



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

**Applicazioni del chitosano come
antiperonosporico sulla varietà
Montepulciano:
dal vigneto alla cantina**

*Chitosan application toward grapevine downy
mildew on Montepulciano cultivar:
from the field to the winery*

Relatore:
Prof. Gianfranco Romanazzi

Tesi di laurea di:
Riccardo Chiurchiù

Correlatori:

Prof. Roberto Potentini

Dott. Simone Piancatelli

Anno Accademico 2020-2021

INDICE

	Pag.
RIASSUNTO	
ABSTRACT	
1. INTRODUZIONE	6
1.1. LA CULTIVAR MONTEPULCIANO	6
1.2. LA PERONOSPORA DELLA VITE	8
1.2.1. Ciclo biologico di <i>Plasmopara viticola</i>	8
1.2.2. Infezioni primarie e secondarie	10
1.2.3. Danni e sintomatologia	11
1.2.3.1. <i>Sintomi su foglie</i>	12
1.2.3.2. <i>Sintomi su grappoli</i>	14
1.2.3.3. <i>Sintomi su altri organi verdi</i>	15
1.3. STRATEGIE DI PROTEZIONE DALLA PERONOSPORA	16
1.3.1. Modelli previsionali	17
1.3.2. La resistenza varietale	18
1.3.3. Mezzi di lotta agronomici	19
1.3.4. Mezzi di lotta chimici	20
1.4. IL RAME	21
1.4.1. Meccanismo d'azione dei prodotti a base di rame	22
1.4.2. Prodotti a base di rame	24

1.4.3.	Problematiche legate all'impiego di prodotti rameici in agricoltura	26
1.4.4.	Principali alterazioni dei vini dovute alla presenza di metalli pesanti	29
1.4.5.	Principali effetti del rame nel vino	30
1.5.	IL CHITOSANO	32
1.5.1.	Impiego del chitosano nella protezione delle piante	36
1.5.2.	Impiego del chitosano in enologia	39
1.5.3.	Azioni ed effetti dell'applicazione di chitosano nel vino	40
<i>1.5.3.1.</i>	<i>Azione chiarificante e stabilizzante</i>	40
<i>1.5.3.2.</i>	<i>Azione antisettica</i>	40
<i>1.5.3.3.</i>	<i>Azione antiossidante</i>	42
<i>1.5.3.4.</i>	<i>Azione chelante</i>	43
<i>1.5.3.5.</i>	<i>Azione sugli enzimi</i>	45
2.	OBIETTIVI DELLA RICERCA	46
3.	MATERIALI E METODI	48
3.1.	VIGNETO SPERIMENTALE	48
3.2.	STRATEGIE DI PROTEZIONE ANTIPERONOSPORICA SAGGIATE	49
3.3.	ANDAMENTO METEOROLOGICO STAGIONALE	51
3.4.	VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI	52
3.5.	RACCOLTA DELLE UVE E DELLE FOGLIE	55
3.6.	ANALISI DEI PARAMETRI QUALITATIVI DELLE UVE E LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DA RAME DELLE UVE E DELLE FOGLIE	55
3.7.	MICROVINIFICAZIONI	56

3.7.1.	Protocollo di vinificazione adottato	57
4.	RISULTATI	60
4.1.	ANDAMENTO METEOROLOGICO STAGIONALE	60
4.2.	VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SU FOGLIE	62
4.3.	VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SU GRAPPOLI	65
4.4.	ANALISI DEI PARAMETRI QUALITATIVI DELLE UVE E LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DA RAME DELLE UVE E DELLE FOGLIE	68
4.5.	ANALISI DEI PARAMETRI QUALITATIVI DI MOSTI E VINI PRODOTTI	72
5.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	78
6.	BIBLIOGRAFIA	84
7.	RINGRAZIAMENTI	92

RIASSUNTO

Le limitazioni poste all'uso dei prodotti cuprici in agricoltura (Reg. UE 1981/2018), visti gli effetti negativi del rame sull'ambiente e sulla salute umana, hanno stimolato la ricerca di soluzioni alternative per la protezione antiperonosporica dei vigneti. Questa tesi, realizzata nell'ambito del progetto *PSR Marche "Vitinnova"*, ha avuto un duplice obiettivo: (i) valutare l'efficacia, nei confronti delle infezioni di peronospora su Montepulciano, di strategie di protezione innovative basate sull'impiego di chitosano a livello aziendale, utilizzandolo da solo o in associazione al rame (trattamenti alternati o combinati); (ii) verificare l'influenza delle strategie di protezione saggiate nei confronti dei parametri qualitativi di uve, mosti e vini prodotti, nonché il livello di contaminazione da rame. Le prove di campo sono state svolte in un vigneto gestito da "Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr." ed ubicato ad Angeli di Varano (AN), zona di produzione del Rosso Conero; l'efficacia dei trattamenti è stata confrontata sia con un testimone aziendale che con un testimone non trattato. Le analisi dei parametri qualitativi invece sono state condotte mediante la strumentazione *Foss WineScann* e *HyperLab Smart*. Nel complesso, l'annata non è stata favorevole alla malattia, tuttavia si sono evidenziate delle differenze statisticamente significative fra le varie strategie circa l'intensità media ponderata delle infezioni fogliari: il chitosano associato a basse quantità di rame ha garantito dei livelli di protezione paragonabili a quelli del testimone aziendale. I trattamenti con rame e chitosano alternati o combinati, oltre a garantire ottimi livelli di protezione, hanno anche permesso di ridurre significativamente la quantità di rame residuale sulle bacche all'arrivo in cantina: rispetto al testimone aziendale sono state registrate le riduzioni del 66%, 67%, 54% e 33% rispettivamente, nel testimone non trattato, nel chitosano da solo, nei trattamenti alternati ed infine nei trattamenti combinati. Le uve trattate in maniera alternata hanno mostrato dei valori statisticamente non diversi da quelle dove il rame non è stato somministrato affatto. Infine, non sono emerse delle differenze statisticamente significative importanti per quanto riguarda i parametri considerati nei rilievi condotti sui mosti e sui vini prodotti con le uve delle parcelle. Questi risultati suggeriscono che il chitosano, al contrario del rame, non influenzi negativamente la qualità del vino, confermando anche su scala commerciale la sua validità come sostanza alternativa al rame nella protezione antiperonosporica.

ABSTRACT

Limitations placed on the use of copper compounds in agriculture according to the EU Regulation 1981/2018, due to copper negative effects on the environment and on the human health, have promoted the search for alternative solutions to protect vines from grapevine downy mildew (GDM). This work, developed within the PSR Marche project "Vitinnova", followed a double objective: (i) evaluate the effectiveness of innovative protection strategies against GDM infections, based on the use of chitosan on a commercial scale, applying the biopolymer alone or in association with low quantity of copper (alternating or combined treatments); (ii) verify the influence of these innovative GDM management strategies, on qualitative parameters of grapes, musts and wines produced; furthermore, also the level of copper contamination was investigated. Field trials were carried out in a vineyard established with the cv. Montepulciano, managed by "*Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr.*", and located in Angeli di Varano (AN), inside the production area of Rosso Conero; effectiveness of chitosan-based treatments was compared with both conventional farm application of copper and an untreated control. Analysis of qualitative parameters were carried out using Foss WineScann and HyperLab Smart instruments. Overall, the season was not favorable to the disease; nevertheless, statistically significant differences were highlighted between strategies regarding the McKinney Index of leaves infections: chitosan associated with copper ensured GDM protection levels similar to those obtained with conventional farm application of copper. Alternating or combined treatments, in addition to providing a good protection, also showed significant reductions in the residual amount of copper on the berries: the following significant reductions were recorded compared to the farm application: 66%, 67%, 54% and 33%, respectively, in the untreated control, in chitosan alone, in alternating treatments and finally in combined treatments; it should be highlighted that grapes treated alternately showed values not statistically different from those where copper was not applied at all. Finally, no significant differences were observed as regards the main qualitative parameters considered during the assessments conducted on musts and on wines produced with grapes from the experimental plots. These results suggest that chitosan does not negatively affect the quality of wine, confirming the biopolymer as a good alternative to copper for GDM management, even on a commercial scale.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA CULTIVAR MONTEPULCIANO

Il Montepulciano è uno dei vitigni a bacca nera più importanti del centro Italia, tanto da ricoprire la superficie vitata nazionale per circa 34800 ha. Iscritto al Registro Nazionale delle Varietà di Vite nel 1970, è una cultivar dalle origini non del tutto definite, che si è diffusa ancor prima degli Antichi Romani ed alcuni studiosi ritengono abbia radici greco/balcaniche per via delle sue caratteristiche morfologiche e del suo vigore. In passato è stato spesso confuso con il Sangiovese, probabilmente a causa del riferimento al comune toscano di Montepulciano. Questo vitigno trova le condizioni migliori alla coltivazione in Abruzzo, Marche, Molise, Puglia e, seppur in minor quantità, anche in Umbria e Lazio. Nelle Marche, in particolare, esso rappresenta la base per la produzione di 4 vini a denominazione di origine: “Offida Rosso” (85% minimo di uve Montepulciano, secondo il disciplinare di produzione), “Rosso Piceno Superiore” (dal 35 all’85%), “Rosso Conero” e “Rosso Conero Riserva” (85% minimo per entrambi).

La descrizione ampelografica della vite è molto importante per il riconoscimento varietale. La foglia adulta di Montepulciano è caratterizzata da una grandezza media, è di forma pentagonale, pentalobata, con seno peziolare semi-chiuso o chiuso, mediamente profondo; i seni laterali superiori si presentano chiusi e anche a margini sovrapposti molto profondi. La pagina superiore è di color verde carico, mentre quella inferiore è di colore verde-grigiastro, lanuginosa. Il picciolo è glabro, di media lunghezza e grandezza, rotondeggiante o leggermente schiacciato, verde con lievi sfumature violacee. Il grappolo è di medie dimensioni, serrato o semi-serrato, conico o cilindro-conico, spesso alato; il peduncolo è corto, grosso e semilegnoso. L’acino si presenta di media grandezza, ovale o sub-ovale, a sezione trasversale regolare e circolare; la buccia risulta pruinosa e consistente; i vinaccioli, di media grandezza, sono presenti in numero variabile, da 1 a 3.

La velocità di accrescimento del Montepulciano è media e sembra adattarsi meglio a sistemi di allevamento a scarsa o media espansione, in quanto è una varietà con germogli a sviluppo prevalentemente procombente, cioè che tendono verso il basso. Tradizionalmente nella regione Abruzzo veniva e viene ancora oggi allevato a tendone per ottenere elevate performance produttive. Nelle Marche viene allevato soprattutto

con sistemi in parete e si adatta bene alla potatura corta. È una cultivar dalla produzione media-abbondante e abbastanza costante negli anni. Riguardo alle esigenze, questa cultivar predilige terreni collinari ben esposti, altrimenti vi è il rischio che l'uva non riesca a raggiungere la giusta maturazione in tempi regolari. Sono in corso lavori per individuare e selezionare geneticamente nuovi cloni con caratteristiche migliorate sia sotto il profilo sanitario che della precocità in termini di anticipo della maturazione. Per quanto riguarda la suscettibilità alle avversità, il vitigno presenta una buona resistenza alle gelate primaverili, ma risulta invece suscettibile alle infezioni di peronospora e oidio, soprattutto sulle foglie. I grappoli (Figura 1) mostrano in genere un livello di resistenza superiore alle malattie, in particolare al marciume acido. Il vino che si ottiene dal Montepulciano è di color rosso rubino, al palato si presenta vinoso, fruttato, tannico e di corpo.

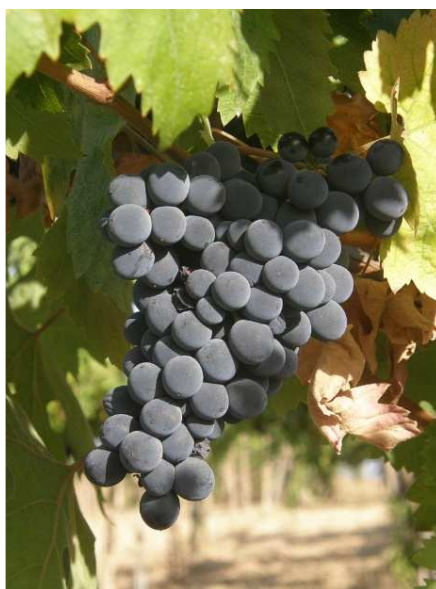


Figura 1 - Grappolo sano di Montepulciano giunto a maturazione.

1.2. LA PERONOSPORA DELLA VITE

Vitis vinifera (Linneus, 1753) può essere infettata da *Plasmopara viticola*, agente causale della peronospora della vite, una delle patologie più temute dai viticoltori. Questo parassita è attualmente classificato, a seguito di revisioni tassonomiche, nella classe degli *Oomycetes* (regno *Chromista*, famiglia *Peronosporaceae*), ed è stato segnalato per la prima volta in Europa nel 1878, in alcuni vivai francesi della zona di Bordeaux; la malattia si diffuse rapidamente anche in Italia, dove a partire dal 1879 prese piede su tutta la penisola causando gravissimi danni alla produzione.

1.2.1. Ciclo biologico di *Plasmopara viticola*

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. 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, generalmente grazie all'effetto battente della pioggia e al vento, rilascia in presenza di acqua libera da quattro a otto zoospore flagellate, 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 superficie. La massima sensibilità delle foglie alla peronospora è quando raggiungono un diametro di circa 3 cm, mentre con la maturazione tendono ad acquisire una resistenza ontogenetica e quindi 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 degli organi

vegetali, fino a raggiungere le aperture stomatiche grazie ad un'attrazione chemiotattica da parte degli stomi stessi (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. 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°C 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, iniziando a differenziare gli organi sessuali maschili e femminili (rispettivamente anteridio ed oogonio); a seguito dell'appaiamento tra un nucleo dell'anteridio e uno dell'oogonio, ha inizio la formazione dell'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. Il ciclo biologico del parassita è riassunto in Figura 2.

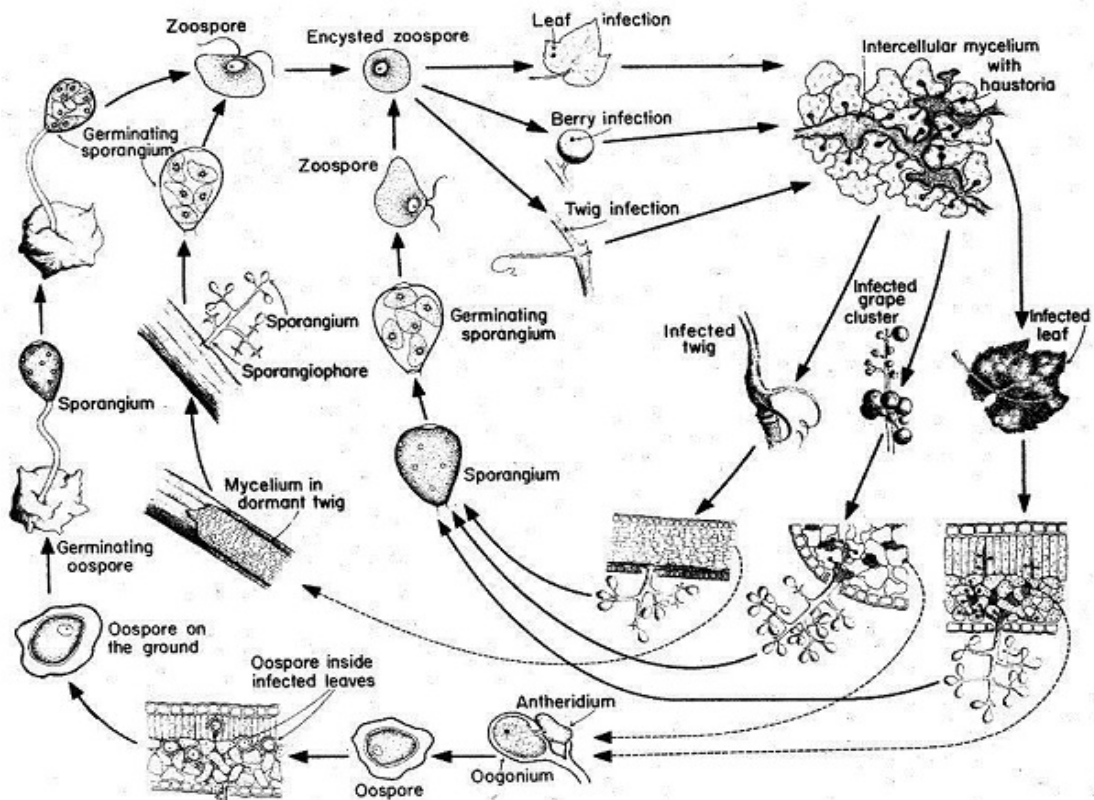


Figura 2 - Rappresentazione schematica del ciclo biologico di *P. viticola* (Jackson, 2008).

1.2.2. 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 ambientali che rendono possibile il verificarsi delle infezioni primarie sono riassunte nella cosiddetta regola empirica “dei tre dieci” messa a punto da Baldacci nel 1947: essa prevede che l’infezione dovuta all’inoculo proveniente dalle oospore svernanti avvenga quando la temperatura minima sia intorno ai 10° C, sia caduta una quantità di acqua di almeno 10 mm (preferibilmente in due eventi piovosi nel giro di 24 - 48 ore) e la lunghezza dei germogli sia di almeno 10 cm (lunghezza considerata sufficiente per avere foglie fotosinteticamente attive con stomi funzionanti). 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 bagnatura della vegetazione a seguito di eventi piovosi ripetuti. La germinazione delle oospore è scalare e non ristretta all’anno successivo della 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), le quali assumono più importanza. 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 metereologiche. Alla fine del periodo di incubazione, in condizioni favorevoli, può avvenire la formazione degli sporangi. Gli sporangi 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, generalmente in corrispondenza dei sintomi comparsi sulla pagina superiore; essi producono i microsporangi 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 potrebbe mancare la bagnatura della superficie vegetale. 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 sporangi e una drastica riduzione delle probabilità di infezione.

1.2.3. Danni e sintomatologia

P. viticola non è in grado di penetrare attivamente nei tessuti vegetali, ma sfrutta le aperture naturali dell'ospite, ad esempio penetrando attraverso le aperture stomatiche, riuscendo quindi a 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, nonché aromi

ed altri componenti minori delle bacche, pregiudicando la qualità del prodotto finale. 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 i 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. Generalmente, essendo un parassita obbligato, *P. viticola* non conduce in tempi brevi a morte le piante infette.

1.2.3.1. 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 3). 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 quanti-qualitativo 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 e temperature favorevoli, in corrispondenza delle macchie sulla pagina inferiore delle foglie, compaiono i rami conidiofori che formano un tipico feltro biancastro facilmente riconoscibile (Figura 3). 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 3 - Sintomi di peronospora su foglie adulte di Montepulciano, con le tipiche “macchie d’olio” sulla pagina superiore (foglia in alto), in corrispondenza delle quali compaiono dei segni di sporulazione del patogeno sulla pagina inferiore (foglia in basso).

1.2.3.2. Sintomi su grappoli

Gli attacchi di peronospora sui grappoli sono estremamente temibili dal punto di vista produttivo e si possono osservare diversi quadri sintomatologici (Jürges *et al.*, 2009) in relazione all'epoca d'infezione che può essere precoce, quindi a carico delle infiorescenze o più tardiva, a seguito dell'allegagione, a carico delle infruttescenze. Sulle infiorescenze, che sono ancora provviste di stomi funzionanti 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. 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.

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-grigiastra, emessa attraverso gli stomi e fessurazioni della buccia degli acini, è tipica delle infezioni più precoci. Le infezioni a carico dei grappoli prossimi all'invaiaatura, 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 perciò il nome di "peronospora larvata" e

conferisce agli acini il caratteristico colore bruno senza la presenza di micelio (Figura 4). La peronospora larvata si manifesta maggiormente nelle estati fresche e piovose, condizioni che consentono estesi attacchi tardivi (Pertot *et al.*, 2005). 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 4 - Grappolo di Montepulciano a maturazione quasi completata gravemente colpito da peronospora larvata, con più del 50% degli acini disseccati.

1.2.3.3. 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 oppure 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. 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.

1.3. STRATEGIE DI PROTEZIONE DALLA 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 (Pontiroli *et al.*, 2001). 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.

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.

1.3.1. Modelli previsionali

I modelli epidemiologici sono strumenti molto utili e 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.*, 2008). 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 metereologiche 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 metereologico risulta essere poco analitico, si preferisce l'uso del modello IPI.

