



HAL
open science

Conservazione ecosistemica delle risorse genetiche associate a colture tipiche della realtà italiana: due casi studio da Vitis vinifera

Alessandro Florio, Gianluca Renzi, Loredana Canfora, Paolo Storchi, Anna Benedetti

► **To cite this version:**

Alessandro Florio, Gianluca Renzi, Loredana Canfora, Paolo Storchi, Anna Benedetti. Conservazione ecosistemica delle risorse genetiche associate a colture tipiche della realtà italiana: due casi studio da Vitis vinifera. Convegno frutticolo nel Lazio: Stato dell'arte della ricerca sulle colture arboree nel Lazio, Tuscia University. ITA. Italian National Agency for New Technologies Energy and Sustainable Economic Development (ENEA), ITA., Apr 2013, Viterbo, Italy. <hal-01824998>

HAL Id: hal-01824998

<https://hal.science/hal-01824998v1>

Submitted on 3 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Conservazione ecosistemica delle risorse genetiche associate a colture tipiche della realtà italiana: due casi studio da *Vitis vinifera*

Alessandro Florio^{*1}, Gianluca Renzi¹, Loredana Canfora¹, Paolo Storchi², Anna Benedetti¹

¹Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo (CRA-RPS), Roma.

²Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Unità di Ricerca per la Viticoltura (CRA-VIC), Arezzo

*Autore corrispondente: Alessandro Florio, tel: 06/7008721 Fax 06/7005711 Email: alessandro.florio@entecra.it

Parole chiave: *conservazione ecosistemica, Vitis vinifera, risorse genetiche microbiche, biodiversità*

INTRODUZIONE

Le comunità microbiche delle filiere agro-alimentari sono strettamente correlate e il loro comportamento è il risultato di continue interazioni geniche e di competizioni nutrizionali, che si instaurano dalla messa a dimora della coltura alla trasformazione e conservazione del prodotto. Questi rapporti sono alla base di tutti i processi microbici che caratterizzano le filiere produttive, comprese quelle vitivinicole, dalle produzioni vegetali al prodotto trasformato finito e contribuiscono a determinare il “*flavour*” caratteristico di ogni tipologia di vino. È stato più volte evidenziato come la diversità microbica del suolo sia direttamente correlata con quella della vegetazione presente determinandone, di conseguenza, variazioni funzionali che si ripercuotono direttamente o indirettamente sulla crescita delle piante e la qualità dei loro prodotti (Bartelt-Ryser *et al.*, 2005). Le comunità batteriche, fungine e degli archaea hanno funzionalità e distribuzione diverse nei suoli, con un rapporto diverso nei confronti delle piante, pertanto la “lettura” di un sistema agricolo attraverso i tre indicatori microbici permette un approccio completo allo studio della ecologia microbica dei suoli agrari. L'espressione dei caratteri propri della varietà vegetale dipende pertanto da fattori quali l'ambiente pedoclimatico di origine e i peculiari metodi di coltivazione e fertilizzazione. Tali fattori selezionano una flora batterica del suolo “tipica”, dunque qualora una certa varietà venga coltivata altrove potrebbe non dare gli stessi risultati o esprimere caratteristiche organolettiche differenti.

SCOPO DEL LAVORO

L'approccio ecosistemico per la conservazione della biodiversità permette la valutazione complessiva dei fenomeni che avvengono all'interno dell'agroecosistema e l'individuazione delle interrelazioni tra i diversi processi. Questo tipo di approccio consente di affrontare temi quale la tutela della tipicità e produttività delle colture e il miglioramento della qualità delle produzioni agroalimentari di pregio a livello pianta-suolo-microrganismo (Cardinali e Benedetti, 2012). Verranno presentati due casi studio, relativi il primo alla conservazione *in situ* e conseguente studio e valutazione della biodiversità microbica associata a siti della Regione Lazio coltivati a vigneto (Caso studio 1), e il secondo alla conservazione delle risorse genetiche microbiche secondo un approccio ecosistemico pianta-suolo-microrganismi *ex situ on farm*, praticato congiuntamente alla conservazione del germoplasma vegetale (Caso studio 2).

