



*UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE*

DIPARTIMENTO SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI ED AMBIENTALI

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Agrarie e del Territorio

**Nuove strategie di protezione della vite dalla  
peronospora in biologico: sperimentazione  
dell'applicazione di chitosano in protocolli  
aziendali**

*New strategies to manage downy mildew in organic  
viticulture: field trials with chitosan in commercial  
vineyards*

Relatore:

*Prof. Gianfranco Romanazzi*

Tesi di laurea di:

*Selene Caproli*

Correlatori:

*Dott.ssa Marwa Moumni, Dott. Simone Piancatelli*

Anno Accademico 2020-2021

“Quando cambiamo il modo di coltivare il nostro cibo, cambiamo il nostro cibo,  
cambiamo la società, cambiamo i nostri valori”

(Masanobu Fukuoka)

## INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>8</b>
1.1. <b>VITICOLTURA MARCHIGIANA</b>	<b>8</b>
1.2. <b>PRINCIPALI MALATTIE CRITTOGAMICHE DELLA VITE</b>	<b>9</b>
<b>2. LA PERONOSPORA DELLA VITE</b>	<b>10</b>
2.1. <b>AGENTE CAUSALE</b>	<b>10</b>
2.2. <b>DIFFUSIONE</b>	<b>10</b>
2.3. <b>CICLO BIOLOGICO DEL PATOGENO</b>	<b>11</b>
2.4. <b>INFEZIONI PRIMARIE E SECONDARIE</b>	<b>13</b>
2.5. <b>DANNI E SINTOMATOLOGIA</b>	<b>14</b>
2.5.1. <b>Sintomi su foglie</b>	<b>15</b>
2.5.2. <b>Sintomi su grappoli</b>	<b>16</b>
2.5.3. <b>Sintomi su altri organi verdi</b>	<b>18</b>
<b>3. L'OIDIO DELLA VITE</b>	<b>19</b>
3.1. <b>AGENTE CAUSALE</b>	<b>19</b>
3.2. <b>DIFFUSIONE</b>	<b>20</b>
3.3. <b>CICLO BIOLOGICO DEL PATOGENO</b>	<b>20</b>
3.4. <b>DANNI E SINTOMATOLOGIA</b>	<b>22</b>
<b>4. STRATEGIE DI GESTIONE DELLA PERONOSPORA</b>	<b>24</b>

<b>4.1.</b>	<b>LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA INTEGRATA</b>	<b>25</b>
<b>4.2.</b>	<b>LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA BIOLOGICA</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>MEZZI DI PROTEZIONE DALLA PERONOSPORA</b>	<b>28</b>
<b>5.1.</b>	<b>MODELLI PREVISIONALI</b>	<b>28</b>
<b>5.2.</b>	<b>MEZZI AGRONOMICI</b>	<b>30</b>
<b>5.3.</b>	<b>RESISTENZA VARIETALE</b>	<b>31</b>
<b>5.3.1.</b>	<b>Meccanismi di resistenza a <i>Plasmopara viticola</i></b>	<b>31</b>
<b>5.4.</b>	<b>MEZZI CHIMICI</b>	<b>34</b>
<b>5.4.1.</b>	<b>Prodotti a base di rame</b>	<b>35</b>
<b>5.4.2.</b>	<b>Aspetti positivi e negativi del rame</b>	<b>39</b>
<b>5.4.3.</b>	<b>Molecole di origine naturale alternative al rame</b>	<b>42</b>
<b>5.4.3.1.</b>	<b><i>Il chitosano</i></b>	<b>42</b>
<b>5.4.3.2.</b>	<b><i>Altri composti con attività antiperonosporica</i></b>	<b>45</b>
<b>5.5.</b>	<b>COMPATIBILITÀ TRA DIVERSI AGROFARMACI</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>OBIETTIVI DELLA RICERCA</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>51</b>
<b>7.1.</b>	<b>SCHEMA SPERIMENTALE E CARATTERISTICHE DEI VIGNETI</b>	<b>51</b>
<b>7.2.</b>	<b>VALUTAZIONE DELLA COMPATIBILITÀ DI CHITOSANO DENSO CON DIVERSI FUNGICIDI</b>	<b>60</b>
<b>7.2.1.</b>	<b>Prove di laboratorio</b>	<b>60</b>
<b>7.2.2.</b>	<b>Prove di campo</b>	<b>63</b>
<b>7.3.</b>	<b>VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI</b>	<b>65</b>
<b>8.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>68</b>

<b>8.1.</b>	<b>CONDIZIONI METEOROLOGICHE</b>	<b>68</b>
<b>8.2.</b>	<b>RISULTATI COMPATIBILITÀ TRA CHITOSANO E ALTRI AGROFARMACI</b>	<b>72</b>
<b>8.2.1.</b>	<b>Prove di laboratorio</b>	<b>72</b>
<b>8.2.2.</b>	<b>Prove di campo</b>	<b>78</b>
<b>8.3.</b>	<b>VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI</b>	<b>81</b>
<b>8.3.1.</b>	<b>Monitoraggio sul vigneto di Matelica</b>	<b>81</b>
<b>8.3.2.</b>	<b>Monitoraggio e rilievo sul vigneto Castelplanio</b>	<b>82</b>
<b>8.3.3.</b>	<b>Monitoraggio sul vigneto di Angeli di Varano</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>87</b>
<b>10.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>91</b>
<b>11.</b>	<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>98</b>

## RIASSUNTO

Le limitazioni poste all'uso di prodotti cuprici in agricoltura biologica stabilite dal Reg. UE 1981/2018 hanno promosso la ricerca di soluzioni alternative. Nella tesi di laurea magistrale, realizzata nell'ambito del progetto PSR Marche "Vitinnova", sono stati posti due obiettivi: analizzare la compatibilità del chitosano con altri prodotti fitosanitari utilizzati in viticoltura biologica, soprattutto quelli a base di rame e zolfo, e valutare su scala commerciale gli effetti di diverse strategie aziendali basate sull'utilizzo del chitosano come prodotto alternativo al rame nella protezione dalla peronospora della vite.

Le prove di compatibilità tra rame e chitosano sono state condotte utilizzando diverse concentrazioni del biopolimero (0,1%, 0,25%, 0,5% e 1%) e dosi dei prodotti cuprici (dose massima d'etichetta (DP),  $\frac{1}{10}$  DP,  $\frac{1}{4}$  DP e  $\frac{1}{2}$  DP). Dai risultati è emerso come i livelli di affinità varino fra i diversi principi attivi saggiati. L'ossicloruro di rame ha mostrato una buona compatibilità in tutte le combinazioni e a qualsiasi concentrazione rispetto agli altri composti rameici. Per questo motivo è stato scelto l'ossicloruro di rame ( $\frac{1}{2}$  DP; 125 mL/hL) come prodotto da utilizzare in campo in combinazione con chitosano (0,25%).

Le prove di campo sono state svolte in tre vigneti, rappresentativi di aree viticole della Regione, ubicati ad Angeli di Varano (AN) (vigneto Moncaro, *cv* Montepulciano), a Castelplanio (AN) (vigneto Moncaro, *cv* Verdicchio) e a Matelica (MC) (vigneto Belisario, *cv* Verdicchio). In ognuno dei vigneti sono state sperimentate diverse strategie di trattamenti antiperonosporici utilizzando il biopolimero: solo chitosano, chitosano alternato al rame, e chitosano combinato con rame. L'efficacia di questi trattamenti è stata confrontata con un testimone aziendale a base di rame ed un testimone non trattato. Le tesi sono state distribuite nei vigneti secondo uno schema sperimentale di blocco randomizzato con tre ripetizioni.

La valutazione dell'efficacia dei trattamenti in campo è stata basata sul calcolo della diffusione, della gravità e dell'Indice di McKinney della malattia. L'andamento stagionale, caratterizzato da scarse precipitazioni e bassa umidità, ad oggi non ha favorito lo sviluppo della peronospora, di conseguenza, non è stato possibile apprezzare differenze significative fra le tesi. Nel vigneto di Castelplanio, la presenza di oidio ha permesso di condurre un rilievo sui grappoli, dal quale è emerso come in tutte le tesi l'indice di McKinney della malattia è risultato significativamente più basso rispetto al testimone non trattato. In particolare, la riduzione di malattia è stata del 46%, 85% e 69%, rispettivamente, nelle tesi trattate con chitosano da solo e combinato o alternato al rame. Questi risultati preliminari fanno pensare che il chitosano abbia una certa efficacia anche nel contenimento dell'oidio.

## ABSTRACT

The limitations on the use of copper-based products in organic agriculture according to EU Regulation 1981/2018 has promoted a search for alternatives. This MSc thesis was developed within the PSR Marche "Vitinnova" project with two aims: to study the compatibility of chitosan with other plant protection products widely used in organic viticulture, especially those based on copper and sulfur, and to evaluate on a commercial scale, the effects of several management strategies using chitosan as an alternative product to copper on grapevine downy mildew.

The compatibility tests between copper and chitosan were carried out with varying concentration of chitosan (0,1%, 0,25%, 0,5% e 1%) and dose of copper-based products (full label dose (DP),  $\frac{1}{10}$  DP  $\frac{1}{4}$  DP e  $\frac{1}{2}$  DP). Results showed different compatibility levels between the tested active substances. Copper oxychloride showed a good compatibility in all combinations and at any concentration, as compared to the others copper compounds. For this reason, copper oxychloride ( $\frac{1}{2}$  DP; 125 mL/hL) was selected to be used combined with chitosan (0.25%) in the field trials.

The field trials were carried out in three vineyards of representative wine-growing areas of Marche region, located in Angeli di Varano (AN) (Moncaro's vineyards; cv. Montepulciano), Castelplanio (AN) (Moncaro's vineyards; cv. Verdicchio) and Matelica (MC) (Belisario's vineyard; cv. Verdicchio). In each vineyard, three management strategies were tested: chitosan alone, alternative chitosan and copper, and combination of chitosan with copper. These treatments were compared with a farm control (based on copper alone) and with an untreated control. A randomized block design with three replicates was used.

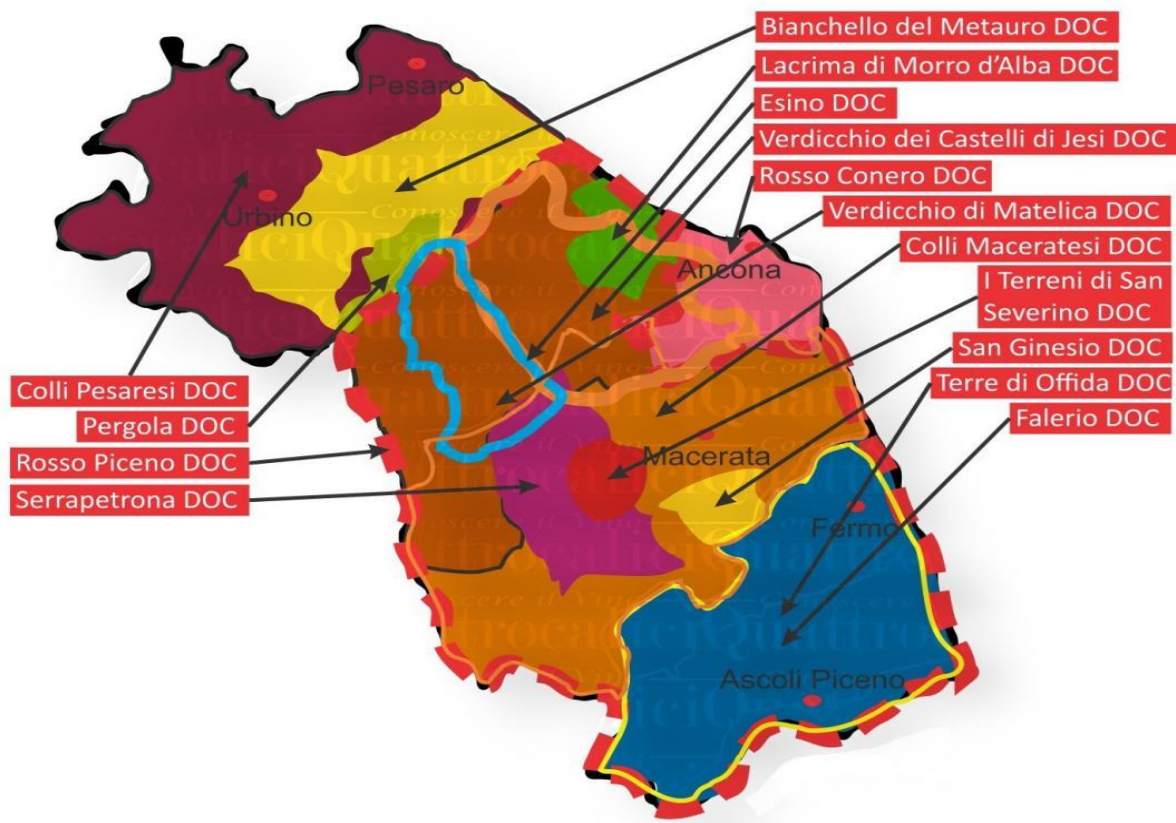
The evaluation of effectiveness of treatment was based on the determination of the following disease parameters: incidence, severity, and McKinney Index. The climatic trend, characterized by low rainfall and low humidity, was not favorable for the development of downy mildew, then it was not possible to appreciate significant differences between the treatments. The presence of powdery mildew in Castelplanio vineyard allows to conduct an assessment on grapes, and here the treatment with chitosan alone, alternative chitosan and copper, and combination of chitosan with copper, significantly reduced the McKinney Index of powdery mildew by 46%, 69% and 85%, respectively. These preliminary results can confirm that chitosan possess, together with a known activity toward downy mildew, also an effectiveness on powdery mildew.

## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1. VITICOLTURA MARCHIGIANA**

Nelle Marche il settore vitivinicolo rappresenta una realtà importante data la singolare combinazione di più elementi strutturali: storici, sociali, geografici e culturali che si concentrano nella valorizzazione delle uve autoctone. Infatti, l'orografia della regione, la diversificata natura dei terreni, alcune pratiche tradizionali, come la moltiplicazione della vite per propaggine o la consociazione di più varietà nei vigneti, hanno reso il territorio un contesto eterogeneo e per questo rilevante nel panorama vitivinicolo italiano. La vite nelle Marche è la principale coltura arborea con circa 23.000 ha, di cui il 48% iscritti all'albo dei vigneti per la produzione dei vini Denominazione di Origine Controllata (DOC), distribuiti per lo più in aree collinari, per metà nelle province di Ascoli Piceno e Fermo e per un quarto in quella di Ancona. Nella regione esiste un'ampia variabilità genetica, con 206 varietà censite, ma i vitigni principalmente coltivati sono Sangiovese, Montepulciano, Verdicchio e Trebbiano Toscano, i quali interessano più del 70% della superficie vitata, seguiti da Pecorino, Passerina, Biancame e Maceratino o Ribona (a bacca bianca), Vernaccia nera e Lacrima (a bacca nera). Accanto a questi, sono presenti altri vitigni autoctoni di un certo interesse enologico e per i quali è in atto un lavoro di valorizzazione che, a partire dalla sperimentazione, coinvolge l'intera filiera. La vite, da sempre presente sul territorio marchigiano, ha trovato una razionalizzazione e valorizzazione in tempi relativamente recenti. Nelle Marche hanno ottenuto il riconoscimento della Denominazione di Origine Controllata e Garantita (DOCG) cinque vini: la Vernaccia di Serrapetrona, il Conero Riserva, il Verdicchio castelli di Jesi riserva, il Verdicchio di Matelica riserva e l'Offida. Oltre alle cinque DOCG, quasi tutto il territorio regionale è interessato da una o più delle 15 aree definite a DOC, consultabili in Figura 1. Fra queste le più importanti per numero di iscritti e dimensione territoriale risultano il Rosso Piceno e il Verdicchio dei Castelli di Jesi. Altrettanto significativi anche se con aree di diffusione più limitate sono: il Verdicchio di Matelica, il Falerio dei Colli Ascolani, i Colli Maceratesi, il Rosso Conero, l'Esino, i Colli Pesaresi e il Bianchetto del Metauro. Vanno citate, infine, le DOC Lacrima di Morro d'Alba e la Vernaccia di Serrapetrona che, se pure limitate a territori comunali, stanno riscontrando un ottimo successo di mercato. Tra le aree DOC troviamo inoltre i Terreni di San Severino, Offida, e di recente quelli di Pergola e San Ginesio.





**Figura 1** – Mappa regionale degli areali di produzione con Denominazione di Origine Controllata ([www.quattroclici.it](http://www.quattroclici.it), ultima consultazione: luglio 2021).

## 1.2. PRINCIPALI MALATTIE CRITTOGAMICHE DELLA VITE

Le principali malattie che colpiscono la vite sono in buona parte causate da organismi patogeni di natura fungina. Ad ogni stagione vegetativa a seconda dell'andamento climatico, del sito di coltivazione e della sensibilità varietale, la vite è soggetta agli attacchi di numerose malattie crittogamiche verso le quali si sono sviluppate diverse strategie di protezione, oggi basate su criteri di lotta guidata e integrata mediante l'utilizzo di principi attivi costantemente aggiornati per efficacia. Nel dettaglio, le principali malattie fungine che colpiscono la vite sono: oidio, muffa grigia, mal dell'esca e peronospora (Tabella 1). La peronospora della vite, così come l'oidio sono tra le patologie più gravi a livello mondiale, in quanto colpiscono i diversi organi della vite, quali foglie e grappoli, causando danni alla produzione finale sia in termini qualitativi che quantitativi e riducendo la capacità delle piante di accumulare sostanze di riserva per le annate successive.

**Tabella 1** – Principali malattie fungine della vite e relativi agenti causali associati.

<b>Malattia fungina</b>	<b>Agente causale</b>
Peronospora	<i>Plasmopara viticola</i>
Oidio	<i>Erysiphe necator</i>
Muffa grigia	<i>Botrytis cinerea</i>
Mal dell'esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , <i>Fomitipora mediterranea</i> , <i>Phaeoacremonium minimum</i>
Escoriosi	<i>Phomopsis viticola</i>
Verticilloso	<i>Verticillium dahliae</i>
Marciume nero	<i>Guignardia bidwelli</i>
Marciume radicale fibroso	<i>Armillaria mellea</i>
Marciume radicale lanoso	<i>Rosellina necatrix</i>

## **2. LA PERONOSPORA DELLA VITE**

### **2.1. AGENTE CAUSALE**

La peronospora, causata dall'oomicete *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt) Berl. et de Toni, appartiene alla classe degli *Oomycetes*, ordine *Peronosporales*, famiglia *Peronosporaceae*. Recentemente gli *Oomycota*, considerati pseudofunghi, sono stati riclassificati e spostati dal regno dei *Mycota* a quello dei *Chromista*, a sottolineare l'affinità di questi organismi con l'acqua. *P. viticola* è un parassita obbligato che quindi ha bisogno dell'ospite per il proprio sviluppo e per la propria riproduzione. Forma un micelio cenocitico (privo di setti) nella foglia e dal micelio stesso vengono formati gli austori, strutture di forma sferica specializzate nell'instaurare un rapporto biotrofico che garantisca l'approvvigionamento di sostanze nutritive necessarie alla sua crescita, senza però compromettere la vitalità della cellula dell'ospite.

### **2.2. DIFFUSIONE**

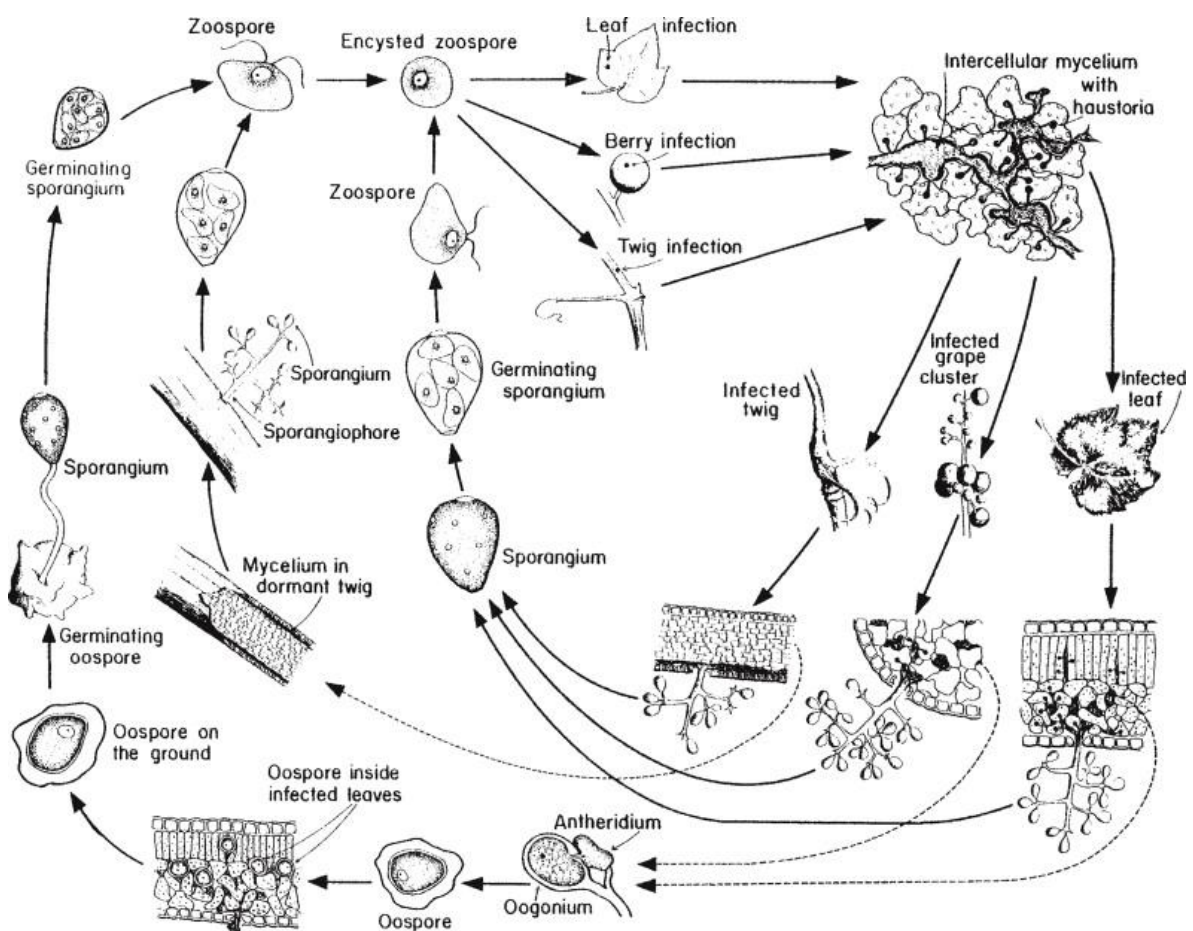
L'agente eziologico della peronospora della vite è *P. viticola*, patogeno originario del Nord America e arrivato in Europa nella seconda metà del 1800 probabilmente con del materiale vivaistico infetto importato in Francia per le attività di ibridazione successive all'avvento distruttivo della fillossera. Nel giro di pochissimi anni la malattia si è diffusa in tutto il continente, ma la prima vera dimostrazione del suo potenziale distruttivo è stata nel 1893, quando il 50% della produzione francese è andata persa a causa di un attacco epidemico

(Paolocci, 2012). Dall'inizio del secolo successivo la malattia ha iniziato a manifestarsi periodicamente, in base alle condizioni meteorologiche, causando danni gravissimi ai vigneti e forti flessioni della produzione, soprattutto nei paesi dell'Europa continentale, fra i quali l'Italia. Infatti, mentre le specie americane sono piuttosto tolleranti a *P. viticola*, *Vitis vinifera* si è rivelata estremamente suscettibile al patogeno, rendendo il suo arrivo in Europa disastroso: in pochi anni si è assistito a una vera e propria epidemia che ha coinvolto l'intero comparto vitivinicolo del continente.

### **2.3. CICLO BIOLOGICO DEL PATOGENO**

Il ciclo annuale di *P. viticola* è garantito dalla sua capacità di sopravvivere in mancanza dei tessuti recettivi della pianta ospite sotto forma di oospore (Figura 2). Queste ultime sono prodotte dalla riproduzione sessuata di anteridi e oogoni negli organi infetti dell'ospite tra la fine dell'estate e la fase di filloptosi. Le oospore acquisiscono la capacità di germinare al termine di un periodo di maturazione che generalmente viene conseguita tra la fine di novembre e l'inizio di dicembre. In primavera, le oospore mature germinano ed emettono un macrosporangio, il tempo necessario a completare la germinazione delle oospore dipende dalla temperatura (minima di 10 °C e ottimale di 20 °C) e dall'umidità delle foglie della lettiera. Il macrozoosporangio, una volta giunto sulla superficie fogliare, grazie all'effetto battente della pioggia e al vento, rilascia in presenza di acqua libera da quattro a otto zoospore, ciascuna delle quali può dare origine all'infezione primaria. Principalmente, le condizioni che influenzano la riuscita delle infezioni primarie sono tre: la natura e la quantità dell'inoculo iniziale in termini di macrosporangii vitali; le condizioni ambientali, in particolare disponibilità di acqua e di temperature adeguate; infine, la presenza di organi recettivi nell'ospite. Quest'ultima condizione prevede che le foglie siano fotosinteticamente attive, dotate quindi di stomi aperti e disposte in maniera distesa per favorire la formazione di un velo d'acqua sulla pagina inferiore. La massima sensibilità delle foglie alla peronospora è quando raggiungono un diametro di circa 3 cm, mentre con la maturazione tendono ad essere meno suscettibili (Boso *et al.*, 2005). Le zoospore sono biflagellate e si muovono nuotando nel velo d'acqua che si forma sulla superficie vegetale, fino a raggiungere le aperture stomatiche per un'attrazione chemiotattica da parte degli stomi stessi, la cui natura non è stata tuttavia chiarita (Kiefer *et al.*, 2002). Una volta raggiunto lo stoma le zoospore si incistano perdendo i flagelli e germinano producendo un tubetto germinativo che, raggiunta la cavità sottostomatica, si allarga in una vescicola. Da questa vescicola si origina successivamente un'ifa primaria, dalla quale si sviluppa un micelio che

si ramifica velocemente nello spazio intercellulare del parenchima spugnoso. Le zoospore sono molto delicate e la loro vita al di fuori dei tessuti dell'ospite è molto limitata, in quanto sono sprovviste di parete e si disseccano facilmente in mancanza di acqua. Di conseguenza, in questa fase del ciclo vitale il patogeno è molto vulnerabile. Affinché la patogenesi abbia successo, il primo austorio prodotto deve essere funzionale e deve assicurare al parassita biotrofo le molecole necessarie al suo metabolismo. Le ife del patogeno si sviluppano allora rapidamente e producono a loro volta gli austori, particolari strutture di nutrizione, che entrano in stretto contatto con la membrana plasmatica delle cellule dell'ospite dopo aver superato la parete cellulare.



**Figura 2** – Tipica rappresentazione schematica del ciclo biologico di *Plasmopara viticola* (Jackson, 2008).

A temperature medie e umidità relativa ottimali l'oomicete colonizza tutto lo spazio intercellulare grazie alle ife ramificate e in 6-7 giorni inizia quindi il ciclo secondario agamico, in grado di produrre sporangi e rami sporangiofori che fuoriescono dalle aperture stomatiche. La sporulazione del patogeno richiede un'umidità relativa molto elevata

superiore al 95%, con un intervallo di temperatura compreso tra 13 e 19° C e almeno 4 ore di buio. La sporulazione avviene al buio, si completa in 7 ore ed è inibita da luce bianca o verde (Rumbolz *et al.*, 2002). L'esplosione epidemica della malattia è legata soprattutto al ripetersi di più cicli asessuati durante la stagione vegetativa in presenza di condizioni favorevoli, quindi con estati umide e temperate. A fine stagione, negli organi infetti dell'ospite tra la fine dell'estate e la fase di filloptosi, il patogeno si riproduce per via sessuata eterogamica. Lo spermatozista feconda l'oosfera contenuta nell'oogonio che dunque si trasforma in oospora; queste oospore, restano poi nei residui dei tessuti che cadono al suolo e durante l'inverno maturano se sottoposte a condizioni ambientali freddo-umide, mantenendo la loro vitalità per almeno due anni.