1.3.2. La 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 innovativa che potrebbe consentire 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, è necessario adeguare la normativa vigente, che attualmente può essere d'ostacolo alla diffusione su larga scala di varietà ibride, ma soprattutto di piante ottenute con tecniche di ingegneria genetica; inoltre è importante approfondire la conoscenza del patrimonio viticolo, che è in grado sia di fornire materiale utile nei programmi di selezione genetica che di tornare utile nella scelta dei vitigni da utilizzare nella viticoltura di qualità, eventualmente anche nel regime di coltivazione in biologico.

1.3.3. Mezzi di lotta 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 nel caso 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 la gestione della chioma e l'arieggiamento della fascia vegetativa, soprattutto intorno ai grappoli. Gli accorgimenti tecnici si basano soprattutto sul mantenimento di una giusta carica di gemme durante la potatura invernale, ma anche nell'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'interfilare e dei residui di potatura. Va precisato però che, vista l'elevata suscettibilità di *V. vinifera* a *P. viticola* e la pericolosità della malattia, spesso le pratiche agronomiche, seppur corrette, hanno un'efficacia limitata nel contenere il patogeno.

1.3.4. Mezzi di lotta chimici

Ancora oggi il ricorso a prodotti fitosanitari dotati di attività antiperonosporica risulta essere necessario vista la parziale o totale inefficacia dei mezzi di protezione alternativi, i quali da soli non sono sufficienti al controllo della malattia. Gli interventi chimici nei confronti della peronospora della vite sono generalmente preventivi e mirano a contenere 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 poiché, una volta sfuggite, diventano di difficile gestione. 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: fungicidi di copertura, che rimangono all'esterno del vegetale e svolgono un'azione preventiva e fungicidi penetranti, che vengono assorbiti dal vegetale svolgendo un'azione curativa nei confronti delle infezioni in atto, i quali si dividono a loro volta

in: citotropici e translaminari, che si ridistribuiscono localmente all'interno dei tessuti fino ad attraversare la lamina fogliare e sistemici, in grado cioè di entrare nei tessuti conduttori ed essere traslocati a distanza notevole dal punto di applicazione raggiungendo i vari organi vegetali. Solo in casi di particolare necessità si tende a sfruttare le capacità eradicanti di questi prodotti; inoltre, è buona norma impiegare composti endoterapici (che in genere hanno dei meccanismi d'azione mono o oligosito) solo in miscela, con prodotti di superficie e con diverso meccanismo di azione, dove almeno una sostanza attiva abbia caratteristiche di copertura, per limitare al massimo la probabilità di insorgenza di ceppi del patogeno resistenti ai principi attivi utilizzati. Per quanto riguarda la protezione delle viti dalla peronospora, i prodotti a base di rame restano comunque i più ampiamente utilizzati sia in agricoltura integrata (dove possono essere affiancati dai prodotti di sintesi), ma soprattutto in agricoltura biologica, dove rappresentano gli unici agrofarmaci ammessi realmente efficaci. 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 o addirittura sostitutiva al rame.

1.4. IL RAME

Il primo dato scientifico sull'efficacia del rame risale al 1761, quando si scoprì che immergere i semi in una debole soluzione di solfati di rame inibiva le malattie fungine trasportate dai semi stessi. Dagli inizi dell'Ottocento la lavorazione dei chicchi di cereali con solfati di rame e la successiva essiccazione con la calce divenne una pratica standard per evitare la formazione di muffe nella conservazione. Nel 1882, lo scienziato francese Millardet, scoprì in modo del tutto fortuito l'attività antiperonosporica di una miscela di rame e calce che i viticoltori francesi distribuivano sulle viti per rendere meno invitanti i grappoli, scongiurando eventuali furti. Questo intruglio, composto da solfato di rame (estremamente solubile e fitotossico) neutralizzato con idrato di calcio, prese il nome di poltiglia bordolese. La velocità di cessione dello ione rame può essere modulata in base alla quantità di idrato di calce:

più la poltiglia è acida, più pronta sarà la cessione del rame, ma anche il rischio di fitotossicità aumenta a sua volta.

Il rame è un oligoelemento biologicamente essenziale per tutti gli esseri viventi poiché gli ioni Cu sono componenti insostituibili di enzimi, fattori di trascrizione e altre strutture proteiche. Essendo un microelemento della nutrizione vegetale e costituente della dotazione minerale dei suoli, con ampia variabilità, a concentrazioni dell'ordine di alcune decine di mg/kg (con soglia di attenzione a 100 mg/kg) è inserito in numerosi e complessi cicli biogeochimici; il rame ha avuto da sempre infinite utilizzazioni industriali in virtù delle sue proprietà ed ha trovato impiego come antiperonosporico da ormai circa 140 anni. In agricoltura ne sono note diverse applicazioni, ma la più rappresentativa nel settore è quella di utilizzo per scopi fitosanitari. Il rame è soprattutto considerato come un fungicida multisito di copertura in grado di inibire la germinazione delle spore di molti funghi patogeni e, oltre all'ampio spettro d'azione, i bassi costi e la facile reperibilità, è ampiamente conosciuto e utilizzato da tempo dagli operatori agricoli. Il rischio pressoché nullo di insorgenza di resistenze nelle popolazioni di organismi fitopatogeni rappresentano le basi del successo che i prodotti rameici hanno riscosso nel corso del tempo. Il rame viene distribuito sottoforma di composti che liberano ioni, responsabili dell'attività tossica nei confronti dei miceti. L'elenco dei patogeni contrastati con successo da interventi con prodotti rameici è comunque molto articolato; oltre agli oomiceti, sono sensibili molti generi fungini ed interessante (e pressoché esclusiva) è anche l'azione batteriostatica.

1.4.1. Meccanismo d'azione dei prodotti a base di rame

Il meccanismo d'azione del rame si basa sulla tossicità che esso apporta tramite ioni Cu^{++} alle cellule dell'organismo bersaglio, i quali vanno ad interferire con le spore a diversi livelli. Vi sono interferenze non specifiche su diverse proteine ed enzimi (soprattutto sul sistema piruvato-deidrogenasi), inibizione della respirazione e fenomeni di denaturazione non specifica delle strutture proteiche con conseguente alterazione della permeabilità cellulare. Lo ione rame viene assorbito con grande efficienza dalle spore in fase di germinazione ("meccanismo suicida") ed esercita la propria attività tossica su varie componenti cellulari: tende infatti a sostituire gli ioni

calcio e magnesio presenti nei polimeri di parete, denatura le proteine strutturali e di membrana grazie alla capacità di reagire rapidamente con gruppi sulfidrilici, idrossilici, amminici e carbossilici, oltre a provocare dei danni irreversibili ai lipidi di membrana. Bisogna però affermare che l'attività antifungina di un prodotto rameico è condizionata dalla quantità di ioni Cu^{++} disponibili a livello del bersaglio (spore del patogeno target). La disponibilità ionica è strettamente collegata alla capacità del prodotto di liberare gli ioni stessi nell'acqua, che venendo a contatto con le spore saranno assorbiti, come rappresentato nella Figura 5.

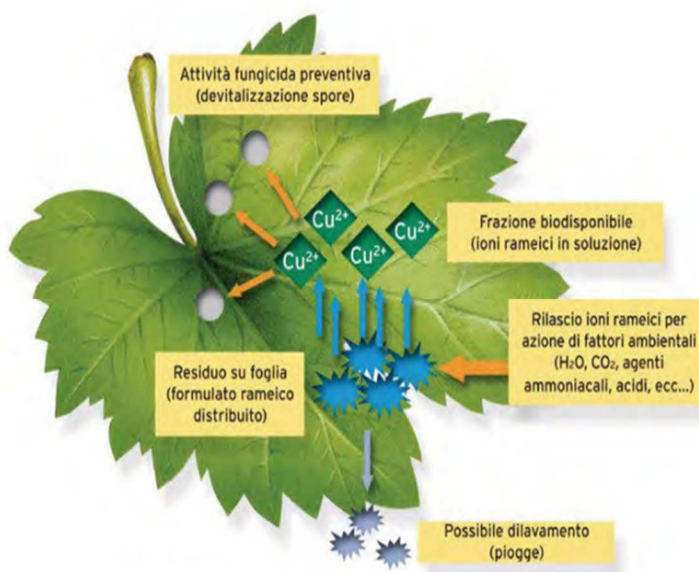


Figura 5 - Rappresentazione schematica dell'attività degli ioni Cu^{++} su una foglia di vite (Fonte: <https://www.chimiberg.com/UserFiles/File/com-tecnichenuove-terraevita-tv-2016-117.pdf>).

Alla luce di quanto detto finora, appare chiaro che il meccanismo d'azione del rame, agendo sulle spore in fase di germinazione, sia esclusivamente preventivo; pertanto, i formulati rameici vengono adoperati come prodotti di copertura e gioca un ruolo fondamentale il binomio dose/intervallo d'intervento. La frequenza dei trattamenti è strettamente condizionata da fattori quali: accrescimento (dipende dalla vigoria della cultivar), fase fenologica ed andamento meteorologico (in particolare dalla frequenza e dall'intensità delle precipitazioni): durante le fasi di più intenso sviluppo vegetativo si creano in media 2-3 foglie nuove ogni settimana ed anche la superficie degli acini cresce rapidamente dall'allegagione in poi; questi sono tessuti

vegetali chiaramente non coperti da un precedente trattamento. Da tenere in considerazione anche l'eventuale dilavamento, poiché la soglia al di sotto della quale l'efficacia dei formulati rameici non è ridotta o lo è solo limitatamente, è indicativamente di 20 mm di pioggia; con precipitazioni superiori, l'efficacia cala più o meno rapidamente, in funzione della dose e della formulazione impiegata. Il rischio d'infezione, cioè la necessità di effettuare trattamenti più frequenti, è legato anche alle caratteristiche dei singoli vigneti e del territorio in cui sono inseriti (sensibilità varietale, durata della bagnatura); alla qualità della distribuzione, dipendente dalla buona copertura della vegetazione, per la quale risultano fondamentali anche la taratura ed il corretto funzionamento dell'atomizzatore, nonché il momento della somministrazione, preferibilmente in assenza di vento per evitare l'effetto deriva. In merito alla prontezza d'azione e alla persistenza, è bene chiarire il concetto che è alla base della cinetica di dissoluzione del rame: l'acqua che riveste la pianta, a causa dello sbalzo termico, subisce una diminuzione di pH a causa dell'incremento di CO₂, che si trasforma in acido carbonico. Questo dissolve il sale di rame, che cede in maniera incontrollata il "rame idratato", poi disperso a causa delle ripetute bagnature (pioggia e rugiada) perdendo la sua efficacia nei confronti dell'agente patogeno ed aumentando conseguentemente il rischio di fitotossicità.

1.4.2. Prodotti a base di rame

Prima di entrare nel merito, è utile ricordare che la persistenza del prodotto somministrato sulla fascia vegetativa e la prontezza d'azione sono strettamente dipendenti dalla forma di rame utilizzata e soprattutto dal suo livello di solubilità (Figura 6). Oltre alla classica e ben conosciuta poltiglia bordolese (solfato di rame neutralizzato), ad oggi vengono commercializzate altre sostanze attive a base di rame, ognuna con persistenza e prontezza d'azione variabili. La disponibilità di formulati rameici industriali per usi fitosanitari in Italia, è riferibile a cinque categorie di principi attivi: solfato neutralizzato con calce; solfato tribasico; ossicloruro (ossicloruro di rame e calcio o triramico e ossicloruro tetraramico); ossido rameoso ed idrossido di rame. Tali prodotti si presentano in diverse formulazioni (polvere bagnabile, granuli disperdibili, sospensione concentrata) e in qualche caso due diversi tipi di rame possono essere combinati insieme nello stesso formulato commerciale (es. ossicloruro

e idrossido, oppure solfato tribasico e idrossido). Esistono in commercio anche numerosi formulati in cui il rame (soprattutto come ossicloruro) è miscelato con fungicidi organici.

➤ ***La poltiglia bordolese ($CuSO_4 / 3Cu(OH)_2 / 3CaSO_4$)***

È senza dubbi il prodotto più storico, contiene solfato di rame e idrossido di calcio all'1% (1 kg di entrambi i composti ogni 100 L di acqua). Più la poltiglia ha un pH basso più l'effetto è pronto, ma meno durevole nel tempo a differenza di una poltiglia prevalentemente alcalina. 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.

➤ ***L'idrossido di rame [$Cu(OH)_2$]***

Ha un contenuto di rame metallo pari al 50%, è composto da particelle aghiformi rilasciate velocemente ed in grado di aderire bene alla vegetazione trattata. Si ottiene trattando una soluzione di solfato di rame con idrossido alcalino in presenza di eccesso di ammoniaca. Ha una buona prontezza d'azione grazie alla finezza delle sue particelle, presentando comunque una buona persistenza d'azione e ridistribuzione grazie alla sua capacità di rimobilitazione sulla vegetazione se presente forte umidità ambientale.

➤ ***L'ossicloruro di rame [$ClCu_2(OH)_3$]***

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 ($3CuO \cdot CuCl_2 \cdot 3H_2O$) e l'ossicloruro di rame e calcio (triramico) che è un complesso tra l'ossido rameico e il cloruro di calcio ($3CuO \cdot CaCl_2 \cdot 3H_2O$). 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.

➤ **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. Industrialmente, tale prodotto viene preparato per reazione tra acido solforico (H_2SO_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.

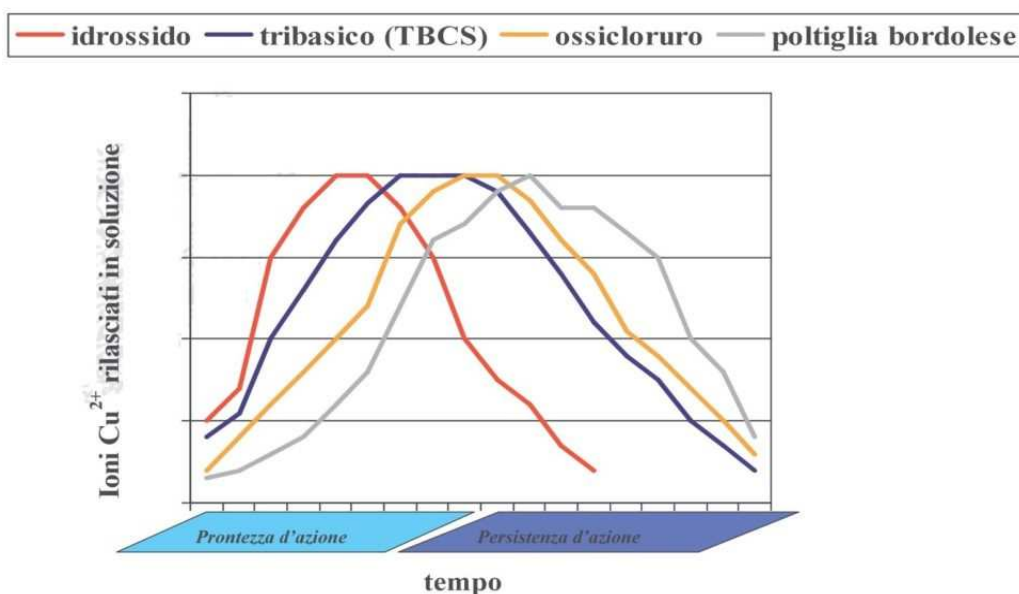


Figura 6 - Rappresentazione grafica sulle differenze tra vari prodotti cuprici ed il loro rapporto tra ioni Cu^{2+} rilasciati in soluzione e tempo, che comprende prontezza d'azione e persistenza (Fonte: <http://www.nicolagiannicoagronomo.it/>).

1.4.3. Problematiche legate all'impiego di prodotti rameici in agricoltura

Il rame distribuito con i trattamenti antiparassitari si deposita sulle foglie e sugli altri organi epigei delle piante, e non viene assorbito dai tessuti vegetali, se non in determinate circostanze che affronteremo più avanti. Di conseguenza, la totalità del prodotto finisce, nel tempo, per raggiungere gli orizzonti superficiali del suolo, sia per fenomeni diretti di deriva al momento dell'applicazione, sia per dilavamento dagli organi trattati, sia, infine, per la fisiologica caduta a fine stagione delle foglie che presentano ancora residui. In breve, il bilancio di massa vede modeste asportazioni (qualche decina di grammi per ettaro) da parte della vegetazione (si concentra

principalmente negli apparati radicali), a fronte di massicci input fitoiatrici antropici. Merita di essere segnalato il fatto che sono diffusi in commercio fertilizzanti contenenti elevate concentrazioni di rame, consentiti anche in agricoltura biologica che, di fatto, servono alla “difesa occulta” (illegale) delle colture, tenuto conto che i terreni italiani di norma non mostrano carenze di questo elemento.

Nonostante i prodotti a base di rame siano consentiti in agricoltura biologica, risulta importante prendere in considerazione anche gli effetti indesiderati di un uso continuativo e reiterato nel tempo di prodotti cuprici, da diversi punti di vista. Essendo un metallo pesante, è soggetto a bioaccumulo nelle catene trofiche, è tossico per gli organismi acquatici e del suolo, tende ad accumularsi nel terreno, provocando alterazioni quantitative e qualitative nella composizione della microflora e fauna terricola. Una volta nel suolo, questo metallo pesante non subisce nessuna degradazione né chimica né fotolitica o alcuna metabolizzazione: l'unico tipo di asportazione di rilievo è costituita dall'azione dilavante della pioggia; nel terreno, l'ione rameico interagisce con le argille e la sostanza organica, per formare composti insolubili (Businelli *et al.*, 2007). Inoltre, la produzione industriale può provocare emissioni atmosferiche di vapori tossici, formazione di fanghi ed eluati pericolosi, contaminazioni dei siti industriali, contaminazioni in ambito idrico e geologico, bioaccumulazione e tossicità per il regno vegetale e animale (Owen, 1981). A pH >7, il rame precipita sotto forma di idrossido [Cu (OH)₂], che è praticamente insolubile in acqua. Quando il pH del suolo si abbassa, la sensibilità al Cu è maggiore, soprattutto se in tali suoli la sostanza organica e i minerali argillosi sono scarsi. Data l'affinità del rame per le molecole umiche, la sua ritenzione da parte dei minerali argillosi è tanto maggiore quanto minore è il contenuto di sostanza organica. Tale circostanza spiega l'alta percentuale di rame nella frazione residuale degli orizzonti profondi (Moolenaar e Beltrami, 1998).

Anche se il rame è considerato un microelemento della nutrizione vegetale, elevate concentrazioni possono risultare fitotossiche (si possono osservare ad esempio manifestazioni clorotiche, stentata crescita di giovani germogli ed apici radicali) nei confronti delle cellule vegetali stesse, nelle quali tuttavia in genere non riesce a penetrare. Le cellule vegetali, infatti, sono protette da cuticola, uno strato di cutina e cere presenti sulle pareti esterne dell'epidermide in grado di conferire una barriera

impenetrabile per lo ione rame. In alcune circostanze, tale barriera risulta meno efficiente: nei tessuti giovanili, in particolare sugli organi fiorali e sui giovani frutti appena allegati, il sottile strato di cuticola presente può risultare insufficiente ad impedire il contatto tra lo ione rame e la cellula vegetale. In situazioni caratterizzate da un'abbondante disponibilità idrica, lo scollamento delle componenti cerosi della cuticola dovuto alla forte idratazione delle cellule sottostanti può provocare delle soluzioni di continuità nello strato protettivo che consentono allo ione rame di penetrare all'interno del tessuto vegetale. Il contatto tra rame e membrana cellulare provoca un'alterazione della membrana stessa e una volta assorbito dalla cellula, il rame determina fenomeni di fitotossicità, la cui entità è ovviamente in funzione della quantità di prodotto assorbito (Sancassani, 2017) (Figura 7). La sensibilità a questo fenomeno è particolarmente spiccata su alcune cultivar di vite, melo, pero e generalmente sul pesco. Il rilascio dello ione rame deve quindi essere preferibilmente graduale, non solo per evitare o ridurre l'eventuale fitotossicità, ma anche per assicurare una persistenza più duratura dell'attività fungicida.

A causa dei rischi e delle problematiche ambientali e per la salute umana, nell'Unione Europea l'utilizzo del rame in agricoltura è stato limitato, fino ad arrivare alla situazione attuale dove sono ammessi 28 kg/ha di rame metallo in 7 anni, corrispondenti a circa 4 kg/ha/anno (Regolamento UE 1981/2018). Inoltre, dato che il rame soddisfa i criteri di tossicità e bioaccumulo è stato inserito nella lista dei composti "candidati alla sostituzione" ed è quindi destinato a scomparire dal mercato dopo il 2025 (in alcuni paesi europei l'utilizzo del rame in agricoltura è stato già azzerato), con grande preoccupazione per i viticoltori biologici, che vedono il rame come unica arma efficace nei confronti della peronospora della vite (La Torre *et al.*, 2018). Tutto ciò ha stimolato negli anni la ricerca di soluzioni alternative al rame per la protezione antiperonosporica.