MATERIALI E METODI

Caso studio 1

Il presente caso studio si inserisce all'interno del progetto di monitoraggio della fertilità biologica della Regione Lazio BIORELA.

In particolare si è voluta caratterizzare la fertilità biologica e la diversità genetica microbica di alcuni siti in cui viene allevata la *vitis vinifera l.*

I quattro siti oggetto di studio sono ubicati nel territorio della Regione Lazio. I siti s14, s15, si trovano a Corcolle (Rm) latitudine 41°54'6", longitudine 12°45'50", il sito s59 è ubicato a Tivoli, latitudine 41°30'4", longitudine 12°43'92", ed infine il sito s-66 è situato a Terracina, latitudine 41°20'8", longitudine 13°12'79". Nel sito s14 viene coltivata la varietà di vite pizzutello bianco, mentre il sito s15 alleva la varietà pizzutello nero, e in entrambi i siti la gestione agronomica è di tipo convenzionale. Il sito s59, è gestito in regime biologico e la

varietà di vite coltivata nel vigneto è il pizzutello bianco. Infine il sito s66, seguito con una conduzione convenzionale coltiva la varietà Moscato di Terracina.

A tale scopo è stato utilizzato un indice sintetico di fertilità biologica (IBF) (Benedetti and Pompili, 2006) che permette una valutazione comparativa di siti diversi sulla base di parametri di attività e contenuto della biomassa microbica del suolo, determinate in condizioni standardizzate di laboratorio, nonché l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare (T-RFLP) per l'analisi della struttura delle popolazioni batteriche, fungine e di archaea. Sarà molto utile quindi definire in primo luogo la fertilità biologica del suolo come parametro routinario, veloce e sintetico. In questo modo sarà possibile determinare un indice di fertilità biologica, potenzialmente correlato con il grado di biodiversità e sostenibilità del suolo. Dai dati della respirazione microbica, della biomassa microbica e della sostanza organica nel suolo è stato possibile calcolare i quozienti metabolici e di mineralizzazione della sostanza organica qCO_2 e qM . La somma algebrica dei parametri analizzati è in grado di fornire l'indice IBF.

Caso studio 2

Il secondo caso studio, facente parte di un progetto CRA più ampio (BIODATI, Linea di Ricerca ECOSISTEM) ha come obiettivo verificare da un lato la relazione che lega la risorsa genetica microbica dei suoli a colture arboree di interesse agrario per la conservazione delle colture di qualità strettamente legate al territorio, dall'altro applicare la metodologia messa a punto (Cardinali e Benedetti, 2012) per la caratterizzazione e successiva conservazione *in situ on farm* della biodiversità microbica associata ad aziende agrarie "custodi" ove sono già in atto azioni di recupero e conservazioni *in situ* del materiale vegetale.

Lo studio è stato condotto presso i campi catalogo di vitigni presenti presso il CRA-VIC di Arezzo (43° 28' 32'' N, 11° 49' 30'' E), e le principali caratteristiche chimico-fisiche del suolo sono qui di seguito riportate: sabbia 25,5%, limo 40,4%, argilla 34,1%, pH 6,9, CSC 10,2 meq/100 g, sostanza organica 1,09 %, N totale 0,88 ppm, P solubile 9,8 ppm, K assorbibile 64 ppm. È stato effettuato un campionamento di suolo (bulk soil) in corrispondenza di cloni di Cabernet Sauvignon, Sangiovese e Trebbiano con portainnesto SO4, oltre che in corrispondenza del clone SO4 e del suolo non coltivato (controllo).

La respirazione microbica è stata determinata effettuando la misura dell'emissione di CO_2 secondo il metodo "statico" dopo 1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21 e 28 giorni (Isermayer, 1952). Per ciascun campione è stato quindi calcolato il parametro C_0 espresso come carbonio potenzialmente mineralizzabile (mg CO_2 /Kg di terreno in 28 giorni) e calcolato in base alla formula $C = C_0(1 - e^{-kt})$ (Riffaldi *et al.*, 1996).

