 50: 1031–1036.

Ungaro, F. 2007. Considerazioni sullo sviluppo delle PTF per la stima della densità apparente in Veneto, Emilia Romagna e Toscana. Rapporto interno CNR-IRPI Firenze, 12 pp.

## 7 BIBLIOGRAFIA

- Arnon D.I., Hoagland D.R. 1940. Crop production in artificial culture solution and soils with special reference to factors influencing yields and absorption of organic nutrients. *Soil Sci.* 50:463-483.
- Balconi C., Stevanato P., Motto M., Biancardi E. 2010. Breeding for biotic stress resistance/tolerance in plants. In: Ozptuk (Ed.). Springer, New York (in stampa).
- Benedetti A., Dell'Abate M.T., Mocali S., Pompili L. 2006. Indicatori microbiologici e biochimici della qualità del suolo. In: ATLAS, Atlante di Indicatori della Qualità del Suolo, a cura di P. Sequi, A. Benedetti e M.T. Dell'Abate, CRA-Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 65-81.
- Berengo M. 1963. L'agricoltura veneta dalla caduta della Repubblica italiana all'Unità, Banca Commerciale Italiana, 38.
- Biancardi, E., R. Marchetti, P. Stevanato, A. Orsi, L. Sghedoni, Bertaggia M. 2008. La presenza di azoto profondo nei terreni bieticoli italiani. *Agroindustria* 3:185-190.
- Bolton Jr H., Fredrickson J.K., Elliot L.F. 1993. Microbial ecology of the rhizosphere. In: F.B. Metting (ed), *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, Inc. New York, NY , 27-63.
- Bolton Jr H., Elliot L.F., Papendick R.I., Bezdicek D.F. 1985. Soil microbial biomass and selected soil enzyme activities: effects of fertilization and cropping practices. *Soil Biol. Biochem.*, 17: 297-302.
- Bockelmann U., Szewzyk U., Grohmann E. 2003. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 55: 201-211.
- Botrè U. 1956. La viticoltura e l'enologia in provincia di Vicenza. *Atti Accademia Italiana della vite e del vino* Vol. VIII: 361-367.
- Bozzolo A. 2010. Influenza dell'apporto di compost sulle caratteristiche del suolo e sull'attività vegetativa e produttiva della vite in vigneti dei Colli Euganei. Tesi di Dottorato di ricerca in Viticoltura,

enologia e marketing delle imprese vitivinicole, XXII Ciclo,  
Università degli Studi di Padova.

- Bucelli P., Costantini E. 2006. Vite da vino e zonazioni vitivinicole. In: Costantini E. (ed.), *Manuale di valutazione dei suoli e delle terre. Collana di Metodi analitici per l'agricoltura diretta da Paolo Sequi*, vol. 7. Edizioni Cantagalli, Siena, 519-577.
- Bürgmann H., Pesaro M., Widmer F., Zeyer J. 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J. Microbiol. Methods*, 45: 7-20.
- Buschan G. 1895. Viti fossili e viti preistoriche in Italia in "Storia della vite e del vino in Italia" Ed. Unione Italiana Vini, Milano.
- Calò A., Paroretto M., Rorato G. 1996. Storia regionale della vite e del vino in Italia "Veneto" Ed. Unione Italiana Vini, Milano, pp 532.
- Cardinale M., Brusetti L., Quatrini P., Borin S., Puglia A. M., Rizzi A., Zanardini E., Sorlini C., Corselli C., Daffonchio D. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 6147-6156.
- Colwell R.R. (1997). Microbial biodiversity and biotechnology. In: Reaka-Kudla ML, Wilson DE, Wilson EO (eds) *Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources*. Joseph Henry Press, University of Washington, Washington, DC, 279-288.
- Cosmo I. 1949. Indagine sulla viticoltura e l'enologia delle Venezie, *Agricoltura delle Venezie. Ann. Staz. Sper. Vitic. Enol. Conegliano*.
- Costacurta A., Cancellier S. 1999. *I vitigni dei Berici C.C.I.A.A.,* Vicenza.
- Costantini E. 2009. *Manual of Methods for Soil and Land Evaluation*. Science Publishers Inc., Enfield (NH), USA, pp 564.
- Courtois S., Frostegård A., Goransson P., Depret G., Jeannin P., Simonet P. 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environ. Microbiol.*, 3: 431-439.