#### **2.4. INFEZIONI PRIMARIE E SECONDARIE**

Le infezioni primarie sono causate dalle zoospore provenienti dalle oospore prodotte dal ciclo sessuale, mentre le infezioni secondarie sono causate dagli sporangi derivanti dal ciclo asessuale di *P. viticola*. Le condizioni che rendono possibile il verificarsi delle infezioni primarie sono riassunte nella cosiddetta "regola dei tre dieci" messa a punto da Baldacci nel 1947: essa prevede che la contaminazione dovuta all'inoculo prodotto dalle oospore avvenga quando la temperatura minima sia intorno ai 10° C, sia caduta una pioggia di almeno 10 mm in due eventi piovosi nel giro di 24-48 ore e la lunghezza dei tralci sia di almeno 10 cm (Belli, 2007). L'inoculo formatosi a seguito della germinazione delle oospore può dar luogo a più ondate successive di infezioni primarie nel caso in cui ci siano condizioni favorevoli, ossia prolungata umidità della vegetazione data da eventi piovosi ripetuti. L'eterogeneità nella germinazione delle oospore non è ristretta all'anno successivo alla loro formazione, bensì può protrarsi fino a cinque anni con un potenziale infettivo molto elevato. Uno sviluppo epidemico di peronospora in vigneto può essere dunque causato da molteplici infezioni primarie risultanti dalla continua e scalare germinazione delle oospore nel corso della stagione, sebbene sia stato osservato che con l'avanzare della stagione il loro impatto diminuisce rispetto a quello delle infezioni secondarie (Gobbin, 2004). Una volta avvenuta l'infezione primaria si va incontro ad un periodo di incubazione (lasso di tempo che intercorre tra il momento dell'infezione e la comparsa dei sintomi caratteristici) che ha durata variabile dai 4 ai 15 giorni in relazione alle condizioni meteorologiche. Alla fine del periodo di incubazione, in condizioni favorevoli, può avvenire la formazione degli sporangi (Figura 3).



**Figura 3** – Sporangia di *Plasmopara viticola* visti al microscopio ottico (Pertot *et al.*, 2007).

Gli sporangia sono i responsabili delle infezioni secondarie e si originano a seguito di almeno 4 ore di buio con temperatura maggiore di 13° C e umidità relativa che si aggira intorno al 98%. I rami sporangiofori fuoriescono dagli stomi presenti sulla pagina inferiore delle foglie e si manifestano come muffa biancastra in corrispondenza dei sintomi della pagina superiore; essi producono i microsporangia che contengono le zoospore, le quali vengono disperse da acqua e aria ed innescano le infezioni secondarie. La dispersione con le precipitazioni è quella più efficace perché, oltre a liberare lo sporangio dal ramo sporangioforo, l'acqua è in grado di veicolare i propaguli verso il nuovo organo della pianta. Anche il vento può svolgere queste azioni di distacco e trasporto ma l'intensità deve essere elevata e l'infezione risulta meno efficace in quanto viene a mancare l'umettazione sull'organo verde dell'ospite. In ogni caso le infezioni secondarie sono strettamente legate alla temperatura in quanto se si presentano valori inferiori a 5° C o superiori a 29° C si ha una perdita di vitalità degli sporangia e una riduzione drastica delle probabilità di infezione.

## 2.5. DANNI E SINTOMATOLOGIA

*P. viticola* penetra nei tessuti dell'ospite attraverso le aperture stomatiche, quindi può colonizzare tutti gli organi verdi della vite sui quali sono presenti stomi funzionanti. Ne consegue che, colpendo organi fotosinteticamente attivi, le infezioni gravi possono compromettere il metabolismo generale delle piante, riducendo la capacità della pianta di produrre ed accumulare zuccheri, aromi ed altri componenti minori delle bacche. La diminuzione dell'attività fotosintetica è ovviamente la conseguenza più evidente della colonizzazione delle foglie e si ripercuote sia sulla nutrizione dei grappoli in accrescimento che sulla produzione di riserve da destinare agli organi legnosi e alle radici per le stagioni seguenti. La malattia ha però anche effetti sulla fisiologia generale della pianta, ad esempio

sugli scambi gassosi. I danni possono essere dunque divisi in diretti ed indiretti: i primi sono relativi agli attacchi sui grappoli che possono portare a una consistente perdita della produzione dell'anno in corso, mentre sono considerati indiretti danni a carico degli organi vegetativi, i quali possono portare a perdite quantitative consistenti e a scadimenti qualitativi sia della produzione in corso che degli anni successivi. Nel complesso i danni da peronospora dipendono dalla fase fenologica e dal momento dell'infezione e determinano un generale deperimento sanitario della pianta che diventa più suscettibile anche ad altre fitopatie.

### **2.5.1. Sintomi su foglie**

Le foglie giovani, con un diametro inferiore ai 2 cm, presentano aperture stomatiche non differenziate o poco numerose che le rende praticamente insensibili alla peronospora. Come accennato in precedenza, le foglie diventano suscettibili quando presentano stomi funzionanti e, come conseguenza dell'infezione, compaiono delle chiazze tondeggianti sulla pagina superiore, con colorazione che vira dal verde chiaro al giallastro. Le macchie rappresentano il classico sintomo visibile dell'avvenuta infezione sulle foglie di vite e vengono definite come "macchie d'olio", aree traslucide che compaiono dopo un periodo di incubazione variabile a seconda della temperatura ambientale e della natura dei tessuti vegetali (Figura 4). In seguito, se l'infezione è precoce, la macchia necrotizza a partire dal centro, determinando disseccamenti localizzati. Questo provoca nella peggiore delle ipotesi la parziale defogliazione della vite, che si traduce in un drastico peggioramento quantitativo della produzione dell'anno e si può ripercuotere anche sulle produzioni degli anni futuri influenzando negativamente il processo di lignificazione dei tralci. Le foglie di vite, con l'aumentare dell'età diventano meno sensibili agli attacchi di peronospora, con la crescita e l'ispessimento dei tessuti stessi infatti tendono ad acquisire una resistenza ontogenetica. Lo sviluppo delle ife del patogeno quindi è limitato in quanto le nervature creano delle barriere naturali che provocano degli ingiallimenti "a mosaico" tra una nervatura e l'altra. Con umidità ambientale elevata in corrispondenza delle macchie, sulla pagina inferiore delle foglie, compaiono i rami conidiofori che formano un tipico feltro biancastro facilmente riconoscibile (Figura 4). Gli sporangi che si sviluppano sulla pagina inferiore delle foglie in corrispondenza del mosaico manifestano una muffa biancastra più rada rispetto a quella presente su foglie giovani. Da notare che, in condizioni ambientali particolarmente favorevoli alla patogenesi (temperatura ottimale ed elevata umidità), sulle foglie più recettive si possono osservare sia la sporulazione, sia la necrosi senza la precedente formazione della macchia d'olio.



**Figura 4** – Tipici sintomi a “macchia d’olio” di peronospora della vite causati da *Plasmopara viticola* sulla pagina superiore della foglia (a sinistra); segni di sporulazione del patogeno rappresentati da un feltro biancastro che fuoriesce dalle aperture stomatiche della pagina inferiore, costituito dagli organi di riproduzione agamica (rami sporangiofori e sporangi) dell’oomicete (a destra) ([www.agroambiente.it](http://www.agroambiente.it)).

### **2.5.2. Sintomi su grappoli**

Gli attacchi di peronospora sui grappoli sono estremamente temibili dal punto di vista produttivo. A carico delle infiorescenze le infezioni possono essere gravi e causare forti perdite nelle annate più umide. Sui peduncoli e sui fiori compaiono macchie olivastre e successivamente un feltro miceliare biancastro. L’infezione precoce dell’infiorescenza (dalla prefioritura fino a fine fioritura) determina imbrunimento e ripiegamento ad uncino (o a “S”) della parte terminale del rachide (Figura 5). I grappolini nella fase iniziale dello sviluppo continuano a essere molto sensibili. Similmente a quanto avviene sulle foglie, in caso di pioggia o elevata umidità, raspo e racimoli vengono ricoperti dalle fruttificazioni biancastre del patogeno. I danni diretti sui grappoli colpiti possono essere gravi nelle annate favorevoli allo sviluppo della malattia, anche quando le infezioni sono tardive.





**Figura 5** – Giovane grappolo imbrunito e tipico ripiegamento a forma di “S” del rachide in seguito ad infezione peronosporica.

Gli attacchi di *P. viticola* sui grappoli in post-fioritura possono manifestare due diverse sindromi (marciume grigio e marciume bruno) in funzione dell’epoca d’attacco, dell’età dei grappoli e dell’umidità ambientale. Sui giovani grappoli la via d’entrata del patogeno è rappresentata dagli stomi degli acini, dei raspi, dei racimoli e dal cercine in corrispondenza della zona calicina. L’infezione del giovane grappolo determina allessamento e una caratteristica curvatura del rachide a “S” o a uncino a seguito dell’arresto della crescita dei tessuti infetti. Successivamente, si può osservare la produzione di un feltro biancastro sugli acini e da qui la conseguente denominazione in “marciume grigio”. Questa muffetta bianco-grigiastria, emessa attraverso gli stomi e fessurazioni della buccia degli acini, è tipica delle infezioni primaverili. Le infezioni a carico dei grappoli prossimi all’invaiaitura, invece, determinano la comparsa del “marciume bruno”, poiché gli acini imbruniscono (con sfumature più o meno violacee a seconda dello stadio fenologico), perdono di turgore e avvizziscono fino al disseccamento. Questa seconda forma è conseguente all’allegagione o ad attacchi su acinelli più grandi (di almeno 2 mm di diametro) in cui gli stomi sono degenerati in lenticelle, dalle quali il patogeno non riesce ad evadere per produrre i tipici rami sporangiofori. Questa sindrome prende il nome di “peronospora larvata” e conferisce agli acini il caratteristico colore bruno senza la presenza di micelio (Figura 6). La peronospora larvata si manifesta maggiormente nelle estati fresche e piovose, condizioni che consentono estesi attacchi tardivi (Pertot *et al.*, 2007). La resistenza ontogenetica degli acinelli si manifesta in maniera variabile in funzione sia della cultivar che delle variazioni stagionali che influenzano i tempi della fioritura (Kennelly, 2005).



**Figura 6** – Grappoli di varietà a bacca bianca affetti da peronospora larvata: gli acini diventano violacei (a sinistra) e iniziano a disidratarsi fino a seccare completamente (a destra).

### **2.5.3. Sintomi su altri organi verdi**

Tutti gli organi verdi, con stomi differenziati ed attivi, possono essere colpiti. I germogli erbacei sono attaccati soprattutto vicino ai nodi (Figura 7), o in maniera indiretta, attraverso infezioni dei piccioli fogliari. In questo ultimo caso l'agostamento dei tralci è impedito con conseguente esposizione a danni da freddo in inverno. Il primo sintomo che si evidenzia è una leggera clorosi, raramente seguita dalla tipica sporulazione dell'oomicete. L'infezione raramente interessa l'intera circonferenza del tralcio e molto spesso invece resta confinata nei tessuti superficiali dell'organo colpito.



**Figura 7** – Infezione di *Plasmopara viticola* su un giovane germoglio in prossimità dell'internodo (a sinistra) e lesioni dei tessuti corticali e piccoli cancri su germogli prossimi alla lignificazione (a destra).

Le porzioni colpite presentano allessature ed imbrunimenti. In caso di infezioni precoci la parte terminale del germoglio o del viticcio presenta un portamento contorto legato a fenomeni di ipertrofia cellulare (Ferrari, 2005). Con l'avanzare del processo di lignificazione diminuisce la recettività dei germogli e i sintomi, meno evidenti che su altri organi, sono caratterizzati da lesioni dei tessuti corticali e piccoli cancri (Figura 7).

### **3. L'OIDIO DELLA VITE**

#### **3.1. AGENTE CAUSALE**

L'oidio, o mal bianco, è una malattia parassitaria molto diffusa che provoca, specialmente nei vitigni più sensibili, ingenti danni sia a livello qualitativo che quantitativo. L'agente causale di questa malattia è il fungo ascomicete *Erysiphe necator* Schwein (forma anamorfa *Oidium tuckeri* Berk), appartenente alla classe degli *Leotiomycetes*, ordine *Erysiphales*, famiglia *Erysiphaceae*. Il fungo produce corpi fruttiferi contenenti gli aschi con le ascospore nella fase gamica o ascofora, mentre forma i conidi nella fase agamica o conidiofora. È un ectoparassita, per cui il micelio si sviluppa unicamente sulla superficie della pianta ospite e colpisce *V. vinifera* praticamente in tutti gli areali di coltivazione, causando gravi decrementi produttivi e scadimenti qualitativi (Calonnec *et al.*, 2004), con perdite economicamente rilevanti.

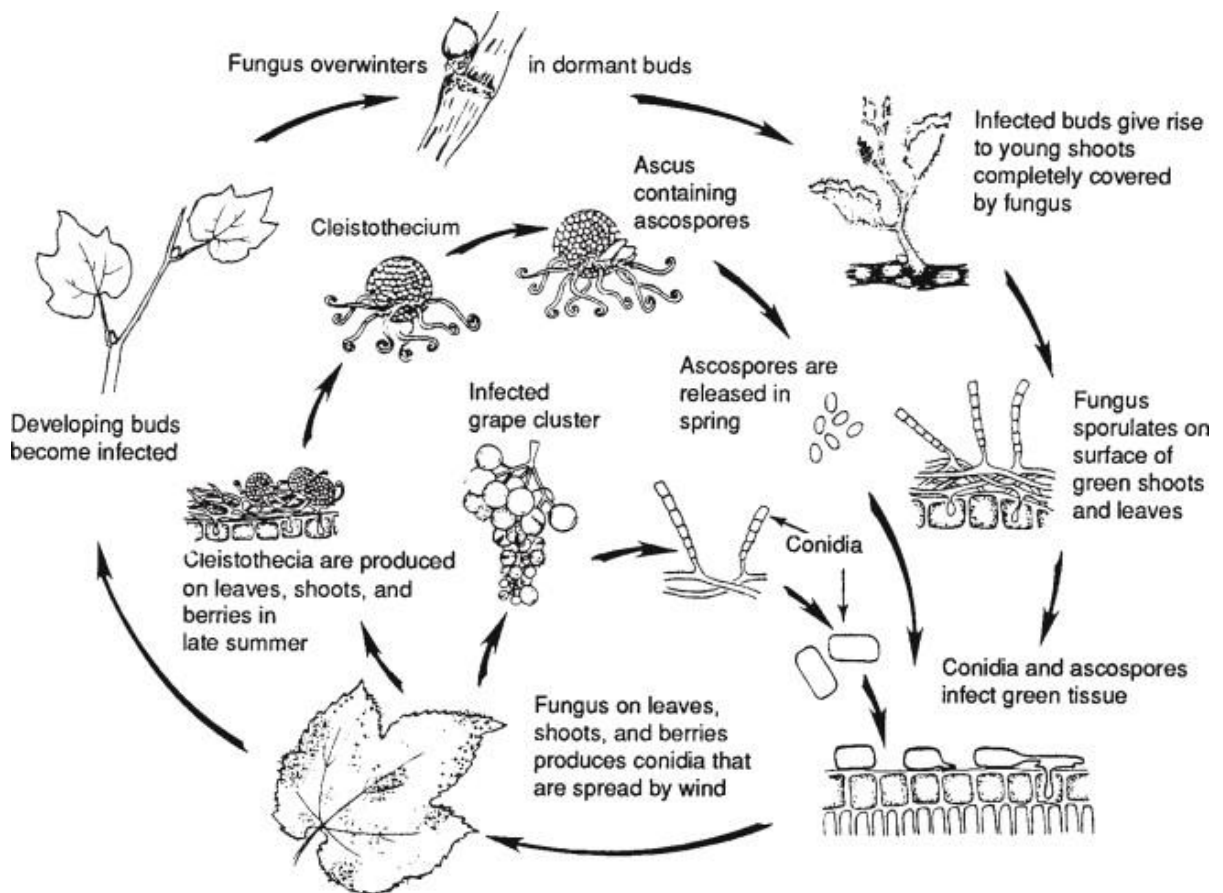
### 3.2. DIFFUSIONE

Il patogeno ha origini nordamericane; nella zona d'origine esso provoca danni poco rilevanti sulle viti americane, con le quali ha, probabilmente, condiviso la propria evoluzione. La prima pubblicazione certa su di esso è riconducibile a Schweinitz nel 1834. In Europa, la malattia fu osservata per la prima volta nel 1845 nel sud est dell'Inghilterra dal giardiniere Tucker: due anni dopo il botanico reverendo J. Berkley propose l'identificazione di una nuova specie nominata *Oidium tuckeri* in onore dello stesso giardiniere. Negli anni successivi la malattia si diffuse in tutta Europa, fu osservata in Italia per la prima volta nel 1849, e causò memorabili e devastanti infezioni fra il 1852 e il 1854 in diverse aree del bacino del mediterraneo. Nel 1866 il patogeno raggiunse anche l'Australia e alla fine del XIX secolo il Giappone e il Brasile. Oggi è diffuso in tutte le aree di coltivazione della vite.

### 3.3. CICLO BIOLOGICO DEL PATOGENO

Il ciclo di *E. necator* è assicurato dalla sua capacità di svernare in due diverse forme. È capace di sopravvivere come micelio nelle gemme infettate in tarda estate-inizio autunno durante la loro formazione e rimanere latente, protetto all'interno delle perule, fino alla primavera successiva quando dopo il germogliamento riprende la sua crescita e moltiplicazione e dà avvio alla colonizzazione della nuova vegetazione (Figura 8). Questo parassita può sopravvivere durante la stagione avversa anche attraverso i cleistoteci (Rügner *et al.*, 2001), derivanti dalla riproduzione sessuata. La prima forma di svernamento è tipica delle regioni con inverni molto miti ed è fortemente ostacolata dalle basse temperature invernali; infatti, temperature inferiori a  $-12^{\circ}\text{C}$  possono provocare la morte del micelio all'interno della gemma di vite. Mentre lo svernamento attraverso i cleistoteci è tipico di tutte le zone con inverni freddi. I cleistoteci contengono da 4 a 6 aschi a maturità, ciascuno dei quali contiene da 4 a 7 ascospore ialine ovato-globose e sono dispersi dalle piogge o dai forti venti e arrivano negli anfratti della corteccia delle viti o al suolo. Nelle zone con climi molto miti possono rilasciare le ascospore già nella tarda estate causando così infezioni tardive nella stessa stagione vegetativa (Gadoury *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2010). Una volta maturi, in primavera deiscono bagnati dalla pioggia, dalla nebbia o dalle irrigazioni, in un periodo compreso tra il germogliamento e la fioritura della vite (Rossi *et al.*, 2010), permettendo agli aschi di liberare le ascospore che germinano sulla superficie vegetale producendo un singolo tubetto germinativo che termina in un appressorio lobato. L'infezione delle ascospore è favorita da temperature al di sopra dei  $10^{\circ}\text{C}$  e da 2-3 mm di pioggia (Gadoury e Pearson, 1990). Le colonie fungine crescono e si sviluppano molto rapidamente

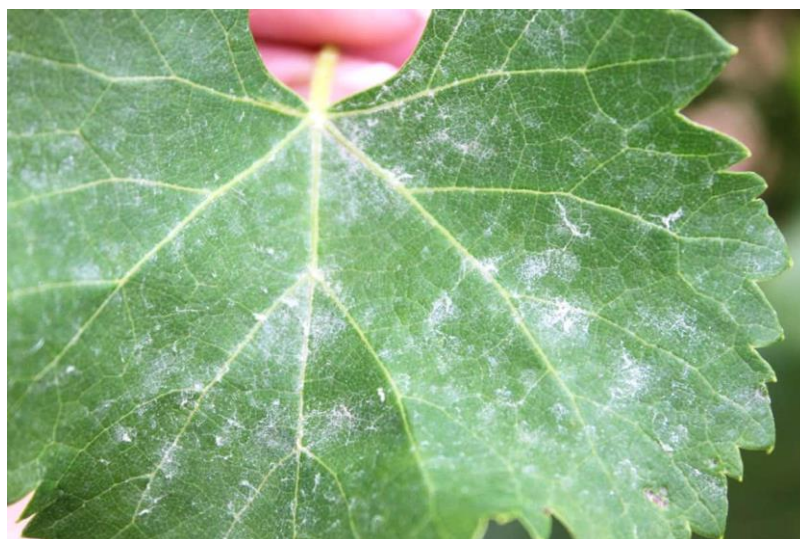
a temperature comprese tra 23 e 30°C con un optimum a 26°C, ma i limiti termici dello sviluppo sono ben più ampi, andando da 6 a 32°C. Temperature di 36°C possono devitalizzare le colonie più esposte in alcune ore, ma nelle parti più interne ed ombreggiate della chioma della pianta, le colonie possono sopravvivere e tornare successivamente a sporulare: nelle foglie più esposte, infatti, la temperatura delle superficie può essere più alta di 15°C rispetto alle foglie più ombreggiate (Gadoury *et al.*, 2011). La pioggia battente contrasta lo sviluppo di epidemie in quanto rischia di dilavare i conidi ed il micelio dalla superficie degli organi infetti. La presenza di acqua sulla pianta è un ostacolo alla germinazione dei conidi che spesso si deformano come conseguenza di un'eccessiva pressione di turgore cellulare. Per contro, l'aumento di umidità relativa che si ha dopo la pioggia stimola una maggiore produzione di conidi. Raramente l'umidità diventa fattore limitante in quanto i conidi possono germinare già con valori di umidità relativa del 20-25%; valori del 40-60% sono sufficienti per la germinazione e l'infezione.



**Figura 8** – Ciclo biologico di *Erysiphe necator* (Jackson, 2008).

### 3.4. DANNI E SINTOMATOLOGIA

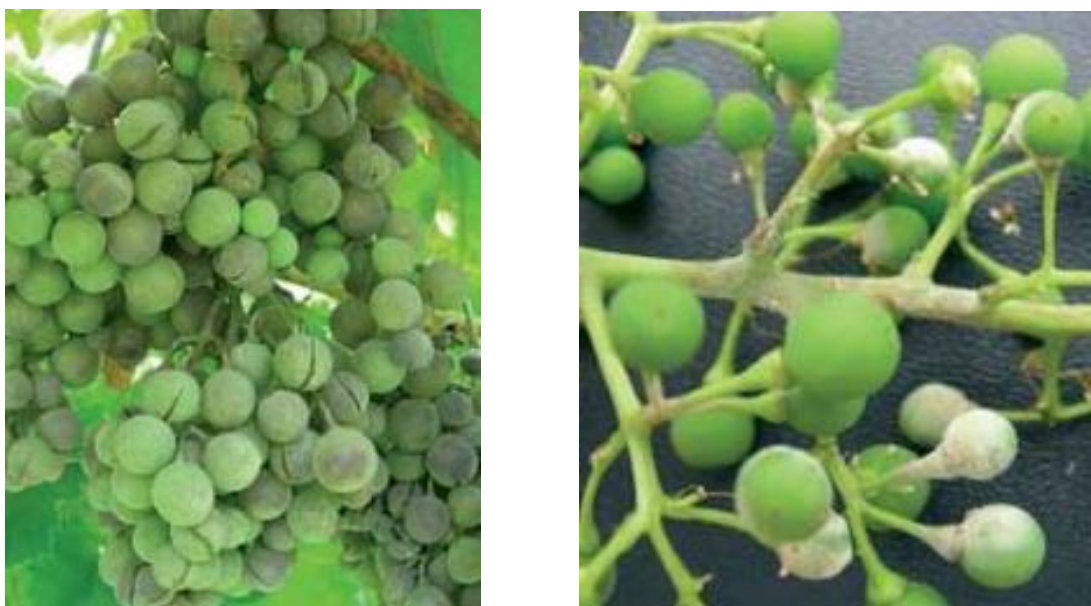
L'oidio, così come la peronospora, colpisce tutti gli organi verdi delle piante ospiti. I sintomi sulle foglie sono costituiti da aree più chiare sulle quali compare inizialmente una patina biancastra evanescente ed in seguito un'efflorescenza polverulenta (Figura 9). In caso di forti attacchi e con l'evolvere della malattia compaiono imbrunimenti delle nervature e punteggiature necrotiche. Nella fase iniziale dell'infezione i sintomi possono essere confusi con quelli della peronospora poiché le decolorazioni clorotiche possono ricordare le classiche macchie d'olio causate da quest'ultima. Con la progressione della malattia la lamina fogliare si piega verso l'alto assumendo la tipica conformazione “a coppa” come conseguenza dell'arresto della crescita dei tessuti; in seguito, la foglia ingiallisce, necrotizza e cade anticipatamente.



**Figura 9** – Sporulazione di oidio sulla pagina superiore della foglia di vite.

Le foglie mature sono meno suscettibili di quelle giovani, sia in cultivar suscettibili che resistenti ma in queste ultime la maturazione e l'invecchiamento dei tessuti sono accompagnati da una resistenza più marcata (Péros *et al.*, 2006). L'oidio può colpire anche i tessuti giovani dei tralci, in seguito alla necrosi delle cellule superficiali dovuta all'azione del patogeno compaiono delle aree brune dall'aspetto reticolato che rimangono visibili anche dopo la lignificazione. Sui germogli il sintomo è causato dalla rapida colonizzazione dei tessuti da parte del micelio svernante protetto dalle perule all'interno delle gemme. In primavera i germogli infetti sono precocemente ricoperti da un'abbondante muffa biancastra polverulenta e, poiché lo sviluppo della lamina fogliare è ostacolato dall'attività del patogeno, assumono un aspetto particolare che è valso loro la denominazione di “germogli

a bandiera” dal termine inglese “*flag-shoots*”. I sintomi più gravi della malattia si hanno sulle infiorescenze che sono suscettibili già prima della fioritura. Gli attacchi precoci causano l’aborto e la caduta dei fiori o inibiscono la crescita dei grappolini. In seguito ad infezioni post-fiorali le cellule dell’epidermide degli acini colpiti dal patogeno necrotizzano, non riescono ad assecondare la crescita in volume della polpa e di conseguenza si spaccano aprendo la strada ad altre infezioni. In caso di attacchi deboli o più tardivi, sugli acini si formano punteggiature e imbrunimenti, accompagnati dalla classica efflorescenza biancastra (Figura 10).



**Figura 10** – Tipiche spaccature degli acini in crescita osservabili su un grappolo di vite (a sinistra) e infezioni di oidio su rachide e bacche di un giovane grappolo con tipica efflorescenza biancastra data dalla sporulazione del patogeno (a destra) (Pertot *et al.*, 2007).

I grappoli e gli acini sono molto sensibili all’infezione; in particolare, gli acini sono maggiormente suscettibili durante il periodo compreso tra l’allegagione e la fase di “chiusura” dei grappoli. Sull’acino lo sviluppo dell’oidio è molto lento e spesso le infezioni avvenute in giugno possono manifestarsi visivamente soltanto in agosto. I danni diretti od indiretti dovuti ad attacchi di oidio possono essere molteplici. Nel dettaglio, quelli indiretti riducono fortemente la produttività della pianta e il suo sviluppo vegetativo, favorendo inoltre l’insorgenza di altre malattie; i germogli ed i tralci infetti non si sviluppano adeguatamente, sono cioè deboli ed irregolarmente lignificati, mentre le foglie hanno minore capacità fotosintetica e di accumulo dei fotosintati, a causa del loro continuo

depauperamento da parte dell'azione parassitaria del fungo. La minore disponibilità di zuccheri ed altri metaboliti limita la crescita dei tessuti della pianta; inoltre, se da un lato l'azione parassitaria del fungo riduce la fotosintesi, dall'altro, a causa dell'infezione, aumentano respirazione e traspirazione dei tessuti infetti con conseguente ulteriore depauperamento delle sostanze nutritive prodotte. La riduzione dell'accumulo di zuccheri si ripercuote direttamente sullo sviluppo della pianta e sull'accumulo di riserve energetiche per la stagione successiva, ma anche sulla produzione, con vistose riduzioni del grado zuccherino delle uve alla raccolta. Un altro importante danno indiretto, legato soprattutto al depauperamento delle sostanze nutritive della pianta da parte del fungo, è il ritardo di maturazione dell'uva con conseguenti ripercussioni negative sulla qualità del vino. I danni indiretti si fanno ancora più pesanti se c'è filloptosi (caduta delle foglie infette) anticipata. Per quanto riguarda i danni diretti alla produzione, sono considerati più rilevanti quelli a carico dei fiori che, in seguito all'infezione, si deformano, producono poco polline e di conseguenza perdono fertilità dando origine a grappoli con pochi acini. I danni al grappolo possono limitarsi alla comparsa di reticolature necrotiche brunastre sugli acini oppure, in seguito alla perdita di elasticità dell'epidermide a causa della morte delle cellule superficiali, evidenziarsi con spaccature che aumentano il rischio di infezioni di muffa grigia e marciume acido. Gli attacchi più gravi possono portare alla perdita totale della produzione dovuta alla degenerazione ed al disseccamento del grappolo. Altrettanto grave è l'attacco al rachide e ai peduncoli che porta frequentemente alla caduta degli acini e quindi a perdita di produzione. I vigneti colpiti in modo grave dalla malattia sono potenzialmente predisposti ad attacchi più precoci e intensi nell'anno successivo, sono più sensibili ai freddi invernali ed agli attacchi di altri patogeni.