Figura 7 - Danni su grappolo in post-allegagione, provocati da un trattamento con una dose eccessiva di rame (Fonte: <http://www.nicolagiannicoagronomo.it/>).

1.4.4. Principali alterazioni dei vini dovute alla presenza di metalli pesanti

La presenza dei metalli pesanti nel vino è legata principalmente:

- all'assorbimento di oligoelementi della nutrizione (come Cu e Fe) da parte della pianta (fino a 1 mg/L);
- alla contaminazione da fitofarmaci;
- alla contaminazione da attrezzature o elementi di contatto durante le fasi di lavorazione;
- alla contaminazione da additivi e prodotti enologici di dubbia provenienza (acido metatartarico, acido citrico, bentonite, ecc..).

In passato, in cantina si utilizzavano materiali in ottone e bronzo (valvole, raccordi, corpi pompa), che rappresentavano una fonte importante di rame. Non solo, questi materiali cedevano anche altri metalli pesanti come piombo (soprattutto il bronzo) e col tempo sono stati rimpiazzati da materiali più inerti come l'acciaio inossidabile. I metalli pesanti comprendono un insieme di elementi, presenti nel vino in quantità variabili (alcuni arrivano al mg/L mentre altri solo qualche $\mu\text{g/L}$). I più comuni sono l'alluminio (Al), l'arsenico (As), il cadmio (Cd), il cobalto (Co), il cromo (Cr), il ferro (Fe), il litio (Li), il manganese (Mn), il mercurio (Hg), il nichel (Ni), il piombo (Pb), il rame (Cu) e lo zinco (Zn). Alcuni metalli di transizione, come Cu e Fe,

sono denominati catalizzatori (Figura 8) in quanto reagiscono con l'ossigeno convertendolo in radicali liberi molto reattivi, capaci di ossidare un numero elevato di composti presenti nel vino, compresi quelli che migliorano la qualità e le caratteristiche sensoriali. Rame e ferro possono inoltre contribuire alla formazione di intorbidamenti, influenzare l'attività microbiologica e il sistema redox del vino o anche causare cambiamenti indesiderati di aroma e gusto. Per evitare un'eccessiva presenza di metalli, che potrebbero provocare tossicità all'uomo o influenzare negativamente le proprietà organolettiche del prodotto finale, il loro contenuto nel vino è regolamentato da leggi a livello nazionale nei vari paesi produttori, ma anche da organizzazioni di commercio nazionale, come dall'OIV (Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino).

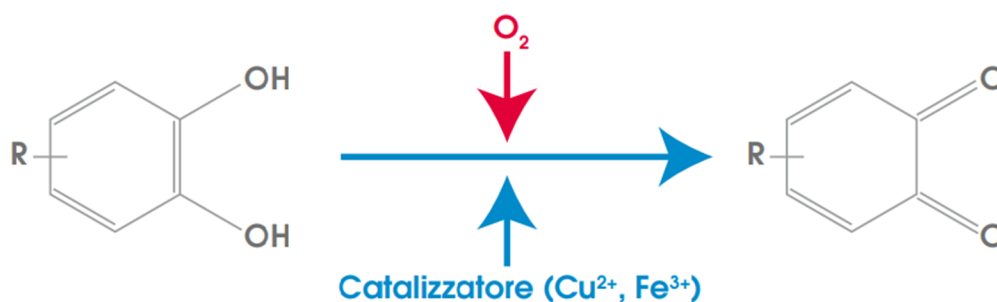


Figura 8 - Rappresentazione stechiometrica di ioni metallici (rame e ferro) che agiscono come catalizzatori di origine chimica e relativo effetto ossidante (Fonte: <https://www.perdomini-ioc.com/it/perdominews/la-soluzione-naturale-contro-lossidazione-dei-vini/>).

1.4.5. Principali effetti del rame nel vino

Nonostante i limiti europei imposti sul suo impiego in agricoltura come prodotto antifungino, il rame è ancora alla base della gestione della peronospora nei vigneti ed è possibile quindi ritrovarlo durante tutte le fasi del processo di vinificazione. Il vino, quindi, può entrare in contatto con il rame in svariate fasi. A causa degli interventi di protezione dalla peronospora si ritrovano sulle uve in vendemmia dei contenuti di rame dai 2 ai 10 mg/kg (circa 5 mg/kg in media, limite di legge 20 mg/kg). La presenza del metallo pesante può interferire con il decorso fermentativo, anche se basse concentrazioni non dovrebbero disturbare troppo i lieviti, i quali iniziano a reagire in maniera grave sopra i 12 mg/kg (Eccli, Kobler, Centro di Sperimentazione Agraria di

Laimburg, 2008. Fonte: [fv_rame_2008.pdf \(kobler-margreid.com\)](#)). Inoltre, i lieviti producono una vasta serie di prodotti secondari durante la fermentazione, tra i quali anche l'idrogeno solforato (H₂S) ed altri composti contenenti zolfo che reagiscono con il rame diventando insolubili. Nei vini giovani dopo la fermentazione il rame è presente in tracce, solitamente inferiori a 0,1 mg/L. Quando però il rame nel vino supera gli 0,5 mg/L, può originare un sale che provoca intorbidamento di colore bianco lattiginoso (difetto conosciuto come casse rameosa) che evolverà in un precipitato bruno - rosso. Stiamo parlando del solfuro di rame (CuS) che si forma per reazione del rame con acido solfidrico in ambiente riducente, in quanto l'acido solfidrico si forma a sua volta per riduzione dell'anidride solforosa; perciò, la precipitazione si verifica più facilmente in bottiglia. Anche la luce può favorire la casse rameosa, in quanto abbassa il potenziale riduttivo. Le prime molecole di solfuro rameico che si formano sono solubili, ma quelle in eccesso sono insolubili, assumendo carattere colloidale a carica negativa; queste in presenza di cationi o colloidali proteici, possono facilmente coagulare e precipitare. Il rame può provocare intorbidamento anche qualora il vino fosse sottoposto a elevate temperature (come avviene alla pastorizzazione). Il deposito rameico è solubile in acido citrico e cloridrico, o in acqua ossigenata (Sicheri, 2015).

Un alto contenuto di rame, associato alla presenza di fosfiti (altri composti che possono derivare dalle pratiche fitosanitarie) e a un contenuto nutrizionale non corretto (carenza di vitamine del gruppo B, scarso contenuto di aminoacidi) determina un forte stress metabolico dei lieviti, riduzione dell'accumulo degli aminoacidi liberi nel mosto e aumento dell'acidità volatile, rischiando un rallentamento dell'attività fermentativa. Il rame inoltre è anche responsabile della riduzione dell'accumulo degli aminoacidi liberi nel mosto (Garde-Cerdà *et al.*, 2017) indispensabili per l'alimentazione dei lieviti, compromettendo di conseguenza la qualità del vino (García-Esparza *et al.*, 2006; Miotto *et al.*, 2014). Infine, il rame peggiora le caratteristiche organolettiche del vino, interagendo anche con gli aromi primari dell'uva e creando legami covalenti (effetto chelante) con questi ultimi, per poi precipitare causando una perdita definitiva delle molecole olfattive; ad alte concentrazioni, inoltre, catalizza come accennato le reazioni di ossidazione nei mosti e vini diventando cofattore dell'attività polifenolossidativa.

Tuttavia, in alcuni casi particolari il rame può anche essere aggiunto nel vino sottoforma di solfato di rame, ad esempio quando devono essere rimossi difetti olfattivi (“sentori di ridotto”) provocati dalla riduzione dei composti dello zolfo come l’H₂S. Bisogna comunque considerare che il rischio di una eccessiva ossidazione o di una diminuzione della longevità con apporti importanti di solfato di rame è sempre presente. Entrando più nel dettaglio e citando qualche studio, è stato dimostrato che l’aggiunta di solfato di rame nei vini bianchi prima dell’imbottigliamento è di solito inefficace e può essere addirittura controproducente. Secondo una ricerca effettuata presso il *National Wine and Grape Industry Centre* (NWIGC) in Australia, quando si aggiunge rame al vino finito, anche se si lega ai solfuri, le particelle generate sono troppo piccole per essere allontanate dalla filtrazione. Il rame, sotto forma di solfuro, è reversibile e può ancora partecipare in altre reazioni indesiderate del vino: il rame aggiunto per risolvere un problema può pertanto finire per accentuare quello stesso problema. In un secondo lavoro i ricercatori del NWIGC sono riusciti a dimostrare che il rame presente nei vini bianchi, quando ci sono ancora proteine nel vino, può essere eliminato in modo efficace attraverso la chiarifica con bentonite utilizzata per rimuovere le proteine, anche se la sua eliminazione non è totalmente garantita (le molecole sono estremamente microscopiche).

1.5. IL CHITOSANO

Fra i composti innovativi a ridotto impatto ambientale con attività antiperonosporica studiati, il chitosano rientra fra quelli che hanno mostrato i risultati più promettenti (Romanazzi *et al.*, 2016, 2021). Questa sostanza è prodotta a partire dalla chitina, che è il secondo biopolimero più abbondante sulla Terra dopo la cellulosa ed è costituita da unità di N-acetil-D-glucosammina legate fra loro da legami alfa 1-4 glicosidici (Figura 9); fu scoperta nei funghi dallo studioso francese Henry Braconnot (1811). Dal materiale fungino parzialmente purificato mediante ebollizione con idrossido di potassio diluito per la rimozione di proteine e pigmenti, si otteneva un composto: il chitina-glucano. Pochi anni dopo, la chitina fu scoperta anche nell’esoscheletro di alcuni insetti. Ledderhose nel 1878 determinò la struttura della chitina e dimostrò che poteva essere sintetizzata a partire da molecole di glucosammina e acido acetico. Nella chitina le varie unità formano lunghe catene che si aggregano in lamine attraverso il

legame idrogeno: i vari modi in cui tali lamine si possono aggregare tra loro, determinano le tre forme cristalline note della chitina denominate α , β e γ . Tali caratteristiche, unite alla sua degradabilità da parte degli enzimi endogeni, rendono la chitina un ottimo materiale per la produzione di fili per suture chirurgiche, bende, pelle sintetica; essa presenta, inoltre, la proprietà di accelerare la rimarginazione delle ferite superficiali negli esseri umani. La chitina viene oggi ottenuta industrialmente principalmente dai gusci dei crostacei, soprattutto gamberi, per un ammontare di 50000 tonnellate annue, e, risultando insolubile in soluzioni acquose, alcali e acidi diluiti a causa del suo elevato grado di cristallinità, è un composto che si biodegrada molto lentamente. Il suo smaltimento ha rappresentato per molto tempo un serio problema per l'industria ittica, fino a quando è stata scoperta la possibilità di trasformazione in prodotti di elevato valore aggiunto quali il chitosano. In tal modo la chitina si è trasformata da prodotto di scarto a materia prima, disponibile e a basso costo diventando così un prodotto di grande utilità per le sue numerose applicazioni (Shahidi, 1999). Il chitosano è un polimero lineare di D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, legate tramite legami β 1-4. Viene prodotto per deacetilazione (rimozione del gruppo-COCH₃) della chitina, ed è un importante componente strutturale della parete cellulare dei funghi fitopatogeni, nonché dell'esoscheletro di insetti e crostacei. Chimicamente può essere definito un polisaccaride a lunga catena.

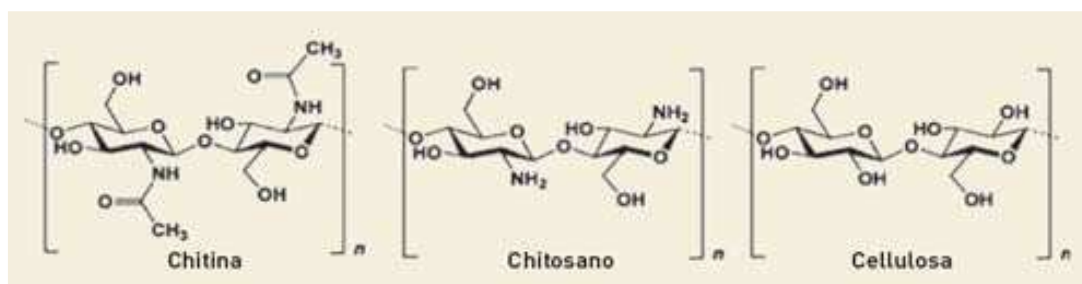


Figura 9 - Rappresentazione schematica delle strutture chimiche conformazionali di chitina, chitosano e cellulosa messe a confronto (Fonte: https://www.assoenologi.it/wp-content/uploads/2019/10/assogiovani_chitosano_ottobre2019.pdf).

La molecola ha un peso che può superare il milione di Dalton e contenere, rispettivamente anche più di 5000 unità di D-glucosammina (unità deacetilate) e N-

acetil-D-glucosammina (unità acetilate). Il chitosano al contrario della chitina è completamente biodegradabile (Bautista Baños *et al.*; 2006) una volta a contatto con il terreno è digerito dai microrganismi per poi essere trasformato in metaboliti solubili, ma è anche biocompatibile e atossico. È insolubile in acqua, soluzioni alcaline e solventi organici mentre lo è molto in soluzioni acide (Rabea *et al.*, 2003; Raafat *et al.*, 2009).

Ad oggi, esistono due principali sistemi di produzione del chitosano: a partire da organismi fungini (in particolare *Aspergillus niger*) oppure da esoscheletro di crostacei (scarti dell'industria ittica). In quest'ultimo caso, i prodotti di scarto dei crostacei sono sottoposti a un processo di demineralizzazione con HCl 0,25 N a temperatura ambiente in rapporto 1:40 p/v che si completa in circa 15 minuti. Segue la deproteinizzazione con NaOH N a 70°C per 24 ore, al termine della quale si ottiene la chitina che viene sottoposta a deacetilazione (Figura 10) per trattamento a temperature elevate (100°C - 120°C), con una soluzione di NaOH al 60% (p/v) (Juang *et al.*, 2002). Il chitosano grezzo ottenuto nel modo sopra descritto deve subire complessi trattamenti di purificazione per eliminare le sostanze presenti nel materiale di partenza: proteine, lipidi, sali minerali (in particolare carbonato di calcio) e pigmenti, per cui questo tradizionale metodo chimico di estrazione risulta poco economico e ad alto impatto ambientale. In alternativa, è stato proposto un metodo di fermentazione con batteri lattici che è stato ottimizzato considerando vari fattori, quali la scelta del microrganismo più attivo, del terreno di cultura, dell'aggiunta di nutrienti al terreno di cultura, al fine di ottenere un prodotto ad alte rese, economicamente vantaggioso e a basso impatto ambientale. *Lactobacillus plantarum*, inoculato su MRS Broth mescolato ad agar per solidificare il mezzo di cultura e incubato a 35–37°C in presenza di CO₂ per 48–72 ore, si è dimostrato il più efficiente tra i lattobacilli considerati per estrarre il chitosano dai gamberetti (Pacheco *et al.*, 2009), con maggiore resa e sostenibilità di quella ottenuta con metodo chimico (Khanafari *et al.*, 2008). In aggiunta, l'impiego degli acidi organici per la demineralizzazione è stata una importante modifica del processo di purificazione che ha portato a numerosi vantaggi: l'acido lattico viene prodotto a basso costo dai batteri stessi; i sali risultanti dal processo possono essere impiegati come prodotti antigelo o come conservanti alimentari; le sostanze proteiche vengono precipitate e recuperate per l'utilizzo come

mangimi. Le caratteristiche fisiche del chitosano ottenuto attraverso i due metodi sopra riportati, non differiscono apprezzabilmente: esso si presenta sotto forma di polvere fine o in scaglie di colore variabile dal giallastro al bianco, insapore e con un leggero caratteristico odore. Il chitosano è insolubile in acqua a pH neutro e alcalino e in alcuni solventi organici, mentre è solubile negli acidi, in conseguenza della protonazione del gruppo amminico che porta alla formazione di sale con l'anione dell'acido utilizzato (acido glutammico, cloridrico, acetico, lattico). Nell'intervallo di pH dei sistemi acquosi naturali (pH=6-8), i gruppi amminici del chitosano si presentano in forma protonata e il composto assume le caratteristiche di un acido di Lewis, capace quindi di interagire con gruppi leganti basici. Il chitosano con un basso grado di deacetilazione, intorno al 40%, è solubile anche a valori di pH inferiori a 9, mentre il chitosano con un grado di deacetilazione intorno all'85%, è solubile solo a valori di pH inferiori a 6,5. La deacetilazione, inoltre, influenzando la viscosità della soluzione ne determina anche la configurazione, passando da una forma allungata, molto flessibile in relazione a un alto grado di deacetilazione, alla forma ad alfa elica per una deacetilazione di grado inferiore.

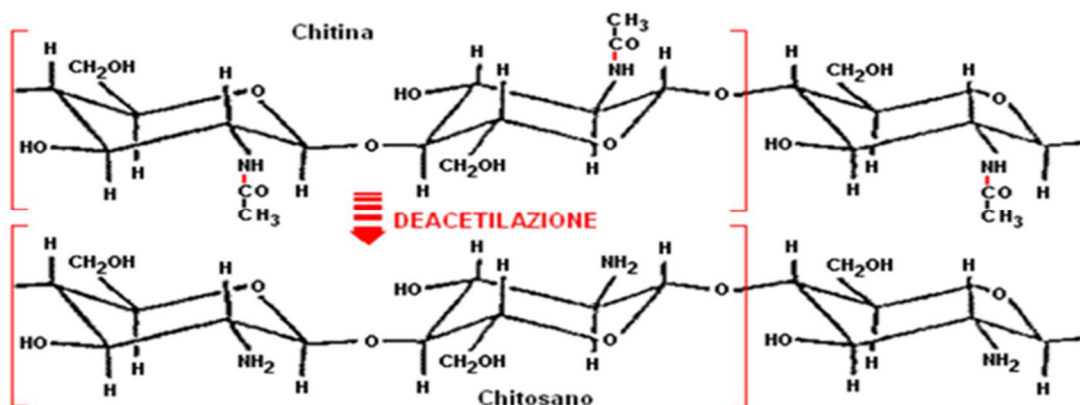


Figura 10 - Rappresentazione grafica della reazione chimica di deacetilazione della molecola di chitina, trasformata poi in chitosano in seguito alla rimozione del gruppo acetile (COCH₃) (Fonte: <http://www.galenotech.org/chitosano.htm>).

Infine, la solubilità del chitosano è influenzata dalla presenza di sali, in quanto, maggiore è la forza ionica della soluzione, minore è la sua solubilità. Il comportamento del chitosano come polielettrolita in ambiente acido spiega la sua abilità a formare

complessi con molecole cariche negativamente, quali lipidi e proteine, presenti in soluzione od allo stato colloidale provocandone la flocculazione (Muzzarelli *et al.*, 1985) e di conseguenza l'allontanamento dalla soluzione. Tuttavia, esistono oggi in commercio delle formulazioni di chitosano (ad esempio il cloridrato) che si possono sciogliere direttamente in acqua.

1.5.1. Impiego del chitosano nella protezione delle piante

Il chitosano cloridrato è stata la prima sostanza di base approvata dall'Unione Europea per la protezione delle piante (Regolamento UE 2014/563), sia per l'agricoltura biologica che integrata. Il chitosano cloridrato è stato classificato come sostanza di base, ovvero una sostanza attiva già impiegata in altri ambiti (ad esempio medico o alimentare) che pur non essendo utilizzata solamente per scopi fitosanitari e non pertanto venendo immessa sul mercato come prodotto fitosanitario, può risultare utile a tal fine. Per definizione, quindi, possiamo definire “di base” una sostanza attiva che soddisfa i criteri di prodotto alimentare, edibile e non pericolosa per l'uomo e l'ambiente (art. 2 del Regolamento CE n. 178/2002). Inoltre, il chitosano è anche considerato come sostanza GRAS (*Generally Recognized as Safe*) negli Stati Uniti. Quando il biopolimero viene applicato sui tessuti vegetali, mostra una triplice attività: attività elicitante delle difese dell'ospite, attività antimicrobica e attività filmogena (Romanazzi *et al.*, 2018).