- Da Schio G. 1905. *Enologia e viticoltura della provincia di Vicenza*. Ed. Tipografia F.lli Pastorio, Vicenza.
- Dalmasso G., Cosmo I., Dall'Oglio G. 1931. *L'indirizzo viticolo per le Province Venete*, Annuario R., Stazione sperimentale di Viticoltura ed Enologia.
- Dé Crescenzi P. 1805. *Trattato di Agricoltura*, Accademia della Crusca, I, Milano.
- Delmont T.O., Robe P., Clark I., Simonet P., Vogel T.M. 2011. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *J. Microbiol. Methods*, 86: 397-400.
- Digvijay V., Satyanarayana T. 2011. An improved protocol for DNA extraction from alkaline soil and sediment samples for constructing metagenomic libraries. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 165: 454-64.
- Deluc L.G, Grimplet J., Wheatley M.D., Tillett R.L., Quilici D.R., Osborne C., Schooley D.A., Schlauch K.A., Cushman J.C., Cramer G.R. 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics*, doi: 10.1186/1471-2164-8-429.
- Dunbar J., Wong D.C.L., Yarus M.J., Forney L.J. 1996. Autoradiographic method for isolation of diverse microbial species with unique catabolic traits. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 5643-5647.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14: 2611-2620
- Filleur S., Walch-Liu P., Gan Y., Forde B.G. 2005. Nitrate and glutamate sensing by plant roots. *Biochemical Society Transactions*, 33:283-286.
- Florenzano G. 1986. *Fondamenti di microbiologia del terreno*. Ed. Reda, Roma, pp. 748.
- Fossà A. 1975. *Uva Garganega di Gambellara. Vini Emangiari nella zona D.O.C. del Gambellara*. Tip. Lessinia, Gambellara (VI).

- Fregoni M. 2010. L'Humus e il Terroir. Atlante nutrizionale della vite. Atti Convegno Viticoltura biodinamica di Cerreto Guidi, 12 giugno 2010.
- Fregoni M. 2009. Atlante nutrizionale della vite. Ed. Tecniche Nuove, pp. 272.
- Nutrizione e fertilizzazione della vite. Ed. Il Sole 24 Ore Edagricole, pp. 418.
- Franchi M., Ferris J.P., Gallori E. 2003. Cations as mediators of the adsorption of nucleic acids on clay surfaces in prebiotic environments. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 33: 1-16.
- Garbeva P., van Veen J.A., van Elsas J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42: 243-70.
- Harris D. 1994. Analysis of DNA extracted from microbial communities. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. (Eds.), *Beyond the Biomass, compositional and functional analysis of soil microbial communities*. John Wiley, Chichester, pp.111-118.
- Holmsgaard P., Norman A., Hede S.C., Poulsen P.H.B., Al-Soud W.A., Hansen L.H., Sørensen S.J. 2011. Bias in bacterial diversity as a result of Nycodenz extraction from bulk soil. *Soil Biol. Biochem.*, 43: 2152-2159.
- Hren M., Ravnkar M., Brzin J., Ermacora P., Carraro L., Bianco P. A., Casati P., Borgo M., Angelini E., Rotter A., Gruden K. 2009. Induced expression of sucrose plants grown in the field. *Plant Pathology*, 58:170-180.
- Kelemen M.V., Sharpe J.E. 1979. Controlled cell disruption: a comparison of the forces required to disrupt different microorganisms. *J. Cell Sci.*, 35: 431-441.
- Knietsch A., Waschowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R. 2003. Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 5: 46-56.

- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M., 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:2731-2741.
- Lando 1553. Commentario delle cose più notabili e mostruose d'Italia. Venezia, pp 6-7.
- Laquitaine L., Gomès E., François J., Marchive C., Pascal S., Hamdi S., Rossitza A., Delrot S., Coutos-Thévenot P. 2006. Molecular Basis of Ergosterol-Induced Protection of Grape Against *Botrytis cinerea*: Induction of Type I LTP Promoter Activity, *WRKY*, and Stilbene Synthase Gene Expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1103-1112.
- Lindahl V., Bakken L.R. 1995. Evaluation of method for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16: 135-142.
- Lovo P.L., Onorato M. 1998. *Civiltà della vite e del vino nel vicentino*. Ed. Morganti, Treviso, pp. 80-116.
- Mantese G. 1982. *Scritti scelti di storia vicentina Vol. VIII*, Vicenza: 593.
- Marchive C., Mzid R., Deluc L., Barrieu F., Pirrello J., Gauthier A., Corio-Costet M., Regad F., Cailleteau B., Hamdi S., Lauvergeat V. 2007. Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, *VvWRKY1*, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* 58:1999-2010.
- Marini 2010. *Stima dell'attività microbica mineralizzatrice di vigneti a conduzione biologica e tradizionale*. Tesi di laurea in Scienze e Tecnologie per l'ambiente. Università degli Studi di Padova, A.A.2010-2011.
- Maroso G., Varanini G.M. 1984. *Vite e vino nel Medioevo da fonti veronesi e venete*. Ed. Centro documentazione per la storia della Valpolicella (VR).
- Marzotto N. 1925. *Uva da vino Vol.I. Tip Commerciale*, Vicenza, pp 318.
- Massolongo A. 1859. *Le piante fossili dei terreni terziari del vicentino*. Ed. Merlo, Verona.