#### **4. STRATEGIE DI GESTIONE DELLA PERONOSPORA**

*P. viticola* risulta essere ancora oggi di difficile controllo sia in agricoltura integrata che in agricoltura biologica e rappresenta una delle principali avversità della vite, in quanto in determinate condizioni può portare ad importanti perdite di produzione sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo. La protezione oggi non si basa più soltanto sull'utilizzo di sostanze chimiche ma è concepita come integrazione tra le conoscenze sulla biodiversità varietale, sui processi ecologici del suolo, sulle tecniche colturali e sulla gestione dei fattori ambientali, utilizzando in modo coordinato i mezzi a disposizione che siano essi agronomici, fisici, genetici, chimici e microbiologici. Le strategie di protezione sono studiate al fine di ridurre gli interventi al momento più opportuno e allo scopo di applicare misure razionali di



contenimento di una data malattia certi della diagnosi effettuata, delle caratteristiche del patogeno in questione, delle condizioni ambientali che lo favoriscono e delle eventuali difese naturali della specie o della varietà presa in esame, impiegando molecole con un ridotto impatto ambientale e meno pericolose per la salute degli operatori agricoli e dei consumatori finali. È infatti di fondamentale importanza tener conto della salvaguardia della salute degli operatori agricoli direttamente coinvolti nell'impiego dei prodotti fitosanitari oltre che dei consumatori finali a livello di sicurezza alimentare. Inoltre, si devono rispettare gli equilibri ecologici che già di per sé garantiscono un contenimento naturale di patogeni e fitofagi economicamente dannosi per l'attività agricola. Tuttavia, per alcune malattie importanti come la peronospora della vite, il ricorso ai mezzi chimici risulta essere ancora oggi lo strumento di contenimento più utilizzato e più efficace.

#### **4.1. LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA INTEGRATA**

L'agricoltura integrata si basa su un sistema di controllo che consiste nell'uso razionale e ottimale di tutte le tecniche di protezione disponibili, che siano di natura biologica, chimica, fisica e agronomica, combinate tra loro al fine di mantenere gli organismi nocivi al di sotto di una soglia tale da non provocare un danno economico. A tal proposito è bene differenziare la protezione integrata che coniuga i vari mezzi a disposizione per il mantenimento del patogeno sotto una determinata soglia d'intervento e la produzione integrata, che invece non riguarda solo la protezione dalle malattie ma estende il concetto di gestione integrata dell'agroecosistema a tutti i fattori della produzione per perseguire non solo la protezione della coltura, bensì il miglioramento della qualità globale del prodotto, in vista di una sua ottimizzazione sia sul piano ecologico, che su quello economico. La Direttiva CE n.128 del 21 ottobre 2009 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei prodotti fitosanitari definisce la protezione integrata come «l'attenta considerazione di tutti i metodi di protezione fitosanitaria disponibili e la conseguente integrazione di tutte le misure appropriate, volte a scoraggiare lo sviluppo di popolazioni di organismi nocivi e che mantengono l'uso dei prodotti fitosanitari e altre forme d'intervento a livelli che siano giustificati in termini economici ed ecologici, riducendo o minimizzando i rischi per la salute umana e per l'ambiente. L'obiettivo prioritario della protezione integrata è la produzione di colture difese con metodi che perturbino il meno possibile gli ecosistemi agricoli e che promuovano i meccanismi naturali di controllo fitosanitario» (articolo 3, Decreto Legislativo n. 150/2012). In Italia, i principi della protezione integrata si sono concretizzati in specifici programmi regionali riuniti nei "Disciplinari di produzione

integrata” che ne regolano la corretta applicazione. Per far sì che la protezione integrata risulti efficiente sono necessari diversi accorgimenti quali: la prevenzione attraverso misure agronomiche, la conoscenza della biologia dell’organismo infestante, il monitoraggio per verificarne l’effettiva presenza e stabilirne la densità, l’individuazione del momento di intervento più opportuno, la valutazione della soglia di tolleranza o danno, l’attribuzione della priorità degli interventi agronomici, biologici, fisici e, in caso di intervento chimico necessario, la scelta di composti meno tossici, meno persistenti e più selettivi. Con questi criteri quindi si definisce l’obbligo di puntare verso sistemi agricoli sostenibili e a basso impatto ambientale. Questo tipo di concetto è sicuramente recente ed ha preso campo grazie ad una sempre maggiore sensibilità verso l’ambiente e grazie anche alla constatazione che le strategie di protezione messe in atto in passato presentavano molti punti critici. In particolare, era molto diffuso un approccio calendarizzato alla difesa fitosanitaria ed era pratica comune l’uso ripetuto ed esclusivo di mezzi chimici per il contenimento di organismi dannosi alle colture con conseguenze negative per l’ambiente, gli organismi non-target e la salute umana. In aggiunta, in questo contesto si sono sempre più diffusi fenomeni di resistenza ai vari principi attivi fra i patogeni stessi, con la necessità quindi di immettere continuamente nel mercato nuove sostanze attive. Inoltre, non di minore importanza, il continuo ricorso agli input chimici porta con sé problemi dal punto di vista degli eccessivi residui dei principi attivi sia nella produzione destinata all’uso alimentare sia nell’ambiente, provocando gravi danni agli ecosistemi naturali. Infine, va considerato che l’eccessivo impiego di mezzi chimici comporta un’esposizione maggiore degli operatori agricoli a rischi per la propria salute. Sulla base di questi concetti, la ricerca in questo campo ha come obiettivo quello di valutare le possibilità di applicazione di altre strategie di protezione fitosanitaria meno impattanti e pericolose, che in alcuni casi hanno già mostrato ottimi risultati dal punto di vista dell’efficacia e della sostenibilità ambientale, sanitaria o economica. Nella protezione integrata dunque sono coinvolti sia mezzi diretti che indiretti nei confronti delle avversità e in campo ci si può avvalere, in particolare, di mezzi agronomici, genetici, biotecnologici e biologici ad integrazione o sostituzione dei mezzi chimici. Le tecniche di protezione agronomiche, ad esempio, si basano sul concetto di prevenzione dell’insorgenza delle condizioni ideali per la malattia, agendo quindi indirettamente sull’organismo fitopatogeno e riducendone il rischio di insediamento o sviluppo. Le principali tecniche di prevenzione agronomica si basano sulla gestione razionale della chioma (interventi di potatura mirati, eliminazione porzioni e/o organi infetti, razionalizzazione dell’irrigazione e della nutrizione azotata ed altro), sull’eliminazione delle

fonti d'inoculo (ad esempio dai residui colturali) e su una serie di interventi volti a rendere l'ambiente circostante avverso o inospitale allo sviluppo degli organismi fitopatogeni (consociazioni, lavorazioni del terreno ed altro). Di fondamentale importanza è inoltre la scelta del luogo, del periodo d'impianto e della varietà in funzione delle specifiche condizioni pedoclimatiche di coltivazione, prediligendo varietà tolleranti o resistenti alle principali avversità che colpiscono la coltura in esame. I mezzi biologici invece sono riferiti all'utilizzo di organismi antagonisti dei patogeni. Infine, un altro pilastro della protezione integrata è l'impiego di materiale di propagazione sano che garantisce l'assenza di organismi dannosi all'impianto. Tutte queste strategie hanno lo scopo di evitare interventi chimici superflui, trattando con dei mezzi chimici solo ed esclusivamente in presenza di un rischio reale o molto probabile di infezione con prodotti di elevata qualità dal punto di vista ecotossicologico. L'adozione di strategie di difesa e di produzione integrata hanno evidenziato la necessità di individuare prodotti efficaci che possano andare a sostituire i fungicidi tradizionali, tra cui anche il rame utilizzato nella protezione antiperonosporica. Dunque, risulta molto importante la ricerca e la sperimentazione in campo fitosanitario, al fine di trovare degli anticrittogamici alternativi a quelli attualmente in uso nella lotta ai patogeni che possano essere utilizzati nel rispetto dell'ecosistema agroambientale.

#### **4.2. LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA BIOLOGICA**

L'agricoltura biologica è disciplinata a livello europeo dal Regolamento Ce 834/2007 e dalle sue modalità applicative riportate nel Reg. Ce 889/2008, norme che hanno sostituito, a partire dal 1° gennaio 2009, il Reg. Cee 2092/91. I suoi principi base risiedono nell'abolizione di input chimici di sintesi, infatti l'impiego di pesticidi che possono avere conseguenze nocive per l'ambiente o dare origine a residui nei prodotti agricoli deve essere fortemente limitato. È opportuno dare la preferenza all'applicazione di misure preventive nella lotta contro i parassiti, le malattie e le erbe infestanti. L'agricoltura biologica, quindi consiste in un sistema di produzione compatibile con l'ambiente che si basa sulla capacità di autoregolazione degli ecosistemi e si prefigge come obiettivo quello di mantenere l'equilibrio nell'agroecosistema salvaguardando la biodiversità, la fertilità del terreno e in generale l'ecosistema agrario, difendendo le colture mediante l'applicazione di tecniche di protezione biologiche e l'uso di pratiche agronomiche tradizionali o di prodotti fitosanitari di origine naturale o chimica non di sintesi. Nonostante questo, ci sono dei patogeni che risultano essere difficilmente controllabili con i mezzi di protezione diversi da quelli chimici e tra questi di sicuro rientra anche *P. viticola*. Tra le sostanze più utilizzate in agricoltura

biologica troviamo due principi attivi inorganici, fondamentali per la protezione del vigneto biologico: lo zolfo e il rame. Per quanto riguarda lo zolfo non esistono limitazioni nell'utilizzo, mentre per il rame la quantità massima a disposizione è stata ridotta in media a 4 kg ad ettaro per anno, a causa delle sue caratteristiche intrinseche di pericolosità per l'uomo e l'ambiente. Queste limitazioni mettono in grossa difficoltà soprattutto le aziende a conduzione biologica, dove appunto il rame è l'unico antiperonosporico ammesso per l'utilizzo e di accertata efficacia, nonché l'unica arma a disposizione degli agricoltori per contrastare la malattia, in quanto non sono presenti alternative chimiche da poter applicare (Pertot *et al.*, 2007) e le altre pratiche adottabili in biologico non sono altrettanto efficaci. Tuttavia, come accennato in precedenza il rame essendo un metallo pesante si accumula nel terreno causando diversi effetti ambientali negativi, come l'inquinamento delle falde acquifere e l'alterazione dello sviluppo dei microrganismi e dei lombrichi giungendo talvolta anche a concentrazioni tossiche per la vite stessa, perciò, è necessario trovare delle alternative che ne limiti quanto possibile l'utilizzo.

## **5. MEZZI DI PROTEZIONE DALLA PERONOSPORA**

La gravità dei danni che la peronospora è in grado di provocare su *V. vinifera* rende necessario mettere a punto strategie che consentano al viticoltore di conseguire un raccolto soddisfacente assicurandosi un reddito ogni anno. Il principio su cui si basano tutte le strategie di protezione dalla peronospora è quello della prevenzione che deve garantire un basso livello di pressione della malattia durante la stagione vegetativa. Infatti, l'aspetto più complesso per impostare una strategia di protezione razionale contro *P. viticola* è lo studio approfondito delle correlazioni fra andamento climatico e maturazione delle oospore così da prevedere l'inizio dell'infezione primaria. Tuttavia, per una protezione efficace della vite dal patogeno, ancora oggi, si rende necessario ricorrere ai trattamenti chimici adottando una impostazione cautelativa-preventiva in quanto *P. viticola* in condizioni favorevoli, essendo un patogeno policiclico, può provocare perdite onerose anche a partire da una piccola quantità di oospore svernanti.

### **5.1. MODELLI PREVISIONALI**

Nel caso di malattie infettive ad elevata pericolosità come la peronospora della vite, è pressoché impossibile subordinare i trattamenti all'accertamento dei sintomi visivi ed è pertanto necessario il ricorso ad approcci di tipo cautelativo o preventivo, con l'ausilio valutazioni previsionali. I modelli epidemiologici hanno come principale obiettivo la

previsione del rischio di comparsa o di sviluppo epidemico della malattia, per poter così adattare la strategia di intervento e razionalizzare gli interventi antiperonosporici in funzione del reale rischio infettivo. L'attività si concretizza nel fornire ai viticoltori, attraverso un puntuale sistema di avvertimento, indicazioni tempestive sulle linee di difesa da adottare, in relazione all'epoca d'intervento e ai prodotti fitosanitari più appropriati nelle varie situazioni. I modelli previsionali legati alle patologie fungine si basano su algoritmi che mettono in relazione i dati meteorologici (pioggia, temperatura, umidità relativa, bagnatura fogliare) con parametri di sviluppo dei funghi (es. maturazione, germinazione, dispersione delle oospore) per individuare il momento di avvio delle infezioni e la loro evasione dal tessuto vegetale. Molti di questi sono stati sviluppati per una migliore gestione dei trattamenti fungicidi, in particolare per il controllo delle infezioni primarie (Caffi *et al.*, 2006). Per arrivare a fornire agli agricoltori indicazioni precise sulla necessità o meno di effettuare interventi contro determinate malattie, i modelli vengono integrati da altre informazioni ottenute tramite rilievi periodici dello stato fitosanitario della coltura su campi spia non trattati, che quindi possono manifestare con anticipo gli eventuali sintomi della malattia, oppure quantificando la presenza di spore fungine di alcuni funghi patogeni presenti nell'ambiente.

Nel caso specifico della peronospora della vite rivestono fondamentale importanza i dati forniti dai servizi agrometeorologici locali (ASSAM), quali temperatura, umidità relativa, precipitazioni e ore di bagnatura. Tra i principali modelli previsionali in uso per il monitoraggio di *P. viticola* troviamo i modelli IPI e UCSC. Il modello IPI (Indice di Potenziale Infettivo) fornisce indicazioni sulla prima pioggia potenzialmente infettante, in sostituzione della vecchia "regola dei tre dieci", mentre il modello UCSC (*Grapevine Downy Mildew Primary Infection*) mostra una rappresentazione grafica di tutte le infezioni primarie che si verificano nel corso della stagione. A questo scopo il modello UCSC utilizza dati orari di temperatura dell'aria, umidità relativa, pioggia e bagnatura fogliare per simulare dettagliatamente i processi infettivi. Il modello, di tipo meccanicistico, si basa sul concetto fondamentale secondo cui la popolazione di *P. viticola* all'interno di un vigneto è composta da diverse famiglie di oospore che, durante il periodo invernale, si trovano in fase di quiescenza. Queste famiglie devono superare un determinato e graduale periodo di latenza, dopo il quale iniziano a germinare. Il processo di simulazione della germinazione prende avvio a ogni evento piovoso che bagna il tappeto di foglie del vigneto. La simulazione può essere interrotta in ogni fase del processo infettivo, se le condizioni climatiche non sono favorevoli al patogeno, così come può completarsi sino alla comparsa dei sintomi sulla

vegetazione. Il processo infettivo viene scomposto in sei differenti fasi: superamento della latenza (temperatura e bagnatura della lettiera), germinazione delle oospore (bagnatura fogliare), sopravvivenza degli macrozoosporangi (circa due giorni in condizioni ottimali), rilascio e dispersione delle oospore (bagnatura fogliare), infezione (temperatura e durata della bagnatura fogliare) e incubazione (temperatura e umidità dell'aria). Tra i due modelli previsionali presi in esame l'UCSC è più articolato rispetto all'IPI dal momento che esso si basa esclusivamente su misure meteorologiche giornaliere per un breve periodo (a partire dal 1° marzo). Tuttavia, è da precisare come la numerosità delle variabili prese in esame dal modello UCSC deve essere accompagnata da un adeguato numero di stazioni meteorologiche soprattutto in caso di vaste aree di coltivazione. Ciò è necessario in quanto piccole imprecisioni dei dati meteo possono portare a squilibri previsionali importanti. Proprio per questo, in aree dove il dato meteorologico risulta essere poco analitico, si preferisce l'uso del modello IPI. Esistono anche altri modelli previsionali che sono in grado di simulare la progressione delle infezioni secondarie a partire dalla comparsa in campo dei primi sintomi o dall'avvenuta infezione in funzione della "regola dei tre dieci". Sistemi previsionali di questo tipo sono il Vinemild, messo a punto in Svizzera, il Pro, elaborato in Germania, il Milvit in Francia e il Plasmò in Italia. Dal punto di vista pratico però, sebbene questi sistemi siano precisi e affidabili, non tengono conto del momento esatto in cui prendono avvio le infezioni primarie, fulcro su cui si basano tutte le strategie di protezione.

## **5.2. MEZZI AGRONOMICI**

Le pratiche agronomiche non sono risolutive, ma possono essere d'aiuto nel contenimento e nell'impostazione di una strategia di protezione che sia il più efficace possibile contro il patogeno contribuendo al contenimento dei danni. Nella fase d'impianto bisogna considerare le caratteristiche dei diversi patogeni che colpiscono la vite e in particolare a causa di *P. viticola* si devono evitare le zone di fondovalle e le zone dove in generale tendono a verificarsi frequenti ristagni idrici e situazioni di prolungata bagnatura fogliare. Un altro fattore di centrale importanza nella scelta del luogo d'impianto è l'eventuale presenza di vigneti abbandonati che avvantaggerebbero l'oomicete costituendo una notevole fonte di inoculo e un importante minaccia per gli impianti sani vicini, pertanto risulta indispensabile l'eliminazione di questi vigneti. Per quanto riguarda invece gli interventi da fare durante la gestione del vigneto, questi riguardano soprattutto l'arieggiamento della fascia vegetativa, soprattutto intorno ai grappoli. Gli accorgimenti tecnici riguardano il mantenimento di una giusta carica di gemme durante la potatura invernale, effettuare una puntuale potatura verde

per eliminare i germogli inutili e cimare quelli portanti i grappoli, effettuare una defogliazione che può essere più intensa nella parete del filare meno esposta alla luce del sole ed evitare ristagni di acqua con opportune lavorazioni del terreno. Altre pratiche agronomiche di importanza rilevante riguardano la corretta gestione dell'interfila e dei residui di potatura.

### **5.3. RESISTENZA VARIETALE**

Negli ultimi anni, anche la selezione dei caratteri di resistenza è tornata ad essere un'arma di difesa contro i patogeni. La suscettibilità a *P. viticola* accomuna tutte le varietà di *V. vinifera*. Tuttavia, esistono anche specie di *Vitis*, appartenenti soprattutto al ceppo americano (*V. rotundifolia*, *V. riparia*, *V. cordifolia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri*), che presentano una resistenza proprio nei confronti del patogeno a seguito di una forte selezione dovuta alle condizioni ambientali in cui si sono sviluppate. Il problema principale consiste nel fatto che le specie americane di *Vitis* risultano inadatte alla produzione di vino. Proprio su questi concetti si sono basati gli studiosi per effettuare un programma di miglioramento genetico volto a trasferire i geni di resistenza all'interno del genoma della tipica vite europea. Le tecniche con cui effettuare questo tipo di trasferimento sono essenzialmente tre: l'incrocio tradizionale, la transgenesi (che consiste nell'inserimento nella pianta di un gene di una specie diversa) e la cisgenesi (con la quale viene inserito un gene di un organismo della stessa specie). Strettamente legata a quest'ultima è poi il *genome editing*, tecnica che consente di effettuare interventi molto precisi con cui si sono ottenute alcune varietà resistenti a peronospora e oidio. Il miglioramento genetico nel campo vitivinicolo è fondamentale per limitare l'uso del rame e di altri fitofarmaci che causano una pressione ambientale elevata. Contemporaneamente alle ricerche di carattere molecolare, la conoscenza del patrimonio viticolo, fornisce sia materiale utile nei programmi di selezione genetica che nella scelta dei vitigni da utilizzare nella viticoltura di qualità, eventualmente anche nel regime di coltivazione in biologico.

#### **5.3.1. Meccanismi di resistenza a *Plasmopara viticola***

I meccanismi di difesa nelle piante possono essere distinti in meccanismi costitutivi ed indotti. Le resistenze costitutive sono già presenti nelle piante prima del contatto con il patogeno e sono riconducibili a fattori morfo-anatomici della foglia, del grappolo e dell'acino e alla presenza di composti con attività antifungina preformati, come ad esempio composti fenolici (Gabler *et al.*, 2003). Nel caso di resistenza indotta l'attivazione di

meccanismi di difesa è determinata dall'attacco del patogeno, quindi l'espressione della reazione di difesa è preceduta dal riconoscimento del patogeno da parte della pianta (Prell *et al.*, 2001). *V. vinifera*, specie di origine eurasiatica non è si è coevoluta con *P. viticola* prima della fine del XIX secolo e non possiede basi genetiche di resistenza. All'interno del genere *Vitis* sono state osservate differenti interazioni ospite-patogeno che corrispondono a diverse strade evolutive (Jürges *et al.*, 2009) causate anche dalla coevoluzione di *P. viticola* solo con le specie nordamericane *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. californica*. In queste, ma anche nella specie di origine asiatica *V. amurensis*, l'inibizione dello sviluppo del patogeno è molto rapida e si verifica dopo l'incistamento delle zoospore. Nelle specie asiatiche non siberiane, *V. coignetiae*, *V. ficifolia*, *V. quinqueangularis* e *V. Jacquemontii*, l'interazione con il patogeno non ha successo e le zoospore non si incistano nei pressi degli stomi, lo sviluppo del micelio è aberrante, si formano solo ife in superficie che però non producono sporangiofori funzionali. Al contrario in entrambe le sottospecie di vite europea, *V. vinifera sativa* e *V. vinifera silvestris* la colonizzazione del mesofillo non incontra ostacoli. Queste osservazioni confermano che l'interazione ospite-patogeno è sotto il controllo di specifici segnali legati alla diversificazione dovuta all'evoluzione.

➤ **Meccanismi di difesa costitutivi**

Le difese costitutive sono rappresentate da tutte quelle barriere fisiche o biochimiche presenti nella pianta indipendentemente dall'infezione e capaci di bloccare il processo di patogenesi nei primi stadi. Relativamente alla peronospora, poiché la penetrazione avviene per via stomatica nella pagina inferiore della foglia, molta attenzione è stata rivolta a comprendere il possibile ruolo dei tricomi presenti nel contrastare o meno il movimento delle zoospore che devono raggiungere l'apertura stomatica. Il feltro idrofobico costituito dai peli costituisce una strategia difensiva molto importante poiché l'infezione dipende sostanzialmente dalla bagnatura fogliare. I peli infatti intrappolano facilmente l'aria e riducono la superficie di contatto tra l'acqua e la lamina fogliare lasciando le spore maggiormente esposte a disidratazione. Nelle specie *V. doaniana* e *V. davidii* è stata osservata la capacità di peli e tricomi di catturare le gocce di acqua, impedendo la liberazione delle zoospore e causando la germinazione degli zoosporangi che producono direttamente le ife. Ciò rende il fungo incapace di raggiungere la superficie fogliare a causa della distanza elevata che lo separa da essa.



### ➤ *Meccanismi di difesa indotti*

Come accennato, le risposte di difesa indotte si manifestano a seguito del contatto tra la pianta e il patogeno o altri induttori di resistenza, che siano biotici o abiotici, e riguardano tutti i meccanismi metabolici in grado di contrastare l'infezione. Esse possono essere classificate in base alla velocità con la quale si manifestano. La risposta di difesa precoce si basa sul riconoscimento da parte della cellula vegetale attaccata di segnali del patogeno. Tali segnali attivano la traduzione a livello genico che porta ad una rapida morte cellulare. Questa risposta ipersensibile (*Hypersensitive Response*, HR), caratteristica anche delle interazioni patogeno-ospite incompatibili, determina un blocco della crescita e diffusione del patogeno che non può colonizzare i tessuti circostanti. La reazione ipersensibile è generalmente associata ad un solo gene dominante e viene chiamata resistenza verticale, in quanto molto efficace e specifica, ma facilmente superabile dal patogeno sviluppando geni di avirulenza. Sono state poi descritte reazioni di tipo sistemico (*Systemic Acquired Resistance*, SAR e *Induced Systemic Resistance*, ISR), dove segnali prodotti nelle piante presso il sito di attacco di un patogeno virulento si propagano all'intera pianta attivando una serie di meccanismi di difesa efficaci contro eventuali infezioni secondarie. La SAR viene attivata sia a livello radicale che a livello aereo e sia da stress abiotici che biotici e il mediatore del segnale è l'acido salicilico. La ISR è invece attivata a livello radicale da elicitori biotici, come ad esempio batteri ed in questo caso fungono da mediatori l'acido jasmonico e l'etilene. In ogni caso, l'effetto finale è comunque dato dall'induzione di resistenza sugli organi epigei, fondamentalmente attraverso la produzione di sostanze che ostacolano l'insediamento dei patogeni (es. fitoalessine). La risposta di difesa si basa sull'attivazione di una risposta genica sistemica e coinvolge cellule adiacenti a quella direttamente attaccata attraverso la produzione attiva di molecole che vanno a rinforzare le barriere strutturali, come la parete cellulare, o che inibiscono direttamente il patogeno. Risposte di difesa sistemica si basano anche sull'attivazione di geni che codificano per la produzione di proteine legate alla patogenesi (*Pathogenesis Related Protein*, PR), come glucanasi e chitinasi che agiscono direttamente sul patogeno. Tra le risposte indotte dall'infezione del patogeno a livello istologico e biochimico rientra anche la produzione di callosio. Dal momento che la penetrazione del patogeno è avvenuta, le difese induttive possono riguardare anche la produzione di molecole di difesa ad azione diretta come i flavonoidi, che sono costitutivi in alcuni tessuti vegetali ed il loro aumento in alcuni organi spiegherebbe ad esempio anche la maggiore resistenza alle patologie nei frutti che ne contengono più alte concentrazioni. L'accumulo di flavonoidi può essere anche indotto e correlato a stress abiotici, come

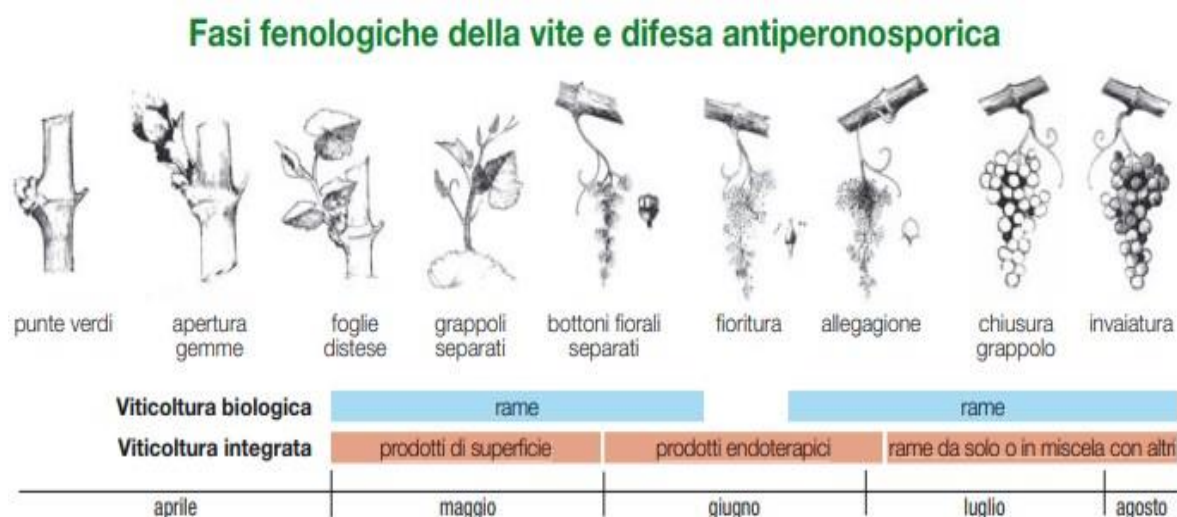
trattamenti fisici a base di raggi UV. Inoltre, l'induzione di resistenza nella pianta può essere stimolata anche tramite trattamenti chimici con prodotti simili a quelli generati nell'interazione ospite-patogeno, come nel caso del chitosano, induttore di resistenza noto da tempo per le sue potenzialità fitoiatriche, oltre che per le sue proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività; esso, una volta applicato sulle superfici vegetali, è in grado di svolgere una triplice attività: elicitante, filmogena e antimicrobica (Romanazzi *et al.*, 2018).