Il DNA è stato estratto a partire da 0,25g di suolo utilizzando il kit commerciale DNA PowerSoil® Total DNA Isolation Kit (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA), quantificato mediante piattaforma QUBIT Quant-iT™ dsDNA high sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen NZ), diluito a 2ng/μL e stoccato a -80°C per le analisi molecolari.

L'abbondanza dei geni 16S rRNA Batterico e di Archaea nei campioni di suolo è stata quantificata utilizzando la real time-PCR (Clark *et al.*, 2012), mediante l'utilizzo del termociclatore Stratagene Mx3000P QPCR (Agilent Technologies). Al termine di ogni reazione è stata condotta una melting analysis per confermare la specificità del prodotto di PCR a seguito dell'amplificazione misurando continuamente la fluorescenza nel range 50-99°C. La specificità della PCR è stata inoltre valutata mediante corsa elettroforetica su gel all'1% (w/v) di agarosio di campioni selezionati casualmente. Il numero di copie di gene per grammo di suolo è stato calcolato dal numero di copie di ogni gene per ng di DNA moltiplicato per la quantità di DNA contenuta in ogni grammo di suolo. Gli standard sono stati ottenuti da prodotti di PCR generati dagli estratti di suolo, purificati da gel, e quantificati utilizzando la piattaforma QUBIT Quant-iT™ dsDNA high sensitivity (HS) Assay Kit (Invitrogen NZ) e diluiti opportunamente. Il numero di copie geniche è stato calcolato utilizzando la seguente equazione (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>):

gene copy number = (ng*number/mol)/(base pairs*ng/g*g mol base pairs)

Gli standard sono stati diluiti opportunamente per ottenere un range di concentrazioni da 0 a 10^8 (10^9 per il 16S rRNA Batterico) numero di copie*μL⁻¹.

La diversità genetica dei batteri ed archaea è stata determinata mediante Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), previa amplificazione del DNA con primers specifici per il gene costitutivo 16S rDNA 67f/1087r marcato (Macdonald *et al.*, 2007). I prodotti di PCR sono stati analizzati qualitativamente su gel di agarosio a 1,5%. L'amplificato è stato successivamente purificato con Qiaquick PCR purification kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA) e dosato (Qubit® 2.0). Trecento ng di amplificato sono stati digeriti con 20U di enzima di restrizione *TaqI* (Promega). Un aliquota di 200 ng di prodotto digerito è stata analizzata mediante elettroforesi capillare utilizzando un sequenziatore ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) e lo standard LIZ600 (Applied Biosystems). Per le analisi successive dei profili, sono stati considerati frammenti da 55 a 500 bp. I frammenti così ottenuti per ciascun campione sono stati analizzati con il software GeneMarker (SoftGenetics), considerando i profili ottenuti dalle digestioni enzimatiche e dalle repliche considerate (Dunbar *et al.* 2001). Sono stati considerati solo frammenti con un intensità ± 0.5 bp, ed è stata considerata l'area di ciascun frammento (TRF).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Caso studio 1

I risultati ottenuti relativamente alla caratterizzazione di base del suolo in termini fisici, chimici e biologici sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Parametri biochimici misurati: b (biologico), c (convenzionale); SOM: sostanza organica; Resp_bas: respirazione basale; Res_cum: respirazione cumulativa; C_micr: biomassa microbica; qCO₂: quoziente metabolico; qM: quoziente di mineralizzazione; IBF indice di fertilità biologica; Classe: numero classe di fertilità.

Siti	SOM (%)	Res_Bas (ppm)C-CO ₂	Res_Cum (ppm)C-CO ₂	C_micr (ppm)C	qCO ₂ (10 ⁻²)h ⁻¹	qM %	IBF	Classe
14c	2,9	6,4	294,4	170,7	0,2	1,7	17	IV
15c	3,6	5,5	206,4	212,8	0,1	1,0	18	IV
59b	0,8	7,8	189,9	76,9	0,4	4,0	12	II
66c	2,6	5,5	230,1	82,9	0,3	1,6	14	III

L'utilizzo dell'IBF ha evidenziato, in accordo con gli indicatori fisici e chimici, un'evidente condizione di stress metabolico nel sito s59, favorita da un basso valore della biomassa microbica e di sostanza organica del suolo, associata ad una ridotta dimensione del pool microbico, con conseguente minor grado di stabilità del sistema suolo per ridotto apporto di nutrienti con una gestione di tipo biologico, che non è in grado di ovviare alle carenze legate al ridotto livello di fertilità biologica presente (Fig. 1). Il sito s59 denuncia uno stato di *stress-pre-allarme*. I siti s14, s15, rispettivamente, hanno una condizione metabolica buona. Il sito s66 ha un livello di fertilità biologica medio.