È ormai noto che nel corso dell'evoluzione le piante hanno imparato a riconoscere alcuni componenti esogeni, sviluppando dei bio-segnali di allarme che di conseguenza innescano delle funzioni difensive. L'attività elicitante del chitosano è stata studiata a partire dal 1990, iniziando con il monitoraggio delle attività enzimatiche legate ai meccanismi di difesa (ad esempio, chitinasi, β -1,3 glucanasi, fenilalanina ammonio-liasi) in diversi frutti ad esempio, fragola, altre bacche, agrumi, uva da tavola (El Ghaouth *et al.*, 1992). A queste sono poi seguite nel tempo indagini sempre più approfondite, anche di tipo molecolare a carico di geni coinvolti con i meccanismi di difesa delle piante (Landi *et al.*, 2014), come ad esempio recentemente con la tecnica qRT-PCR (*Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*). Le piante, quindi, possiedono dei recettori in grado di riconoscere sostanze che sono state liberate in seguito alla presenza di un microrganismo (*Microbes-Associated Molecular Patterns*:

MAMPs), associate al patogeno o liberate dal patogeno stesso (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*: PAMPs), oppure riconoscere sostanze che derivano da un danno causato dal patogeno sulla pianta (*Damage-Associated Molecular Patterns*: DAMPs). Per “elicitore” si intende un qualsiasi segnale molecolare prodotto direttamente o indirettamente dal patogeno, in grado di essere variamente riconosciuto dall’ospite e di stimolarne una risposta attiva di difesa. Gli elicitori possono essere specifici o aspecifici, esogeni o anche endogeni, se prodotti dalla pianta in seguito all’interazione con il patogeno. In ogni caso, l’interazione di qualsiasi elicitore con dei recettori della cellula ospite innesca una serie di segnali molecolari in grado di attivare, a livello nucleare, la trascrizione dei geni di difesa. Gli elicitori aspecifici esogeni sono riconducibili ad ampi gruppi di patogeni, essendo dei prodotti del loro metabolismo primario e soggetti ad una bassa frequenza di mutazione, come ad esempio frammenti di parete cellulare e di flagelli, acidi grassi, acidi nucleici, steroli, proteine e glicopeptidi. Le dimensioni degli oligomeri di chitosano, prodotti nell’interfaccia ifa fungina/apoplasto ad opera delle chitinasi delle chitosanasi della pianta, di per sé principalmente ad azione antifungina diretta, svolgono un ruolo primario nel riconoscimento stesso, essendo 4 e 7 rispettivamente per la chitina ed il chitosano il grado di polimerizzazione minimo per essere biologicamente attivi. Nel loro complesso, la chitina e il chitosano, così come altri oligomeri di glucani, vengono denominati oligosaccarine. Per quanto riguarda il caso specifico della peronospora della vite, oltre all’attività antimicrobica diretta, questa molecola è anche in grado di indurre una serie di risposte di difesa nelle piante, tra cui la biosintesi di acido jasmonico e salicilico, stimolazione delle chitinasi, accumulo di fitoalessine, trans- e cis-resveratrolo con derivati ϵ -viniferina e piceide nelle foglie, sintesi di inibitori delle proteinasi e incremento della lignificazione. Questo biopolimero, dunque, per caratteristiche strutturali simula la presenza del fungo fitopatogeno e agisce come induttore di resistenza (Romanazzi *et al.*, 2018).

L’attività antimicrobica del chitosano contro una vasta gamma di patogeni vegetali è stata confermata attraverso molti studi sia *in vitro* (Reglinski *et al.*, 2010; Trotel-Aziz *et al.*, 2006) sia *in vivo* (Romanazzi *et al.*, 2002, 2016, 2021). Negli ultimi anni sono stati proposti diversi meccanismi d’azione; la maggior parte di essi suggerisce che la sua attività antimicrobica possa essere attribuita alle cariche elettriche positive, che

interagiscono con le cariche negative della superficie di batteri e funghi, alterandone la permeabilità cellulare (De Oliveira Junior *et al.*, 2012), interferendo con gli acidi nucleici (Vesentini *et al.*, 2007) e inibendo di conseguenza la sintesi di mRNA e proteine (Devlieghere *et al.*, 2004).

Una volta applicato sulla superficie di un tessuto vegetale (ad esempio immersione o spruzzatura), inoltre, il chitosano forma un rivestimento commestibile, le cui proprietà (spessore, viscosità, permeabilità ai gas e all'acqua) dipendono dall'acido in cui viene disciolto. Si è osservato che, in seguito alla somministrazione di trattamenti antifungini a base di chitosano su vite (500/600 L/ha) ad eccezione delle primissime fasi di vegetazione dove vengono impiegate dosi minori, sulla superficie fogliare si crea un biofilm pellicolare in grado di schermare le foglie da attacchi di agenti patogeni e, dopo 4/5 trattamenti, anche di inibire la conduttanza stomatica. Oltre alla tossicità diretta e alla chelazione di nutrienti e minerali per gli agenti patogeni (El Hadrami *et al.*, 2010), la barriera fisica creata dal chitosano sui frutti, inibisce la germinazione delle spore fungine. La patina formata, inoltre, occlude la via stomatica che normalmente consente gli scambi gassosi che sono alla base del processo fotosintetico. Con un minor tenore fotosintetico, la vite accumula di conseguenza nelle bacche una quantità di zuccheri minore, cosa che non avviene invece somministrando prodotti a base di rame. Le foglie hanno risposto positivamente anche durante il periodo estivo, con una maggiore integrità e mantenimento.

Nel complesso, si può affermare che l'induzione di resistenza rappresenta dal 30 al 40% dell'attività del chitosano, la sua attività antimicrobica dal 35 al 45% e la sua attività filmogena dal 20 al 30%; in termini di efficacia nel controllo del decadimento post-raccolta della frutta fresca (Romanazzi *et al.*, 2018). Oltre ad essere usato da solo, il chitosano può essere applicato in associazione ad altre alternative ai fungicidi sintetici (ad esempio come prodotto *coating* su frutta e ortaggi insieme ad oli essenziali), per potenziarne le proprietà elicitanze, antimicrobiche e filmogene, con interazioni additive e a volte sinergiche. Diverse formulazioni commerciali di chitosano sono disponibili come biopesticidi, con la loro efficacia dovuta alla combinazione integrata di questi tre meccanismi d'azione. Per quanto riguarda il prezzo di questo polisaccaride, esso può variare in base al grado di acetilazione residua, al peso molecolare e alla sua purezza. Indicativamente, ad oggi il costo di un

trattamento antiperonosporico con chitosano cloridrato è ancora piuttosto alto: si stima che con volumi di irrorazione di 300/600 L/ha e con concentrazioni di principio attivo allo 0,5% (tra i 3 e i 6 kg di prodotto ad ha), si aggiri attorno ai 150-300 € per ettaro contro i 12-50 € per ha dei trattamenti a base di rame. Infine, è opportuno precisare che l'efficacia in campo di trattamenti con chitosano sembra essere strettamente legata alla concentrazione di principio attivo e al livello di bagnatura delle superfici trattate (Romanazzi *et al.*, 2021).

1.5.2. Impiego del chitosano in enologia

In enologia, sono state autorizzate (risoluzione OIV-OENO 368 del 3 luglio 2009) unicamente le forme di chitosano derivate da funghi, in particolare dall'*Aspergillus niger* (regolamento di applicazione UE 315/2012), un fungo che contiene sulla base secca del micelio un'alta quantità di chitina (42%, Synowieki *et al.*, 2003) e offre una tollerabilità totale rispetto al chitosano di origine animale, che invece può essere causa di fenomeni allergici provocati da eventuali proteine residue potenzialmente rilasciabili nel vino, come la tropomiosina (Peñas *et al.*, 2015). Quest'ultima è considerata l'allergene più presente fra i crostacei, nonché uno tra i principali fattori di cross-reattività (fenomeno che si manifesta clinicamente con l'associazione di due o più allergie, definite "allergie crociate") tra crostacei, insetti, acari e nematodi.

Le indicazioni di utilizzo nel vino di chitosano alle quali attenersi sono le seguenti: fino ad un massimo di 100 g/L per ridurre il tenore di metalli pesanti, in particolare ferro, piombo, cadmio e rame, prevenendo così la casse ferrica e rameica fino ad arrivare ad un massimo di 500 g/hl per ridurre i contaminanti eventualmente presenti, in particolare l'ocratossina A (OTA). Per ridurre le popolazioni di microrganismi indesiderati come il *Brettanomyces*, può essere aggiunto fino ad un massimo di 10 g/hl, da intendersi anche come la dose massima al consumo. I sedimenti del trattamento devono essere eliminati mediante processi fisici. Nel mosto l'utilizzo di chitosano è stato approvato per facilitare la sfeccatura e la chiarifica ed effettuare eventualmente un trattamento preventivo delle casse proteiche. Il regolamento CE 1584/2018 a seguito della valutazione positiva del comitato tecnico europeo EGTOP (*expert group for technical advice on organic production*) tra le sostanze aggiunte nella lista allegato VIII bis degli additivi e coadiuvanti tecnologici ammesse per la vinificazione con

metodo biologico, inserisce il chitosano derivato da *Aspergillus niger* per la chiarificazione.

1.5.3. Azioni ed effetti dell'applicazione di chitosano nel vino

L'utilizzo della chitina-glucano e del chitosano per diversi aspetti della produzione del vino può trovare applicazione nella stabilizzazione, nella chiarifica, nella disacidificazione, nell'eliminazione dei metalli pesanti o dei metalli principali (es. piombo, cadmio, ferro, rame) così come nell'eliminazione dell'ocratossina A, degli enzimi e dei pesticidi.

L'azione del chitosano sul vino dipende principalmente da alcuni fattori:

- la viscosità;
- il grado di deacetilazione raggiunto nel trattamento della chitina (superiore all'80% rispetto a quello del chitosano solitamente inferiore al 20%). Più questo grado sarà elevato, maggiori saranno i caratteristici gruppi $-NH_2$ - della molecola chitosano, che potranno attivarsi in NH_3^+ in ambiente acido, come quello del vino;
- il peso molecolare medio: più questo sarà basso, maggiore sarà la densità di carica della molecola (preferibilmente inferiore a 100 kDa).

1.5.3.1. Azione chiarificante e stabilizzante

Grazie alle sue proprietà, dal 2011 il chitosano è stato ammesso in enologia per questi scopi, nella dose massima di 100 g/hL. Possiede infatti una forte affinità verso i polifenoli ossidati ed ossidabili (spesso migliore di gelatina o caseina) con conseguente flocculazione e precipitazione, in quanto tali sostanze presentano carica negativa. Di conseguenza si riscontrerà un sensibile miglioramento dell'NTU (Unità Nefelometrica di Torbidità).

1.5.3.2. Antisettica

Esplica una formidabile azione verso i batteri lattici ed acetici, anche sui i lieviti indigeni. L'Università di Tolosa (Taillandier *et al.*, 2014), ha eseguito uno studio per verificare le effettive modalità di azione del chitosano nel confronto dei microrganismi. Tale ricerca si è basata sull'analizzare ed osservare la reazione di

alcuni ceppi di *Brettanomyces bruxellensis*, dopo essere stati coltivati (inoculo iniziale di $5\text{-}20 \times 10^6$ cellule ml^{-1}) su apposito terreno di coltura (YPDA agar pH 3,5) e incubati a 30°C per 48 ore. Successivamente sono stati trattati con diverse concentrazioni di chitosano (grado deacetilazione $> 70\%$) e, attraverso diverse tecniche, si sono esaminati i comportamenti e le modificazioni delle cellule microbiche. In particolare, tra le altre analisi, sono stati utili due metodi analitici per monitorare gli effetti: conteggio delle cellule al microscopio ottico su camera Thoma, nella quale è stato usato il blu di metilene per evidenziare le cellule morte da quelle ancora vitali (incolori); impiego del sistema “*firefly luciferase*”, cioè un metodo altamente specifico basato sulla misurazione dell’emissione luminosa prodotta durante l’ossidazione della luciferina in presenza di ATP e ioni Mg (intensità della luce direttamente proporzionale alla concentrazione di ATP). Da tale ricerca è emerso che i principali effetti del chitosano osservati sui microrganismi sono stati due, cioè un fenomeno di adsorbimento a causa di interazioni elettrostatiche (Kong *et al.*, 2010; Goy *et al.*, 2016) che ha comportato l’aggregazione delle cellule alla molecola di chitosano e la successiva sedimentazione, con perturbazione del complesso parietale-membranoso, conseguente rilascio di ATP e morte cellulare. Il meccanismo d’azione non è semplice come si può pensare, ma un intricato processo di eventi, tra i quali vi sono teorie differenti. Questo processo risulterebbe da una serie di funzioni che si svolgono contemporaneamente e/o in successione, piuttosto che essere limitato tutto ad una sola molecola bersaglio. La sua carica policationica degli amminogruppi, come già introdotto, è in grado di garantire al chitosano la sua azione antisettica in quanto genera un’interazione elettrostatica con i componenti anionici presenti sulle pareti cellulari dei microrganismi (idrolisi di alcuni peptidoglicani parietali con perdite di elettroliti come il K^+ ed altri elementi di ridotto peso molecolare interni alla cellula, quali proteine di piccola taglia, acidi nucleici, glucosio e componenti enzimatiche). L’interazione fra la carica positiva delle molecole di chitosano e le membrane cellulari delle specie batteriche, cariche invece negativamente, causa squilibri a livello della membrana microbica con conseguenti sbilanciamenti a livello dell’equilibrio osmotico interno delle cellule dei batteri. Si ricorda anche la capacità di penetrare nella cellula microbica e di combinarsi con il suo DNA impedendo la trascrizione e la sintesi di mRNA e proteine. Effettivamente, alcune osservazioni realizzate mediante *Confocal*

Laser Scanning Microscope (CLSM, microscopia confocale a scansione laser) sono state in grado di evidenziare la presenza di oligomeri del chitosano all'interno di cellule batteriche. Stratificandosi sulla parete cellulare, il chitosano altererebbe la sua permeabilità, bloccando il passaggio di elementi nutritivi ed inibendo la crescita microbica. Il chitosano possiede una diversa efficacia in base al tipo di organismo attaccato: ad esempio i batteri Gram + (nel vino sono rappresentati dai batteri lattici), sono risultati molto più sensibili all'attività antimicrobica del chitosano, rispetto ai Gram - (batteri acetici) in quanto questi ultimi presentano un doppio strato lipidico semipermeabile esterno (membrana esterna) che agisce come un'ulteriore barriera di diffusione più spessa e di conseguenza più difficilmente penetrabile. L'interazione elettrostatica maggiore si ha nei Gram + poiché questi sono costituiti da acidi teicoici e lipoteicoici (polimeri polianionici) che attraggono il chitosano.

1.5.3.3. Antiossidante

A differenza dei vini rossi, dove la moderata presenza di ossigeno può essere anche benefica per la stabilizzazione del colore e del prodotto stesso, agendo soprattutto sull'interazione con tannini e antociani, nei bianchi l'ossigeno disciolto rappresenta un agente dannoso. In sua presenza, infatti, i composti fenolici del vino bianco vengono ossidati a chinoni, favorendo fenomeni alterativi di imbrunimento, variando anche negativamente il profilo organolettico che rappresenta, ad esempio, un vitigno autoctono. Per contrastare questi problemi, spesso si ricorre all'uso di prodotti ammessi come "solfiti", acido ascorbico, glutazione e tannini enologici. Negli ultimi anni, è stato ed è tutt'ora interessante scoprire l'affinità tra composti fenolici di vini ottenuti da uve a bacca bianca ed impiego di chitosano per impedirne l'imbrunimento. Alcuni ricercatori dell'Università di Bologna (Chinnici *et al.*, 2014) hanno voluto approfondire in merito all'attività antiossidante del chitosano, confrontandolo con l'anidride solforosa in una soluzione modello per entrambi i composti contenente fattori predisponenti per le ossidazioni e un pH di 3,6. Sono stati preparati in totale 3 campioni, lasciati al buio, a temperatura ambiente e a contatto con l'aria per 21 giorni, in modo da far agire i composti antiossidanti. Dal quattordicesimo al ventunesimo giorno si è potuto osservare che la soluzione contenente SO₂ si è significativamente più ossidata rispetto a quella contenente chitosano. Quest'ultimo, infatti, a differenza

della SO₂ rimane inalterato e attivo lungo tutto l'arco temporale del test, mentre la solforosa libera viene gradualmente consumata e di conseguenza non più disponibile alla protezione del campione dai fenomeni ossidativi. Inoltre, anche la concentrazione di tioli varietali caratterizzanti cultivar bianche come ad esempio il Sauvignon Blanc, sono rimaste più presenti nel campione con chitosano rispetto al campione con SO₂. L'azione antiossidante di 1 g/L del biopolimero si è dimostrata comparabile a 80 mg/L di solforosa libera per i primi 14 giorni.

1.5.3.4. Azione chelante

Attualmente vengono utilizzati trattamenti antimetallizzanti applicando ferrocianuro di potassio o fitato di calcio, due prodotti che devono essere somministrati da un addetto competente specializzato iscritto all'albo. Il trattamento con questi due prodotti richiede una procedura strettamente regolamentata con test preliminari e deve essere garantita la totale assenza di residui dopo il trattamento a causa della loro elevata tossicità. Inoltre, vi sono anche alcune tecniche preventive volte a ridurre il rischio delle casse metalliche, come le addizioni di acido ascorbico, acido citrico e gomma arabica. Tuttavia, questi additivi non risolvono il problema della tossicità di alcuni metalli pesanti e spesso non sono soluzioni definitive, ma solo temporanee (Ribèreau-Gayon *et al.*, 2007). Il già ben noto potere chelante ed adsorbente storicamente ascritto al chitosano, rende da un lato possibile l'abbattimento degli ioni metallici presenti nel mezzo trattato, azione che potrebbe privare le popolazioni indesiderate di oligoelementi essenziali al loro sviluppo, d'altro canto pare anche ipotizzabile una contestuale azione di cattura ed eliminazione dal substrato delle spore eventualmente presenti nella matrice da decontaminare. La funzione chelante del chitosano è già ampiamente utilizzata per il trattamento delle acque reflue di diversi settori industriali (Bornet *et al.*, 2005). Anche questa proprietà deriva dalla presenza di gruppi amminici che, in ambiente acido, vengono protonati trasformando la molecola in un policatione. Queste ammine protonate formano siti di legame multipli con cui diversi metalli (ferro, rame, zinco) vengono complessati tramite uno scambio ionico. Ma vi sono anche altri tipi di interazione che possono spiegare la chelazione di metalli pesanti. La chelazione avviene tramite i gruppi idrossilici (OH) situati in posizione 3 delle unità di glucosammina del chitosano o comunque dall'effetto chelante combinato tra i gruppi

idrossilici e quelli amminici della molecola. Le interazioni tra metallo e chitosano possono essere di tipo dativo o elettrostatico. Uno studio dell'università di Montpellier ha esaminato l'efficacia chelante, in particolare su ferro, piombo e cadmio del chitosano e di alcuni prodotti simili come la chitina e la chitina-glucano (in forma solida a granulometria variabile con particelle tra 75 e 125 ppm). Sono stati utilizzati un vino rosso, uno bianco e uno dolce, prodotti dalla vendemmia 2003. Per ogni tipologia di vino sono stati aggiunti i vari adsorbenti nelle dosi di 0,1, 0,5 e 1 g/L (tre campioni per tipo) e le miscele sono state agitate delicatamente e poi lasciate ad agire per 48 ore a 20°C. Le soluzioni sono state successivamente centrifugate a 3000 giri per 30 minuti a temperatura ambiente (20°C) per sedimentare gli assorbenti. Infine, aliquote di 50 ml del surnatante sono state prelevate per l'analisi dei metalli residui mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornetto a grafite (per ciascun vino è stato analizzato un campione non trattato come controllo) (Teissedre *et al.*, 2008). Nel caso della dose massima utilizzata, ovvero quella consentita dalla legge (100 g/hl), il chitosano ha rimosso oltre il 90% del ferro in tutti e tre i vini con un massimo del 98% in quello dolce. Il piombo è stato ridotto nel rosso, nel bianco e nel dolce rispettivamente al 26, 34 e 16%. Il cadmio invece è risultato l'elemento meno rimosso in percentuale, con un contenuto nei tre vini di 73, 89, 78%. Ad ogni modo il chitosano si è dimostrato il demetallizzante più efficiente tra i derivati di chitina provati, specialmente nel vino dolce, a causa dell'interferenza con gli zuccheri ai quali il chitosano è risultato l'unico indifferente. La percentuale di metalli chelati aumenta con l'aumentare delle dosi impiegate. Lo stesso esperimento è stato poi ripetuto ma valutando l'effetto chelante di ferro, piombo e cadmio (concentrazioni iniziali identiche a quelle del precedente studio) nelle tre tipologie di vini, a tre pH differenti. Come osservato precedentemente, il chitosano presenta nel complesso la più alta efficienza di rimozione, in particolare del ferro e del piombo. Il cadmio viene ridotto di meno in percentuale, probabilmente a causa della competizione per i siti amminici con il piombo che è presente a concentrazioni maggiori. Inoltre, per quanto riguarda il chitosano, si osserva come la sua efficienza aumenti a pH inferiori, in quanto possedendo un pKa di 6,3-6,5, aumenta la protonazione dei gruppi amminici e quindi anche l'efficacia. In conclusione, anche se si sono osservati gli effetti del chitosano solo sul ferro, piombo e cadmio, si può affermare che tale molecola può dare ottimi

risultati nella riduzione dei metalli prevenendo sia intorbidamenti dovuti a casse ferrica e rameica, sia riducendo le concentrazioni dei metalli pesanti tossici, limitando il rischio alla salute del consumatore. In questo modo, si potrebbe evitare l'impiego di altri additivi che possono implicare problemi, come appunto ferrocianuro di potassio e fitato di calcio.