#### **5.4. MEZZI CHIMICI**

Ancora oggi il ricorso a prodotti fitosanitari dotati di attività antiperonosporica risulta essere necessario vista la parziale o totale inefficacia dei mezzi di lotta alternativi, i quali da soli non sono sufficienti al controllo della malattia. La difesa chimica nei confronti della peronospora della vite è generalmente preventiva e mira a limitare il più possibile le infezioni in modo da limitare il ricorso a trattamenti curativi. Si segue un approccio più o meno calendarizzato già dalla prima infezione; per questo a volte sono necessari interventi anche in assenza di pioggia, detti cautelativi, soprattutto nelle fasi fenologiche di elevata suscettibilità dalla differenziazione dei grappolini all'allegagione, per evitare che eventuali precipitazioni sulla vegetazione non preventivamente protetta, diano origine ad infezioni (Figura 11). I trattamenti su base cautelativa devono assicurare la copertura della vegetazione durante l'intero periodo di sviluppo del patogeno e pertanto devono essere ripetuti ad intervalli più o meno regolari in funzione della persistenza del principio attivo utilizzato e dell'andamento meteorologico. È di centrale importanza conoscere le caratteristiche degli agrofarmaci che vengono utilizzati e, in particolare, un sistema di classificazione ampiamente utilizzato li divide in base alla modalità d'azione in: fungicidi di superficie, che rimangono all'esterno del vegetale e svolgono un'azione preventiva; citotropici e translaminari, i quali vengono assorbiti dal vegetale e si ridistribuiscono localmente all'interno dei tessuti fino ad attraversare la lamina fogliare, svolgendo un'azione curativa nei confronti delle infezioni in atto; mentre i sistemici entrano nei tessuti conduttori e possono essere traslocati a distanza notevole dal punto di applicazione raggiungendo i vari organi vegetali. Solo in casi estremi si tende a sfruttare le capacità eradicanti di questi prodotti; inoltre, è buona norma impiegare composti endoterapici solo in miscela, con prodotti di superficie e con diverso meccanismo di azione, dove almeno una sostanza attiva abbia caratteristiche di copertura.

Per quanto riguarda la protezione delle viti dalla peronospora il rame resta comunque la molecola cardine in agricoltura integrata, ma soprattutto in agricoltura biologica dove

rappresenta l'unica sostanza attiva efficace ed ammessa. Tuttavia, a seguito di limitazioni legislative volte alla riduzione dell'impatto ambientale dovuto all'utilizzo reiterato nel tempo di questo metallo pesante, hanno preso il via numerose sperimentazioni relative a formulati innovativi a basso dosaggio di rame o a nuove molecole meno impattanti che potrebbero essere utilizzate in maniera complementare al rame o addirittura sostituirlo completamente.



**Figura 11** – Tipico schema di protezione della vite dalla peronospora in relazione alle fasi fenologiche della pianta sia in agricoltura biologica che in agricoltura integrata, facendo ricorso ai mezzi chimici (L'Informatore Agrario, 2017).

#### 5.4.1. Prodotti a base di rame

Nel 1882 a Bordeaux Alexis Millardet, botanico francese, per una fortuita coincidenza notò che alcune viti bagnate con una miscela bluastra di solfato di rame e calce mantenevano le foglie sane durante la stagione nonostante le infezioni di peronospora, malattia risultata distruttiva da pochi anni introdotta in Europa. Ad oggi, dopo più di un secolo il mercato dei fungicidi ha visto un enorme incremento di prodotti disponibili, ma il rame resta comunque la molecola che tuttora mostra la maggiore efficacia nei confronti della peronospora. Agisce su più livelli interferendo con i processi respiratori, frenando la biosintesi delle proteine, diminuendo l'attività della membrana cellulare con rallentamento nel trasferimento di ioni e bloccando i processi ossidoriduttivi agendo a livello dei gruppi sulfidrilici degli enzimi. L'attività antifungina viene espletata in presenza di anidride carbonica atmosferica e emessa dalla pianta. Inizialmente l'azione è di tipo fungistatico, presupponendo dei legami

abbastanza labili del metallo con le spore germinanti del fungo e sulle quali si verifica un accumulo di  $\text{Cu}^{++}$ . Su queste si può trovare una concentrazione di  $\text{Cu}^{++}$  fino a 100 volte superiore a quella presente nella soluzione circostante (Martelli, 1984). Questa concentrazione sviluppa due tipi di azione: (i) agisce a livello della membrana del fungo modificandone la permeabilità mediante la denaturazione delle proteine strutturali ed enzimatiche che la compongono; (ii) interferisce con numerose azioni enzimatiche, alterando i processi respiratori ed ossido-riduttivi provocando la morte della cellula del parassita. L'efficacia dei prodotti cuprici dipende dalla velocità con cui vengono liberati gli ioni rameici; la prontezza di azione varia quindi con il tipo di preparato, la formulazione e le caratteristiche chimico-fisiche. Particolare importanza rivestono le dimensioni e la struttura delle particelle: l'efficacia aumenta con il diminuire delle dimensioni delle particelle e risulta negativamente influenzata dal numero di passaggi chimici che il sale di rame deve subire prima di diventare attivo, liberando  $\text{Cu}^{++}$ ; allo stesso modo i cristalli a struttura angolare risultano più attivi rispetto a quelli rotondiformi. Per quanto riguarda lo spettro di azione dei preparati cuprici su vite, è stato dimostrato che il rame è attivo oltre che verso la peronospora della vite, anche su malattie provocate da altri funghi e batteri (Borgo, 2004). Tale prerogativa non è sempre data dalla diretta azione dei sali rameici sul patogeno, ma può essere la conseguenza di effetti secondari e collaterali. Fra questi aspetti si può annoverare l'ispessimento maggiore che il rame provoca nei riguardi della cuticola e dell'epidermide, consentendo una più elevata resistenza agli attacchi delle malattie in generale e dalla muffa grigia in particolare. Il rame, però, essendo un metallo pesante, possiede un'elevata tendenza ad accumularsi nel suolo. Durante i trattamenti, esso raggiunge l'uva e la vegetazione della vite, ma in buona parte si disperde accumulandosi nel suolo, con una concentrazione nel terreno e sui tralci di potatura che dipende dalla forma di rame utilizzata (Duca, 2016). Indagini svolte su Montepulciano nelle Marche hanno evidenziato un accumulo di rame nei terreni vitati che ne porta il contenuto al quadruplo di quello dei terreni coltivati diversamente. Nel suolo il rame non subisce degradazione o metabolizzazione, non evapora ma si lega alla sostanza organica ed ai colloidi del terreno. Il rame, in particolare quando si accumula in concentrazioni elevate, diventa dannoso anche per gli agenti ausiliari, quali coccinellidi, imenotteri e crisope. Quando nel terreno vengono raggiunti contenuti molto elevati di rame, si può infine assistere a visibili fenomeni di fitotossicità sulle piante stesse, costituiti da crescita stentata e clorosi. I composti di rame attualmente disponibili, dopo la revisione in ambito comunitario del 2009, sono: l'idrossido di rame, l'ossicloruro di rame, l'ossido rameoso, il solfato di rame neutralizzato e il solfato tribasico. Queste sostanze si

possono trovare in formulati tal quali o in miscela tra loro; le miscele più frequenti sono tra ossicloruro e idrossido, o solfato tribasico e idrossido. Tali formulazioni combinate permettono di sfruttare l'effetto sinergico fra i due componenti, per esempio l'immediatezza dell'idrossido e la maggior persistenza dell'ossicloruro o del solfato tribasico. Inoltre, queste combinazioni consentono di ridurre le dosi d'impiego e avere comunque un'efficacia analoga, ma con minor dispersione di rame metallo, dannoso per gli ecosistemi circostanti. Tutti i principi attivi si possono trovare in commercio con diverse formulazioni e concentrazioni di rame metallo in funzione della ditta formulatrice; quindi, è indispensabile che l'utilizzatore presti la massima attenzione alle indicazioni riportate in etichetta prima di qualsiasi impiego. I formulati commerciali a base di rame devono essere impiegati sempre in maniera preventiva, ossia prima di una pioggia infettante perché non hanno alcuna attività curativa sulle infezioni in atto e agiscono esclusivamente sulla porzione del vegetale coperta dal trattamento. È proprio per questo che, nonostante il rame sia tra i prodotti più persistenti e meno dilavabili, in caso di piogge o bagnature prolungate la copertura deve essere tempestivamente ripristinata, per coprire nuovamente la vegetazione e in particolare quella nuova che nel frattempo si è formata. I composti rameici, come tutti gli altri prodotti di superficie, proprio per il loro meccanismo d'azione multisito (agiscono cioè su più funzioni vitali delle cellule), non danno origine a fenomeni di resistenza, come invece può capitare a quelli ad azione mono o oligosito che penetrano all'interno della pianta e agiscono esclusivamente su uno o pochi bersagli specifici delle funzioni cellulari. Non ultimo per importanza, i composti cuprici non hanno effetti collaterali nei confronti degli insetti utili e quindi non arrecano alcun danno, per esempio, ai fitoseidi che sono i predatori dei temibili acari (ragnetti rossi o gialli delle colture).

Tra le molecole a base di rame comunemente adoperate in agricoltura per la protezione delle piante si annoverano:

➤ ***Poltiglia bordolese***

La poltiglia bordolese ( $\text{CuSO}_4 / 3\text{Cu}(\text{OH})_2 / 3\text{CaSO}_4$ ) è un prodotto rameico storico che prende il nome dalla città francese Bordeaux dove fu sperimentata per la prima volta. Contiene solfato di rame e idrossido di calcio all'1 %, vale a dire preparata con 1 Kg di solfato di rame e 1 Kg di calce spenta per ogni 100 litri di acqua. Le proporzioni tra solfato di rame e idrossido di calcio sono fondamentali, infatti se si aumenta il solfato di rame la poltiglia diviene più acida ed ha un effetto più pronto ma meno durevole nel tempo, mentre con una poltiglia più alcalina, ovvero contenente una maggiore dose di idrossido di calcio,

si ottiene l'effetto contrario, cioè meno prontezza d'azione ma più persistenza. Per evitare sgradevoli effetti fitotossici è consigliato comunque utilizzare una poltiglia a reazione neutra, data dalle proporzioni indicate sopra, e che di solito è quella che si trova nelle preparazioni commerciali già miscelate e pronte all'uso che contengono in media il 20-25 % di rame metallo.

➤ ***Ossido rameoso e rameico***

Sono composti di rame con ossigeno. L'ossido rameico (CuO) viene prodotto e partire dal rame metallo o da una soluzione di solfato di rame (CDA\_UK, 2003). L'ossido rameoso (Cu<sub>2</sub>O) invece si trova in natura sotto forma di cuprite. Quest'ultima è una sostanza giallo-rossastra, stabile all'aria, che se sottoposta a condizione di umidità dà origine all'ossido rameico, costituito da granuli cristallini neri. Tali ossidi si presentano sotto forma di polvere amorfa e sono caratterizzati da elevato peso molecolare. Sono leggermente fitotossici per la pianta e l'adesività sulla vegetazione trattata è in funzione delle dimensioni delle particelle del prodotto stesso. La sospensione in acqua è fortemente limitata nel tempo a causa dell'elevato peso specifico che tende a far precipitare il prodotto. Per questi motivi in commercio si trovano dei granuli micronizzati che garantiscono maggiore solubilità e maggiore adesività sugli organi verdi.

➤ ***Idrossido di rame***

L'idrossido di rame [Cu (OH)<sub>2</sub>] può essere ottenuto trattando a freddo dei sali di rame, come il solfato di rame, con un idrossido alcalino. Ha un contenuto di rame metallo pari al 50%, ed è caratterizzato da una buona persistenza e prontezza di azione. Infatti, è composto da particelle aghiformi che aderiscono bene alla vegetazione trattata, ma per lo stesso motivo presentano il rischio di fitotossicità.

➤ ***Ossicloruro di rame***

Industrialmente l'ossicloruro di rame [ClCu<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub>] si ottiene per reazione dell'acido cloridrico sul rame metallo oppure con una sospensione di cloruro di rame. Rispetto al solfato di rame ha il vantaggio di possedere una minore fitotossicità. In distribuzione esistono due prodotti: l'ossicloruro tetrarameico che è un complesso tra l'ossido rameico e il cloruro rameico (3CuO CuCl<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O) e l'ossicloruro di rame e calcio (triramico) che è un complesso tra l'ossido rameico e il cloruro di calcio (3CuO CaCl<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O). Il triramico presenta un'azione più veloce del tetrarameico, ma meno persistente, a causa della molecola

poco stabile. Essa possiede una maggiore sicurezza in quanto tende a rilasciare una minor quantità di rame sulla vegetazione a parità di tempo d'impiego. Al contrario l'ossicloruro tetrarameico risulta essere più persistente e il rilascio di rame è quantitativamente maggiore al triramico ma la prontezza d'azione è più lenta.

➤ ***Solfato di rame***

Il solfato tribasico di rame ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) è il più importante tra i sali di rame e viene utilizzato non solo come fungicida ma anche per apportare rame al terreno. Esso è presente in natura come calcanite. Industrialmente, tale prodotto viene preparato per reazione tra acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) diluito e ossido di rame in presenza di aria. È molto solubile in acqua, il suo pH tendente all'acido conferisce maggiore aggressività e prontezza d'azione. Ha un titolo di rame metallo basso (25%) ma è abbastanza fitotossico sulle piante per cui bisogna stare attenti alle dosi e alle modalità di utilizzo.

➤ ***Peptidato di rame***

È un formulato costituito da peptidi e rame metallo in quantità pari al 5%. La sua azione si basa sulla capacità dei peptidi di essere assorbiti dalla pianta e trasportati all'interno delle cellule sfruttando diversi meccanismi di trasporto enzimatico e canali di natura proteica. Ciò avviene perché i peptidi sono molecole organiche. Possiede gli stessi effetti dei classici composti del rame, ma poiché permette a parità di efficacia di ridurre la quantità di rame sembra avere meno impatto ambientale (Pontiroli *et al.*, 2001). Il rame si trova in forma di chelato, cioè complessato nella matrice organica, che ne consente un maggiore accumulo a livello intracellulare. Il peptidato consente quindi un assorbimento attivo del rame, di conseguenza si possono utilizzare minori concentrazioni di rame, limitando così il suo impatto ambientale. Tuttavia, la rapida penetrazione del rame nei tessuti vegetali costituisce allo stesso tempo uno svantaggio, in quanto può determinare fenomeni di tossicità, soprattutto in stagioni particolarmente fredde o calde e umide o piovose.

➤ ***Tallato di rame***

È preparato con resine, acidi grassi estratti dal legno di pino e idrossido di rame, non si conosce ancora bene il suo meccanismo di azione e la sua efficacia, si sa però che ha una bassa fitotossicità.

#### **5.4.2. Aspetti positivi e negativi del rame**

L'evoluzione della difesa fitosanitaria non dipende soltanto dal progresso scientifico e tecnico, ma anche dalle scelte politiche a livello mondiale, nazionale e locale; scelte che in ultimo ne stabiliscono gli obiettivi e i traguardi. A questo proposito il rame, pur essendo un metallo pesante, è uno dei fungicidi più utilizzati sia in viticoltura biologica che integrata per il controllo peronospora della vite, ritenuta una delle più gravi ampelopatie nelle aree dove le condizioni climatiche sono caratterizzate da elevata umidità e abbondanti piogge, come ad esempio in Europa. I prodotti a base di rame presentano numerosi vantaggi che ne hanno determinato il successo. Ad esempio, oltre ad avere un'elevata efficacia nel controllo della malattia e una bassa tossicità per le viti; presentano un basso costo, hanno un ampio spettro d'azione e sono ben conosciuti dagli operatori agricoli. Essi, inoltre, svolgono un'azione tossica multisito, che previene l'insorgenza di resistenze nei patogeni, aspetto da non trascurare soprattutto in agricoltura integrata in cui l'eventuale abbandono del rame porterebbe portare a problematiche legate a resistenze per la predilezione di molecole ad azione curativa. I prodotti cuprici svolgono un'azione preventiva in quanto agiscono sulle strutture riproduttive del patogeno e mirano quindi a limitare il più possibile le infezioni, riducendo il ricorso ad eventuali interventi curativi. Inoltre, possono contribuire a irrobustire la cuticola fogliare o la buccia dei frutti e renderli così meno suscettibili a ferite e conseguenti attacchi di altri patogeni, come i marciumi dei frutti. Questi aspetti hanno reso il rame uno dei principali mezzi tecnici di difesa adottati in agricoltura, soprattutto in viticoltura. Tuttavia, a seguito di un utilizzo reiterato di prodotti a base di rame, sono sorte nel tempo una serie di problematiche correlate alla natura intrinseca di questo metallo pesante, che per sue caratteristiche è soggetto a innescare fenomeni di tossicità residua, di riduzione della microflora e della fauna nel terreno, fenomeni di fitossicità su colture sensibili e residui persistenti. Infatti, essendo un metallo pesante, il rame tende ad accumularsi nelle catene trofiche e nel terreno, soprattutto negli strati più superficiali, interferendo negativamente con gli organismi che popolano il suolo. A causa dell'uso ripetuto nel tempo di prodotti contenenti rame, in molti terreni viticoli la concentrazione di rame ha raggiunto livelli elevati, soprattutto negli strati più superficiali, dove viene trattenuto dalla sostanza organica e dai colloidali. In queste situazioni, a subirne maggiormente le conseguenze negative sono proprio gli organismi che vivono nel suolo, come riportato da alcuni studi sul campo in cui sono stati mostrati chiari collegamenti tra l'aumento delle concentrazioni di rame nel suolo e la riduzione delle popolazioni di lombrichi e carabidi (Paoletti *et al.*, 1998; Wightwick *et al.*, 2008). Inoltre, nonostante il rame sia classificato come un microelemento della nutrizione vegetale, alte concentrazioni possono portare a fitotossicità per le viti stesse,



ridotta crescita di giovani radici e germogli, possibili clorosi fogliari e riduzione della capacità di assorbimento di acqua e nutrienti (Dagostin *et al.*, 2011; Juang *et al.*, 2012). Altro aspetto negativo tutt'altro che trascurabile riguarda le contaminazioni dell'uva con residui del metallo pesante i quali, oltre ad essere pericolosi per la salute del consumatore, hanno una serie di risvolti negativi in fase di vinificazione sulle caratteristiche aromatiche dei vini stessi (Garde-Cerdán *et al.*, 2017). Non ultimo per importanza, gli agrofarmaci a base di rame possono rappresentare un pericolo per la salute degli operatori del settore agricolo, i quali sono spesso esposti al contatto con questi prodotti.

Proprio a seguito di queste problematiche i prodotti rameici sono stati e sono tutt'ora oggetto di una continua evoluzione tecnologica, che ha permesso alle industrie agrofarmaceutiche di ottenere formulati rameici efficaci a dosi sempre più basse di rame e si sono sviluppate strategie di utilizzo a basso dosaggio di rame (Romanazzi *et al.*, 2010). Ciò è stato possibile attraverso formulazioni e granulometrie capaci di aumentare l'adesività e la persistenza del rame sugli organi trattati, ma anche di velocizzare la disponibilità degli ioni  $\text{Cu}^{++}$ . Considerando comunque i rischi legati all'impiego di prodotti contenenti rame, il loro utilizzo in agricoltura è stato soggetto a diverse restrizioni nel corso degli anni, fino ad arrivare alla situazione attuale dove, attraverso il Reg. UE 1981/2018, l'Unione Europea ha fissato un limite medio all'impiego di rame in agricoltura di 4 kg/ha per anno (ovvero 28 kg ammessi nei 7 anni di rinnovo con un massimo assoluto di 6 kg/ha per annata) e, dato che soddisfa i criteri di tossicità e bioaccumulo, lo ha inserito nella lista delle sostanze attive candidate alla sostituzione, sebbene alcuni paesi del vecchio continente abbiano già azzerato gli apporti cuprici in agricoltura. Inoltre, sulla base dei rischi legati all'utilizzazione dei mezzi chimici nella protezione dei vegetali di interesse agronomico, nel maggio 2020, la Commissione europea ha presentato, contemporaneamente alla "strategia per la biodiversità", la strategia "Farm to Fork", la quale si compone di una serie di obiettivi da raggiungere entro il 2030, tra i quali: ridurre del 50% l'uso dei pesticidi di sintesi chimica o pericolosi e destinare almeno il 25% della superficie agricola all'agricoltura biologica. Tutto ciò riguarda anche i prodotti rameici, i quali vengono ancora ampiamente utilizzati in agricoltura integrata, ma soprattutto in agricoltura biologica dove, ad oggi, rappresentano i soli in grado di garantire un reddito e dei livelli di protezione accettabili da alcune malattie come la peronospora della vite. Di conseguenza, l'aumento delle superfici biologiche da una parte e le sempre più stringenti limitazioni poste all'uso del rame dall'altra, aprono la strada alla ricerca di nuove strategie di protezione dalle malattie che siano meno impattanti sull'ambiente e meno pericolose per l'uomo.

### **5.4.3. Molecole di origine naturale alternative al rame**

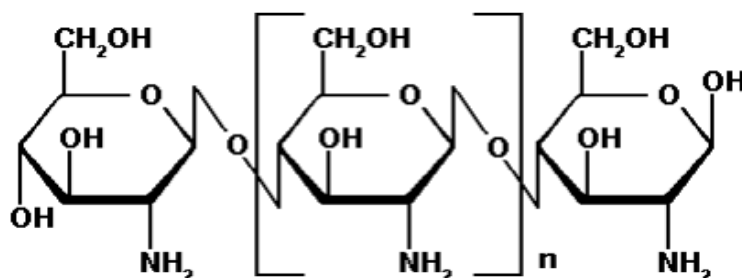
In viticoltura l'apporto di rame al terreno dovuto ai trattamenti antiperonosporici ripetuti è tutt'altro che trascurabile visti gli effetti che si ripercuotono negativamente su pedo fauna, composizione microbiologica ed enzimatica del suolo. La Commissione Europea quindi negli ultimi anni sta lavorando alla riduzione delle quantità distribuite di questo metallo pesante nell'ambiente. In quest'ottica risulta di fondamentale importanza l'impiego di molecole ad attività antiperonosporica alternative al rame.

Per rispondere a queste necessità, recentemente, è stata fortemente incentivata la ricerca di composti naturali alternativi per ridurre o eliminare l'utilizzo di prodotti cuprici in agricoltura biologica (Gessler *et al.*, 2011). Alcuni studi hanno identificato delle sostanze naturali con interessanti qualità in termini di controllo nei confronti di *P. viticola*. In particolare, si tratta di proteine idrolizzate (Lachhab *et al.*, 2014), chitosano (Maia *et al.*, 2012), laminarina (Aziz *et al.*, 2003) e alcuni microorganismi (Alfonzo *et al.*, 2012). Spesso questi composti di origine naturale non sono inquadrati come veri e propri agrofarmaci, quindi seguono un iter di approvazione diverso e semplificato. Alcuni estratti vegetali, sali minerali semplici o complessi come fosfiti e fosfonati, e microrganismi testati per la difesa sono ammessi dalla normativa come fertilizzanti o biostimolanti, quindi non registrati come fitofarmaci. Mentre, il chitosano cloridrato è stata la prima sostanza di base (SdB) approvata per usi fitosanitari con il Reg. UE n. 563/2014 a norma del regolamento CE n. 1107/2209 relativo all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari. Questa diversificazione permette a queste molecole naturali di non dover sottostare alla normativa ben più rigida che invece disciplina i fitofarmaci, i quali per essere approvati necessitano di un lungo processo di valutazione dei rischi, un percorso troppo costoso e impegnativo per la maggior parte dei prodotti naturali che hanno un mercato ridotto e sono spesso elaborati da aziende medio-piccole.

#### **5.4.3.1. Il chitosano**

Il chitosano è un biopolimero naturale, ad azione biostimolante delle difese della pianta, ottenuto per deacetilazione della chitina mediante esposizione a soluzioni alcaline di NaOH o per idrolisi enzimatica in presenza di chitina deacetilasi. È formato da D-glucosamina e N-acetil-D glucosammina che sono tenute insieme da legami glucosidici  $\beta$  1-4 (Figura 12). È una molecola ottenuta industrialmente dall'esoscheletro dei crostacei ed è largamente utilizzato in diverse applicazioni come soluzioni, gel o film e fibre.

È utilizzato negli ambiti più disparati come quello della cosmesi, della biomedicina, delle biotecnologie e dell'industria alimentare, oltre che nel settore agricolo per la protezione delle colture dalle malattie.



**Figura 12** – Rappresentazione schematica della struttura chimica del chitosano.

Per quanto riguarda l'agricoltura il chitosano trova applicazione per la sua efficacia nel controllo delle malattie di frutta e ortaggi (Romanazzi *et al.*, 2017). Il chitosano cloridrato è stato il primo composto naturale ad essere registrato nella lista delle sostanze di base approvate dall'Unione Europea per fini fitosanitari ai sensi del Regolamento Reg. UE 2014/563, sia per l'agricoltura biologica che integrata. Grazie alla sua bassa tossicità è stato approvato come sostanza GRAS (*Generally Recognized As Safe*) negli Stati Uniti dalla USFDA (Hu *et al.*, 2019) e la sua applicazione è ritenuta dunque sicura per il consumatore e l'ambiente. Molti autori hanno studiato le applicazioni del chitosano con risultati positivi nel post raccolta per la protezione di derrate alimentari facilmente deperibili, come ad esempio su: uva da tavola (Meng *et al.*, 2008), fragole (Romanazzi *et al.*, 2013), melograno (Varasteh *et al.*, 2012), ciliege (Petriccione *et al.*, 2015), papaya (Ali *et al.*, 2011), kiwi (Kaya *et al.*, 2016) e guava (Krishna e Rao, 2014). Inoltre, di recente è stata pubblicata una rassegna completa sui dati disponibili in letteratura circa l'efficacia del chitosano, i suoi meccanismi d'azione, i suoi possibili impieghi nella conservazione di frutta e verdura sia da solo che in combinazione con altri trattamenti (Romanazzi *et al.*, 2017; Rajestary *et al.*, 2021). Il chitosano è uno degli elicitori più studiati per il controllo di *P. viticola* e altri funghi fitopatogeni della vite come *Botrytis cinerea* ed *Erysiphe necator* (Romanazzi *et al.*, 2002). L'efficacia fitoiatrice è dovuta alla sua triplice attività: antimicrobica, filmogena ed elicitante (Romanazzi *et al.*, 2018). L'azione antimicrobica è resa possibile dalle cariche elettriche positive del biopolimero che vanno ad interagire con le cariche elettriche negative tipiche della superficie cellulare di batteri e funghi, alterando la loro permeabilità cellulare; con questi meccanismi, il chitosano può interferire con gli acidi nucleici microbici, inibendo la sintesi di mRNA e proteine (Devlieghere *et al.*, 2004). L'azione filmogena invece consiste

nella formazione di un film semipermeabile attorno ai tessuti, che blocca l'infezione e lo sviluppo dei parassiti, ma che al contempo tende a ridurre la traspirazione delle superfici vegetali trattate. Infine, il biopolimero è considerato un potente elicitore in quanto è in grado di indurre nei tessuti vegetali una risposta di difesa contro gli organismi patogeni: dato che la struttura del chitosano è chimicamente simile alla struttura delle pareti cellulari dei funghi e di altri costituenti fungini, quando viene applicato sui tessuti vegetali simula la presenza del patogeno e stimola l'attivazione di una serie di meccanismi di difesa endogeni delle piante, come ad esempio l'induzione della sintesi di fitoalessine nelle cellule vegetali, la formazione di lignina, la produzione di inibitori della proteasi, variazioni del flusso ionico, l'acidificazione del citoplasma, la depolarizzazione della membrana e fosforilazione delle proteine, l'attivazione di chitinasi e glucanasi, la generazione di specie reattive dell'ossigeno, la formazione di callosio, la biosintesi dell'acido jasmonico e l'espressione di geni correlati alle risposte di difesa (Amborabé et al., 2008; El Hadrami et al., 2010). Il chitosano stimola anche la produzione di un'ampia gamma di sostanze coinvolte in maniera più o meno diretta nei meccanismi di autodifesa, come proteine correlate alla patogenesi (PR), specie reattive dell'ossigeno (ROS), lignina, callosio, fitoalessine, fenilalanina ammonio liasi (PAL), perossidasi e chitinasi. Inoltre, *in vitro* è stato dimostrato come l'applicazione del chitosano influisca positivamente nell'accumulo di trans e cis-resveratrolo e  $\epsilon$ -viniferina nelle foglie di *V. vinifera* (Aziz et al., 2006), che svolgono naturalmente una funzione di difesa della pianta contro i microrganismi patogeni, soprattutto fungini. Il chitosano può potenziare le difese delle piante e indurre la resistenza dell'ospite sia nelle specie monocotiledoni che in quelle dicotiledoni (El Hadrami et al., 2010).