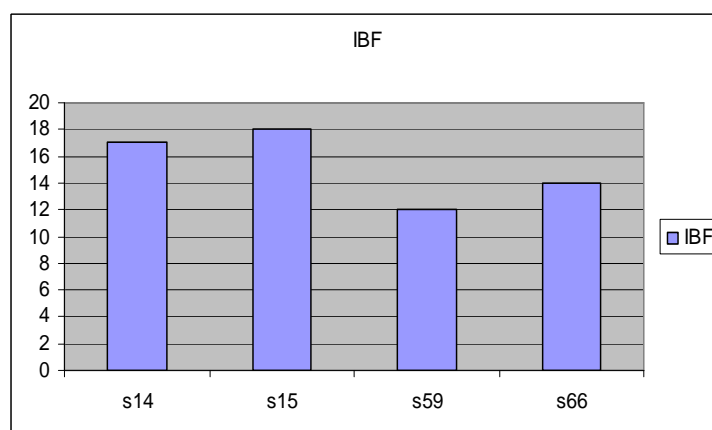


Fig. 1 Valutazione dell'IBF.

Caso studio 2

L'attività microbica totale è stata determinata mediante misura della respirazione del suolo. Come si osserva dalla Figura 2 la differenza più marcata è relativa al suolo senza pianta rispetto a tutte le altre tesi. Probabilmente ciò è da ricondurre alla procedura d'impianto del vigneto, che spesso può sconvolgere la naturale successione degli orizzonti, e modificare drasticamente la fertilità agronomica, chimica e biologica del suolo. Tra i campioni di suolo sotto coltura quelli che presentano minore attività respirometrica sono relativi ai cloni di Trebbiano.

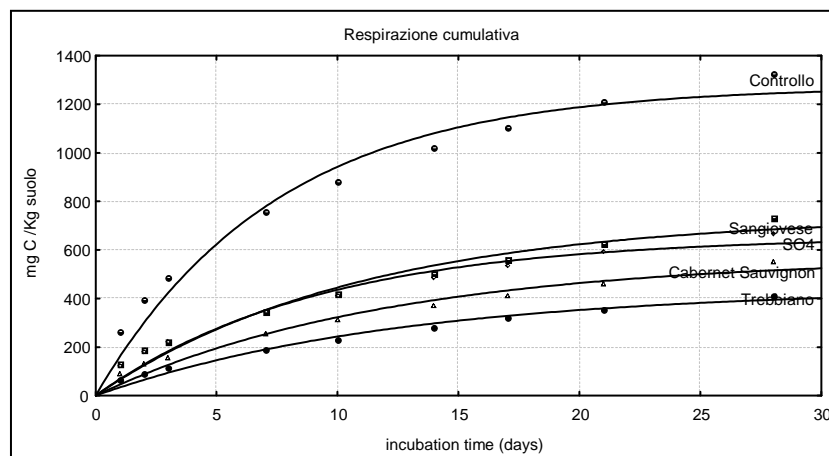


Fig. 2. Attività della biomassa microbica determinata mediante respirazione del suolo.