1.5.3.5. Azione sugli enzimi

L'azione benefica di vari enzimi idrolitici dell'uva è spesso limitata a causa del pH del mosto o comunque di insufficiente attività, data la durata limitata dei trattamenti pre-fermentativi. Per queste ragioni sono stati sviluppati diversi preparati enzimatici, principalmente da alcune specie fungine impiegate in enologia. Ad esempio, l'enzima β -glicosidasi, enzimi pectolitici e altri vengono sfruttati per le loro azioni specifiche, con l'obiettivo di migliorare la qualità del vino. Queste preparazioni industriali, però, in alcuni casi non sono immediatamente pure, ma possono contenere anche diversi enzimi contaminanti come l'enzima cinnamato-decarbossilasi, che porta alla comparsa di fenoli volatili. Per questa ragione è necessario un adeguato sistema di purificazione e isolamento degli enzimi desiderati nei processi industriali. Il chitosano impiegato come superficie isolante, viene già usato per queste azioni anche tramite tecniche cromatografiche. Inoltre, si stanno studiando altri sistemi per impiegarlo nell'isolamento e nella purificazione di altri enzimi utilizzabili in enologia come anche in altri settori.

2. OBIETTIVI DELLA RICERCA

I prodotti a base di rame sono ancora oggi gli unici in grado di garantire un elevato livello di protezione delle viti dalla peronospora. L'aumento esponenziale delle superfici coltivate in biologico e la maggiore sensibilità dei consumatori riguardo l'impatto dell'attività agricola sull'ambiente, hanno posto l'attenzione sui rischi legati alle quantità eccessive di rame apportate negli agroecosistemi, soprattutto nelle aree viticole biologiche. A seguito dei rischi per la salute umana e l'ambiente legati all'impiego del metallo pesante in agricoltura, è emersa la necessità di ridurre e di regolamentarne l'utilizzo (Rusjan *et al.*, 2007). Dopo aver compreso gli aspetti negativi del rame, l'Unione Europea, attraverso disposizioni legislative via via sempre più stringenti ne sta regolamentando l'impiego in agricoltura: inizialmente con il Regolamento UE 473/2002 il limite imposto era di 6 kg/ha di rame metallo per anno, ma attualmente il limite è stato abbassato a 28 kg/ha nell'arco di 7 anni, ovvero una media annuale di 4 kg/ha (Regolamento UE 1981/2018). Inoltre, come già accennato, i prodotti a base di rame potrebbero presto scomparire dal mercato, dato che per le loro caratteristiche sono stati inseriti nella lista dei candidati alla sostituzione e, nell'ambito dell'*European Green Deal*, nel maggio 2020 la Commissione Europea ha approvato la strategia "*Farm to Fork*", che guiderà le future scelte politiche in ambito agroalimentare e nella quale sono stati fissati degli obiettivi da raggiungere nel prossimo futuro, come ad esempio il dimezzamento dei pesticidi chimici (partendo da quelli pericolosi come il rame) e l'aumento delle superfici bio, destinando il 25% dei terreni agricoli ad agricoltura biologica entro il 2030. Il seguente lavoro di tesi è stato sviluppato partecipando ad attività sperimentali nell'ambito del progetto *PSR Marche "Vitinova"*, il quale propone di innovare le strategie di protezione antiperonosporica delle viti in agricoltura biologica attraverso l'uso di sostanze alternative al rame di comprovata efficacia, come il chitosano, impiegandolo in condizioni aziendali. Negli anni di sperimentazione, verranno inoltre monitorati lo sviluppo vegetativo, l'equilibrio vegeto-produttivo ed il decorso della maturazione delle uve tramite tecniche agronomiche come la "*precision farming*", così da modulare gli interventi agronomici e mitigare gli effetti dei cambiamenti climatici, seguendo anche la linea tracciata dalla strategia "*Farm to Fork*". In ambito enologico, oltre a limitare la presenza dello ione Cu in bottiglia, si vogliono contenere i livelli di anidride solforosa

e idrogeno solforato nei vini, impiegando ceppi di lieviti basso-produttori di SO₂ insieme ad un'adeguata sanità delle uve e della cantina.

Il presente elaborato si propone di studiare eventuali influenze sulla qualità del prodotto finale di strategie di protezione innovative dalla peronospora della vite, sperimentate su scala commerciale. L'obiettivo, nello specifico, è quello di valutare l'efficacia in campo sulle infezioni tardive di peronospora, di trattamenti antiperonosporici a base di chitosano, utilizzato da solo o posto in diverse strategie con il rame. Successivamente, saranno seguiti dei protocolli di microvinificazione sulle uve provenienti dal vigneto sperimentale e verranno condotte analisi di laboratorio sulle bacche, sui mosti e sui vini prodotti, per cercare di valutare eventuali differenze o influenze sulla qualità, dovute ai trattamenti in campo con chitosano per la protezione antiperonosporica. Risulta infatti importante valutare, oltre all'efficacia in campo, anche eventuali effetti collaterali indesiderati a carico del prodotto finale, che possono essere causati dalle molecole innovative studiate per sostituire quelle tradizionali.

3. MATERIALI E METODI

3.1. VIGNETO SPERIMENTALE

Le prove discusse in questa tesi sono state condotte su uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale, gestito dall'azienda agricola "Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr.", ubicato ad Angeli di Varano (AN), nell'area di produzione del Rosso Conero. L'appezzamento è esposto a sud, ha un'estensione di circa 3,4 ha, è allevato in parete e il sesto d'impianto prevede 2,2 m tra le file e 1 metro sulle file. Lo studio sperimentale ha interessato una superficie di 1,5 ha del vigneto, comprendendo 36 filari, suddivisi tra 5 diverse tesi a confronto da circa 3000 m² ciascuna. Nel vigneto l'area destinata alla sperimentazione è stata suddivisa in cinque tesi (o strategie innovative), messe a confronto secondo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni (Figura 11). 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, fra quelli selezionati per i rilievi patometrici 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 sintomatici, poi 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 tre blocchi con cinque piante ciascuno, rappresentativi dell'intero vigneto sui tre filari centrali di ogni tesi, nei quali successivamente sono stati effettuati i rilievi patometrici. 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.



Figura 11 - Ripartizione dei vari trattamenti antiperonosporici saggiati all'interno del vigneto sperimentale di proprietà dell'azienda "Terre Cortesi Moncaro", nei pressi di Angeli di Varano (AN) con fotografia aerea estrapolata da Google Earth 3D.

3.2. STRATEGIE DI PROTEZIONE ANTIPERONOSPORICA SAGGIATE

La valutazione dell'efficacia antiperonosporica del chitosano in un contesto aziendale è stata effettuata ipotizzando quattro diverse strategie di protezione antiperonosporica (o tesi) a confronto con un testimone non trattato, le quali si differenziano tra loro per il tipo di trattamenti effettuati durante la stagione (Tabella 1); nel dettaglio, si possono individuare le seguenti porzioni:

- Testimone non trattato (NT);
- Testimone aziendale (AZ): trattato tutto l'anno con prodotti a base di rame;
- Trattamenti con chitosano (CH): concentrazione 0.50% di principio attivo 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 degli altri trattamenti contenenti chitosano. Inoltre, in tutte e cinque le tesi è stata mantenuta la difesa antioidica con i soliti protocolli aziendali. 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. I trattamenti sono stati eseguiti dal 30 aprile 2021 al 21 luglio 2021 con cadenza variabile: abbastanza ravvicinati nel periodo primaverile-estivo, più dilazionati invece col progredire della stagione, tenendo in considerazione le condizioni meteorologiche e l'andamento stagionale; complessivamente sono stati effettuati 7 interventi antiperonosporici (posizionamento degli interventi in Tabella 2).

Tabella 1 - Diverse strategie di applicazione del chitosano e formulati cuprici con relativi principi attivi, dosaggi e volumi d'irrorazione considerati per i trattamenti antiperonosporici effettuati nel vigneto di Angeli di Varano (AN).

Trattamenti	Principi attivi	Dose o Concentrazione (%)	Volumi d'irrorazione
AZ	Idrossido di rame Solfato di rame tribasico e neutralizzato	Programma aziendale	da 100 L/ha fino a 400 L/ha
CH	Chitosano cloridrato	Chitosano 0,5%	da 650 L/ha fino a 1000 L/ha
AL	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano cloridrato	prima metà della stagione come AZ poi Chitosano 0,5%	
CO	Chitosano cloridrato + Ossicloruro di rame	Chitosano 0,25% + ½ DP (125 mL/hL)	

Tabella 2 - Dettaglio del posizionamento dei trattamenti antiperonosporici durante la stagione e relativa fase fenologica del Montepulciano nel vigneto.

Data trattamento	Fase fenologica
30/04/2021	"9 or more leaves unfolded " BBCH19
10/05/2021	"Inflorescences clearly visible" BBCH53
25/05/2021	"Inflorescences swelling, flowers closely pressed together" BBCH55
28/05/2021	"Inflorescences fully developed; flowers separating" BBCH57
05/06/2021	"Beginning of flowering: 10% of flowerhoods fallen" BBCH61
24/06/2021	"Berries goat-sized, bunches begin to hang" BBCH73
21/07/2021	"Majority of berries touching" BBCH79

3.3. ANDAMENTO METEOROLOGICO STAGIONALE

L'andamento meteorologico condiziona fortemente gli sviluppi ed il decorso delle principali malattie delle colture agrarie, vite inclusa. Studiare le condizioni meteorologiche permette non solo di stimare la presenza di condizioni favorevoli all'inizio delle malattie, ma anche di mettere a punto le strategie di protezione più idonee alla loro gestione. È noto infatti come, ad esempio, un'elevata umidità portata dalle precipitazioni favorisca l'insorgenza di malattie fungine e gli agenti fitopatogeni come *P. viticola*. Nell'ambito di questa ricerca, sono stati costantemente raccolti ed elaborati i dati meteorologici forniti settimanalmente su base provinciale dal "Notiziario Agrometeorologico" dell'ASSAM (Agenzia Servizi Settore Agroalimentare delle Marche), in modo da avere un completo quadro informativo riguardante l'andamento meteorologico stagionale. Più precisamente, sono stati raccolti i dati riguardanti la stazione meteorologica di Camerano (AN) data la prossimità con il vigneto oggetto della sperimentazione, per un periodo compreso fra l'inizio di gennaio e la prima decade di settembre 2021.

3.4. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI

Oggetto della tesi sono state le valutazioni d'efficacia dei trattamenti svolti durante l'anno, a carico delle infezioni tardive di peronospora e quindi del livello di malattia presente in prossimità della raccolta. Il rilievo è stato condotto il 29 settembre 2021 e sono state prese in considerazione le infezioni peronosporiche a carico sia delle foglie che dei grappoli. Il rilievo è stato svolto in 3 blocchi lungo i filari: parte iniziale del filare situata a monte, un blocco al centro del filare) ed infine uno nella la parte terminale del filare, posta a valle del vigneto. 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 (Tabella 3) o al numero di bacche infette per ogni grappolo (Tabella 4). Per quanto riguarda le foglie, ai fini dello studio si considera che le piante prese in esame abbiano in totale una media 100 foglie ciascuna, classificando quelle malate con 10 differenti classi di gravità della malattia. Il numero di grappoli invece è stato contato per ogni pianta.

L'adozione di scale empiriche permette di stimare alcuni parametri patometrici, come 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:

$$D = n \cdot 100 / N$$

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, è stata calcolata tramite la seguente formula:

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

c: valore classe empirica

f: frequenza della classe

N: numero totale delle osservazioni

X: valore della classe massima della scala empirica.

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:

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

c: valore classe empirica

f: frequenza della classe

N: numero totale delle osservazioni

X: valore della classe massima della scala empirica.

Successivamente si sono calcolate le medie e le deviazioni di ciascun blocco e di ciascuna tesi ed è stata condotta un'analisi statistica; il software di statistica impiegato per questa analisi prende il nome di SPSS20 (*Statistical Package for Social Science*). È stata eseguita 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 $P \leq 0,05$.

Tabella 3 - Scala empirica utilizzata per il rilievo della malattia sulle foglie.

Classe di malattia	Superficie fogliare 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%

Tabella 4 - Scala empirica utilizzata per il rilievo di malattia sui grappoli.

Classe di malattia	Numero di bacche infette o % di grappolo infetta
0	Grappolo sano
1	1-5 bacche
2	6-11 bacche
3	12-25 bacche
4	25%
5	26-50%
6	51-75%
7	76-100%

3.5. RACCOLTA DELLE UVE E DELLE FOGLIE

Sono state effettuate due tipologie di raccolta delle uve di Montepulciano: un campionamento ed una vendemmia delle tesi sperimentali. Nel primo caso sono stati prelevati 3 campioni di bacche da 0,5 kg ciascuno (3 repliche) da tutte e 5 le tesi (per un totale di 1,5 kg d'uva per ogni tesi) presenti nel vigneto sperimentale, in modo da effettuare delle analisi accurate sui parametri qualitativi delle uve e valutarne le caratteristiche in relazione ai trattamenti effettuati durante la stagione per gestire la peronospora. Una volta raggiunta la giusta maturazione e valutate le previsioni meteo, si è svolta la vendemmia, avvenuta manualmente in data 5 ottobre 2021, con cassette da 20/30 kg che venivano poi svuotate in dei bins, condotti subito in azienda per la vinificazione e le analisi. Sono state raccolte in questo caso 2 repliche da ogni tesi da circa 100 kg di uva ciascuna, per un totale complessivo di 200 kg per ogni tesi. Le uve prelevate sono state mantenute separate perché sono state svolte delle microvinificazioni, in modo da valutare l'eventuale influenza e le eventuali differenze che le strategie di protezione antiperonosporica saggiate hanno avuto o hanno indotto sui mosti e vini ottenuti.

Inoltre, è stato condotto un campionamento delle foglie in data 5 ottobre 2021 con lo scopo di valutare la presenza di rame residuo sulle stesse, dato che con la raccolta meccanica una quota variabile di foglie può finire insieme alle uve, contaminando queste ultime con i residui di rame. In particolare, sono state raccolte 2 repliche da ogni tesi, da circa 20 foglie ciascuna; le foglie campionate dovevano essere sane, distese e si trovavano in prossimità della fascia produttiva, preferibilmente in posizione opposta al grappolo.

3.6. ANALISI DEI PARAMETRI QUALITATIVI DELLE UVE E DEL LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DA RAME DELLE UVE E DELLE FOGLIE

I campioni di uve e di foglie di Montepulciano sono stati conferiti presso il laboratorio analisi della cantina della società cooperativa Terre Cortesi Moncaro nella sede di Montecarotto rispettivamente in data 30 settembre 2021 e 5 ottobre 2021 e sottoposti a valutazioni di laboratorio: sulle foglie è stato determinato il livello di contaminazione da rame, mentre dai campioni di uve sono stati analizzati i seguenti parametri:

- indice rifrattometrico, espresso in gradi Brix (%);
- acidità totale (g/L);
- pH, per verificarne la giusta acidità;
- acido malico (g/L);
- azoto alfa amminico (mg/L);
- azoto ammoniacale (ammonio) (mg/L);
- azoto prontamente assimilabile (APA) (mg/L), la frazione azotata non proteica, data dalla somma dell'azoto amminico (NH₂) e dell'azoto ammoniacale (NH₃);
- rame, per valutare la quantità residuale (mg/L).

Tutte le analisi sono state condotte utilizzando la strumentazione *Foss WineScan*, ad eccezione del rame che invece è stato valutato sia per le uve che per le foglie mediante l'analizzatore automatico *Hyperlab Smart*, il quale effettua test chimici mediante saggi enzimatici. Per ogni parametro rilevato sono state calcolate le medie e le deviazioni standard per ogni tesi; successivamente, è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) per confrontare i diversi trattamenti, utilizzando il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) secondo il livello di probabilità $P \leq 0,05$.

3.7. MICROVINIFICAZIONI

Quando si vogliono sperimentare nuovi protocolli di vinificazione o utilizzare prodotti innovativi, è consigliato svolgere il tutto su piccola scala, tramite delle microvinificazioni. In questo caso sono state infatti vinificate piccole quantità di uva in vinificatori da 100 L (circa 70 dei 100 kg provenienti da ogni replica, per evitare di colmare completamente il vinificatore). I protocolli delle microvinificazioni seguono uno standard definito in base alla tipologia di vino che si intende realizzare, oppure possono essere stabiliti diversamente quando si tratta di una sperimentazione scientifica atta a valutare determinate caratteristiche e differenze che si ottengono dai prodotti utilizzati sia in campo, come in questo caso, che in cantina.

3.7.1. Protocollo di vinificazione adottato

La vinificazione delle uve provenienti dal vigneto di Angeli di Varano (AN), è avvenuta presso la cantina dell'Azienda "Terre Cortesi Moncaro", nella sede di Montecarotto (AN) ed è iniziata in data 5 ottobre 2021. Le uve raccolte sono state vinificate in doppio, seguendo il seguente protocollo:

- diraspa-pigiatura;
- aggiunte al pigiato di: metabisolfito di potassio 5 g/hl, tannino liquido L-Harvest 10 g/hL, tannino Fermcolor 3 g/hl, acido ascorbico 3 g/hL, metabisolfito di potassio 12 g/hL, lievito NT 116 20 g/hL, attivante V Starter Premium 10 g/hL;
- fermentazione in vinificatori di acciaio inox da 100 litri con cappello sommerso da una grata di acciaio inox. Per i primi 4 giorni di fermentazione sono stati aggiunti 15 g/hL di fosfato biammonico e per i primi 3 giorni anche 10 g/hL di V Starter Premium;
- durante la macerazione a cappello sommerso sono stati effettuati n.5 delestage (rimontaggi);
- al secondo giorno di macerazione sono stati aggiunti tannino Fermicolor 2 g/hL, Enopar Wine Eno 10 g/hL;
- svinatura e aggiunta di Cooper Enartis 10 ml/hL, tannino Elevage Enartis 2 g/hL;
- travaso all'aria separando la feccia;
- aggiunta di Cooper Enartis 20 ml/hl;
- sfecciatura.

Le uve destinate alla vinificazione sono state prelevate da tutte e cinque le strategie di protezione antiperonosporica saggiate (NT, AZ, CH, AL, CO) e sono stati analizzati i principali parametri qualitativi sia dei mosti che dei vini. Per quanto riguarda i mosti, è stato condotto un unico rilievo in data 6 ottobre 2021 e sono stati considerati i seguenti parametri: i gradi Brix, l'acidità totale, il pH, l'acido malico, il totale dei solfuri, gli zuccheri, l'APA (azoto prontamente assimilabile). I rilievi a carico del vino sono avvenuti periodicamente sulle tesi microvinificate, anche se non tutti i parametri sono stati ripetuti ad ogni rilievo; in dettaglio, i rilievi sulle microvinificazioni sono avvenuti nelle seguenti date: 8, 12, 14, 18, 23, 28 ottobre, 5 e 11 novembre. Per quanto

riguarda le analisi dei vini, condotte a partire dall'inizio fermentazione (08 ottobre 2021), sono stati presi in considerazione un numero maggiore di parametri rispetto a quelli considerati per il mosto (Tabella 5). Tutte le analisi sono state condotte anche in questo caso utilizzando la strumentazione *Foss WineScan* ad eccezione delle solforose, le quali sono state determinate per via iodometrica con titolatore automatico e del rame che invece è stato valutato mediante l'analizzatore automatico *Hyperlab Smart* (il quale effettua test chimici mediante saggi enzimatici). Per ogni parametro rilevato sono state calcolate le medie e le deviazioni standard per ogni tesi; successivamente, è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA) per confrontare i diversi trattamenti, utilizzando il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) secondo il livello di probabilità $P \leq 0,05$.