Altri effetti imputabili ad applicazioni di chitosano sulle piante possono essere: maggior potere germinativo ed emergenza precoce, riduzione dello stress idrico, aumento della biomassa prodotta in rapporto all'acqua consumata, miglior sviluppo delle radici, stabilizzazione della vita biologica delle piante, aumento del raccolto, aroma più intenso dei frutti, maggiore crescita vegetale e formazione di micorrize ed infine aumento della "shelf life" di prodotti ortofrutticoli freschi. Sicuramente assumono grande importanza le sperimentazioni e le ricerche volte ad approfondire le conoscenze riguardanti questa molecola e il suo possibile utilizzo su ampia scala. Il chitosano è stato utilizzato anche nella lotta ai fitoplasmi, come nel caso del legno nero, dove è emerso un tasso di remissione dei sintomi leggermente superiore ai testimoni non trattati, sebbene altri formulati commerciali abbiano mostrato delle risposte molto più efficaci (Romanazzi et al., 2010; 2013). Il chitosano è una molecola sicura e biodegradabile, non presenta tossicità né verso l'uomo né

verso le specie vegetali e, tra i vari prodotti naturali, attualmente rappresenta il candidato principale per affiancare e in qualche caso sostituire i prodotti rameici nelle strategie di protezione della vite dalla peronospora in agricoltura biologica ed integrata. Inoltre, a differenza del rame, non ha conseguenze negative sulle caratteristiche organolettiche del vino, come dimostrato da un panel di esperti in seguito a prove di microvinificazione.

#### **5.4.3.2. Altri composti con attività antiperonosporica**

Oltre al chitosano anche altre sostanze di origine naturale hanno riscosso un certo interesse come alternative al rame per il controllo della peronospora della vite. In particolare, alcuni dei principali composti naturali che hanno dimostrato una certa attività fungicida o fungistatica sono: fosfiti e fosfonati, acido salicilico, bicarbonato di sodio e potassio, farine di roccia, propoli, olio di Neem e laminarina.

##### **➤ Fosfiti e fosfonati**

Il fosfito ( $K_2HPO_3$ ) e il fosfonato ( $KN_2PO_3$ ) sono dei sali dell'acido fosforico ( $H_3PO_4$ ) e dell'acido fosforoso ( $H_3PO_3$ ). I principi attivi sono il potassio diidrogenofosfato e il potassio fosfato che garantiscono meccanismi d'azione diretti e indiretti. Il meccanismo d'azione dei prodotti a base di questi sali è di tipo diretto sul metabolismo amminoacidico, sulla composizione proteica, sulla riduzione del pool nucleotidico, e di tipo indiretto con lo stimolo alla produzione di sostanze di difesa nella pianta ospite. Il controllo dei funghi da parte di questi sali avviene inibendo la crescita del micelio, riducendo la sporulazione e modificando la struttura del micelio tramite alterazione del contenuto di acidi grassi liberi delle cellule della parete. Pertanto, sono considerati degli ottimi fungicidi antiperonosporici per la loro azione translaminare, la loro elevata capacità di essere assorbiti e la loro conseguente efficace attività inibitoria. Inoltre, hanno una bassa fitotossicità e non costituiscono una minaccia a livello ambientale in quanto si ionizzano in idrogeno e fosforo eliminando i problemi legati all'accumulo nel terreno o nelle falde. Il limite principale di questi fungicidi naturali è rappresentato dal fatto che solo negli ultimi anni sono stati registrati come agrofarmaci (prima facevano parte del gruppo dei fertilizzanti) e non si possono utilizzare in agricoltura biologica. Ne consegue che non possono essere considerati delle valide alternative al rame nel controllo di *P. viticola* in vigneti biologici.

##### **➤ Acido salicilico**

È un composto naturale che stimola le difese endogene ed è presente all'interno delle piante in piccole quantità. Può essere considerato un prodotto alternativo al rame nella protezione antiperonosporica ma la sua efficacia è sicuramente più limitata poiché riesce a garantire un buon controllo solo in caso di bassa pressione della malattia. Rispetto ai prodotti cuprici ha il vantaggio di poter essere distribuito in tutte le fasi fenologiche del vigneto dal momento che assicura la copertura anche in fioritura, dove invece il rame è altamente problematico.

➤ ***Bicarbonato di potassio e sodio***

Il bicarbonato di sodio è una sostanza naturale, non tossica in grado di controllare alcuni funghi. Il sale di potassio invece è un prodotto sintetizzato partendo dall'idrossido di potassio. Il primo è un prodotto commerciale, poco costoso e poco tossico, ma deve essere applicato alla pianta con l'aggiunta di un bagnante o con un adesivante per migliorare la distribuzione e l'assorbimento dello stesso. L'azione del bicarbonato di potassio sembra dovuta al danneggiamento della membrana delle cellule nelle spore e allo spostamento del pH della linfa a un valore di circa 6,4, incompatibile con la vita dei funghi. Ha un meccanismo preventivo in grado di diminuire l'incidenza della malattia, e allo stesso tempo sembra avere una certa efficacia anche dopo la comparsa della malattia. Le tempistiche e le dosi di utilizzo sono molto importanti in quanto un alto livello di bicarbonato di sodio può provocare ustioni alle foglie. Un uso non corretto del prodotto porta al danneggiamento delle foglie e al suo accumulo nel terreno con conseguente alterazione del pH e rallentamento della crescita delle piante. In definitiva tra i due il bicarbonato di potassio è quello che ha dimostrato una migliore efficacia nei confronti di *P. viticola*.

➤ ***Farine di roccia***

Le caratteristiche variano a seconda del minerale componente la roccia macinata come basalto, granito, bentonite, algamatolite del Brasile, dolomia. Il principale componente della farina di roccia è l'acido silicico che arriva fino al 75% nel basalto. In queste polveri si trovano anche elementi quali magnesio, calcio, microelementi come ferro, rame e molibdeno. Si usano come protettivi, sia in campo, sia in serra. L'acido silicico, come già detto, favorisce l'irrobustimento delle foglie e degli steli, inoltre gli altri elementi minerali e microelementi, contribuiscono a rinforzare la pianta. La polvere di roccia mostra anche un'azione meccanica (barriera fisica) nei confronti dei patogeni e, grazie alle sue caratteristiche igroscopiche, può agire come disidratante dei parassiti.

### ➤ **Propoli**

È un prodotto derivante dalle api che elaborano un gran numero di sostanze resinose, cerose e gommose presenti negli organi vegetali di piante quali castagno, salice, ippocastano, pioppo, abete, quercia e frassino. Contiene composti di natura fenolica (flavoni, flavonoidi e flavononi) che manifestano proprietà fitostimolanti, favoriscono l'autodifesa della pianta e potenziano l'azione di alcuni antiparassitari ma senza alcun effetto diretto verso il parassita di natura fungina. L'impiego del propoli da solo è sconsigliato a causa della sua inefficacia ma può essere interessante la distribuzione di una miscela contenente zolfo o sali di rame di cui potenzia l'azione e ne permette un uso in concentrazioni limitate.

### ➤ **Olio di neem**

È un olio vegetale estratto da *Azadirachta Indica*, una specie arborea presente in climi tropicali come quelli indiani. Ha effetti insetticidi e fungicidi in particolare verso specie crittogame come *P. viticola* e *Botrytis cinerea*. Ciò è possibile grazie ai limonoidi, molecole particolarmente attive dal punto di vista antimicrobico, e ai derivati dello zolfo presenti all'interno dell'olio stesso. Ha un buon profilo tossicologico, è specifico e non ha tossicità verso gli altri organismi come gli insetti utili.

### ➤ **Laminarina**

La  $\beta$ -1,3-glucan laminarina deriva dall'alga marrone *Laminaria digitata*. Ha dimostrato di essere un efficiente elicitore delle difese endogene delle cellule della vite e di essere in grado di controllare lo sviluppo e le infezioni di *B. cinerea* e *P. viticola* (Aziz *et al.*, 2003). Nei confronti della peronospora si è esclusa la sua azione diretta su zoospore e su sporangi. Interessante però è il fatto che le piante normalmente suscettibili alla peronospora trattate con la laminaria solfato, abbiano mostrato la stessa risposta dei vitigni resistenti alla malattia come il Solaris (Trouvelot *et al.*, 2008). L'applicazione di questo prodotto sulla parete fogliare non ha indotto la morte delle cellule vegetali ed ha dimostrato un controllo di *B. cinerea* e *P. viticola* rispettivamente del 55% e del 75% circa. Spesso vengono associate a estratti microbici di *Saccharomyces*.

## **5.5. COMPATIBILITÀ TRA DIVERSI AGROFARMACI**

Nella pratica spesso i trattamenti fitosanitari vengono eseguiti combinando assieme più prodotti diversi tra loro. Le motivazioni di questa scelta sono varie: innanzitutto così facendo si possono combattere più patogeni contemporaneamente riducendo i costi di distribuzione

dei prodotti, sia in termini di manodopera che di carburante, abbassando il numero di trattamenti e dimezzando i tempi di lavoro. Inoltre, anche nel caso in cui si voglia combattere un unico patogeno, l'uso di più principi attivi combinati fa sì che l'insorgenza di resistenze sia limitata. Un ultimo fattore di non minore importanza è dato dal vantaggio di combinare più prodotti così da diminuire il dosaggio di ogni singola formulazione, soprattutto di quelle più pericolose come nel caso del rame, che in quanto metallo pesante è sempre più limitato dalle disposizioni europee circa il suo quantitativo di utilizzo annuo. Per questi motivi, affinché una nuova molecola abbia successo a livello industriale, non è sufficiente dimostrarne l'efficacia, ma risulta di fondamentale importanza anche valutarne il livello di compatibilità, in quanto spesso non si conoscono sufficientemente tutti i possibili effetti che possono scaturire dall'unione con altri prodotti già ampiamente utilizzati. Si potrebbero verificare infatti dei fenomeni di antagonismo con diminuzione dell'efficacia o addirittura di incompatibilità. In quest'ultimo caso si potrebbero creare reazioni indesiderate che portano a precipitazione o insolubilizzazione dei componenti, con conseguente riduzione dell'efficacia del trattamento o, nei casi più gravi, sussiste persino il rischio di intasamenti di filtri, pompe e ugelli dell'irroratrice. Molti dei composti che possono ridurre o eliminare l'utilizzo di prodotti cuprici in agricoltura biologica valutati a livello sperimentale con buoni risultati, come il chitosano, necessitano quindi di ulteriori studi per facilitarne la diffusione su scala commerciale; questi approfondimenti riguardano soprattutto per quanto riguarda la compatibilità con agrofarmaci ampiamente utilizzati come quelli a base di rame e zolfo. Infatti, questi prodotti alternativi, anche quando non hanno un'azione comparabile a quella dei fungicidi tradizionali, possono essere utili contro la peronospora, sia applicati da soli che in combinazione con formulati cuprici, poiché stimolano il rafforzamento fisico dei tessuti vegetali e lo sviluppo delle difese endogene delle piante, aumentando così la resistenza nei confronti dei patogeni.



## 6. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Nei vigneti a gestione biologica i prodotti cuprici rappresentano da anni il mezzo più adoperato per la protezione dalla peronospora. L'aumento esponenziale delle superfici coltivate in biologico e la maggiore sensibilità dell'opinione pubblica riguardo l'impatto dell'attività agricola sull'ambiente hanno posto l'attenzione sui rischi legati alle quantità eccessive di questo metallo pesante. A seguito dei rischi per la salute umana e l'ambiente legati all'impiego del rame in agricoltura, è emersa la necessità di ridurre e di regolamentarne l'utilizzo. Dalle limitazioni imposte dall'Unione Europea (Reg. UE 1981/2018), nasce la necessità di sperimentare nuovi prodotti e di sviluppare nuove strategie di protezione fitosanitaria, che possano sostituire le pratiche tradizionali. In quest'ottica si colloca la presente attività di ricerca che trova fondamento nel progetto PSR Marche "Vitinnova", il quale mira a innovare sia fasi di campo che di cantina. Per quanto riguarda il campo, l'intento è quello di sviluppare strategie di protezione antiperonosporica delle viti in biologico e su scala commerciale attraverso l'uso di sostanze naturali alternative di efficacia dimostrata, quali il chitosano, che in prove sperimentali pluriennali ha fornito un livello di protezione paragonabile a quello del rame (Romanazzi *et al.*, 2016 e 2021). Perciò è stato studiato nel dettaglio in questa tesi l'introduzione del chitosano all'interno di specifiche condizioni aziendali e colturali in modo tale da applicare i risultati già positivi di prove parcellari su scala commerciale.

La tesi pertanto ha come obiettivo generale quello di contribuire a fornire delle risposte al comparto agricolo biologico che chiede la risoluzione dei problemi legati al rame, dal momento che i principi fondanti di questo metodo produttivo sono in antitesi con l'impiego di sostanze responsabili di inquinamento ambientale, ma allo stesso tempo i prodotti a base di rame sono ancora oggi gli unici in grado di garantire un'efficace protezione dalla peronospora e di assicurare quindi un reddito nelle annate più critiche. I produttori biologici potranno avvalersi delle informazioni che scaturiranno da questa sperimentazione, per migliorare le tecniche e le strategie operative da adottare per il contenimento delle avversità che richiedono elevate quantità del metallo pesante. La riduzione o l'eliminazione degli apporti di rame avrà ovvie ripercussioni positive sull'ambiente e ricadute benefiche sugli organismi tellurici e la qualità del suolo.

Lo scopo principale del presente lavoro di tesi è quello di valutare l'efficacia antiperonosporica del chitosano a livello aziendale, sia da solo che miscelato o alternato a prodotti cuprici, in termini di superfici trattate, modalità di distribuzione, volumi e tempistiche di intervento, in modo da verificare l'adattabilità di questo biopolimero ad una

diffusione su scala commerciale. Per fare questo, rientra tra gli obiettivi anche la valutazione della compatibilità con altri agrofarmaci utilizzati in viticoltura biologica. Oltre ad analizzare le infezioni peronosporiche, sarà interessante anche valutare se le strategie ipotizzate per contenere la peronospora nei vigneti sperimentali abbiano effetti di contenimento anche nei confronti dell'oidio.

In definitiva quindi il progetto potrà concorrere alla crescita dell'agricoltura biologica attraverso il superamento di una delle principali criticità che al momento affligge il comparto. Non è poi da sottovalutare la possibilità d'impiego di sostanze di derivazione naturale come il chitosano anche in agricoltura integrata in ottemperanza alla direttiva 2009/128/CE sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari, perché i prodotti rameici sono ampiamente utilizzati anche in viticoltura integrata.

## **7. MATERIALI E METODI**

La prova sperimentale oggetto di tesi è stata condotta in tre diversi vigneti marchigiani, più precisamente due in provincia di Ancona, rispettivamente a Castelplanio e ad Angeli di Varano, e uno in provincia di Macerata a Matelica in località Piane. I primi due sono di proprietà dell'azienda agricola "Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop.", mentre il terzo appartiene all'azienda agricola "Belisario s.r.l.". La sperimentazione ha interessato la stagione vegetativa 2021 nell'arco temporale che va da inizio maggio a fine luglio. L'attività di ricerca è stata svolta nell'ambito del progetto "Vitinnova" ([www.vitinnova.it](http://www.vitinnova.it)), realizzato con il contributo del PSR Marche in particolare della Misura 16.1.2. "Strategie innovative nella filiera vitivinicola per produzioni a tutela dell'ambiente e della salute del consumatore". Tutto questo è stato possibile grazie alla collaborazione dei principali partner di progetto coinvolti, ovvero le aziende vitivinicole Terre Cortesi–Moncaro e Belisario, la Cooperativa Moderna, la CIA e il Servizio Fitosanitario Regionale delle Marche e l'Università Politecnica delle Marche.

### **7.1. SCHEMA SPERIMENTALE E CARATTERISTICHE DEI VIGNETI**

Nei vigneti l'area destinata alla sperimentazione è stata suddivisa in cinque tesi o trattamenti, messe a confronto secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni. In questo modo le diverse tesi sono state poste alle stesse condizioni, riducendo di fatto l'incidenza dei vari fattori ambientali che interferiscono sullo sviluppo della malattia. Inoltre, dato che tutti i trattamenti in oggetto sono stati distribuiti con le irroratrici aziendali, è stato scelto di impostare a priori tra ogni tesi almeno due filari di rispetto, in modo tale da limitare problemi legati alla deriva del prodotto sui filari vicini. Nell'arco di tempo che ha interessato la prova sperimentale sono state effettuate delle misurazioni dirette in vigneto per monitorare le fasi fenologiche durante i trattamenti e sono stati raccolti campioni di materiale vegetale osservati in laboratorio per controllare la comparsa dei primi sintomi associabili alla malattia. Dopo aver segnato con dei nastri colorati i filari sperimentali, all'interno di ciascuna tesi sono stati individuati 3 blocchi con cinque piante ciascuno rappresentativi dell'intero vigneto sui tre filari centrali, nei quali successivamente sono stati effettuati i rilievi. I blocchi stanno a rappresentare la zona a monte, quella intermedia e la zona a valle del vigneto. La scelta delle piante è stata razionale: sono state escluse dalla scelta quelle a crescita stentata o eccessivamente vigorose rispetto alla media, oltre alle prime e alle ultime piante di ciascuna fila. Complessivamente quindi, per ogni tesi sono stati condotti i rilievi su 9 interpali (3 per blocco) da 5 piante ciascuno.

La valutazione dell'efficacia antiperonosporica del chitosano con protocolli aziendali è stata effettuata studiando cinque tesi che si differenziano tra loro per il tipo di trattamento effettuato; in particolare, in tutti e tre i vigneti si possono individuare le seguenti porzioni:

- Testimone non trattato (NT);
- Testimone aziendale (AZ): con prodotti a base di rame;
- Trattamenti con chitosano (CH): concentrazione 0.50% di p.a. per tutta la stagione;
- Trattamenti alternati (AL): a base di rame come in strategia aziendale nella prima metà della stagione, a base di chitosano a concentrazione 0.50% di p.a. superata la fioritura;
- Trattamenti combinati (CO): miscela di ossicloruro di rame a metà della dose massima di etichetta (125 mL/hL) e chitosano a concentrazione dimezzata (0.25%).

Le tesi AZ e NT sono state usate come testimoni positivo e negativo per confrontare l'efficacia delle altre tesi contenenti chitosano. Inoltre, in tutte e cinque le tesi è stata mantenuta la difesa antioidica con i soliti protocolli aziendali.

I tre vigneti nei quali è stato sperimentato l'impiego del chitosano in alternativa o in combinazione al rame sono separati da parecchi chilometri di distanza gli uni dagli altri e dunque sono situati in condizioni pedo-climatiche differenti, rappresentative delle principali aree viticole marchigiane. Le differenze però sono dovute anche alle caratteristiche genetiche delle diverse varietà coltivate, all'epoca dei trattamenti e ai vari formulati utilizzati oltre che alle attrezzature adoperate. Seguono quindi le informazioni di base riguardanti i tre vigneti.

#### ➤ *Vigneto Belisario*

Il vigneto di proprietà dell'azienda Belisario vede come protagonista il Verdicchio allevato a Guyot bilaterale. Si trova in località Piane proprio nel cuore dell'areale di produzione del Verdicchio di Matelica (MC). La Belisario, infatti, è la più grande azienda vitivinicola della provincia di Macerata ed è tra i primi produttori regionali di Verdicchio Riserva DOCG. L'area di studio sperimentale (Figura 13) ha interessato una superficie totale di circa 1,3 ha comprensivi di 25 filari, lunghi 205 m e disposti con sesti d'impianto di 3 x 1,50 m., suddivisi tra 5 differenti tesi a confronto da 2500 m<sup>2</sup> ciascuna.



**Figura 13** – Ripartizione dei vari trattamenti all'interno del vigneto sperimentale di proprietà dell'azienda Belisario, nei pressi di Matelica (MC) con fotografia aerea estrapolata da Google Earth 3D (a sinistra). Dettaglio dei filari di Verdicchio (a destra).

Nel complesso sono state previste quattro diverse strategie di applicazione dei formulati come riassunto di seguito in Tabella 2.

**Tabella 2** - Diverse strategie di applicazione di chitosano e formulati cuprici con relativi principi attivi, dosaggi e volumi d'irrorazione considerati per i trattamenti nel vigneto di Matelica.

<b>Tesi</b>	<b>Principi Attivi</b>	<b>Dose o Concentrazione (%)</b>	<b>Volumi d'irrorazione</b>
Aziendale (AZ)	Solfato di rame tribasico	2 L/ha	400 L/ha
Chitosano (CH)	Chitosano cloridrato	Chitosano 0,5%	da 400 L/ha fino a 1000 L/ha
Alternato (AL)	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano cloridrato	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano 0,5%	
Combinato (CO)	Chitosano cloridrato + Ossicloruro di rame	Chitosano 0,25% + $\frac{1}{2}$ DP (125 mL/hL)	

I trattamenti sono stati eseguiti con un atomizzatore trainato ad aspirazione posteriore bagnando la vegetazione inizialmente con un volume di 400 L/ha, corrispondente a circa 150 litri per tesi, per poi aumentare nel corso della stagione fino a 1000 L/ha.

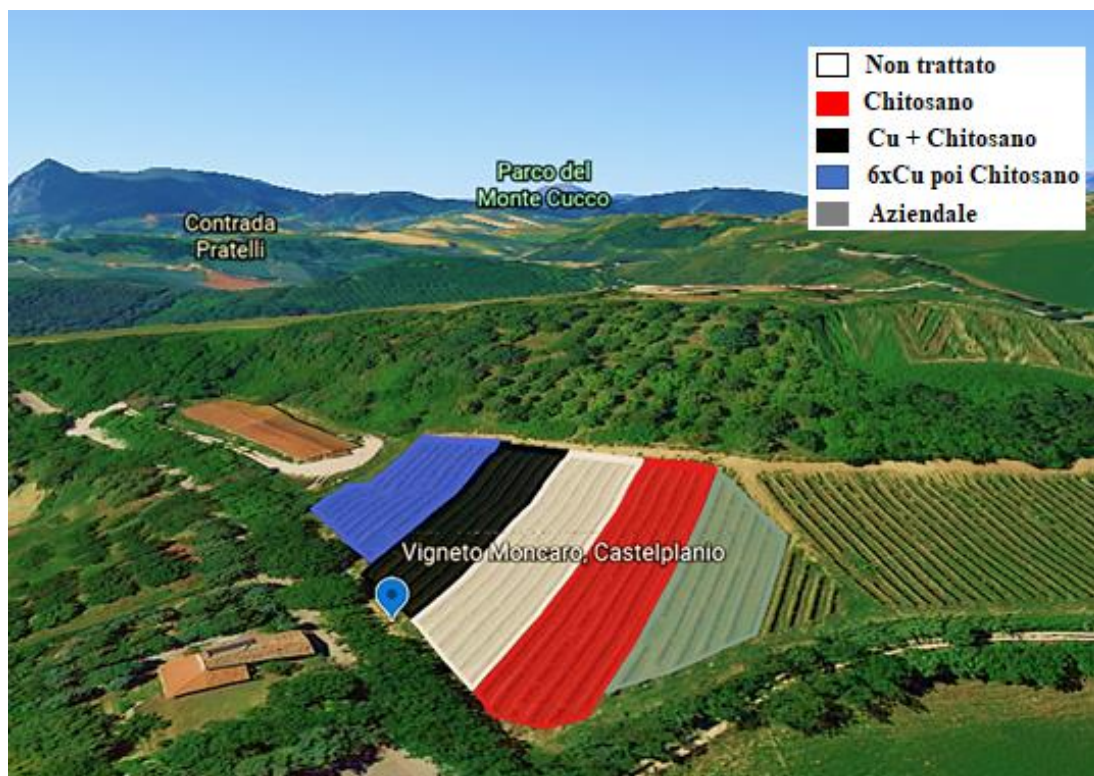
L'atomizzatore di produzione della Società Agricolmeccanica (Friuli), modello Poli15 ha mantenuto nel corso dei trattamenti una velocità di circa 7 km/h con pressione costante a 7 atm e ugelli aperti in funzione della fase fenologica del germoglio (Figura 14). Le irrorazioni sono state effettuate a partire dal 10 Maggio 2021 e proseguite con cadenza periodica in base alle condizioni meteorologiche ad intervalli di 7-15 giorni fino a fine luglio.



**Figura 14** – Atomizzatore trainato della Società Agricolmeccanica, modello Poli 15 impiegato nei trattamenti effettuati nel vigneto di Matelica (MC).

➤ ***Vigneto Moncaro di Castelplanio***

Il vigneto Mulino di proprietà dell'azienda Moncaro vede come protagonista il Verdicchio allevato a Guyot. Si trova a Piagge, in località Castelplanio (AN), nel cuore dell'areale di coltivazione del Verdicchio dei castelli di Jesi. Il sesto d'impianto prevede 2,5 m tra le file e 1 m lungo la fila. L'area di studio sperimentale ha interessato una superficie totale di circa 0,8 ha comprensivi di 35 filari suddivisi tra 5 differenti tesi a confronto da 1500 m<sup>2</sup> ciascuna (Figura 15).



**Figura 15** – Ripartizione dei vari trattamenti all'interno del vigneto sperimentale di proprietà dell'azienda Moncaro, nei pressi di Castelplanio (AN) con fotografia aerea estrapolata da Google Earth 3D.

Le strategie di applicazione dei formulati differiscono dagli altri vigneti solo per i principi attivi usati nelle tesi aziendali e per i volumi di applicazione che sono condizionati dalle dimensioni delle superfici trattate come visibile in Tabella 3.



**Tabella 3** - Diverse strategie di applicazione di chitosano e formulati cuprici con relativi principi attivi, dosaggi e volumi d'irrorazione considerati per i trattamenti nel vigneto di Castelplanio (AN).

<b>Tesi</b>	<b>Principi Attivi</b>	<b>Dose o Concentrazione (%)</b>	<b>Volumi d'irrorazione</b>
Aziendale (AZ)	Idrossido di rame Solfato di rame tribasico e neutralizzato	Dose media di etichetta	da 100 L/ha fino a 400 L/ha
Chitosano (CH)	Chitosano cloridrato	Chitosano 0,5%	da 650 L/ha fino a 1000 L/ha
Alternato (AL)	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano cloridrato	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano 0,5%	
Combinato (CO)	Chitosano cloridrato + Ossicloruro di rame	Chitosano 0,25% + $\frac{1}{2}$ DP (125 mL/hL)	

Nel Vigneto Mulino di Castelplanio è stato utilizzato un atomizzatore trainato ad aspirazione posteriore di produzione della Società Agricola Estense (S.A.E), modello Turbmatic Defender MK2 (Figura 16). La macchina ha lavorato ad una velocità costante di 7-8 km/h e con pressioni e ugelli regolati in base alla fase fenologica del germoglio.



**Figura 16** – Atomizzatore trainato della Società Agricola Estense, modello Turbmatic Defender MK2 utilizzato durante i trattamenti nel vigneto di Castelplanio (AN).

➤ ***Vigneto Moncaro di Angeli di Varano***

Oggetto di sperimentazione è stato anche il vigneto Mazzoni di proprietà dell'azienda Moncaro ubicato ad Angeli di Varano (AN) nel cuore dell'areale di produzione del Rosso Conero (100% Montepulciano). Ha un'estensione totale che si aggira intorno ai 3,4 ha, è allevato in parete e il sesto d'impianto prevede 2,2 m tra le file e 1 m lungo la fila. L'area di studio sperimentale (Figura 17) ha interessato una superficie totale di circa 1,5 ha comprensivi di 35 filari suddivisi tra 5 differenti tesi a confronto da 3000 m<sup>2</sup> ciascuna.