Il principale ostacolo dello studio della diversità microbica del suolo è l'incapacità di coltivare in vitro oltre l'1% dei batteri presenti. I motivi dell'incapacità di crescita dei batteri nei terreni di coltura sono molteplici, tra i quali la difficoltà di riprodurre in laboratorio le condizioni nelle quali questi microrganismi proliferano nell'ambiente e la presenza di batteri che si trovano in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC). I batteri nello stato VBNC rimangono vitali pur non essendo in grado di dividersi in maniera sufficiente da formare colonie visibili su piastre di terreno di coltura non selettivo ed entrano in questo stato quando sono sottoposti a particolari stress ambientali, quali variazioni della temperatura, salinità, ecc. L'uso di tecniche di biologia molecolare ed in particolare lo sviluppo della tecnica della PCR ha reso possibile lo studio della diversità delle comunità microbiche senza la necessità di coltivare i batteri, in quanto ha permesso di amplificare geni da DNA genomico estratto direttamente dal suolo. La risoluzione dei metodi molecolari cambia da tecnica a tecnica. Per questo studio si è scelto di utilizzare la real time per la quantificazione dei batteri e degli archaea del suolo, e una tecnica di fingerprinting mediante T-RFLP per la tipizzazione delle comunità microbiche e l'individuazione di genotipi associati univocamente a una singola coltura vegetale. L'analisi in real time si basa sulla amplificazione di una porzione di gene ben definita mediante PCR e sulla sua quantificazione in tempo reale dovuta alla rilevazione del segnale di amplificazione in fase esponenziale e non in end-point come accade nel classico approccio in PCR. Anche in questo caso la differenza più grande la si osserva tra i suoli sotto coltura ed il controllo in un modo molto simile a quanto osservato nei dati di respirazione e il dato quantitativo più basso è sempre quello del campione di Trebbiano sia nel caso dei batteri (in un range che va da $1,06 \cdot 10^9$ numero di copie geniche a $2,83 \cdot 10^8$) che degli archaea (da $1,22 \cdot 10^7$ a $1,07 \cdot 10^6$) (Fig. 3).

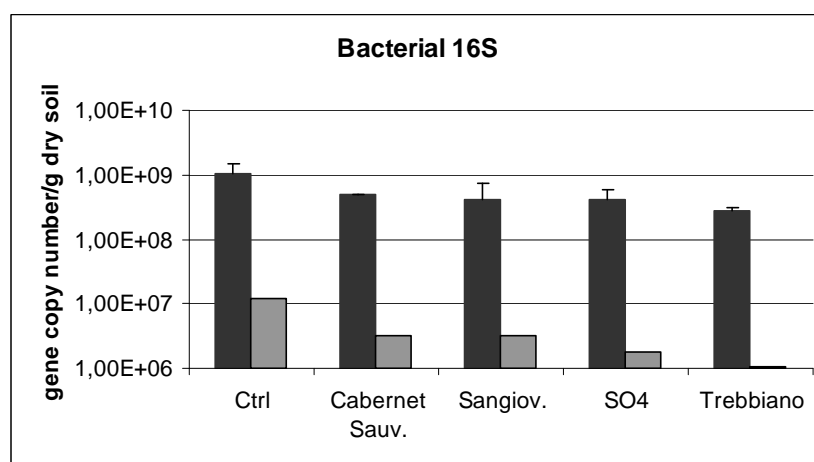


Fig. 3. Quantificazione delle popolazioni batteriche (nero) e di archaea (grigio) mediante qPCR del gene 16S rDNA.

I dati di diversità genetica mostrano invece come ad una più elevata respirazione microbica e quantità di biomassa microbica corrisponda una minore diversità delle popolazioni batteriche e di archaea, data da un numero minore di unità tassonomiche operative (OTU) nel suolo controllo rispetto agli altri suoli (Fig. 4). Considerando le singole OTU, sono stati individuati 10 T-RFs batterici e 9 T-RFs di archaea "tipici", presenti esclusivamente in corrispondenza di uno dei cloni considerati, dunque potenziali marcatori di qualità del prodotto finito.