Tabella 5 - Dettaglio dei parametri (con relativa unità di misura) considerati ad ogni rilievo condotto sulle microvinificazioni di Montepulciano.

Parametri analizzati (u.m.)	08/10/2021	12/10/2021	14/10/2021	18/10/2021	23/10/2021	28/10/2021	05/11/2021	10/11/2021
Alcol (% vol/vol)	x	x	x	x	x	x	x	x
Acidità totale (g/L)	x	x	x	x	x	x	x	x
pH	x	x	x	x	x	x	x	x
Acidità volatile (g/L)	x	x	x	x	x	x	x	x
Zuccheri (g/L)	x	x	x	x	x	x	x	x
Acido malico (g/L)	x	x	x	x	x	x	x	x
Densità	x	x	x	x	x	x	x	
Acido lattico (g/L)	x	x	x	x	x	x	x	x
Acido tartarico (g/L)	x							
APA (mg/L)	x							
Estratto secco (g/L)		x	x	x	x	x	x	
Polifenoli totali (mg/L)		x	x	x	x	x	x	
Antociani (mg/L)		x	x	x	x	x	x	
SO ₂ libera (mg/L)				x				x
SO ₂ totale (mg/L)				x				x

4. RISULTATI

4.1. ANDAMENTO METEOROLOGICO STAGIONALE

I dati raccolti dalla stazione meteorologica di Camerano (Figura 12) ci indicano un decorso di meteorologico eccezionale e confermano la situazione che si è verificata a livello regionale. Escluso gennaio, tutti i mesi da febbraio a luglio sono stati caratterizzati da precipitazioni inferiori alla norma, fatto questo che ha provocato segni di siccità su tutto il territorio regionale. In un periodo, quello dei primi cinque mesi dell'anno, in cui nella nostra regione dovrebbero cadere in media 293 mm, 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 135 mm e l'anomalia al -44%. Le prestazioni peggiori si sono registrate nel mese di maggio: 22 mm il totale, -62% l'anomalia; quello del 2021 è stato il terzo maggio più secco per le Marche dal 1961. In altre parole, mai nella nostra regione è piovuto così poco negli ultimi 61 anni. La precipitazione totale media regionale nel periodo gennaio-luglio è stata di 267 mm corrispondente ad un calo del 33% rispetto allo storico 1981-2010 (ASSAM, 2021). Infine, le ultime due settimane del mese di agosto hanno invece segnato una svolta rispetto alla tendenza di caldo e scarsità di precipitazioni che hanno accompagnato la regione per buona parte dei mesi di luglio e agosto. Oltre alle precipitazioni, anche il livello delle temperature è stato eccezionale: l'estate più calda (periodo da giugno ad agosto) per le Marche è stata quella del 2003 quando la temperatura media regionale fu di 25,3°C corrispondente alla eccezionale anomalia di +3,2°C rispetto alla media storica di riferimento 1981-2010. Il periodo che comprende l'inizio di giugno fino la prima decade di agosto può essere considerato uno dei periodi più caldi mai registrati dal 1961, con una temperatura media regionale di 25°C corrispondente ad una differenza di +2,9°C rispetto 1981-2010, seconda quindi solo all'estate del 2003 (ASSAM, 2021).

È possibile dedurre quindi che tali condizioni meteorologiche, alte temperature e basse precipitazioni, abbiano sfavorito l'insorgenza delle malattie fungine in generale e, in particolare, di peronospora.

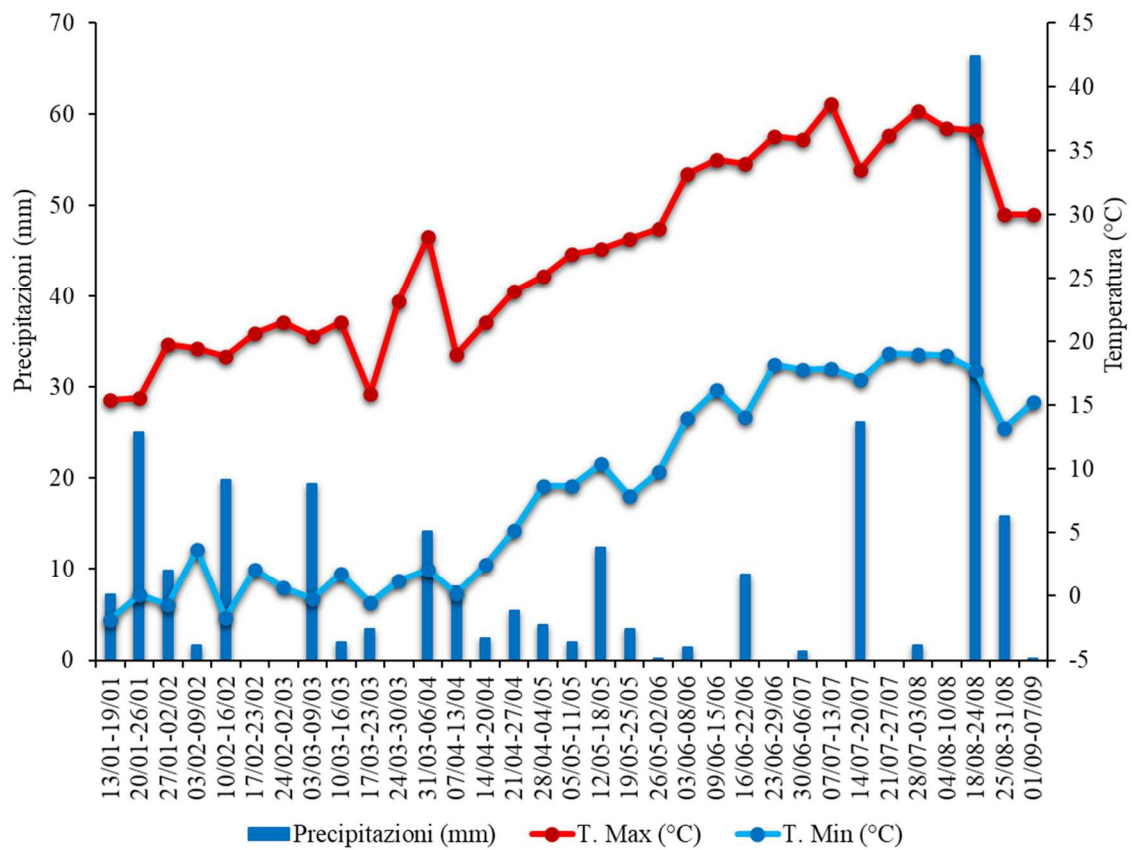


Figura 12 - Grafico dell'andamento meteorologico registrato nel periodo che va da inizio gennaio alla prima decade di settembre 2021. Dati forniti dalla stazione metereologica ASSAM di Camerano (AN).

4.2. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SU FOGLIE

La diffusione (%) delle infezioni tardive di peronospora su foglie risulta statisticamente inferiore rispetto al testimone non trattato in tutte le strategie di protezione saggiate. In particolare, si noti come i trattamenti alternati (prima rame e poi chitosano durante la stagione) e quelli dove il biopolimero ed il metallo pesante sono stati somministrati in combinazione per tutto l'anno abbiano portato a contenimenti della diffusione non statisticamente dissimili da quelli ottenuti con i protocolli aziendali. Inoltre, anche le piante trattate con il chitosano da solo per tutta la stagione hanno mostrato una riduzione significativa rispetto alle piante non trattate (Figura 13).

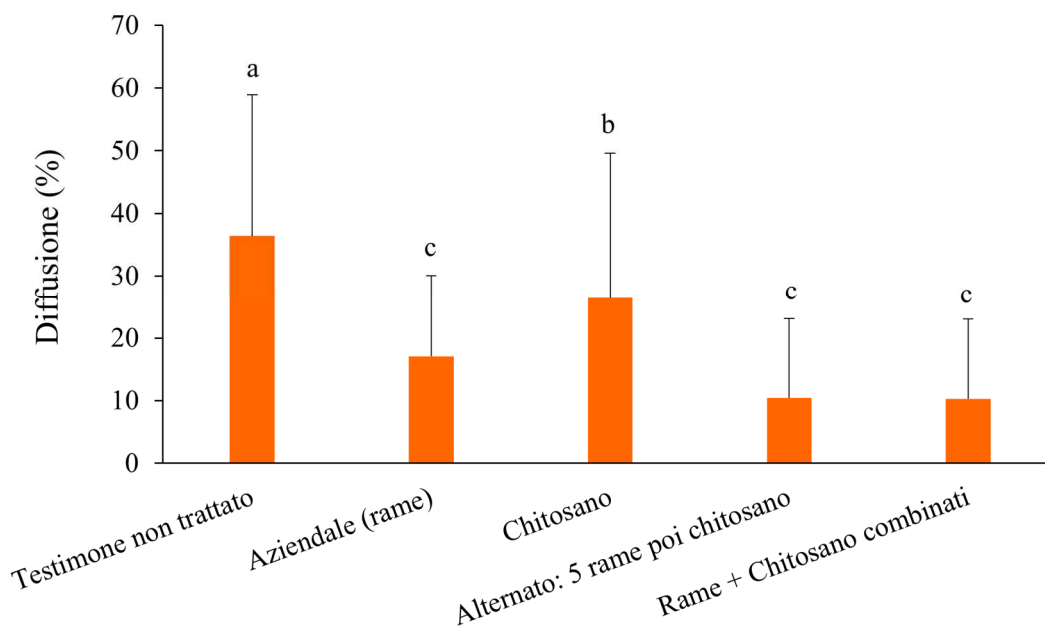


Figura 13 - Diffusione (%) della peronospora su foglie di Montepulciano; rilievo condotto presso il vigneto di Angeli di Varano (AN) il giorno 29 settembre 2021. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

Come si può notare dalla Figura 14, le piante che hanno subito i trattamenti aziendali (a base di rame) hanno manifestato sulle foglie un livello di gravità di infezione significativamente inferiore rispetto alle altre. È importante inoltre sottolineare come la tesi con solo chitosano non sia risultata differente statisticamente da quelle dove il biopolimero è stato alternato o combinato al rame, con valori di gravità statisticamente identici.

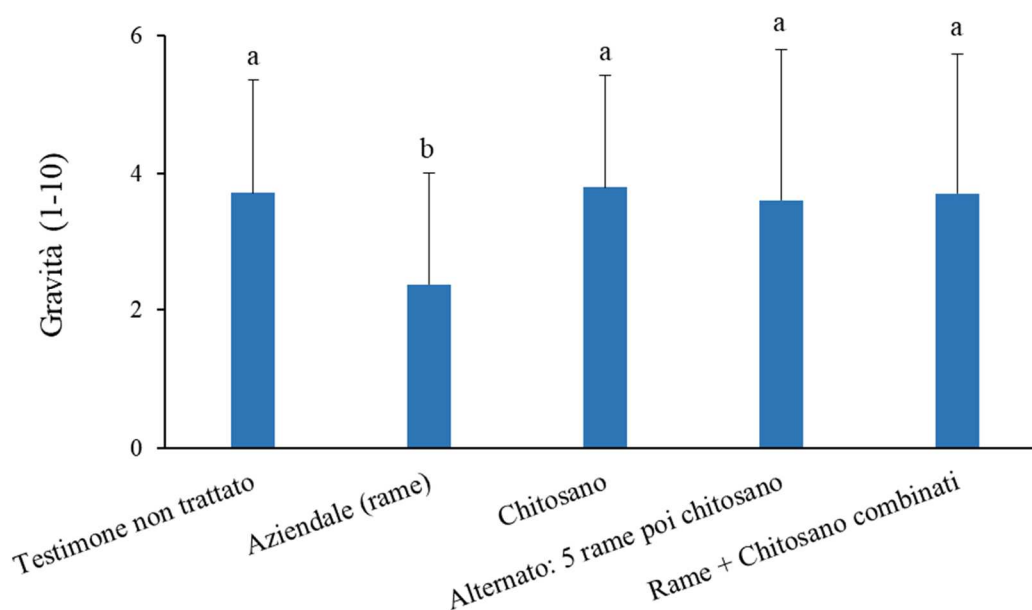


Figura 14 - Gravità (1-10) della peronospora su foglie di Montepulciano; rilievo condotto presso il vigneto di Angeli di Varano (AN) il giorno 29 settembre 2021. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

Per quanto riguarda l'intensità media ponderata della peronospora sulle foglie in prossimità della raccolta (Figura 15) è possibile affermare come il livello di malattia più elevato sia stato riscontrato nel testimone non trattato; tutti i trattamenti effettuati, ad eccezione del chitosano da solo, hanno fatto registrare una riduzione del parametro statisticamente significativa. Nessuna differenza significativa in termini di contenimento della malattia fra il protocollo aziendale e i trattamenti con rame e chitosano alternati durante l'anno o somministrati in combinazione.

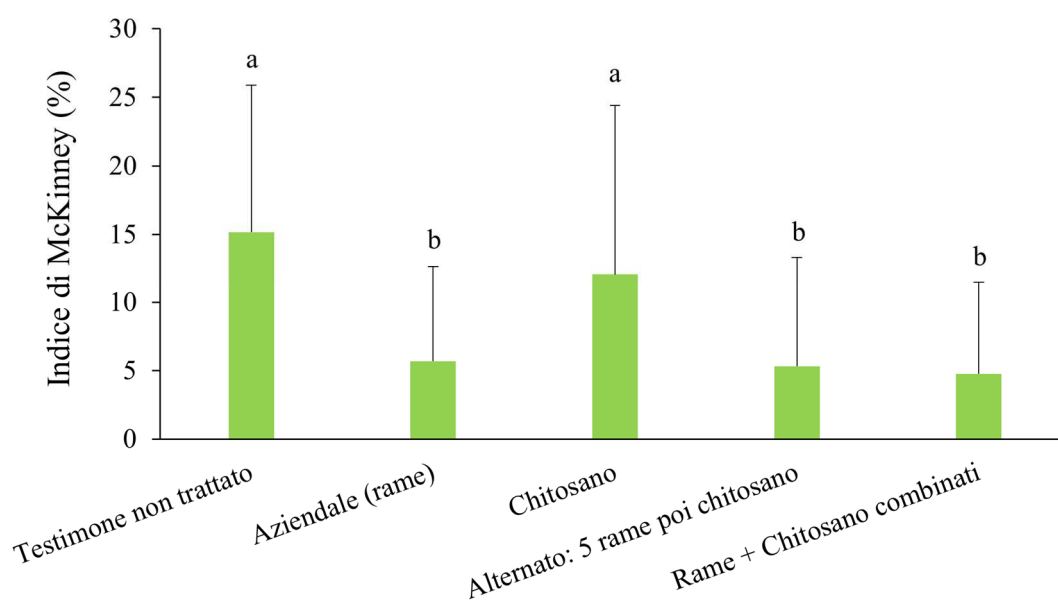


Figura 15 - Indice di McKinney (%) della peronospora su foglie di Montepulciano; rilievo condotto presso il vigneto di Angeli di Varano (AN) il giorno 29 settembre 2021. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

4.3. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI DI PERONOSPORA SU GRAPPOLI

Nel grafico sottostante (Figura 16), nonostante i trattamenti aziendali (solo rame) e quelli combinati (rame + chitosano) abbiano fatto registrare dei valori di diffusione di peronospora larvata inferiori rispetto agli altri trattamenti, la bassa pressione della malattia non ha consentito di apprezzare differenze statisticamente significative fra le varie strategie adottate.

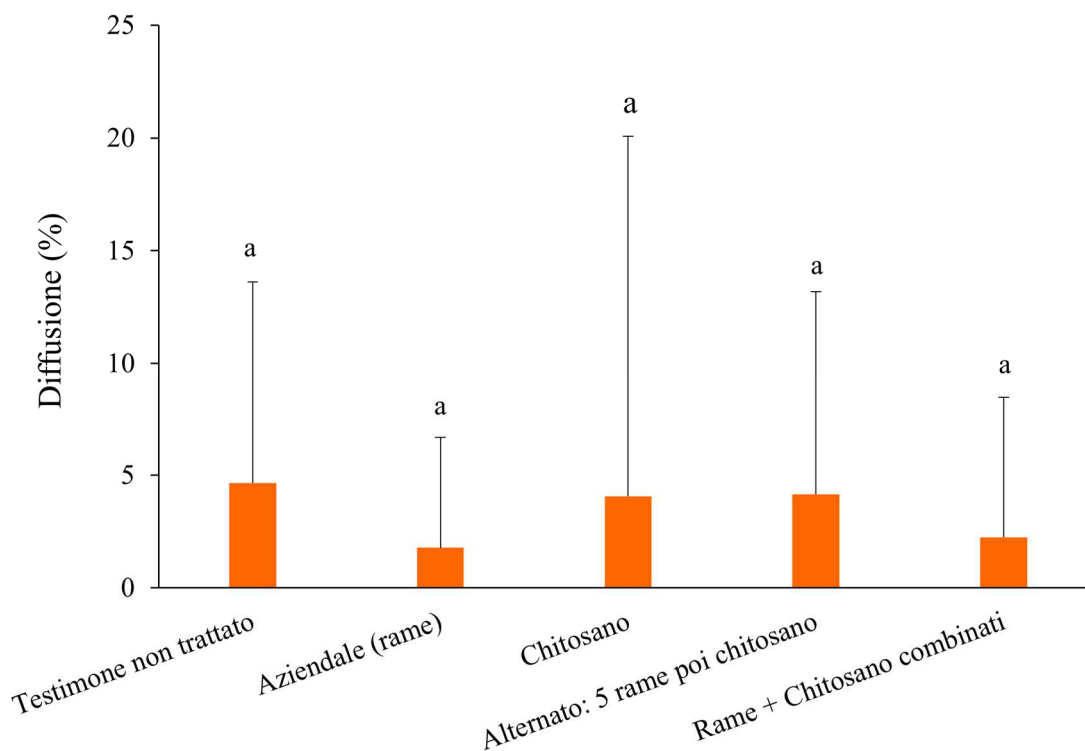


Figura 16 - Diffusione (%) della peronospora su grappoli di Montepulciano; rilievo condotto presso il vigneto di Angeli di Varano (AN) il giorno 29 settembre 2021. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

La gravità dei sintomi di peronospora larvata risulta più elevata nelle tesi contenenti chitosano, sia da solo che in associazione al rame. Il testimone aziendale rappresenta la tesi che ha ridotto maggiormente la gravità dei sintomi (Figura 17).

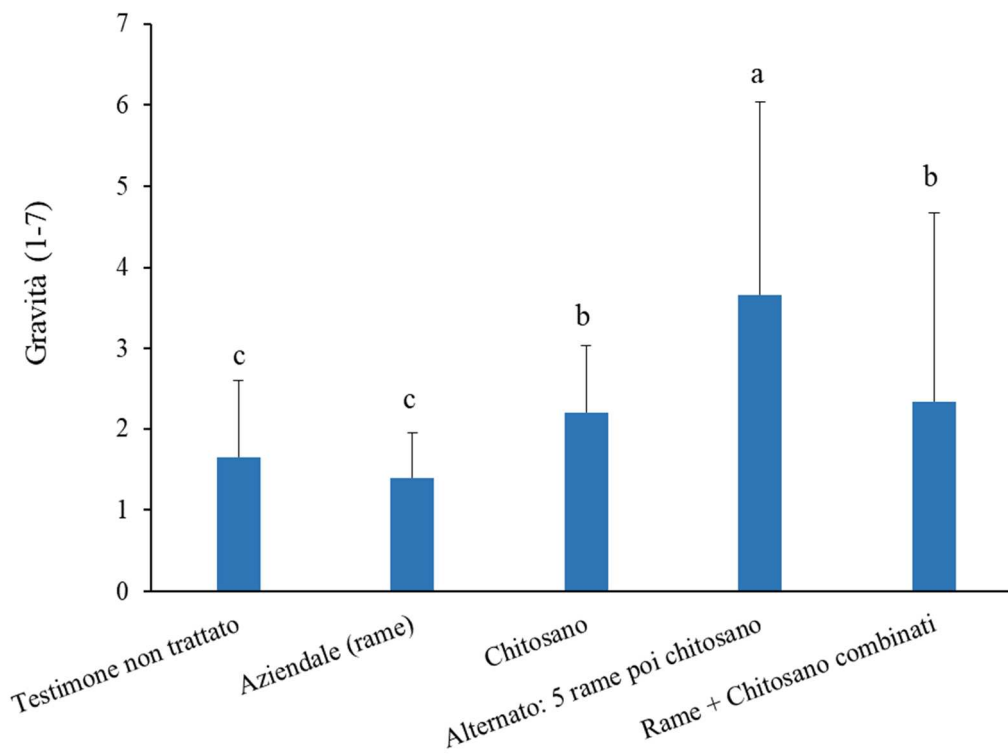


Figura 17 – Gravità (1-10) della peronospora su grappoli di Montepulciano; rilievo condotto presso il vigneto di Angeli di Varano (AN) il giorno 29 settembre 2021. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

Complessivamente, l'intensità media ponderata della malattia a fine settembre sui grappoli, influenzata dall'andamento meteorologico stagionale, risulta particolarmente bassa, tanto da non permettere l'individuazione di differenze statisticamente significative fra i vari trattamenti antiperonosporici saggiati. Ad ogni modo, i trattamenti comprendenti chitosano sia da solo che in associazione al rame, hanno garantito un livello di protezione dei grappoli statisticamente uguale ai trattamenti aziendali a base di rame (Figura 18).