**Figura 17** – Ripartizione dei vari trattamenti all'interno del vigneto sperimentale di proprietà dell'azienda Moncaro, nei pressi di Angeli di Varano (AN) con fotografia aerea estrapolata da Google Earth 3D.

Le strategie di applicazione dei formulati sono le stesse di Castelplanio esclusi i volumi di applicazione che dipendono dalle dimensioni delle superfici trattate (Tabella 4).

**Tabella 4** - Diverse strategie di applicazione di chitosano e formulati cuprici con relativi principi attivi, dosaggi e volumi d'irrorazione considerati per i trattamenti nel vigneto di Angeli di Varano (AN).

<b>Tesi</b>	<b>Principi Attivi</b>	<b>Dose o Concentrazione (%)</b>	<b>Volumi d'irrorazione</b>
Aziendale (AZ)	Idrossido di rame Solfato di rame tribasico e neutralizzato	Dose media di etichetta	da 100 L/ha fino a 400 L/ha
Chitosano (CH)	Chitosano cloridrato	Chitosano 0,5%	da 650 L/ha fino a 1000 L/ha
Alternato (AL)	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano cloridrato	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano 0,5%	
Combinato (CO)	Chitosano cloridrato + Ossicloruro di rame	Chitosano 0,25% + $\frac{1}{2}$ DP (125 mL/hL)	

I trattamenti sono stati eseguiti con un atomizzatore snodato Vma, modello Power 55; la macchina ha lavorato ad una velocità costante di 7-8 km/h e con pressioni regolate in base alla fase fenologica del germoglio (Figura 18).



**Figura 18** – Atomizzatore snodato Vma, modello Power 55 in azione con miscela di chitosano e rame nel vigneto di Angeli di Varano (AN).

## 7.2. VALUTAZIONE DELLA COMPATIBILITÀ DI CHITOSANO DENSO CON DIVERSI FUNGICIDI

Prima di procedere con le prove di campo è stato necessario consultare studi effettuati sulla compatibilità del chitosano con diversi fungicidi, così da individuare la combinazione da adoperare nella tesi combinata (CO) delle prove nel progetto “Vitinnova”. In particolare, sono stati presi come riferimento dati ottenuti da prove precedenti di laboratorio, condotte nel periodo 2019-2020 dall’Università Politecnica delle Marche, nelle quali è stata saggiata la compatibilità fra chitosano denso e diversi formulati commerciali impiegati nella protezione della vite dalle malattie (Romanazzi *et al.*, 2020).

### 7.2.1. Prove di laboratorio

Le prove di compatibilità sono state condotte miscelando chitosano (nella formulazione chitosano denso) con vari prodotti ad azione fungicida. In totale sono state eseguite quattro prove. Nella prima è stato miscelato il chitosano con vari fungicidi ammessi in viticoltura biologica, suggeriti dalle aziende partner del progetto “Vitinnova”, alla dose massima di etichetta (DP) prevista per la protezione della vite (Tabella 5). Il chitosano è stato adoperato allo 0,5% di principio attivo perché, in base a studi precedenti, sembra essere la concentrazione migliore nei confronti della peronospora della vite (Romanazzi *et al.*, 2016).

**Tabella 5** – Fungicidi comunemente utilizzati in viticoltura biologica testati nella prima prova di compatibilità in laboratorio con chitosano denso (0,5% di principio attivo): principi attivi, formulati commerciali e dosi utilizzate degli agrofarmaci.

Principio attivo	Formulato commerciale	Dose saggiata
Idrossido di rame	Mexiram	270 g/hL
Solfato di rame neutralizzato	Siaram 20GW	500 g/hL
Solfato di rame tribasico	Idrorame Flow CHIMIBERG	470 g/hL
Ossicloruro di rame	Pasta Siapa F Blu SIAPA	250 ml/hL
Ossido rameoso	Cobre Nordox MASSÓ	1500 mL/hL
Solfato di rame tribasico + idrossido	KOP-TWIN CHIMIBERG	250 g/hL
Olio essenziale di arancio dolce	PREV-AM NUFARM	800 g/hL
Zolfo bagnabile 1	Microthiol	800 g/hL
Zolfo bagnabile 2	Zolfo AZF	300 g/hL
Zolfo liquido 1	Tiovit L	3 L/ha
Zolfo liquido 2	Thiopron	3 L/ha

Successivamente le migliori combinazioni risultanti dalla prima prova sono state di nuovo valutate in una seconda prova alle stesse dosi massime di etichetta ma variando in questo

caso le concentrazioni di chitosano da miscelare. Si tratta di: ossicloruro di rame, ossido rameoso, solfato di rame tribasico + idrossido, olio essenziale di arancio dolce e i due formulati di zolfo liquido. Il chitosano denso nello specifico è stato miscelato in quattro concentrazioni diverse: 0,1%, 0,25%, 0,5% e 1% di principio attivo. In seguito, per avere un quadro ancora più completo della compatibilità tra le diverse molecole, in una terza prova sono state cambiate le dosi degli agrofarmaci, lasciando invece la concentrazione del chitosano fissa allo 0,5%. In particolare, sono stati testati tre diversi dosaggi dei fungicidi:  $\frac{1}{4}$  DP,  $\frac{1}{2}$  DP e dose massima di etichetta (Tabella 6).

**Tabella 6** – Diversi dosaggi dei fungicidi testati durante la terza prova di compatibilità condotta in laboratorio con chitosano denso alla concentrazione dello 0,5% di principio attivo.

Principio attivo	Dose saggiata		
	$\frac{1}{4}$ DP	$\frac{1}{2}$ DP	DP
Ossicloruro di rame	62,5 mL/hL	125 mL/hL	250 mL/hL
Ossido rameoso	375 mL/hL	750 mL/hL	1500 mL/hL
Solfato di rame tribasico + idrossido	62,5 g/hL	125 g/hL	250 g/hL
Olio essenziale di arancio dolce	200 g/hL	400 g/hL	800 g/hL
Zolfo liquido 1	0,75 L/ha	1,5 L/ha	3 L/ha
Zolfo liquido 2	0,75 L/ha	1,5 L/ha	3 L/ha

Per concludere, è stata condotta una quarta prova di compatibilità volta ad individuare la combinazione ideale da inserire nei trattamenti combinati previsti in una tesi del progetto “Vitinnova”, che ha riguardato esclusivamente chitosano e prodotti a base di rame. In questo caso sono stati testati anche quei prodotti che non avevano dato buoni risultati nella prova 1 e sono state fatte variare contemporaneamente sia le concentrazioni di chitosano (0,1%, 0,25%, 0,5% e 1% di principio attivo), sia i dosaggi d’etichetta dei fitofarmaci ( $\frac{1}{10}$  DP,  $\frac{1}{4}$  DP,  $\frac{1}{2}$  DP e DP) per verificare eventuali effetti dovuti alle concentrazioni delle componenti della miscela. I prodotti utilizzati per l’ultima prova sono riassunti in Tabella 7.

**Tabella 7** – Principi attivi e dosaggi dei prodotti cuprici testati nella quarta prova di compatibilità in laboratorio con chitosano denso allo 0,1%, 0,25%, 0,5% e 1% di principio attivo.

Principio attivo	Dose saggiata			
	$\frac{1}{10}$ DP	$\frac{1}{4}$ DP	$\frac{1}{2}$ DP	DP
Idrossido di rame	27 g/hL	67,5 g/hL	135 g/hL	270 g/hL
Solfato di rame neutralizzato	50 g/hL	125 g/hL	250 g/hL	500 g/hL
Solfato di rame tribasico	47 g/hL	117,5 g/hL	235 g/hL	470 g/hL
Ossicloruro di rame	25 mL/hL	62,5 mL/hL	125 mL/hL	250 g/hL
Ossido rameoso	150 mL/hL	375 mL/hL	750 mL/hL	1500 mL/hL
Solfato di rame tribasico + idrossido	25 g/hL	62,5 g/hL	125 g/hL	250 g/hL

Le prove sono state condotte in volumi da 1 L, sciogliendo separatamente la quantità necessaria di chitosano in 500 mL di acqua e il prodotto da combinare nei restanti 500 mL per poi unirli in un secondo momento mantenendo sempre in agitazione la miscela. Una volta combinati, i prodotti sono stati lasciati interagire in fase stazionaria per circa dieci minuti.

La valutazione della compatibilità in laboratorio è stata condotta osservando il comportamento delle diverse miscele dieci minuti dopo la miscelazione e a un giorno di distanza in fase stazionaria. Il livello di compatibilità è stato valutato prendendo in considerazione una scala empirica di 5 categorie descritte in Tabella 8: 1) compatibile, 2) compatibile, con presenza di sedimenti risospensibili; 3) formazione di precipitati o sedimenti non risospensibili; 4) separazioni o flocculazioni; 5) formazione di gel.

**Tabella 8** – Classi adoperate per la classificazione dei diversi livelli di affinità nelle prove di compatibilità svolte in laboratorio fra chitosano denso ed agrofarmaci utilizzati in agricoltura biologica.

<b>Classi</b>	<b>Descrizione</b>
1	compatibile
2	compatibile con presenza di sedimenti risospensibili.
3	formazione di precipitati o sedimenti non risospensibili
4	separazioni o flocculazioni
5	formazione di gel

Rientrano nella categoria 1 e 2 le combinazioni considerate compatibili, cioè che non presentano reazioni o fasi che potrebbero compromettere la buona riuscita di un trattamento antiparassitario. Nella categoria 2 sono state incluse le miscele che formano dei sedimenti, anche se risospensibili, subito o dopo 24 ore. Nelle categorie 3, 4 e 5 sono state incluse le miscele ritenute incompatibili, che danno luogo rispettivamente a precipitati solidi non risospensibili, separazioni nette o flocculazioni ed infine formazione di gel. Per ogni miscela è stata descritta il tipo di interazione fra le due componenti ed è stato misurato il pH (Romanazzi *et al.*, 2020).

### **7.2.2. Prove di campo**

Sulla base delle conoscenze acquisite dalle precedenti prove di laboratorio, sono state testate alcune combinazioni in condizioni aziendali, allo scopo di valutarne la trasferibilità su scala commerciale così da sviluppare protocolli di utilizzo e dimostrare la validità anche in una futura ottica di mercato. Sono state esaminate più combinazioni fra chitosano denso e vari fungicidi utilizzati dalle aziende partner del progetto “Vitinnova”. In particolare, sono stati testati: prodotti a base di zolfo, ossido rameoso, solfato di rame, solfato di rame neutralizzato ed ossicloruro più idrossido di rame (Tabella 9).

**Tabella 9** – Fungicidi saggiati e rispettive dosi adoperate durante le prove di compatibilità in campo con chitosano denso nell’ambito del progetto “Vitinnova”.

<b>Principio attivo</b>	<b>Formulato commerciale</b>	<b>Dose saggiata</b>
Ossicloruro di rame 1 e 2	Pasta Siapa e Pasta Caffaro	125 mL/hL
Solfato di rame tribasico 1 e 2	Idrorame Flow e Tri-base	235 mL/hL – 200 mL/hL
Solfato di rame neutralizzato	Siaram 20 WG	500 g/hL
Ossido rameoso	Cobre Nordex	750 g/ha
Ossicloruro di rame + idrossido	Airone Extra	75 g/hL
Zolfo bagnabile	Microthiol	3 kg/ha
Zolfo liquido	Thiopron	2-6 L/ha

Le prove sono state condotte in tutte e tre le aziende con i diversi atomizzatori di cui dispongono simulando dei veri trattamenti in vigna con volumi differenti da 100L fino a 50L (Tabella 10). Il chitosano denso è stato miscelato in tre concentrazioni diverse: 0,20%, 0,21%, 0,25%, e 0,5%; scelta dovuta al fatto che nel caso di buona riuscita della prima combinazione la miscela residua non venisse eliminata, ma piuttosto utilizzata come base di partenza per inserire altri fungicidi preventivamente diluiti in acqua.

**Tabella 10** – Combinazioni fra chitosano e fungicidi ammessi in agricoltura biologica testate nelle prove di compatibilità di campo, con relativi volumi utilizzati e concentrazioni di chitosano adoperate.

<b>Combinazioni testate</b>		<b>Volume utilizzato</b>
<b>Chitosano (%)</b>	<b>Principi attivi</b>	
0,25%	Ossicloruro di rame 1 e 2	100 L
0,21%	Ossicloruro di rame + zolfo liquido	60 L
0,25%	Ossido rameoso	100 L
0,20%	Ossido rameoso + zolfo liquido + zolfo in polvere	50 L
0,25%	Solfato tribasico di rame 1	100 L
0,25%	Solfato di rame neutralizzato	100 L
0,25%	Ossicloruro + idrossido di rame	50 L
0,25%	Solfato tribasico di rame 2	50 L



Il sistema di miscelazione adoperato non è stato univoco ma differenziato in tre modalità in base alle informazioni acquisite di volta in volta col proseguire delle prove. Inizialmente è stato adottato il sistema tipico aziendale, quindi una volta sciolto il chitosano in acqua è stato unito direttamente il fungicida tal quale alla soluzione in botte. Secondariamente è stato proposto il sistema utilizzato nelle prove di laboratorio, quindi i formulati sono stati sciolti separatamente nei volumi d'acqua corrispondenti alla metà di quello finale e solo dopo uniti assieme in botte mantenendo sempre in agitazione la miscela. Infine, è stata sperimentata una terza modalità che prevede la diluizione del fungicida in acqua e solo dopo l'aggiunta del chitosano tal quale sempre in continua agitazione. In tutti i casi una volta preparata la miscela in botte sono stati simulati dei trattamenti fitosanitari veri e propri in vigna con pressioni e velocità standard.

La valutazione della compatibilità poi è stata condotta osservando il comportamento delle diverse miscele dieci minuti dopo la miscelazione e valutando i residui depositati nei filtri degli atomizzatori, pesando i filtri stessi pre e post trattamento. Il livello di compatibilità è stato classificato in 3 categorie: 1) compatibile, 2) parzialmente compatibile e 3) incompatibile. Rientrano nella categoria 1 le combinazioni considerate compatibili, cioè che non presentano reazioni o fasi che potrebbero compromettere la buona riuscita di un trattamento antiparassitario. Nella categoria 2 sono state incluse le miscele che formano dei sedimenti, anche se risospesibili. Nella categoria 3 sono state incluse le miscele che danno luogo a separazioni nette o formano gel, flocculazioni e precipitati solidi non risospesibili.

### **7.3. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI**

Le primissime osservazioni effettuate nei vigneti in prossimità di ciascun trattamento effettuato sono state di tipo morfo-metrico così da valutare approssimativamente l'andamento della crescita vegetativa delle piante di vite. Inoltre, sono state analizzate le condizioni meteorologiche, secondo dati meteo forniti dall'ASSAM, così da rapportare il livello di infezione in base all'andamento climatico. Le piante di vite sulle quali eseguire le varie misurazioni sono state scelte casualmente lungo ciascun filare, quindi contrassegnate con del nastro colorato, in modo da poterle individuare anche nelle misurazioni e nei campionamenti successivi. Nello specifico sono state misurate le lunghezze dei tralci per valutare la fase fenologica BBCH alla quale si trovava la pianta al momento di ogni trattamento eseguito nel corso della stagione.

Sono stati eseguiti monitoraggi al fine di valutare la comparsa dei sintomi associati alle infezioni di *P. viticola* e *E. nector* Una volta effettuati gli adeguati rilievi di campo per

valutare l'entità dell'infezione sono state adoperate scale empiriche suddivise in più classi di gravità in base alla percentuale di superficie fogliare colpita dai sintomi della malattia. Per quanto riguarda le foglie ai fini dello studio si considera che le piante prese in esame abbiano in totale 100 foglie ciascuna e si classificano quelle malate con 11 differenti classi di gravità della malattia (Tabella 11).

**Tabella 11** – Scala empirica utilizzata per il rilievo della malattia sulle foglie.

Classe	Superficie infetta (%)
0	Foglia sana
1	1-10%
2	11-20%
3	21-30%
4	31-40%
5	41-50%
6	51-60%
7	61-70%
8	71-80%
9	81-90%
10	91-100%

L'adozione della scala empirica permette di calcolare la diffusione della malattia (D), la gravità (G) e l'intensità media ponderata (I) o Indice di infezione di McKinney (McKinney, 1923). La diffusione (D) esprime la percentuale di superficie fogliare infetta sull'intera chioma e la percentuale di grappoli infetti sul totale dei grappoli presenti sulla pianta. La formula per calcolare tale parametro è la seguente:

$$D = n * 100 / N$$

n: numero di bacche/foglie infette

N: numero totale di bacche/foglie esaminate.

La gravità (G) della malattia, valore che esprime l'intensità media della malattia riferita sia alle foglie sia ai grappoli infetti, è stata calcolata tramite la seguente formula:

$$G = \sum(c * f) / n$$

c: valore classe empirica

f: frequenza della classe

n: numero foglie/bacche infette.

Infine, l'Indice di McKinney (o intensità media ponderata della malattia) esprime la gravità della malattia in valore percentuale rispetto a quella massima possibile ed è stato calcolato attraverso la formula:

$$I = \sum (c * f) / (N * X)$$

c: valore classe empirica

f: frequenza della classe

N: numero totale delle osservazioni

X: valore della classe massima della scala empirica.

Dai monitoraggi effettuati in data 15/06 e 29/06/2021 a Matelica, 29/06 e 05/07/2021 a Castelplanio e 06/07/2021 ad Angeli di Varano, sono stati ottenuti i dati per calcolare gli indici sopraindicati. Successivamente si sono calcolate le medie e le deviazioni di ciascun blocco e di ciascuna tesi. Il software di statistica impiegato per questa analisi prende il nome di SPSS20 (*Statistical Package for Social Science*). È seguita un'analisi della varianza ANOVA (*Analysis of Variance*) per verificare l'influenza dei trattamenti sui valori di gravità, di diffusione e dell'indice di McKinney. Le medie ottenute sono infine state separate applicando il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*), secondo il livello di probabilità  $P \leq 0.05$ .

## 8. RISULTATI

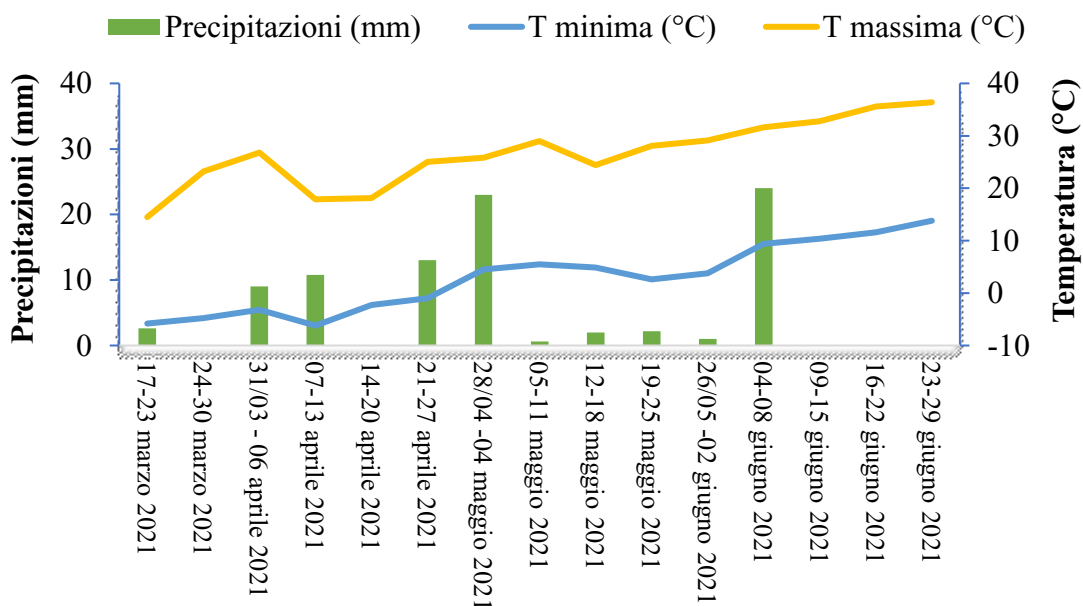
### 8.1. CONDIZIONI METEOROLOGICHE

Allo scopo di inquadrare la prova sperimentale in oggetto, quindi studiare l'evoluzione di *P. viticola* e la sua diffusione, risulta di centrale importanza un'attenta valutazione dell'andamento meteorologico dell'intera stagione vegetativa 2021 in quanto, come descritto in precedenza, l'elevata umidità portata dalle precipitazioni favorisce il parassita. I dati climatici sono stati raccolti attraverso il Bollettino Agrometeorologico che elabora settimanalmente il Servizio Agrometeo Regionale dell'ASSAM. Il Bollettino fornisce dati su temperatura, umidità e precipitazioni e indicazioni per quanto riguarda la difesa delle principali specie vegetali. Sono state prese come riferimento le stazioni meteo più vicine ai rispettivi vigneti e dunque la stazione meteorologica di Matelica (MC), la stazione meteorologica di Castelplanio (AN), e per il vigneto di Angeli di Varano i dati sono stati raccolti dalla stazione meteorologica di Camerano (AN).

#### ➤ *Matelica*

L'andamento meteorologico registrato nella stazione ST21 di Matelica (MC) nel periodo compreso tra metà marzo e fine giugno 2021 (Figura 19) evidenzia soli due eventi mediamente piovosi nella prima settimana di maggio e giugno. I restanti mesi invece sono stati caratterizzati da precipitazioni inferiori alla norma che hanno provocato anche sintomi di siccità piuttosto evidenti sulle piante. Condizioni di certo sfavorevoli per lo sviluppo di *P. viticola*, che in assenza di umidità non trova le condizioni adatte per la germinazione delle oospore responsabili dell'infezione primaria. Solitamente nel vigneto oggetto di tesi in località Piane la bagnatura fogliare notturna si protrae fino alle tarde ore del mattino ed è piuttosto pericolosa visto il tipico microclima della zona, ma nella stagione primaverile 2021 non è stata sufficiente allo sviluppo del patogeno che ha dovuto fare i conti con una stagione piuttosto siccitosa e sfavorevole. Ciò ha determinato quindi un basso, se non nullo, inoculo iniziale e di conseguenza una bassa pressione di malattia che col proseguire della stagione non ha visto segnali di cambiamento.

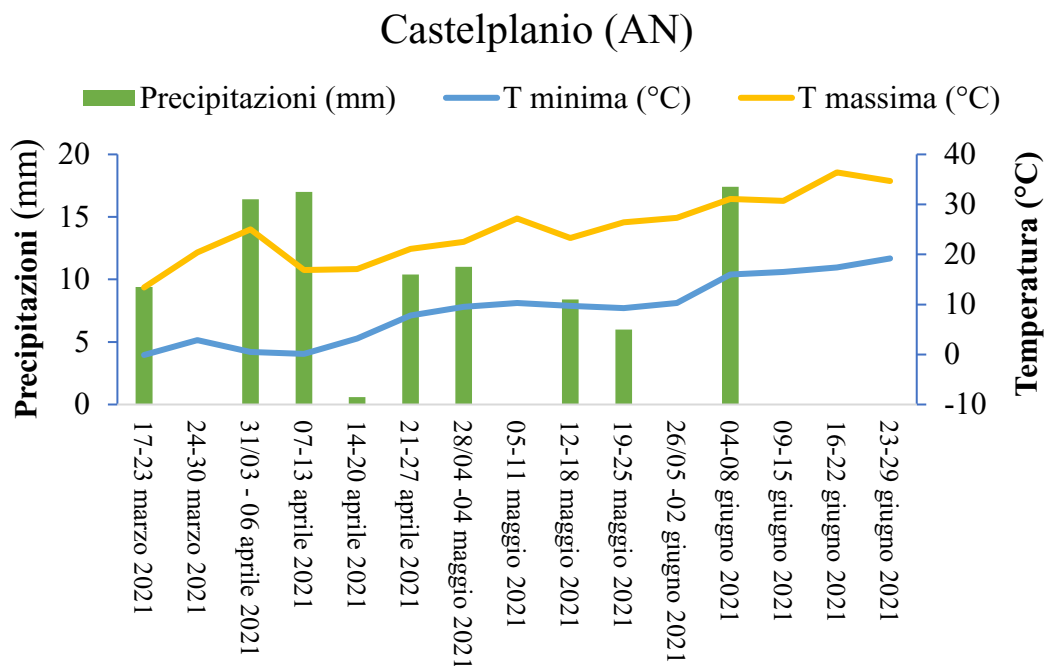
## Matelica (MC)



**Figura 19** - Grafico dell'andamento meteorologico registrato nel periodo che va dal 17 marzo al 6 luglio 2021 nei pressi della stazione ASSAM di Matelica (MC).

### ➤ *Castelplanio*

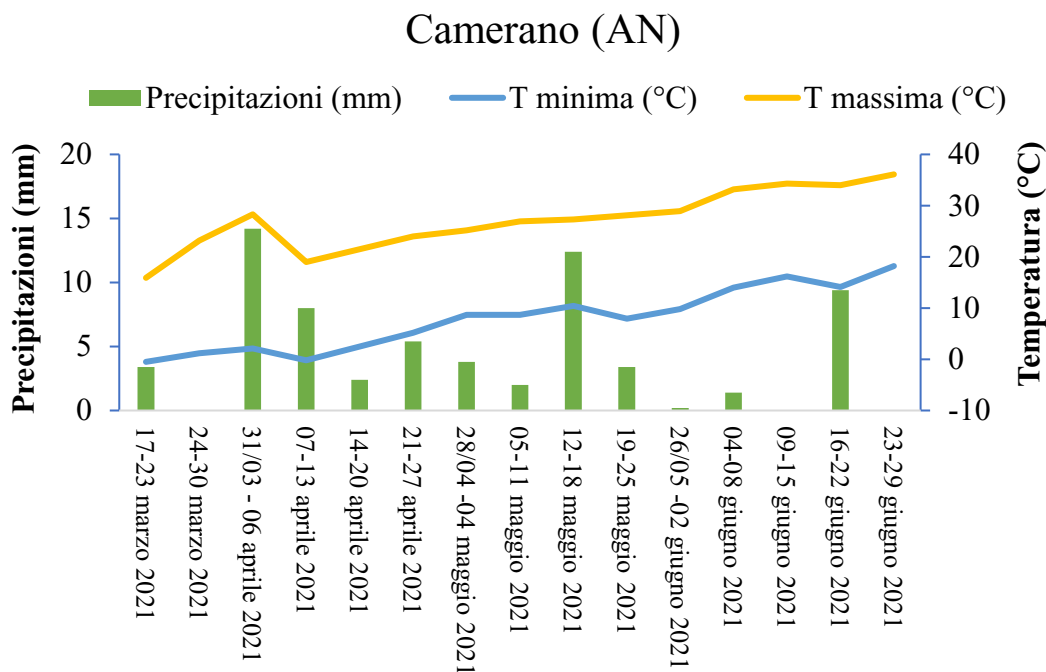
Le condizioni meteorologiche registrate nella stazione di Castelplanio ST47 rispecchiano quelle viste in precedenza nella stazione di Matelica. Infatti, la primavera è stata piuttosto asciutta ad eccezione di qualche scarso evento piovoso (Figura 20). Queste condizioni hanno garantito una bassa pressione iniziale della malattia in termini di infezioni primarie. Pertanto, lo sviluppo del patogeno è stato piuttosto contenuto.



**Figura 20** - Grafico dell'andamento meteorologico registrato nel periodo che va dal 17 marzo al 06 luglio 2021 nei pressi della stazione ASSAM di Castelplanio (AN).

➤ **Camerano**

La stazione meteorologica di Camerano ST16 conferma l'andamento climatico piuttosto sfavorevole per *P. viticola* registrando una primavera piuttosto asciutta e calda evitando le condizioni ottimali per la diffusione del patogeno stesso (Figura 21).



**Figura 21** - Grafico dell'andamento meteorologico registrato nel periodo che va dal 17 marzo al 06 luglio 2021 nei pressi della stazione ASSAM di Camerano (AN).