- Mengel e Kirby, 2001. Principles of plant nutrition. Kluwer Academic Publishers, pp. 849.
- Milani P. 1974. I vini delle valli del Chiampo e di Gambellara. Valle del Chiampo. Antologia, Banca Popolare di Arzignano, Vicenza.
- Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L., Ghiorse W.C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol., 65: 4715-4724.
- Moreira D. 1998. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. Nucleic Acids Res., 26: 3309-3310.
- Nannipieri P., Pietramellara G., Falchini L., Bradford M., Parekh N., Pinzari F., Schmidt N. 2000. Microbial diversity and activity in soil: meaning, limits and advantages of the present methods. In: NATO-ASI "Soil and global change: carbon cycle, trace gas exchange and hydrology".
- Nordgard L., Traavik T., Nielsen K.M. 2005. Nucleic acid isolation from ecological samples--vertebrate gut flora. Meth. Enzymol., 395: 38-48.
- Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol., 43: 93-100.
- Piacentino J. 1930. Cronaca della guerra veneto-scaligera. Ed. Venezia.
- Pietramellara G., Franchi M., Gallori E., Nannipieri P. 2001. Effect of molecular characteristics of DNA on its adsorption and binding on homoionic montmorillonite and kaolinite. Biol. Fertil. Soils, 33: 402-409.
- Pisabaro A.G., de Pedro M.A., Vasquez D. 1985. Structural modification in the peptidoglycan of *E. coli* associated with the stages of growth of the culture. J. Bacteriol., 161: 238-242.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155: 945-959.
- Roubelakis-Angelakis K.A. 2009. Grapevine molecular physiology and biotechnology. Dordrecht ; New York : Springer, 2009.

- Rovira A.D. (1965). Effects of *Azotobacter*, *Bacillus* and *Clostridium* on the growth of wheat. In: Macura J, Vancura V (eds) Plant Microbes Relationships. Czechoslovak Academic Science, Prague, pp. 193–200.
- Sanchez-Ballesta M.T. , Jimenez J.B., Romero I., Orea J.M., Maldonado R., Gonzalez A, Escribano M.I., Merodio C. 2006. Involvement of the phenylpropanoid pathway in the response of table grapes to low temperature and high CO<sub>2</sub> levels. *Postharvest Biology and Technology*, 46:29-35.
- Sandaa R.-A., Enger Ø., Torsvik V. 1998. Rapid method for fluorometric quantification of DNA in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 30(2): 265-268.
- Schreier P., Drawert F., Jumker A. 1976. Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agric. Food. Chem.* 24:331-336.
- Scienza A., Giulivo C. 1983. I portainnesti della vite utilizzati nell'Italia Nord-orientale: Stato attuale, problemi, prospettive. *Riv. Vitic. Enol.* Conegliano .
- Smith S.E., Read D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd ed, Academic Press, London.
- Soar C.J., Speirs J., Maffei S.M., Penrose A.B., McCarthy M.G., Loveys B.R. 2006. Grape vine varieties Shiraz and Grenache differ in their stomatal response to VPD: apparent links with ABA physiology and gene expression in leaf tissue. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12:2-12.
- Squartini, 2010. La biodiversità batterica: approcci metagenomici. Atti del Convegno “La Biodiversità nel terreno agrario”. Accademia dei Georgogili, 19 novembre 2010, Firenze.
- Stach J.E.M., Bathe S., Clapp J.P., Burns R.G. 2001. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 36: 139–151.
- Steffan R.J., Goksoyr J., Bej A.K., Atlas R. 1988. Recovery of DNA from soils and Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 2908–2915.

- Tomasi T., Ghiotti F., Pascarella G, Marcuzzo P., Minelli R., Borsa D., Calò A. 2008. Gambellara terre e colli da vino. Ed. Camera di Commercio, Vicenza, pp. 308.
- Tien C.C., Chao C.C., Chao W.L. 1999. Methods for DNA extraction from various soils : a comparison. *J. Appl. Microbiol.*, 86(6): 937-943.
- Tsai Y.L., Olson B.H. 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2292–2295.
- Veronelli L. 1966. I vini d'Italia, Firenze, pp 534.
- Vezzulli S., Civardi S., Ferrari F., Bavaresco L. 2007. Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. *American Journal Enology Viticulture*, 58:530-533.
- Vianello A., Carpenè A. 1874. La vite ed il vino in provincia di Treviso. Ed. Ermanno Loescher, pp. 186.
- Xu H.S., Roberts N., Singleton F.S., Attwell R.W., Grimes D.J. , Colwell R.R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholera* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, 8: 313-323.
- Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 316–322.