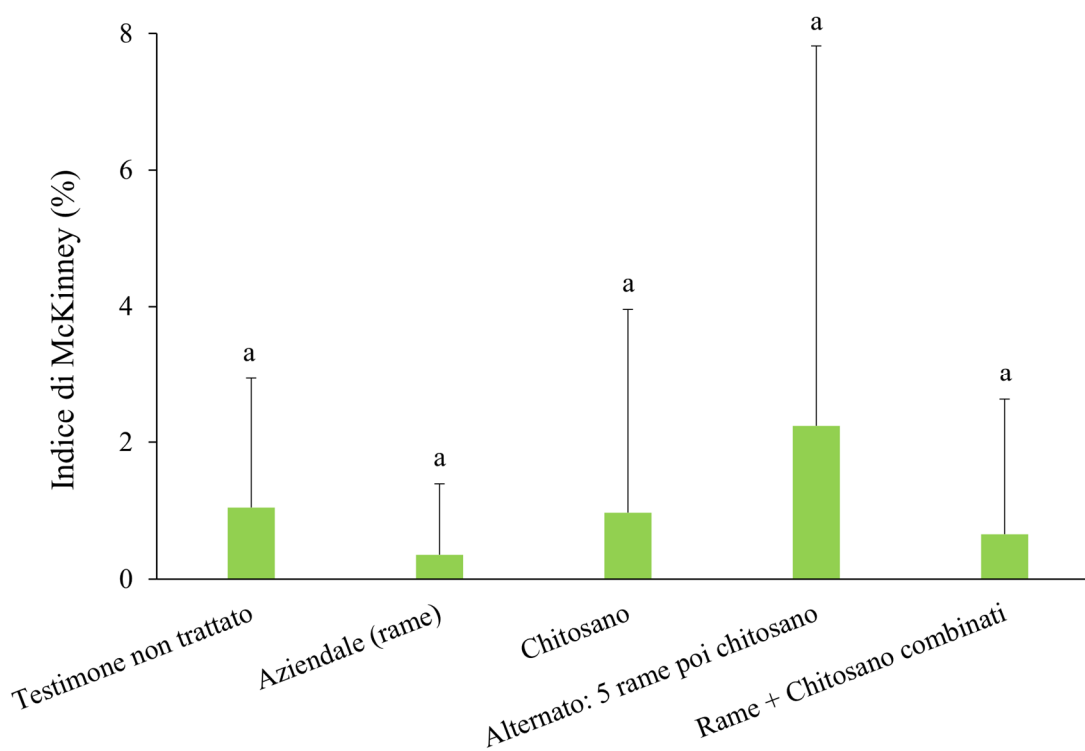


Figura 18 - Indice di McKinney (%) della peronospora su grappoli di Montepulciano; rilievo condotto presso il vigneto di Angeli di Varano (AN) il giorno 29 settembre 2021. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD ($P \leq 0,05$).

4.4. ANALISI DEI PARAMETRI QUALITATIVI DELLE UVE E DEL LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DA RAME DELLE UVE E DELLE FOGLIE

Osservando i valori mostrati nella Tabella 6 si può affermare che i trattamenti utilizzati nella sperimentazione non hanno influenzato negativamente i parametri relativi alla qualità delle uve investigati con lo strumento *Foss WineScan*. I parametri analizzati infatti non mostrano delle differenze statisticamente significative fra i vari trattamenti effettuati, ad eccezione del livello di rame sulle bacche (Figura 19). Sui campioni di uva prelevati, con l'ausilio dello strumento *Hyperlab Smart*, sono state effettuate infatti anche delle analisi circa quantità di rame residuo sulle bacche e quindi nel mosto prodotto. Come mostrato dal grafico, si noti come sia stata osservata una riduzione statisticamente significativa della contaminazione delle bacche dovuta al metallo pesante tra il testimone aziendale, risultato con una quantità di rame di 0,82 mg/L e tutte le altre tesi in prova; sulle uve trattate durante l'anno con solo chitosano, è stata registrata una quantità di rame di 0,27 mg/L, quantitativo statisticamente uguale da quello registrato sul testimone non trattato (0,28 mg/L di rame); anche l'alternanza dei trattamenti rameici con quelli a base di chitosano ha fatto registrare una contaminazione da rame residuale sulle uve non significativamente distante dal valore del testimone non trattato, in quanto sulle uve trattate con i prodotti somministrati alternativamente (prima rame e poi chitosano) sono stati registrati solamente 0,09 mg/L di rame in più rispetto alla tesi testimone dove il rame non è stato somministrato affatto. La tesi dove il chitosano e il rame sono stati somministrati in combinazione per tutta la stagione, si colloca ad un livello intermedio, con un quantitativo di 0,55 mg/L di rame, comunque statisticamente inferiore alla strategia di protezione aziendale e non dissimile dai trattamenti alternati. Con analoga strumentazione, è stato determinato anche il quantitativo di rame presente sulle foglie della fascia produttiva a fine stagione: come si evince dal grafico (Figura 20), le foglie delle parcelle non trattate o trattate con solo chitosano mostrano i valori di contaminazione più bassi (senza differenze statisticamente significative fra loro), mentre in tutte le altre tesi (trattamenti alternati, combinati e testimone aziendale) è stato trovato un quantitativo di rame residuale significativamente più elevato.

Tabella 6 - Risultati delle analisi condotte su uve Montepulciano. I valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) secondo il livello di probabilità $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Brix (%)	Babo	Acidità totale (g/L)	pH	Acido malico (g/L)	N amminico (mg/L)	N ammoniacale (mg/L)	APA (mg/L)
Non trattato	21,97 ±0,83 a	18,93 ±0,73 a	6,01 ±0,33 a	3,14 ±0,02 a	0,30 ±0,28 a	41,67 ±9,07 a	6,33 ±4,51 a	48,00 ±12,17 a
Chitosano	21,63 ±1,22 a	18,63 ±1,03 a	6,38 ±0,47 a	3,11 ±0,06 a	0,65 ±0,28 a	37,33 ±14,01 a	5,00 ±4,58 a	42,33 ±18,23 a
Alternati	21,57 ±1,19 a	18,57 ±2,02 a	6,76 ±0,53 a	3,12 ±0,04 a	0,84 ±0,54 a	29,67 ±0,58 a	9,00 ±3,61 a	38,67 ±4,04 a
Combinati	22,83 ±1,00 a	19,68 ±0,87 a	5,97 ±0,54 a	3,19 ±0,11 a	0,64 ±0,23 a	48,33 ±17,04 a	1,33 ±1,15 a	49,67 ±15,89 a
Aziendali	22,30 ±0,62 a	19,20 ±0,53 a	5,87 ±0,38 a	3,22 ±0,10 a	0,58 ±0,18 a	53,00 ±14,11 a	0,67 ±1,15 a	53,67 ±15,18 a

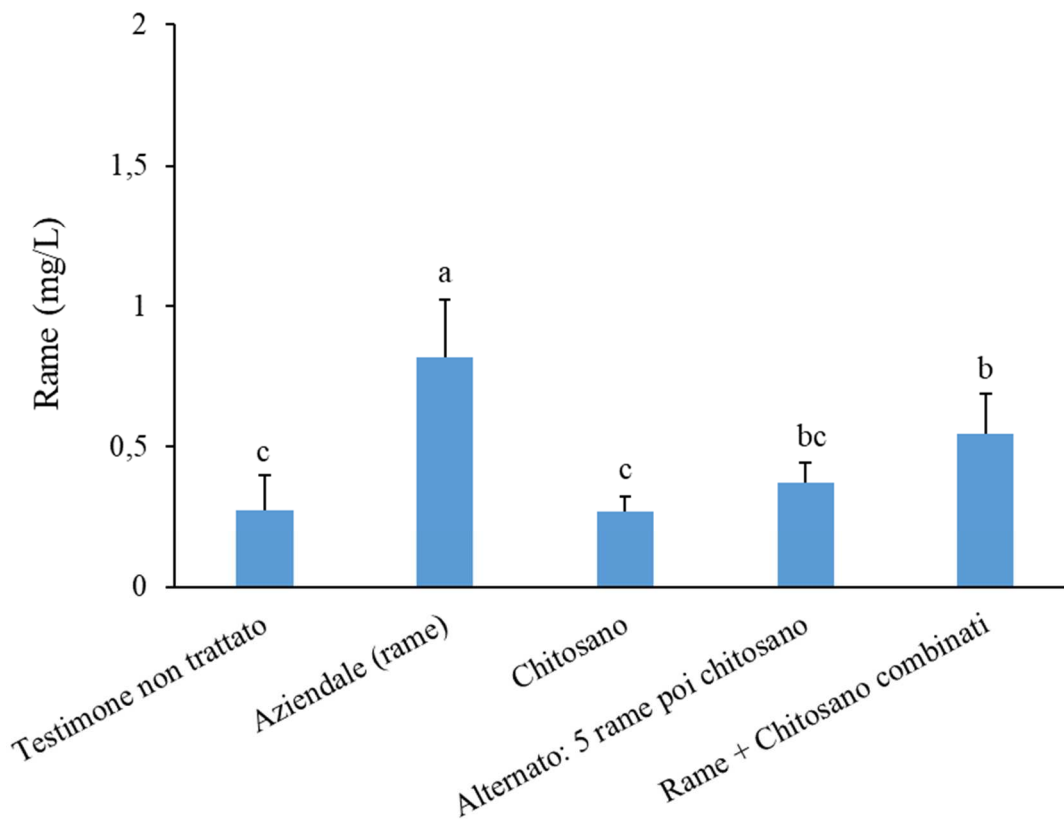


Figura 19 - Analisi sulla presenza di rame (mg/L) su uve Montepulciano provenienti dalle 5 diverse tesi presenti nel vigneto di Angeli di Varano (AN) in data 30 settembre 2021. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

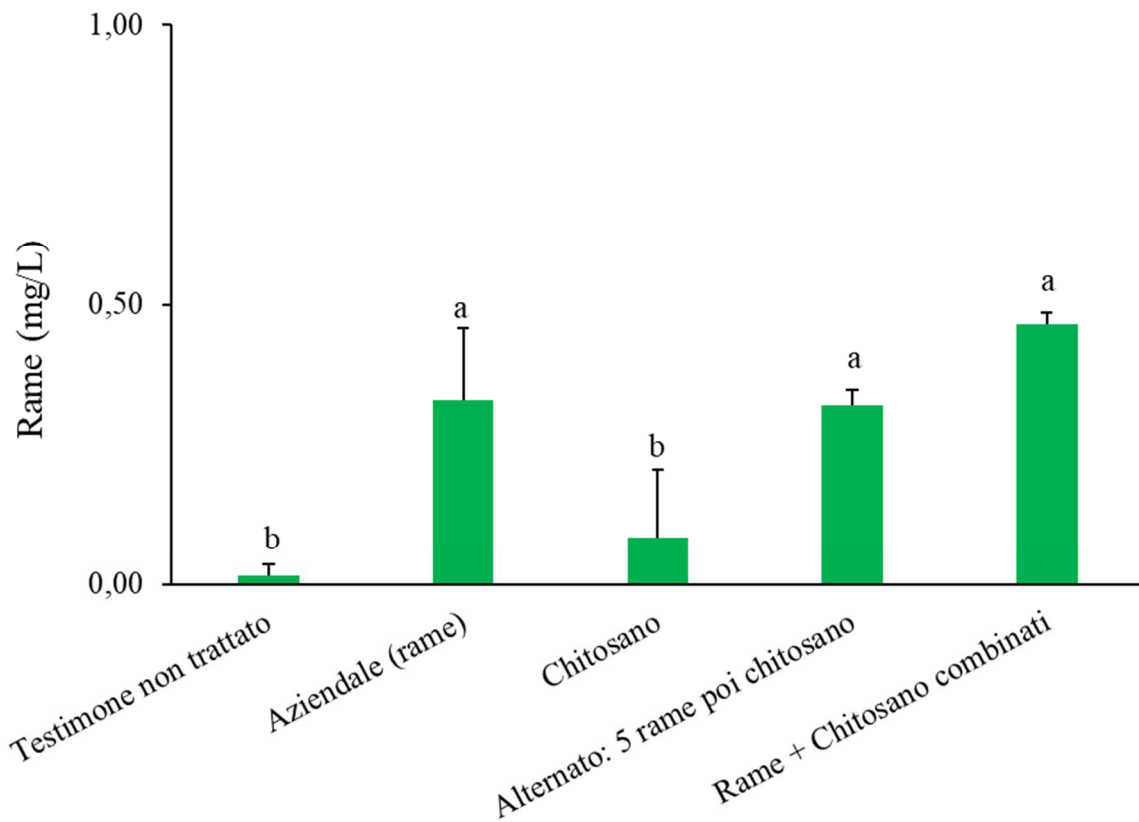


Figura 20 - Analisi sulla presenza di rame (mg/L) su foglie di Montepulciano provenienti dalle 5 diverse tesi presenti nel vigneto di Angeli di Varano (AN) in data 5 ottobre 2021. Gli istogrammi con la stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

4.5. ANALISI DEI PARAMETRI QUALITATIVI DEI MOSTI E DEI VINI PRODOTTI

In linea generale è possibile affermare che le strategie innovative di protezione dalla peronospora della vite saggiate, non hanno influenzato in maniera marcata i parametri qualitativi dei mosti e dei vini investigati fino al 10 novembre dell'annata in corso. Nel dettaglio, non sono emerse differenze statisticamente significative a carico dei mosti, circa i parametri saggiati (acidità totale, pH, SO₂ totale, zuccheri, acido malico, gradi Brix ed APA) in data 6 ottobre 2021 (Tabella 7).

Dall'inizio della fermentazione, ovvero dall'8 ottobre 2021, sono iniziati i rilievi periodici a carico dei vini prodotti con le uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale. Nel primo rilievo (Tabella 8), sono emerse delle differenze statisticamente significative solo a carico dell'acidità totale, la quale è risultata significativamente più alta nel testimone non trattato e più bassa nelle parcelle trattate secondo la strategia alternata. Tuttavia, nei 2 rilievi successivi (12 e 14 ottobre 2021) di nuovo non sono emerse delle differenze significative nei vari parametri presi in considerazione (Tabelle 9 e 10).

In data 18 ottobre, sono emerse delle differenze significative a carico della SO₂ totale, la quale è stata registrata con livelli più alti nel testimone aziendale e nella tesi alternata; valori significativamente più bassi nei vini prodotti con uve non trattate e trattate con solo chitosano (Tabella 11).

Come mostrato nelle tabelle 12, 13, 14 e 15, non sono stati individuati altri parametri con valori significativamente diversi fra le varie strategie di protezione antiperonosporica sotto indagine nei rilievi successivi a quello del 18 ottobre (23 e 28 ottobre, 5 e 10 novembre).

Tabella 7 - Risultati delle analisi condotte in data 06/10/2021 sul mosto prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Acidità totale (g/L)	pH	SO ₂ totale (mg/L)	Zuccheri (g/L)	Acido malico (g/L)	Grado Brix (%)	APA (mg/L)
Non trattato	4,87±0,11 a	3,39±0,02 a	87,50±2,12 a	231,80±5,13 a	0,85±0,21 a	22,55±0,64 a	41,50±21,92 a
Aziendali	4,16±0,06 a	3,51±0,10 a	83,00±0,00 a	226,77±2,88 a	0,95±0,21 a	22,35±0,07 a	33,50±16,26 a
Chitosano	4,85±0,04 a	3,36±0,01 a	77,00±4,24 a	232,73±4,66 a	0,65±0,07 a	22,85±0,35 a	37,50±6,36 a
Alternati	4,45±0,22 a	3,44±0,09 a	87,50±10,61 a	236,12±1,87 a	0,80±0,14 a	23,05±0,07 a	29,50±0,71 a
Combinati	4,30±0,42 a	3,49±0,14 a	84,50±10,61 a	231,19±10,42 a	0,80±0,14 a	22,65±0,49 a	30,00±2,83 a

Tabella 8 - Risultati delle analisi condotte in data 08/10/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (% vol/vol)	Ac. tot. (g/L)	pH	Ac. volatile (g/L)	Zuccheri (g/L)	Ac.malico (g/L)	Densità	Ac. lattico (g/L)	Ac. tartarico (g/L)	APA (mg/L)
Non trattato	4,49 ±1,76a	6,74 ±0,34 a	3,27 ±0,01 a	0,07 ±0,01 a	150,96 ±30,03 a	1,51 ±0,09 a	1,06 ±0,01 a	0,26 ±0,09 a	5,26 ±0,14 a	15,50 ±10,61 a
Aziendali	4,52 ±1,42 a	6,20 ±0,04 bc	3,42 ±0,09 a	0,09 ±0,00 a	150,67 ±28,25 a	1,85 ±0,23 a	1,06 ±0,01 a	0,34 ±0,08 a	4,83 ±0,35 a	13,50 ±9,19 a
Chitosano	3,22 ±0,17 a	6,57 ±0,11 ab	3,25 ±0,00 a	0,08 ±0,01 a	176,83 ±5,74 a	1,46 ±0,06 a	1,07 ±0,00 a	0,23 ±0,06 a	5,62 ±0,08 a	25,00 ±12,73 a
Alternati	3,13 ±1,34 a	5,90 ±0,19 c	3,35 ±0,10 a	0,08 ±0,02 a	174,80 ±32,49 a	1,64 ±0,29 a	1,07 ±0,01 a	0,27 ±0,05 a	4,95 ±0,83 a	20,50 ±21,92 a
Combinati	4,11 ±1,14 a	6,30 ±0,16 abc	3,37 ±0,17 a	0,10 ±0,01 a	159,36 ±26,93 a	1,72 ±0,66 a	1,07 ±0,01 a	6,57 ±9,10 a	3,00 ±3,77 a	12,25 ±10,96 a

Tabella 9 - Risultati delle analisi condotte in data 12/10/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (% vol/vol)	Ac.totale (g/L)	pH	Ac.vol. (g/L)	Zuccheri (g/L)	Ac.malico (g/L)	Ac.lattico (g/L)	Densità	E.secco (g/L)	Polif.tot. (mg/L)	Antociani (mg/L)
Non trattato	13,30 ±0,44 a	8,12 ±0,00 a	3,33 ±0,00 a	0,13 ±0,01 a	6,32 ±1,67 a	1,35 ±0,12 a	0,23 ±0,06 a	1,00 ±0,00 a	29,99 ±0,62 a	2422,50 ±136,47 a	810,00 ±111,72 a
Aziendali	13,17 ±0,18 a	7,44 ±0,42 a	3,47 ±0,10 a	0,12 ±0,02 a	8,00 ±5,74 a	1,44 ±0,06 a	0,20 ±0,16 a	1,00 ±0,00 a	30,52 ±0,10 a	2662,00 ±212,13 a	962,50 ±78,49 a
Chitosano	12,96 ±0,21 a	8,19 ±0,23 a	3,32 ±0,00 a	0,13 ±0,00 a	9,09 ±1,29 a	1,29 ±0,03 a	0,22 ±0,00 a	1,00 ±0,00 a	30,61 ±1,75 a	2438,00 ±118,79 a	836,50 ±99,70 a
Alternati	13,04 ±0,13 a	7,66 ±0,41 a	3,43 ±0,10 a	0,16 ±0,02 a	13,15 ±0,29 a	1,37 ±0,30 a	0,09 ±0,08 a	1,00 ±0,00 a	31,01 ±0,11 a	2602,50 ±64,35 a	923,00 ±48,08 a
Combinati	13,15 ±0,14 a	7,63 ±0,93 a	3,46 ±0,17 a	0,13 ±0,01 a	6,75 ±5,84 a	1,43 ±0,30 a	0,28 ±0,14 a	1,00 ±0,00 a	31,13 ±0,98 a	2729,00 ±141,42 a	948,00 ±59,40 a