In generale a livello regionale le condizioni meteorologiche sono simili tra le varie provincie e tutti i mesi del 2021 fin qui trascorsi sono stati caratterizzati da precipitazioni inferiori alla norma, provocando fenomeni di siccità su tutto il territorio. Le provincie che hanno sofferto di più la carenza di precipitazioni rispetto alla media di riferimento 1981-2010 sono state Ancona (-38% gennaio-maggio, -55% febbraio-maggio) e Macerata (-28% gennaio-maggio, -50% febbraio-maggio). In un periodo, quello dei primi cinque mesi dell'anno, in cui nella nostra regione dovrebbe cadere un totale medio di precipitazione di 293mm, nel 2021 i mm totali sono stati invece 209 che corrispondono ad un deficit del 28% rispetto alla media di riferimento 1981-2010. Se restringiamo al periodo febbraio-maggio, il totale di pioggia scende a 135mm e l'anomalia al -44%. I dati più allarmanti poi si sono registrati nel mese di maggio: 22mm il totale, che corrisponde ad un'anomalia del -62%; maggio 2021 è alla terza posizione come mese più secco per le Marche dal 1961 (Fonte: ASSAM Regione Marche). L'andamento meteorologico, quindi, non è stato favorevole allo sviluppo di *P. viticola* fino ad oggi pressoché nullo e ad una condizione di disponibilità idrica critica per la vite stessa.

## 8.2. RISULTATI COMPATIBILITÀ TRA CHITOSANO E ALTRI AGROFARMACI

### 8.2.1. Prove di laboratorio

Dalle prove di compatibilità effettuate in laboratorio sono emerse sia delle combinazioni che manifestano un'elevata affinità, sia combinazioni che risultano incompatibili. In particolare, dai dati raccolti dopo 10 minuti di fase stazionaria e consultabili in Tabella 12 relativi alla prima prova, si evince come il chitosano denso allo 0,5% di principio attivo combinato con fungicidi alla dose piena d'etichetta (DP), sia risultato incompatibile con i prodotti saggiati a base di idrossido di rame, solfato di rame neutralizzato e tribasico; parzialmente compatibile con quelli a base di zolfo; Infine, è risultato compatibile con i prodotti a base di ossicloruro di rame, ossido rameoso, solfato di rame tribasico più idrossido e olio essenziale di arancio dolce (Figura 22).

**Tabella 12** - Risultati ottenuti durante la prima prova di compatibilità tra chitosano denso e diversi fungicidi alla dose massima d'etichetta utilizzati in agricoltura biologica. Per ogni combinazione vengono riportati i valori della scala di compatibilità attribuiti e la descrizione delle reazioni osservate dopo 10 minuti di fase stazionaria.

<b>Principi attivi DP (+ Chitosano 0.5%)</b>	<b>Valori</b>	<b>Descrizione</b>
Idrossido di rame	4	Precipitato e flocculato
Solfato di rame neutralizzato	5	Gel, precipitato e schiuma
Solfato di rame tribasico	3	Precipitato
Ossicloruro di rame	1	Leggera patina sul fondo
Ossido rameoso	1	Compatibile
Solfato di rame tribasico + idrossido	1	Compatibile con un po' di schiuma
Olio essenziale di arancio dolce	1	Compatibile
Zolfo bagnabile 1	2	Sedimentato
Zolfo liquido 1	2	Leggero sedimento
Zolfo liquido 2	2	Leggera patina sul fondo





**Figura 22** – Risultati della combinazione tra prodotti cuprici a dose piena e chitosano denso alla concentrazione dello 0,5% di principio attivo durante la prima prova di compatibilità in laboratorio. In ordine, da sinistra verso destra: chitosano 0,5%, combinato con idrossido di rame, solfato di rame neutralizzato, solfato di rame tribasico, ossicloruro di rame, ossido rameoso e solfato di rame tribasico più idrossido di rame.

Le combinazioni che hanno mostrato i migliori risultati durante la prima prova, sono state poi impiegate nella seconda prova dove sono state mantenute fisse le dosi d'etichetta saggiate, mentre è stata fatta variare la concentrazione di chitosano per verificare eventuali effetti dovuti alla concentrazione del biopolimero. I risultati (Tabella 13) hanno rispecchiato quelli della prova 1, tranne nel caso della combinazione con il prodotto a base di idrossido e solfato tribasico di rame, dove si può osservare un buon livello di compatibilità solamente nell'intorno della concentrazione 0,5%: infatti, aumentando la concentrazione di chitosano si assiste alla formazione di un gel, mentre a concentrazione più basse dello 0,5% la miscela tende a formare dei precipitati. In pratica, con chitosano allo 0,5% (unica concentrazione compatibile con questo prodotto) la miscela non è abbastanza viscosa da formare un gel, ma riesce a tenere in sospensione il rame che quindi non precipita. Nel caso della combinazione fra chitosano e olio essenziale di arancio dolce si è assistito ad una separazione nella miscela con minor concentrazione di chitosano.

**Tabella 13** - Risultati ottenuti durante la seconda prova di compatibilità tra chitosano a diverse concentrazioni e fungicidi alla dose massima d'etichetta utilizzati in agricoltura biologica. Per ogni combinazione vengono riportati i valori della scala di compatibilità attribuiti 10 minuti di fase stazionaria.

Sostanza attiva	Concentrazione chitosano (%)			
	1	0,50	0,25	0,10
Ossicloruro di rame	1*	1	1	1
Ossido rameoso	1	1	1	1
Solfato tribasico + idrossido di rame	5	1	3	3
Olio essenziale di arancio dolce	1	1	1	4
Zolfo liquido 1	1	1	1	1
Zolfo liquido 2	2	1	1	1

\*1: compatibile; 2: compatibile con presenza di sedimenti risospesibili; 3: formazione di precipitati o sedimenti non risospesibili; 4: separazioni o flocculazioni; 5: formazione di gel.

Nella terza prova, le stesse combinazioni sono state testate variando le dosi degli agrofarmaci e tenendo fissa quella del chitosano allo 0,5% (Tabella 14). Al contrario di quanto capitato nella prova 2, dove diminuendo la concentrazione di chitosano in un caso diminuiva anche il livello di compatibilità, qui non è stato mai registrato un decremento dell'affinità fra combinazioni riducendo i dosaggi dei prodotti. In pratica, i prodotti che a dose piena sono compatibili con chitosano allo 0,5%, lo sono anche a  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{2}$  della dose massima consentita.

Nella quarta prova, dove sono stati testati solo rame e chitosano variando contemporaneamente sia le concentrazioni di chitosano (0,1%, 0,25%, 0,5% e 1%), sia i dosaggi d'etichetta dei fitofarmaci ( $\frac{1}{10}$  DP,  $\frac{1}{4}$  DP,  $\frac{1}{2}$  DP e DP). In questa prova sono stati testati anche quei prodotti che non avevano dato buoni risultati nella prova 1 per verificare eventuali effetti dovuti alle concentrazioni delle componenti della miscela (Tabella 15).

**Tabella 14** - Risultati ottenuti durante la terza prova di compatibilità tra chitosano a concentrazione 0,5% e fungicidi utilizzati in agricoltura biologica alla dose massima d'etichetta consentita su uva da vino (DP), a dose massima dimezzata e a  $\frac{1}{4}$  della dose massima. Per ogni combinazione vengono riportati i valori della scala di compatibilità attribuiti dopo 10 minuti di fase stazionaria.

Sostanza attiva combinata con chitosano 0,5%	Dose		
	$\frac{1}{4}$ DP	$\frac{1}{2}$ DP	DP
Ossicloruro di rame	1*	1	1
Ossido rameoso	1	1	1
Solfato tribasico + idrossido di rame	1	1	1
Olio essenziale di arancio dolce	1	1	1
Zolfo liquido 1	1	1	2
Zolfo liquido 2	1	1	1

\*1: compatibile; 2: compatibile con presenza di sedimenti risospesibili.

Il livello di compatibilità fra chitosano e idrossido di rame risulta essere molto basso, infatti solo le combinazioni con l'idrossido di rame a  $\frac{1}{10}$  DP, hanno dato buoni risultati; aumentando la quantità di fungicida si assiste a reazioni avverse piuttosto marcate: formazioni di precipitati, flocculazioni e di gel nei casi più gravi. Incompatibile con il chitosano risulta anche il solfato neutralizzato di rame, il quale a contatto col biopolimero tende spesso a gelificare, tranne quando le concentrazioni sono molto basse (in questo caso prevale la reazione di flocculazione). Il solfato tribasico di rame presenta una parziale compatibilità con chitosano che merita di essere approfondita: in genere, sembra che a basse concentrazioni di chitosano si formino dei precipitati, mentre aumentandole si va verso la gelificazione della miscela, ma con buone finestre di compatibilità nell'intorno della concentrazione 0,5%; in ogni caso, sempre dopo 10 minuti di fase stazionaria, tutte le combinazioni con  $\frac{1}{10}$  DP risultano compatibili. L'ossicloruro di rame ha dato sempre ottimi risultati di affinità nelle varie combinazioni con chitosano in laboratorio (figura 23), a qualsiasi dosaggio o concentrazione saggiati, a patto che esso sia aggiunto diluito alla soluzione contenente chitosano. Stesso discorso può essere fatto per l'ossido rameoso, anche se in questo caso le miscele tendono a separarsi dopo qualche ora di fase stazionaria; reazione che sembra più marcata in presenza di chitosano, ma che tuttavia non dovrebbe compromettere la buona riuscita di un trattamento fitosanitario.

**Tabella 15** - Risultati ottenuti durante la quarta prova di compatibilità tra chitosano a diverse concentrazioni e fungicidi a base di rame alla dose massima d'etichetta consentita su uva da vino (DP), a dose massima dimezzata, a  $\frac{1}{4}$  della dose massima e ad  $\frac{1}{10}$  della dose massima. Per ogni combinazione vengono riportati i valori della scala di compatibilità attribuiti dopo 10 minuti di fase stazionaria.

Sostanza attiva	Dose	Concentrazione chitosano (%)			
		1	0,50	0,25	0,10
Idrossido di rame	DP	n.t.	5	4	4
	$\frac{1}{2}$ DP	n.t.	4	3	3
	$\frac{1}{4}$ DP	n.t.	2	2	2
	$\frac{1}{10}$ DP	1	1	1	1
Solfato neutralizzato di rame	DP	n.t.	5	5	4
	$\frac{1}{2}$ DP	n.t.	5	5	4
	$\frac{1}{4}$ DP	n.t.	3	3	4
	$\frac{1}{10}$ DP	1	1	1	1
Solfato tribasico di rame	DP	n.t.	3	4	4
	$\frac{1}{2}$ DP	n.t.	n.t.	3	3
	$\frac{1}{4}$ DP	1	1	3	3
	$\frac{1}{10}$ DP	1	1	1	1
Ossicloruro di rame	DP	1	1	1	1
	$\frac{1}{2}$ DP	1	1	1	1
	$\frac{1}{4}$ DP	1	1	1	1
	$\frac{1}{10}$ DP	1	1	1	1
Ossido rameoso	DP	n.t.	n.t.	2	2
	$\frac{1}{2}$ DP	n.t.	n.t.	1	1
	$\frac{1}{4}$ DP	n.t.	n.t.	1	1
	$\frac{1}{10}$ DP	n.t.	n.t.	1	1

\*n.t.: non testato; 1: compatibile; 2: compatibile con presenza di sedimenti risospensibili; 3: formazione di precipitati o sedimenti non risospensibili; 4: separazioni o flocculazioni; 5: formazione di gel.



**Figura 23** – Combinazioni di Chitosano denso 1% + ossicloruro di rame. Da sinistra verso destra: testimone chitosano 1%; testimone ossicloruro di rame DP; chitosano 1% + ossicloruro di rame  $\frac{1}{4}$  DP; chitosano 1% + ossicloruro di rame  $\frac{1}{2}$  DP e chitosano 1% + ossicloruro di rame DP. I due prodotti non hanno mostrato reazioni di incompatibilità in laboratorio, nelle varie concentrazioni o dosi saggiate.

In base a questi risultati ricavati dalle prove di laboratorio è stato deciso di impiegare nei vigneti sperimentali del progetto “Vitinnova” la combinazione di chitosano denso ad una concentrazione di 0,25% con un prodotto a base di ossicloruro di rame a metà della dose massima di etichetta (125 ml/hl), in quanto questa combinazione si è dimostrata essere la più compatibile, affidabile e stabile rispetto a tutte le altre.

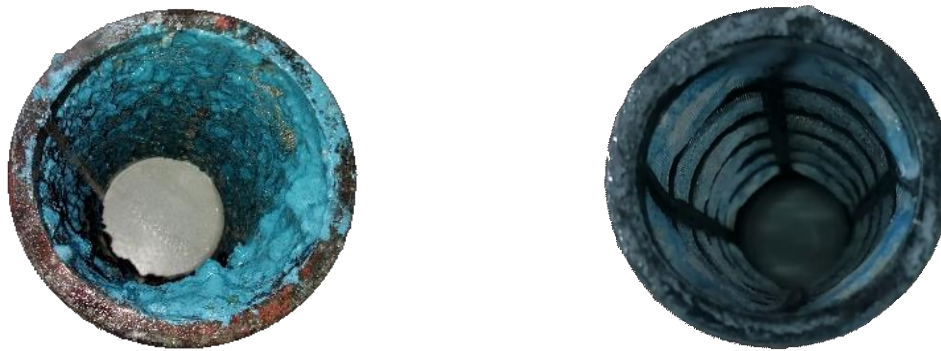
In ogni caso non si può escludere che altri formulati a base di chitosano possano risultare miscibili con formulati di agrofarmaci basati sugli stessi principi attivi saggiati in questa sede. Il chitosano ha un optimum di pH intorno a 5,6 (da 5,5 a 6), pertanto formulazioni con un pH più elevato possono determinare alterazioni nella struttura della molecola, la sua precipitazione e conseguenti effetti sulla miscibilità (Romanazzi *et al.*, 2020).

### **8.2.2. Prove di campo**

Durante le prove di compatibilità in campo sono emersi risultati che rispecchiano in linea generale quelli ottenuti in laboratorio salvo casi isolati. Le difficoltà riscontrate in campo sono per lo più legate al sistema di miscelazione ed alla preparazione delle miscele in volumi elevati.

La formulazione di chitosano adoperata nei trattamenti “Vitinnova” è il chitosano denso, disponibile in commercio come una pasta divisa in due fasi ben distinte, che quindi deve essere accuratamente omogeneizzato prima della diluizione. Per i trattamenti combinati è stata scelta la combinazione chitosano 0,25% + ossicloruro di rame  $\frac{1}{2}$  DP.

Nonostante non siano stati riscontrati problemi di compatibilità fra il biopolimero e l’ossicloruro di rame in laboratorio, durante i primi tentativi di preparazione della miscela in campo, si poteva osservare una reazione di incompatibilità. A seguito di approfondimenti è emerso che la diversa reazione che si ottiene miscelando i due prodotti è imputabile al diverso sistema di miscelazione. Dalle prove è emersa infatti la necessità di preparare il biopolimero e i fitofarmaci in miscele separate da unire solo in un secondo momento dopo la loro preventiva diluizione. Diversamente, vale a dire aggiungendo il prodotto tal quale nella soluzione di chitosano, si osservano infatti reazioni di incompatibilità. È il caso dei primi tentativi, nei quali a seguito dell’aggiunta dell’ossicloruro di rame tal quale in una soluzione contenente chitosano si assisteva ad una reazione di flocculazione istantanea con la completa occlusione dei filtri delle irroratrici (Figura 24), rendendo quindi la miscela inutilizzabile per un trattamento fitosanitario. Questa reazione non era visibile nelle prove condotte in laboratorio, dove la miscela tra il biopolimero e l’ossicloruro di rame non aveva dato alcun problema di compatibilità. Per questo motivo sono stati eseguiti degli approfondimenti di laboratorio, dai quali è emerso che la diversa reazione ottenuta miscelando i due stessi prodotti è imputabile al diverso sistema di miscelazione. L’aggiunta di rame troppo concentrato fa sì che il chitosano aggredisca il metallo scatenando la reazione di incompatibilità, cosa che non avviene se il metallo viene aggiunto previa diluizione con acqua. In laboratorio, infatti, chitosano e rame vengono preparati separatamente in un volume d’acqua che corrisponde a metà di quello finale e successivamente uniti, mentre in campo i prodotti vengono generalmente messi in botte tal quali e poi si porta a volume con acqua.



**Figura 24** – Filtro dell'irroratrice completamente intasato a seguito della reazione di incompatibilità durante la prima prova di in campo, causata dall'aggiunta di ossicloruro di rame tal quale in una soluzione contenente chitosano (a sinistra). Filtro dell'irroratrice dopo un trattamento con gli stessi composti, dove però il rame è stato aggiunto diluito alla soluzione di chitosano (a destra).

Questo risultato è stato utile per ovviare al problema presentatosi e scongiurare la comparsa di reazioni avverse. Tuttavia, questa soluzione richiede dei tempi di preparazione piuttosto lunghi ed è stata sperimentata quindi una terza modalità di miscelazione che prevede l'aggiunta del chitosano a concentrazioni elevate ad una sospensione già contenente l'ossicloruro di rame diluito mantenuta in continua agitazione. Non si sono manifestate delle reazioni di incompatibilità a seguito dell'aggiunta di chitosano molto concentrato nella botte contenente già il rame diluito e questo risultato ottenuto ha permesso di sviluppare un protocollo di miscelazione in campo che permette di rendere più agevole l'inserimento del biopolimero nelle strategie aziendali, in quanto non è necessario diluire preventivamente entrambi i prodotti, ma basta preparare la sospensione con rame in botte come avviene di consueto, sciogliere separatamente il chitosano necessario in un recipiente da circa venti litri, versarlo in botte e portare a volume finale con acqua (Figura25).



**Figura 25** – Immagini scattate in campo su foglie di vite trattate con la miscela di ossicloruro di rame  $\frac{1}{2}$  DP (125 mL/hL) + chitosano 0,25%, che dimostrano la buona compatibilità tra le due molecole (a sinistra), e foglia trattata con soluzione di chitosano 0,5% (a destra).

Con questo sistema sono state poi testate altre combinazioni che hanno dato buoni risultati così come in laboratorio (Tabella 16). In particolare, è stato possibile notare una buona compatibilità tra chitosano e ossicloruro di rame anche in seguito all'aggiunta di zolfo liquido se non troppo concentrato. Buona compatibilità tra chitosano e rame sottoforma di ossido, compatibilità parziale fra chitosano e solfato tribasico di rame. Incompatibilità tra chitosano e solfato neutralizzato di rame così come con idrossido di rame combinato ad ossicloruro di rame.



**Tabella 16** – Risultati ottenuti durante le prove di campo di compatibilità tra chitosano denso e vari agrofarmaci utilizzati in viticoltura biologica; sono riportati i valori della scala assegnati e le concentrazioni/dosi delle combinazioni testate.

<b>Combinazioni testate</b>	<b>Valori</b>	<b>Descrizione</b>
Ossicloruro di rame 1e2 + Chitosano 0,25%	1*	Compatibili entrambi
Ossicloruro di rame + zolfo liquido + Chitosano 0,21%	1	Compatibile con abbondante schiuma
Ossido rameoso + Chitosano 0,25%	1	Compatibile
Ossido rameoso + zolfo liquido + zolfo in polvere + Chitosano 0,20%	3	Incompatibile
Solfato tribasico di rame 1 + Chitosano 0,25%	2	Compatibilità parziale in fase stazionaria
Solfato di rame neutralizzato + Chitosano 0,25%	3	Incompatibile, gel
Ossido rameoso + idrossido + Chitosano 0,25%	2	Compatibilità parziale in fase stazionaria, con patina sul fondo
Solfato tribasico di rame 2 + Chitosano 0,25%	1	Compatibilità in fase stazionaria

\*1: compatibile; 2: parzialmente compatibile; 3: incompatibile.

### **8.3. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI**

Considerando le condizioni meteorologiche avverse allo sviluppo di *P. viticola* registrate nel periodo intercorso tra il mese di marzo e quello di luglio 2021, i monitoraggi effettuati nei campi sperimentali hanno evidenziato in linea generale una bassissima pressione della malattia. Perciò l'attenzione è stata rivolta anche verso altre malattie fungine di grande interesse nel settore vitivinicolo biologico, come ad esempio l'oidio che invece ha avuto delle condizioni più favorevoli al suo sviluppo.

#### **8.3.1. Monitoraggio sul vigneto di Matelica**

I sopralluoghi effettuati nel vigneto di Matelica in data 15/06/2021 e 29/06/2021 per la valutazione delle malattie non hanno evidenziato la presenza di sintomi specifici ascrivibili a oidio né tantomeno a peronospora. Le motivazioni risiedono, come già anticipato, nella mancanza di piogge e nella presenza di bassa umidità relativa, quindi di condizioni

sfavorevoli per lo sviluppo di queste patologie fungine. Il vigneto di Matelica, infatti, è ubicato nell'area dove le precipitazioni sono state più scarse.

### 8.3.2. Monitoraggio e rilievo sul vigneto di Castelplanio

I monitoraggi per la valutazione delle malattie sono stati effettuati nelle date 29/06/2021 e 05/07/2021. Nonostante l'annata poco favorevole per il patogeno, l'attenta osservazione della vegetazione ha messo in luce la presenza seppur in traccia di sintomi specifici su foglie ascrivibili a *P. viticola*, ma vista la mancata sporulazione e la limitata presenza di malattia nell'intero vigneto, per il momento non è stato ritenuto opportuno effettuare alcun rilievo né su foglie né su grappoli. I primi sintomi di peronospora sono comparsi sul testimone non trattato in data 05/07/2021.

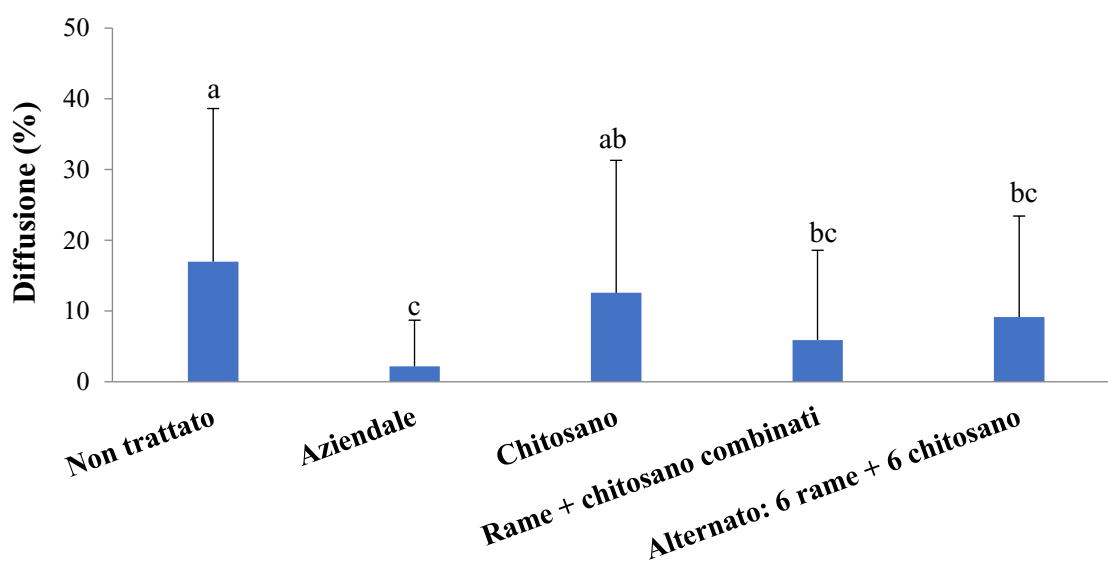
Diverso è stato il caso dell'oidio, che a seguito di un evento piovoso piuttosto importante fra fine giugno ed inizio luglio è stato rilevato con sintomi specifici in data 05/07/2021 sui grappoli di vite, mentre sulle foglie i primi sintomi ascrivibili ad oidio erano già comparsi circa una settimana prima, senza però segni di sporulazione (Figura 26). In questo vigneto la quantità di inoculo iniziale di oidio risultava piuttosto elevata a causa di una pressione importante nell'annata precedente.



**Figura 26** – Grappolo di vite raccolto a Castelplanio infetto da oidio (a sinistra) e immagine del parassita allo stereomicroscopio (a destra).

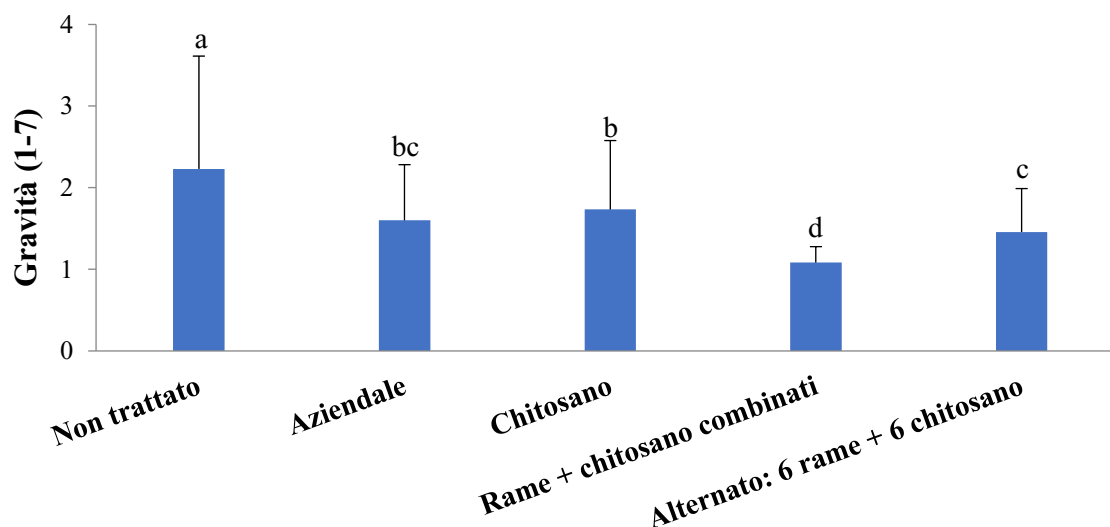
In questo caso è stato ritenuto opportuno effettuare un rilievo della malattia a carico dei grappoli, in quanto i sintomi erano piuttosto diffusi e chiari.

È stata eseguita un'analisi statistica (SPSS20) al fine di far emergere eventuali differenze statisticamente significative fra le varie tesi e di valutare quindi la diversa efficacia dei trattamenti considerati. In particolare, sono stati definiti tramite un'analisi della varianza ANOVA i valori di diffusione (D), di gravità (G), e dell'indice di McKinney (IMK). Il grafico relativo alla diffusione (Figura 27) dimostra come la diffusione massima di oidio si trovi nella tesi non trattata. Allo stesso modo inoltre è possibile notare che il controllo più efficace è avvenuto nel testimone aziendale e nelle tesi trattate con prodotti cuprici combinati e alternati al chitosano. Quest'ultimi non sono differenti statisticamente, tra loro ma presentano valori significativamente minori rispetto al testimone non trattato.



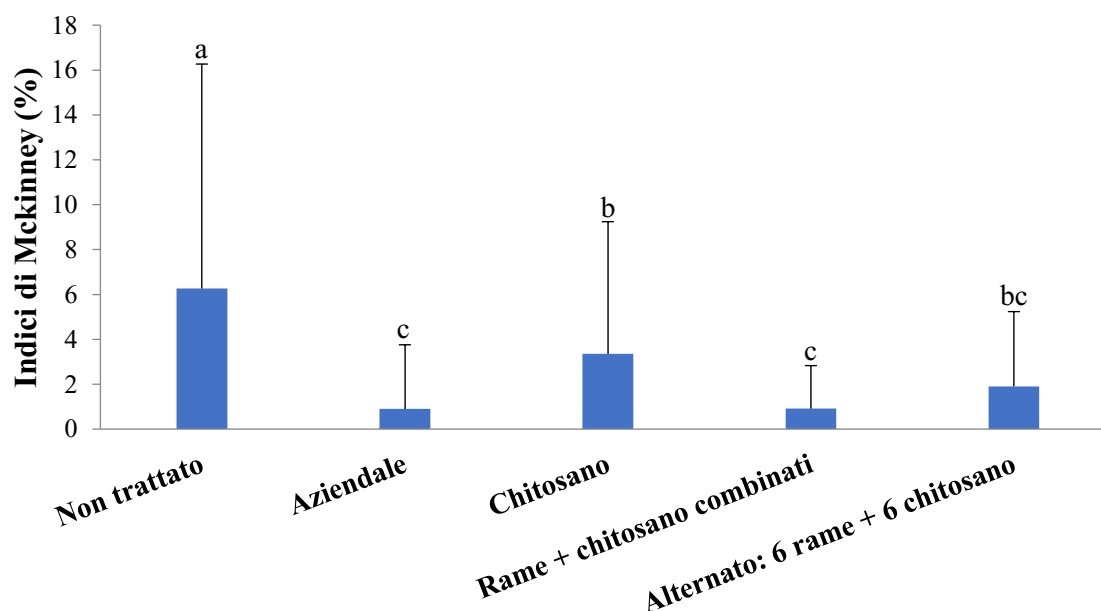
**Figura 27** - Diffusione dell'oidio della vite sui grappoli del vigneto di Castelplanio nel rilievo effettuato in data 05/07/21. I valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Anche nell'istogramma della gravità (Figura 28) si possono osservare delle differenze statisticamente significative fra le varie tesi: la tesi trattata con prodotti cuprici combinati al chitosano è quella che presenta i valori più bassi, seguita dalla tesi alternata. Il trattamento con chitosano non si differenzia dal testimone aziendale, che a sua volta non è dissimile neanche dalla tesi alternata. Tutti i trattamenti comunque hanno contenuto la gravità in maniera significativa se comparati al testimone non trattato.