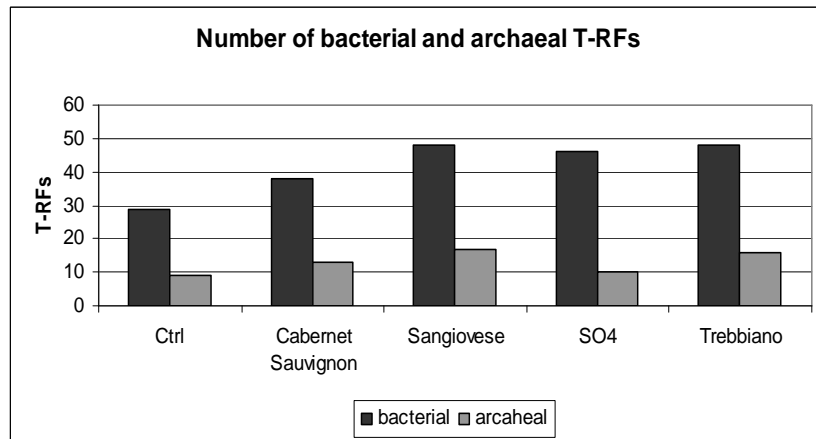


Fig. 4. TR-Fs batterici e di archaea mediante analisi T-RFLP.

CONCLUSIONI

La qualità, l'aroma, il colore ed in genere tutte le caratteristiche organolettiche (cioè quelle percepibili con i nostri sensi senza ricorrere ad apparecchiature) del prodotto finito sono in stretta relazione con le diverse fasi di quella che oggi chiamiamo filiera produttiva, la quale comincia dal suolo, per continuare con la fase di raccolta delle uve, il sistema di estrazione della fase acquosa zuccherina dai chicchi, il tempo di contatto tra mosto e vinacce, e così via. Pur partendo dallo stesso suolo, la qualità finale del vino può tuttavia risultare molto diversa a seconda dell'attività metabolica dei microrganismi implicati nella filiera produttiva, i quali daranno origine a gusti ed aromi differenti: si pensi all'enorme varietà di vini (diverse centinaia solo in Italia) che derivano dalla fermentazione del mosto di relativamente pochi vitigni diversi.

Il lavoro complessivamente ha consentito di valutare in campo la rispondenza dell'indice di fertilità biologica IBF nella caratterizzazione dello stato di salute complessivo di un suolo. Infatti i siti analizzati hanno portato alla valutazione della fertilità chimica e delle proprietà biologiche, le quali rappresentano il primo livello di conoscenza della biodiversità in quattro siti del territorio della Regione Lazio, di cui tre gestiti con una conduzione di tipo convenzionale ed uno gestito in regime biologico. I suoli dei siti analizzati sono custodi delle risorse genetiche delle varietà autoctone della cultivar *Vitis Vinifera L.* e costituiscono zone ad alto valore economico locali.

Il presente studio ha inoltre consentito di individuare potenziali marker microbici del suolo che discriminano i diversi cloni considerati. Future ricerche saranno indirizzate verso l'identificazione tassonomica di tali marker, nonché sull'acquisizione di dati sul metabolismo microbico e sulla capacità delle comunità microbiche eterotrofe di degradare differenzialmente substrati carboniosi.

BIBLIOGRAFIA

- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balsler, T., 2005. Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7, 27–49.
- 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*. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Osservatorio Nazionale Podologico. Edizioni Delta Grafica, Città di Castello (Perugia), cap.5, pp.65-81.
- Cardinali, G., Benedetti, A., 2012. Biodiversità microbica in: "Adozione delle linee guida nazionali per la conservazione in situ, on farm ed ex situ, della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse agrario" (12A08142). *Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana Serie generale - n. 171*.
- Clark, I.M., Buchkina, N., Jhurreea, D., Goulding, K.W.T. and Hirsch, P.R., 2012. Impacts of nitrogen application rates on the activity and diversity of denitrifying bacteria in the Broadbalk Wheat Experiment. *Phil Trans R Soc B* 367: 1235–1244.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R., 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and a new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67: 190–197.
- Isermeyer, H., Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Z. Pflanzenernaehr Bodenkd*, 56, 1952, pp. 26-38.

- Macdonald, C.A., Singh, B.K., Peck, J.A., van Schaik, A.P., Hunter, L.C., Horswell, J. et al., 2007. Long-term exposure to Zn-spiked sewage sludge alters soil community structure. *Soil Biol Biochem* **39**: 2576–2586.
- Riffaldi, R., Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., 1996. Carbon mineralization kinetics as influenced by soil properties, *Biology and Fertility of Soils*, 22, pp. 293-298.