**Figura 28** - Gravità dell'oidio della vite sui grappoli del vigneto di Castelplanio nel rilievo effettuato in data 05/07/21. I valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Complessivamente, tutte le tesi hanno ridotto in maniera statisticamente significativa l'indice di McKinney (Figura 29) rispetto al testimone non trattato. Il testimone aziendale e il trattamento combinato mostrano i valori più bassi, mentre chitosano e trattamenti alternati si collocano ad un livello intermedio.



**Figura 29** - Indice di McKinney dell'oidio della vite sui grappoli del vigneto di Castelplanio nel rilievo effettuato in data 05/07/21. I valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ( $P \leq 0,05$ ).

### 8.3.3. Monitoraggio sul vigneto di Angeli di Varano

Il sopralluogo effettuato nel vigneto di Angeli di Varano in data 06/07/2021 a seguito di un intenso evento temporalesco a cavallo tra giugno e luglio per la valutazione delle malattie non ha evidenziato evidenti sintomi di oidio sulla vegetazione o sui grappoli, ma piuttosto la presenza sporadica di macchie d'olio dovute a peronospora sulle foglie con evidente sporulazione sulla pagina inferiore come visibile dai campioni prelevati in Figura 29 e dalle osservazioni al microscopio ottico in Figura 30. Il livello d'infezione peronosporica però non è stato abbastanza rilevante da giustificare un rilievo sull'intero vigneto. Anche in questo caso come per Matelica e Castelplanio le motivazioni risiedono nelle condizioni meteorologiche sfavorevoli per lo sviluppo di queste patologie fungine. Tuttavia, rispetto agli altri due vigneti questo è risultato l'unico dove sono state trovate delle foglie con sintomi specifici di peronospora e relativa sporulazione di *P. viticola* sulla pagina inferiore.



**Figura 30** - Sintomi a “macchia d’olio” di peronospora sulla pagina superiore di una foglia del vigneto di Angeli di Varano prelevata dal testimone non trattato durante il monitoraggio effettuato in data 06/07/21 (a sinistra); segni di sporulazione del patogeno su pagina inferiore di un’altra foglia della stessa pianta (a destra).



**Figura 30** – Dettaglio al microscopio ottico degli sporangi di *Plasmopara viticola* rinvenuti sui campioni di foglie prelevati durante il monitoraggio ad Angeli di Varano. Barra della scala = 20  $\mu\text{m}$ .

## 9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La valutazione dell'efficacia del chitosano per il controllo della peronospora della vite e della sua adattabilità a contesti aziendali sono oggetto di questa tesi, ma anche al centro dell'interesse di tutto il comparto vitivinicolo che si trova a fronteggiare un problema come quello della sostituzione del rame per evitare le conseguenze negative che questo metallo pesante può avere nei confronti dell'ambiente, della salute umana e della qualità del vino.

Precedenti sperimentazioni hanno dimostrato una discreta efficacia del chitosano nel contenimento della peronospora della vite (Aziz, 2006; La Torre, 2010; Dagostin, 2011; Romanazzi *et al.*, 2016, 2021), oltre alla capacità di controllare anche numerose patologie fungine pre e post-raccolta su prodotti ortofrutticoli (Romanazzi, 2010; Rajestary *et al.*, 2021), come ad esempio quelle causate da *Botrytis cinerea* sull'uva da tavola, stimolando le difese della pianta (Romanazzi, 2002, 2012; Trotel-Aziz, 2006; Meng *et al.*, 2008). La sua azione di contenimento della malattia potrebbe essere dovuta, oltre che alla attività antimicrobica, anche alla sua capacità di induzione di resistenza (ISR) nella pianta ospite, nonché alla sua comprovata attività antitrasspirante, dovuta alla creazione di un sottile film sulle superfici vegetali trattate (Romanazzi *et al.*, 2018). È stato dimostrato che i meccanismi della resistenza indotta (ISR) contro la peronospora della vite comprendono la chiusura stomatica, l'espressione dei geni di difesa (Hamiduzzaman *et al.*, 2005) con un incremento del livello di trascrizione degli enzimi chiave della via dei fenilpropanoidi fra i quali fenilalanina ammonio liasi (PAL) e calcione sintasi (CHS) (Nandeeshkumar, 2008), un'aumentata attività enzimatica (Godard *et al.*, 2009), come accade per le perossidasi, la cui attività è correlata alla lignificazione, suberizzazione, guarigione delle ferite, meccanismi di difesa contro i patogeni (Hiraga, 2001) e depositi di callosio (Hamiduzzaman, 2005). Trattamenti con chitosano allo 0,8% hanno mostrato inoltre un contenimento della vegetazione (Romanazzi *et al.*, 2016), inducendo una riduzione del bilancio fotosintetico netto, della conduttanza stomatica, della superficie fogliare e del peso delle foglie e dei tralci potati. Questa particolarità potrebbe rappresentare una caratteristica favorevole per una viticoltura moderna, sempre alla ricerca di tecniche per gestire al meglio gli eccessi di vigore, che porterebbero ad uno squilibrio tra la crescita vegetativa e riproduttiva, prospettando una produzione inferiore e di peggiore qualità.

Recenti sperimentazioni di campo condotte su vigneti simili a quelli oggetto di studio hanno dimostrato come il chitosano sia efficace nel controllare la peronospora della vite e non condizioni negativamente la qualità dei vini (Romanazzi *et al.*, 2016, 2021; Piancatelli, 2018) a differenza del rame, che invece ha un'influenza negativa sulla qualità del vino

(Garde-Cerdan *et al.*, 2017). Inoltre, sempre di recente, sono stati avviati degli studi sul livello di compatibilità fra diversi formulati a base di chitosano ed agrofarmaci ammessi in agricoltura biologica che stanno evidenziando, in maniera non dissimile da quanto visto in questo lavoro, come la natura chimica delle sostanze attive possa influenzare l'affinità con il biopolimero (Romanazzi *et al.*, 2020). I dati relativi alla compatibilità fra sostanze di base (chitosano, nel caso specifico) e agrofarmaci impiegati dalle aziende per la protezione delle colture rappresentano una novità per il settore; questo tipo di valutazioni apre la strada a nuove possibilità per questa molecola unica nel panorama fitopatologico e a nuove strategie di protezione sostenibili a livello economico ed ambientale, che prevedano, almeno in una prima fase, l'integrazione delle pratiche tradizionali con le strategie di protezione innovative proposte dal mondo della ricerca. I risultati ottenuti da queste prove rappresentano una buona base di partenza per comprendere in maniera più approfondita le interazioni chimiche che entrano in gioco e che possono determinare reazioni di compatibilità o meno fra le sostanze, anche in funzione del sistema di miscelazione. Inoltre, formulazioni diverse, basate sulle stesse sostanze attive saggiate, potrebbero dare risultati diversi.

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti da questo lavoro di ricerca circa la capacità dei vari trattamenti di contenere la malattia, è doveroso precisare che l'aspetto ambientale ha garantito un controllo naturale del patogeno grazie alle condizioni meteorologiche stagionali sfavorevoli al suo sviluppo. Per questa ragione, almeno in una fase iniziale dell'attività di tesi l'attenzione è stata spostata sull'oidio, altra temibile malattia fungina della vite, che invece ha trovato in questa stagione condizioni più favorevoli al suo sviluppo, con l'obiettivo di valutare eventuali effetti di contenimento a seguito dei trattamenti con chitosano ipotizzati nell'ambito del progetto Vitinnova. I risultati ottenuti in questo senso da un rilievo condotto sui grappoli nel vigneto di Castelplanio, sono piuttosto incoraggianti. In linea generale, la stagione è stata caratterizzata da una grave scarsità di precipitazioni più o meno in tutta la regione, ma in particolar modo nell'entroterra e quindi nel vigneto di Matelica in maniera più marcata rispetto agli altri. Tuttavia, nel periodo a cavallo fra fine giugno ed inizio luglio sono stati registrati degli sporadici eventi temporaleschi, soprattutto nelle aree costiere, che hanno facilitato la diffusione delle infezioni oidiche e innescato le prime infezioni peronosporiche nei vigneti di Angeli di Varano e Castelplanio. Grazie a dei monitoraggi condotti nei tre vigneti sperimentali a seguito di queste precipitazioni, è stato possibile accertare le date di comparsa dei primi sintomi di peronospora sul testimone non trattato e condurre un rilievo circa il livello di infezione oidica a carico dei grappoli nel vigneto di Castelplanio. Nonostante la difesa antioidica sia stata mantenuta su tutte le tesi,



la presenza di oidio sui grappoli ha permesso di evidenziare differenze significative fra le varie tesi, con il chitosano che ha mostrato una buona efficacia anche nel contenimento dell'oidio e potrebbe integrare lo zolfo nei protocolli aziendali. Tali risultati erano già stati osservati in precedenti sperimentazioni su Verdicchio (Romanazzi et al., 2021) e sono ascrivibili all'attività antimicrobica, filmogenica ed elicitante del polimero anche su vite, riflettendo quanto osservato in postraccolta (Romanazzi et al., 2018). La stimolazione delle difese dell'ospite, la presenza di un biofilm e il miglioramento del microclima intorno ai grappoli, unite ad una certa attività antimicrobica, potrebbero essere d'aiuto nel contrastare le infezioni oidiche. La malattia è stata ridotta in maniera significativamente maggiore nella tesi dove il chitosano è stato distribuito combinato al rame, che con la sua attività fitotossica, irrobustendo la cuticola delle bacche, contribuisce in maniera indiretta al contenimento dell'oidio. Ciò suggerisce che i due composti possano aver agito in maniera sinergica. In altre indagini, un'altra formulazione di chitosano aveva dato buoni risultati nei confronti dell'oidio della vite, riducendo la gravità della malattia (Iriti *et al.*, 2011). Questi aspetti verranno approfonditi nei successivi mesi con il progredire della stagione e della malattia, conducendo dei rilievi anche su foglie ed anche negli altri vigneti. Inoltre, data la comparsa dei primi sintomi di peronospora nei vigneti di Angeli di Varano e Castelplanio sul testimone non trattato, sarà interessante valutare la capacità dei vari trattamenti di contenere le infezioni con i rilievi su foglie e grappoli previsti per fine luglio e settembre in un'annata caratterizzata da bassa pressione della malattia, per verificare se è possibile fare a meno del rame in annate simili a questa.

Ad ogni modo, la sperimentazione ha permesso di evidenziare le criticità che emergono nel momento in cui si passa da una sperimentazione parcellare ad una su scala commerciale, mettendo in luce le problematiche relative alla compatibilità fra prodotti, al costo delle molecole innovative ed al fatto che le innovazioni in genere non rappresentano una mera sostituzione delle pratiche tradizionali, ma spesso vanno riviste intere strategie di produzione. A questo proposito, le attuali formulazioni di chitosano (e quindi la necessità di omogeneizzarlo o scioglierlo preventivamente) e la sua incompatibilità con alcuni agrofarmaci ampiamente diffusi, ad oggi rappresentano i due principali fattori critici di ostacolo alla sua diffusione; perciò, è auspicabile che nel prossimo futuro le aziende produttrici investano per rendere il chitosano di più facile utilizzazione per le aziende, le quali trovano nel rame un mezzo tecnico sicuro, affidabile, facile da utilizzare e che presenta un basso costo.

Questi risultati, uniti a quelli precedentemente ottenuti sia in termini di efficacia che di compatibilità con altri agrofarmaci, dimostrano comunque la validità del chitosano nella protezione delle piante dalle malattie e lo rendono uno dei principali candidati ad affiancare o a sostituire il rame nel prossimo futuro. I dati ottenuti durante queste attività dovranno sicuramente essere ampliati con prove in annate più critiche da un punto di vista della gestione della peronospora, ma rappresentano sicuramente un buon riferimento circa l'efficacia del biopolimero, che potrà entrare sempre più a far parte delle strategie di protezione dalla peronospora della vite come prodotto complementare o addirittura sostitutivo del rame. La possibilità di sostituire o limitare fortemente gli apporti di rame in vigneto, andando verso l'applicazione di prodotti ad impatto ambientale e salutistico nullo si fa quindi sempre più reale.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Alfonzo, A., Piccolo, S. L., Conigliaro, G., Ventorino, V., Burruano, S., Moschetti, G. (2012). Antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens. *Annals of Microbiology*, 4, 1593-1599.
- Ali, A, Tengku, M, Muhammad, M, Sijam, K, Siddiqui, Y. (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica Papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry*, 124, 620-26.
- Amborabé, B.E., Bonmort, J., Pierrette F.L., Roblin, G. (2008). Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 9, 2317-2324.
- Angeli, D., & Pertot, I. (2007). L'oidio della vite. Istituto agrario di San Michele all'Adige, 12-30.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X. Adrian, M., Bezier, A., Lambert, B., Joubert, J. M., Pugin (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 1118-1128.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., Vernet, G. (2006). Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*, 96, 1188–1194.
- Belli, G., Bianco, P. A. (2007). Elementi di patologia vegetale. Piccin.
- Borgo, M., Zanzotto, A., Bellotto, D. (2004) Use of different fungicides in control strategies against grapevine downy mildew in the province of Treviso [*Vitis vinifera* L.; Veneto]. *Atti delle Giornate Fitopatologiche (Italy)*.
- Boso, S., Santiago, J.L., Martínez M.C. (2005). A method to evaluate downy mildew resistance in grapevine. *Agronomy and Sustainable Development*, 25, 163-165.
- Burruano, S. (2000). The life cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist*, 14, 179-182.
- Caffi, T., Rossi, V., Bugiani, R. (2010). Evaluation of a warning system for controlling primary infections of grapevine downy mildew. *Plant Disease*, 94, 709–716.
- Caffi T., Rossi V., Bugiani, R., Spanna F., Flamini L., Cossu A., Nigro C. (2006). Validation of a simulation model for *Plasmopara viticola* primary infections in different vine-growing areas across Italy. *Proceeding of the 5th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew*. Pertot I., Gessler C., Gadoury D., Gubler W., Kasemeyer H.H., Magarey P. Eds. San Michele all'Adige, Italy, 18-23 June: 112-114.

- Calonnec, A., Cartolaro, P., Poupot, C., Dubordieu, D., Darriet, P. (2004). Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grape (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant Pathology*, 53, 434-445.
- Dagostin, S., Scharer, H. J., Pertot, I., Tamm, L. (2011). Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection*, 30, 776–788.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., and Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-14.
- Duca, D., Toscano, G., Pizzi, A., Rossini, G., Fabrizi, S., Lucesoli, G., Servili A., Mancini V., Romanazzi G., Mengarelli, C. (2016). Evaluation of the characteristics of vineyard pruning residues for energy applications: effect of different copper-based treatments. *Journal of Agricultural Engineering*, 1, 22-27.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8, 968-987.
- Gadoury, D.M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W.F., Dry, I.B., Seem, R.C., Milgroom, M.G. (2011). Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology*, 13, 1-16
- Gadoury, D.M., Pearson, R.C. (1990). Germination of ascospores and infection of *Vitis* by *Uncinula necator*. *Phytopathology*, 80, 1198-1203.
- Garde-Cerdán, T., Mancini, V., Carrasco-Quiroz, M., Servili, A., Gutiérrez-Gamboa, G., Foglia, R., Pérez-Álvarez, E.P., Romanazzi, G. (2017). Chitosan and laminarin as alternatives to copper for *Plasmopara viticola* control: Effects on grape amino acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 75, 7379-7386
- Gessler, C., Pertot, I., Perazzolli, M. (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 1, 3-44.
- Gobbin, D. (2004). Redefining *Plasmopara viticola* epidemiological cycle by molecular genetics.
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O., Gindro, K. (2009). Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin-and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 827-837.
- Hamiduzzaman, M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J., Mauch-Mani, B. (2005). Beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the

potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 18, 819-829.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42, 462-468.

Hu, Z. Y., Balay, D., Hu, Y., McMullen, L. M., Gänzle, M. G. (2019). Effect of chitosan, and bacteriocin–Producing *Carnobacterium maltaromaticum* on survival of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* on beef. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 68-75.

Iriti, M., Vitalini, S., Di Tommaso, G., D'amico, S., Borgo, M., Faoro, F. (2011). New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 263-269.

Jackson, R. S. (2008). *Wine science: principles and applications*. Academic press, 108-238.

Juang K. W., Lee Y. I., Lai H. Y., Wang C. H., Chen B. C., (2012). Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 1315-1322.

Jürges, G., Kassemeyer, H. H., Dürrenberger, M., Düggelin, M., Nick, P. (2009). The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biology*, 6, 886-898.

Kaya, M., Cesonien, L., Daubaras, R., Leskauskaitė, D., Zabulionė, D. (2016). Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia Melanandra*) for extending of the shelf life. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 355-60.

Kiefer, B., Riemann, M., Büche, C., Kassemeyer, H.H., Nick, P. (2002). The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*, 215, 387-393.

Krishna, K.R., Rao, D.V.S. (2014). Effect of chitosan coating on the physiochemical characteristics of guava (*Psidium Guajava* L.) fruits during storage at room temperature. *Indian Journal of Science and Technology*, 7, 554-58.

La Torre, A., Talocci, S., Miele, M. (2010). Evaluation of anti-downy mildew effectiveness and economic sustainability of substances of natural origin. *Petria*, 20, 46-48.

Maia, A. J., Leite, C.D., Botelho, R.V., Faria, C. M. D. R., Machado, D. (2012). Chitosan as an option to control mildew in the sustainable vinegrowing. *Semina Ciências Agrarias Londrina*, 33, 2519-2530.

- Lachhab, N., Sanzani, S. M., Adrian, M., Chiltz, A., Balacey, S., Boselli, M., Ippolito A., Poinssot, B. (2014). Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science*, 5, 716.
- Martelli R. (1984). Meccanismo d'azione degli antiparassitari a base di rame. *VigneVini*, 11, 51-53.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 2, 501-508.
- Mescalchin, E., Pertot, I. (2003). La riduzione del rame in viticoltura biologica, in *Bioagricoltura. Safe Crop*, 81, 27-29.
- Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K. K., Prakash, H. S., Niranjana, S. R., Shekar, S. H. (2008). Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 188–194.
- Paoletti, M. G., Sommaggio, D., Favretto, M. R., Petruzzelli, G., Pezzarossa, B., Barbafieri, M. (1998). Earthworms as useful bioindicators of agroecosystem sustainability in orchards and vineyards with different inputs. *Applied Soil Ecology*, 10, 137-150.
- Paolocci, M. (2012). Valutazione del diverso grado di tolleranza di varietà di *Vitis vinifera* tradizionalmente coltivate in Italia Centrale a *Plasmopara viticola* ed *Erysiphe necator*, 9.
- Péros, J.P., Nguyen, T.H., Troulet, C., Michel-Romiti, C., Notteghem, J.L. (2006). Assessment of powdery mildew resistance of grape and *Erysiphe necator* pathogenicity using a laboratory assay. *Vitis* 45, 29-36.
- Pertot, I., Gobbin, D., Dagostin, S., Ferrari, A., Gessler, C. (2007). La peronospora della vite. *Safe Crop* 64.
- Petriccione, M, Sanctis, F De, Pasquariello, MS, Mastrobuoni, F, Rega, P, Scortichini, M, and Mencarelli, F. (2015). The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. *Food Bioprocess Technology*, 8, 394-408.
- Piancatelli, S. (2018). Formulati alternativi al rame per il controllo della peronospora della vite in agricoltura biologica. Tesi di laurea, Università Politecnica delle Marche.
- Pontiroli, R., Rizzotti, R., Zerbotta, F. (2001). Prove di difesa antiperonosporica in viticoltura biologica. *Informatore Fitopatologico*, 51, 62-66.
- Rajestary, R., Landi, L., Romanazzi, G. (2021). Chitosan and postharvest decay of fresh fruit: Meta-analysis of disease control and antimicrobial and eliciting activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 563-582.

- Romanazzi, G., Nigro, E., Ippolito, A., Di Venere, D., Salerno, M. (2002). Effects of pre- and post-harvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grape. *Journal of Food Science*, 67, 1862-1867.
- Romanazzi, G., Santini, M., Murolo, S., Masciulli, A., D'Ercole, G., and Patrizio, F. (2010). Evaluation of the effectiveness of copper formulations used at reduced rates and of alternative compounds in the control of *Plasmopara Viticola*. *Petria*, 20, 9-12.
- Romanazzi, G., Murolo, S., Mancini, V., Feliziani, E. (2012). Valutazione dell'efficacia contro la peronospora della vite di molecole classiche e innovative. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 451-458.
- Romanazzi, G., Mancini, V., Feliziani, E., Servili, A., Nardi, S., Flamini, L. (2014). Effectiveness of alternative compounds in the control of grapevine downy mildew. *Atti GDPM2014, Vitoria-Gasteiz (Spain)*, 30 giugno – 4 luglio, 111-112.
- Romanazzi, G., Mancini, V., Feliziani, E., Servili, A., Endeshaw, S., Neri, D. (2016). Impact of alternative fungicides on grape downy mildew control and vine growth and development. *Plant Disease*, 100, 739–748.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Sivakumar, D. (2018). Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2745.
- Romanazzi, G., Piancatelli, S., Mancini, V., Coppa, D. (2020). Miscibilità di formulati a base di chitosano con agrofarmaci utilizzati in viticoltura biologica. *ATTI Giornate Fitopatologiche*, 2, 167-172.
- Romanazzi G., Mancini V., Foglia R., Marcolini D., Kavari M., Piancatelli S. (2021). Use of chitosan and other natural compounds alone or in different strategies with copper hydroxide for control of grapevine downy mildew. *Plant Disease* 105 (in press, Published Online 18 Nov 2020, doi 10.1094/PDIS-06-20-1268-RE).
- Rossi, V., Bugiani, R., Caffi, T., Giosuè, S. (2006). Dynamic simulation of grape downy mildew on grapevine. *Proceeding of the 5th International Workshop on Grapevine Downy and Powdery Mildew*. Pertot I., Gessler, C., Gadoury, D., Gubler, W., Kasemeyer, H.H., Magarey, P. Eds. San Michele all'Adige, Italy, 18-23 June, 109-111.
- Rossi, V., Caffi, T., Leger, S.E. (2010). Dynamics of ascospore maturation and discharge in *Erysiphe necator*, the causal agent of powdery mildew. *Phytopathology*, 100, 1321-1329.
- Rossi V., Caffi, T., Giosuè, S., Girometta, B., Bugiani, R., Spanna, F., Dellavalle, D., Brunelli, A., Collina, M. (2005). Elaboration and validation of a dynamic model for primary infections of *Plasmopara viticola*. *Rivista Italiana di Agrometeorologia*, 10(3), 7-13.

- Rossi, V., Caffi, T., Giosuè, S., Bugiani, R. (2008). A mechanist model simulating primary infections of downy mildew in grapevine. *Ecological Modelling*, 212, 480-491.
- Rügner, A., Rumbolz, J., Huber, B., Bleyer, G., Gisi, U., Kassemeyer, H.H., Guggenheim R. (2001). Formation of overwintering structures of *Uncinula necator* and colonization of grapevine under field conditions. *Plant Pathology*, 51, 322-330
- Rumbolz, J., Wirtz, S., Kassemeyer, H. H., Guggenheim, R., Schäfer E., Büche, C. (2002). Sporulation of *Plasmopara viticola*: differentiation and light regulation. *Plant Biology*, 03, 413-422.
- Rusjan, D., Strlic, M., Pucko, D., Korosec-Koruza, Z. (2007). Copper accumulation regarding the soil characteristics in sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. *Geoderma*, 141, 111–118.
- Samma, F., Quirico, A. C., Roggero, G., Bellagarda S., Deboli R., Merlone, A. (2015). Valutazione del modello previsionale EPI con inclusione dell'incertezza di misura e riferibilità nella taratura. *Notiziario ERSA*, 1-2.
- Sancassani, G.P., Buccini, M., Fremiot, P., Rho, G., Toffolatti, S.L, Vercesi, A. (2006). Prove di efficacia antiperonosporica di prodotti a basso dosaggio di rame su vite. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 167-172.
- Thuerig, B., Slaughter, A., Marouf, E., Held, M., Mauch-Mani, B. and Tamm, L. (2011). Sitespecific field resistance of grapevine to *Plasmopara viticola* correlates to altered gene expression and was not modulated by the application of organic amendments. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 255–265.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 405–413.
- Trouvelot, S., Varnier, A. L., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.-M., Pugin, A., Daire, X. (2008). A  $\beta$ -1, 3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 232-243.
- Varasteh, F, Arzani, K, Barzegar, M, Zamani, Z. 2012. Changes in anthocyanins in arils of chitosan-coated pomegranate (*Punica Granatum* L. Cv. Rabbab-e-Neyriz) fruit during cold storage. *Food Chemistry* 130: 267-272.



Wightwick, A. M., Mollah, M. R., Partington, D. L., Allinson, G. (2008). Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7, 2457-2464.

## 11. RINGRAZIAMENTI

Con questo biennio di studio e ricerca porto a termine una pagina importante della mia vita. Ho il piacere di ricordare le persone che hanno contribuito a rendere pieno e interessante il tragitto che mi ha portato fin qui. Il primo pensiero va a tutti coloro che mi hanno affiancato durante l'intero percorso accademico, l'Università Politecnica delle Marche nella sua interezza, i professori e tutti i compagni di corso.

Un ringraziamento doveroso va al Professor Gianfranco Romanazzi relatore di questa tesi, al quale vorrei esprimere la mia gratitudine per avermi dato la possibilità di intraprendere questo lavoro di tesi, per le competenze e la passione che mi ha trasmesso, la grande disponibilità e cortesia.

Ringrazio la Dott.ssa Marwa Moumni e il Dott. Simone Piancatelli (angelo custode e compagno di lunghe trasferte) per l'indispensabile supporto durante tutta l'attività di tesi e per essere stati un esempio attraverso la grande passione che entrambi mettono nel loro lavoro.

Nulla sarebbe stato possibile senza il sostegno della mia famiglia. Questo traguardo lo dedico a mamma e papà, per avermi supportato in ogni momento, per aver creduto in me più di quanto io ne fossi capace, per gli abbracci, le lunghe discussioni e i tanti insegnamenti.

Ai nonni, per il loro amore incondizionato da vicino e da poco più su.

Grazie allo zio Claudio, per aver fatto crescere in me la passione per il mondo agricolo come solo un vero mentore sa fare. Il suo motto: "la zootecnia è la materia più bella che ci sia" non potrà mai smettere di risuonare tra i miei ricordi più cari.

Ringrazio poi tutte le coinquiline di questi anni per essere stata la mia seconda famiglia. In particolare, Lucrezia e Cristina per le risate e le serate fatte di tanto trash, per le intrusioni improvvisate e l'ukulele che ne faceva da protagonista.

Grazie ad ognuno degli amici con cui ho condiviso un pezzo di strada in questi anni.

A Ilaria, la mia sostenitrice più grande e compagna di vita.

Alle Sorelle girovaghe dal legame di sangue indissolubile.

A Claudia e Marina e ai ricordi dell'ITA Garibaldi.

A Natascia, l'abruzzese del mio corazon. A Chiara, Cammy e tutti i miei amici più cari.

Per finire l'ultimo ringraziamento va ad Alessandro che con il suo amore ha saputo rassicurarmi e sorreggermi ad ogni caduta, per la pazienza e la fiducia.

Grazie.