Tabella 10 - Risultati delle analisi condotte in data 14/10/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (% vol/vol)	Ac.totale (g/L)	pH	Ac.volatile (g/L)	Zuccheri (g/L)	Ac.malico (g/L)	Ac.lat. (g/L)	Densità	E.secco (g/L)	Polif.tot. (mg/L)	Antociani (mg/L)
Non trattato	13,57 ±0,26 a	8,03 ±0,04 a	3,32 ±0,00 a	0,13 ±0,02a	2,61 ±0,06 a	1,21 ±0,16 a	0,33 ±0,11 a	1,00 ±0,00 a	29,78 ±0,99 a	2356 ±172,53 a	74,50 ±132,23 a
Aziendali	13,41 ±0,06 a	7,44 ±0,30 a	3,47 ±0,08 a	0,10 ±0,03 a	5,03 ±2,31 a	1,42 ±0,15 a	0,28 ±0,08 a	1,00 ±0,00 a	30,27 ±0,03 a	2631 ±237,59 a	949,50 ±88,39 a
Chitosano	13,30 ±0,30 a	8,25 ±0,12 a	3,31 ±0,01 a	0,12 ±0,00 a	4,78 ±0,73 a	1,25 ±0,08 a	0,26 ±0,11 a	1,00 ±0,00 a	30,33 ±1,32 a	2616 ±82,02 a	823,00 ±45,25 a
Alternati	13,50 ±0,18 a	7,45 ±0,07 a	3,44 ±0,08 a	0,15 ±0,02 a	6,67 ±2,62 a	1,28 ±0,33 a	0,24 ±0,11 a	1,00 ±0,00 a	30,34 ±0,47 a	2447,5 ±207,89 a	865,00 ±89,10 a
Combinati	13,34 ±0,35 a	7,62 ±0,79 a	3,45 ±0,18 a	0,12 ±0,04 a	4,44 ±2,03 a	1,41 ±0,37 a	0,35 ±0,03 a	1,00 ±0,00 a	31,03 ±0,18 a	2389 ±179,61 a	949,00 ±80,61 a

Tabella 11 - Risultati delle analisi condotte in data 18/10/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (% vol/vol)	Ac.tot. (g/L)	pH	Ac.vol. (g/L)	Zucch. (g/L)	Ac.mal. (mg/L)	Ac.lat. (mg/L)	Dens.	E.secco (g/L)	Polif.tot. (mg/L)	Ant. (mg/L)	SO ₂ L. (mg/L)	SO ₂ T. (mg/L)
Non trattato	13,63 ±0,28 a	7,91 ±0,08 a	3,33 ±0,01 a	0,13 ±0,02 a	2,15 ±0,08 a	1,16 ±0,14 a	0,31 ±0,09 a	0,99 ±0,00 a	29,50 ±1,18 a	2382,00 ±179,61 a	790,50 ±101,12 a	23,00 ±2,83 a	68,00 ±2,83 b
Aziendali	13,54 ±0,22 a	7,30 ±0,21 a	3,48 ±0,08 a	0,12 ±0,01 a	2,81 ±0,06 a	1,34 ±0,16 a	0,29 ±0,06 a	1,00 ±0,00 a	30,40 ±0,50 a	2656,50 ±226,98 a	918,00 ±97,58 a	27,00 ±0,00 a	75,00 ±1,41 a
Chitosano	13,59 ±0,17 a	8,10 ±0,09 a	3,33 ±0,00 a	0,15 ±0,01 a	2,58 ±0,25 a	1,11 ±0,06 a	0,32 ±0,02 a	1,00 ±0,00 a	30,31 ±1,07 a	2455,50 ±38,89 a	809,50 ±7,78 a	22,00 ±1,41 a	65,00 ±1,41 b
Alternati	13,75 ±0,24 a	7,25 ±0,23 a	3,47 ±0,09 a	0,16 ±0,03 a	3,66 ±1,37 a	1,18 ±0,37 a	0,25 ±0,01 a	1,00 ±0,00 a	30,39 ±0,05 a	2619,50 ±67,18 a	848,00 ±48,08 a	25,00 ±0,00 a	76,50 ±3,54 a
Combinati	13,50 ±0,49 a	7,53 ±0,62 a	3,46 ±0,16 a	0,13 ±0,02 a	2,66 ±0,08 a	1,33 ±0,42 a	0,34 ±0,01 a	1,00 ±0,00 a	30,90 ±0,06 a	2743,00 ±141,42 a	932,00 ±77,78 a	23,50 ±2,12 a	70,00 ±2,83 ab

Tabella 12 - Risultati delle analisi condotte in data 23/10/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (% vol/vol)	Ac.tot. (g/L)	pH	Ac.vol. (g/L)	Zucch. (g/L)	Ac.mal. (mg/L)	Ac.lat. (mg/L)	Densità	E.secco (g/L)	Polifenoli tot. (mg/L)	Antociani (mg/L)
Non trattato	13,42 ±0,26 a	7,82 ±0,09 a	3,30 ±0,01 a	0,14 ±0,01 a	2,08 ±0,08 a	1,13 ±0,14 a	0,31 ±0,08 a	0,99 ±0,00 a	28,73 ±1,22 a	2323,50 ±169,00 a	741,00 ±106,07 a
Aziendali	13,40 ±0,28 a	7,20 ±0,12 a	3,46 ±0,07 a	0,13 ±0,00 a	2,48 ±0,25 a	1,26 ±0,13 a	0,28 ±0,03 a	1,00 ±0,00 a	29,25 ±0,65 a	2552,50 ±178,90 a	874,50 ±64,35 a
Chitosano	13,40 ±0,23 a	7,91 ±0,13 a	3,31 ±0,01 a	0,16 ±0,00 a	2,29 ±0,06 a	1,06 ±0,08 a	0,31 ±0,06 a	0,99 ±0,00 a	29,32 ±1,41 a	2362,50 ±60,10 a	756,00 ±66,47 a
Alternati	13,58 ±0,18 a	7,14 ±0,18 a	3,42 ±0,07 a	0,17 ±0,03 a	2,08 ±0,09 a	1,33 ±0,00 a	0,31 ±0,02 a	0,99 ±0,00 a	28,99 ±0,04 a	2371,00 ±33,94 a	762,50 ±2,12 a
Combinati	13,29 ±0,50 a	7,44 ±0,52 a	3,43 ±0,16 a	0,16 ±0,04 a	2,47 ±0,03 a	1,22 ±0,44 a	0,32 ±0,01 a	1,00 ±0,00 a	29,91 ±0,46 a	2636,50 ±197,28 a	867,50 ±102,53 a

Tabella 13 - Risultati delle analisi condotte in data 28/10/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (%vol/vol)	Ac.tot. (g/L)	pH	Ac.vol. (g/L)	Zucch. (g/L)	Ac.mal. (mg/L)	Ac.lat. (mg/L)	Densità	E.secco (g/L)	Polifenoli tot. (mg/L)	Antociani (mg/L)
Non trattato	13,14 ±0,40 a	7,61 ±0,04 a	3,32 ±0,01 a	0,13 ±0,01 a	2,12 ±0,14 a	1,13 ±0,17 a	0,26 ±0,03 a	0,99 ±0,00 a	28,33 ±0,88 a	2252,50 ±197,28 a	690,00 ±115,97 a
Aziendali	13,19 ±0,29 a	7,04 ±0,13 a	3,46 ±0,06 a	0,14 ±0,01 a	2,50 ±0,33 a	1,29 ±0,14 a	0,32 ±0,04 a	0,99 ±0,00 a	28,98 ±0,64 a	2509,00 ±202,23 a	816,00 ±84,85 a
Chitosano	13,24 ±0,17 a	7,69 ±0,22 a	3,30 ±0,01 a	0,15 ±0,00 a	2,12 ±0,13 a	1,06 ±0,04 a	0,29 ±0,02 a	0,99 ±0,00 a	28,45 ±1,87 a	2183,50 ±149,20 a	685,00 ±70,71 a
Alternati	13,28 ±0,13 a	7,05 ±0,17 a	3,41 ±0,08 a	0,16 ±0,02 a	2,19 ±0,04 a	1,08 ±0,25 a	0,30 ±0,04 a	0,99 ±0,00 a	28,38 ±0,10 a	2353,50 ±27,58 a	738,00 ±5,66 a
Combinati	13,06 ±0,48 a	7,31 ±0,54 a	3,42 ±0,17 a	0,14 ±0,01 a	2,43 ±0,17 a	1,25 ±0,43 a	0,31 ±0,01 a	1,00 ±0,00 a	29,48 ±0,52 a	2593,00 ±171,12 a	834,00 ±69,30 a

Tabella 14 - Risultati delle analisi condotte in data 05/11/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (%vol/vol)	Ac.tot. (g/L)	pH	Ac.vol. (g/L)	Zucch. (g/L)	Ac.mal. (mg/L)	Ac.lat. (mg/L)	Densità	E.secco (g/L)	Polif.tot. (mg/L)	Ant. (mg/L)
Non trattato	13,17 ±0,32 a	7,58 ±0,04 a	3,33 ±0,01 a	0,14 ±0,03 a	2,03 ±0,21 a	1,15 ±0,17 a	0,29 ±0,00 a	0,99 ±0,00 a	28,60 ±0,84 a	2248,50 ±193,04 a	669,50 ±109,60 a
Aziendali	13,26 ±0,23 a	6,94 ±0,16 a	3,45 ±0,08 a	0,15 ±0,02 a	2,53 ±0,18 a	1,24 ±0,16 a	0,26 ±0,03 a	0,99 ±0,00 a	28,57 ±0,63 a	2499,00 ±173,95 a	823,00 ±60,81 a
Chitosano	13,28 ±0,16 a	7,55 ±0,20 a	3,30 ±0,00 a	0,17 ±0,01 a	2,24 ±0,16 a	1,01 ±0,01 a	0,26 ±0,00 a	0,99 ±0,00 a	28,17 ±1,61 a	2205,00 ±158,39 a	674,50 ±81,32 a
Alternati	13,47 ±0,18 a	6,88 ±0,17 a	3,43 ±0,08 a	0,19 ±0,04 a	1,67 ±0,74 a	1,06 ±0,31 a	0,28 ±0,01 a	0,99 ±0,00 a	28,40 ±0,17 a	1191,32 ±1649,93 a	717,00 ±26,87 a
Combinati	13,23 ±0,44 a	7,13 ±0,66 a	3,43 ±0,17 a	0,17 ±0,02 a	2,41 ±0,08 a	1,22 ±0,42 a	0,31 ±0,02 a	0,99 ±0,00 a	29,12 ±0,12 a	2526,50 ±98,29 a	813,50 ±67,18 a

Tabella 15 - Risultati delle analisi condotte in data 10/11/2021 sul vino prodotto dalle uve di Montepulciano provenienti dal vigneto sperimentale di Angeli di Varano (AN). Sulla colonna, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Fisher LSD (*Least Significant Difference*) con $P \leq 0,05$.

Trattamenti	Alcol (% vol/vol)	Acidità totale (g/L)	pH	Acidità volatile (g/L)	Zuccheri (g/L)	Acido malico (mg/L)	Ac. lattico (mg/L)	SO₂ Libera (mg/L)	SO₂ totale (mg/L)
Non trattato	13,33 ±0,29 a	7,34 ±0,03 a	3,35 ±0,02 a	0,17 ±0,01 a	2,25 ±0,21 a	1,00 ±0,14 a	0,25 ±0,07 a	24,00 ±1,41 a	62,00 ±1,41 a
Aziendali	13,14 ±0,18 a	6,68 ±0,07 a	3,50 ±0,06 a	0,16 ±0,01 a	2,50 ±0,14 a	1,15 ±0,21 a	0,25 ±0,07 a	26,00 ±1,41 a	65,00 ±1,41 a
Chitosano	13,12 ±0,21 a	7,29 ±0,09 a	3,33 ±0,01 a	0,18 ±0,00 a	2,30 ±0,14 a	0,90 ±0,00 a	0,20 ±0,00 a	19,50 ±4,95 a	54,50 ±7,78 a
Alternati	13,40 ±0,13 a	6,63 ±0,06 a	3,46 ±0,07 a	0,18 ±0,03 a	2,15 ±0,07 a	1,00 ±0,28 a	0,25 ±0,07 a	24,50 ±2,12 a	65,50 ±0,71 a
Combinati	13,00 ±0,46 a	6,86 ±0,71 a	3,47 ±0,18 a	0,17 ±0,01 a	2,30 ±0,14 a	1,15 ±0,35 a	0,30 ±0,00 a	22,00 ±2,83 a	62,50 ±2,12 a

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La valutazione dell'efficacia del chitosano per il controllo della peronospora della vite e della sua influenza sulla qualità del prodotto finale sono oggetto di questa tesi, ma anche al centro dell'interesse di tutto il comparto vitivinicolo (soprattutto quello biologico) che si trova a fronteggiare un problema come quello della sostituzione del rame per evitare le conseguenze negative nei confronti dell'ambiente, della salute umana e della qualità del vino, legate all'utilizzo reiterato nel tempo di questo metallo pesante; il quale, rappresenta ancora oggi l'unico mezzo di protezione veramente efficace nella gestione della peronospora a disposizione dei viticoltori biologici.

Il chitosano, infatti, oltre ad essersi mostrato in grado di controllare numerose patologie fungine pre e postraccolta su diverse colture e prodotti ortofrutticoli freschi stimolando le difese dei tessuti vegetali (Sharathchandra *et al.*, 2004; Trotel-Aziz *et al.*, 2006; Romanazzi *et al.*, 2002, 2012, 2018; Manjunatha *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2008; Romanazzi, 2010; Rajestary *et al.*, 2021), sembra avere un'efficacia anche nel controllo della peronospora della vite. Diversi autori hanno riportato in letteratura una discreta efficacia del biopolimero nel contenimento di questa malattia; inoltre, da prove pluriennali di campo, condotte su scala parcellare anche dall'Università Politecnica delle Marche, esso ha garantito dei livelli di protezione non dissimili da quelli ottenuti con fungicidi rameici (Aziz *et al.*, 2006; La Torre, 2010; Dagostin *et al.*, 2011; Piancatelli, 2018; Romanazzi *et al.*, 2016, 2021), senza tra l'altro condizionare negativamente i parametri dei vini, a differenza del rame che invece ha un'influenza negativa sulla qualità del vino (Garde-Cerdan *et al.*, 2017; Domenicone, 2020). 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 antitraspirante, 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 sintetasi (CHS) (Nandeeshkumar, 2008), un'aumentata attività enzimatica (Godard *et al.*, 2009), come accade per le perossidasi, la cui attività è correlata a

lignificazione, suberizzazione, guarigione delle ferite, meccanismi di difesa contro i patogeni 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; tuttavia, è bene tenere in considerazione che l'impiego di concentrazioni troppo elevate di principio attivo, oltre ad aumentare i costi degli interventi, potrebbe portare a fenomeni di fitotossicità nelle piante.

Di recente sono stati avviati degli studi sulla trasferibilità a livello commerciale di strategie di protezione dalla peronospora basate sull'impiego di chitosano (Caproli, 2021), i quali hanno previsto, in primo luogo, la valutazione del livello di compatibilità fra chitosano ed altri agrofarmaci ammessi ed ampiamente utilizzati in agricoltura biologica che stanno evidenziando 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 ed aprono la strada a nuove possibilità di impiego 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. Questo tipo di valutazioni giocano un ruolo fondamentale nella trasferibilità di prodotti innovativi su scala commerciale, in quanto le aziende spesso in un unico passaggio devono miscelare più prodotti con azioni diverse per poter ottimizzare i costi dei trattamenti. In merito alla compatibilità del formulato "chitosano denso" (formulazione impiegata nell'ambito del progetto Vitinnova) con prodotti a base di rame, è stato visto che: l'idrossido di rame ed il solfato di rame neutralizzato hanno mostrato una bassa compatibilità, il solfato tribasico di rame presenta una media affinità e sono necessari degli approfondimenti in questo senso, mentre l'ossicloruro di rame e l'ossido rameoso hanno dato buoni risultati in diverse combinazioni sia di

laboratorio che di campo. Da non trascurare il fatto che formulazioni diverse, basate sulle stesse sostanze attive, potrebbero portare a risultati diversi.

Questa tesi, sviluppata nell'ambito del progetto *PSR Marche Vitinnova*, si poneva l'obiettivo mettere a confronto diverse strategie di protezione antiperonosporica adottate per la stagione 2021 e basate sull'utilizzo di chitosano, sia per quanto riguarda l'efficacia nei confronti di infezioni tardive di peronospora, che per la valutazione di alcuni parametri legati qualità delle bacche, dei mosti e dei vini, prodotti dalle uve del vigneto sperimentale, trattate in maniera diversificata durante la stagione. L'interesse intorno a queste indagini nasce dal fatto che, per verificare se è possibile eliminare il rame dai trattamenti antiperonosporici, sostituendolo con il chitosano (il quale, oltre ad un'attività antiperonosporica, esercita anche un'attività antitrspirante), non è sufficiente valutare l'efficacia del biopolimero in campo, ma bisogna anche assicurarsi che non ci siano effetti collaterali indesiderati sul prodotto finale.

Nonostante l'annata non sia stata favorevole alla peronospora della vite, verso la fine dell'estate, alcuni eventi piovosi importanti hanno permesso al patogeno di svilupparsi e di portare a termine alcuni cicli infettivi, soprattutto a carico delle foglie fotosinteticamente attive più giovani (organi più suscettibili). Proprio sulle foglie, sono emerse infatti delle differenze statisticamente significative circa la capacità delle diverse strategie saggiate di contenere la malattia a fine stagione ed è stato visto come i trattamenti effettuati con ridotte quantità di rame associate al chitosano (prodotti alternati o combinati) abbiano protetto la vegetazione in maniera non dissimile al testimone aziendale, mentre il chitosano da solo si è collocato ad un livello intermedio. Sui grappoli, vista la bassa pressione della malattia, non è stato possibile apprezzare delle differenze significative fra i trattamenti.

Dai risultati ottenuti dalle analisi sulle uve e sui mosti, si noti come i campioni trattati con il chitosano, per quanto riguarda i parametri valutati, non presentino differenze significative con i campioni non trattati o trattati in maniera tradizionale e che quindi, la presenza del biopolimero non sembra aver influenzato le caratteristiche qualitative del prodotto raccolto. È importante sottolineare però i dati sulla contaminazione da rame: le uve trattate con chitosano, come ci si aspettava, hanno mostrato una quantità di rame residuo all'ingresso in cantina significativamente inferiore rispetto a quelle trattate esclusivamente con il rame e non statisticamente

diversa da quella trovata sui frutti provenienti dal testimone non trattato; il risultato sorprendente, però è che anche laddove si è usato il rame combinato o alternato con il chitosano, si sono registrati dei notevoli abbattimenti rispetto al testimone aziendale circa la quantità di rame arrivata in cantina; addirittura, la strategia che prevedeva l'utilizzo del rame nella prima parte della stagione e poi l'utilizzo del solo chitosano per la restante metà della stagione, ha fatto registrare dei livelli di rame residuo statisticamente uguali a quelle dove il rame non è stato somministrato affatto. Questi trattamenti effettuati con il rame all'inizio della stagione sono utili per limitare le infezioni primarie di *P. viticola*, anche perché le viti sono molto suscettibili alla peronospora nelle prime fasi fenologiche dopo la formazione di organi recettivi (Ash, 2000). Avere a disposizione diverse strategie di protezione può essere vantaggioso per l'agricoltore perché la pressione del patogeno non è la stessa ogni anno, ma varia in base all'andamento meteorologico stagionale. Pertanto, nelle annate più favorevoli si potrà gestire la peronospora senza ricorrere affatto al rame, mentre nelle annate più critiche, almeno in una prima fase, si potrà affiancare al rame il chitosano, proteggendo comunque la vegetazione, impattando meno sull'ambiente e rispettando anche i limiti sempre più stringenti della Comunità Europea (Regolamento UE 2018/1981) in termini di quantità di rame ammessa per ettaro ogni anno. Infatti, anche quando applicato da solo, il biopolimero ha dimostrato di essere efficace sia in presenza di alta che di bassa pressione della malattia (Romanazzi *et al.*, 2016, 2021). Purtroppo, ad oggi l'approccio cautelativo e preventivo con cui vengono necessariamente programmati i trattamenti antiperonosporici in viticoltura biologica viene adottato anche in annate poco favorevoli alla malattia, con conseguente spreco di risorse e di prodotti che vengono così immessi inutilmente nell'ambiente (problema sollevato anche al bilancio fitosanitario nazionale della vite per il biennio 2020-2021, svolto online a novembre 2021). In conclusione, è possibile affermare che nel prossimo futuro promettenti prospettive sono offerte dai trattamenti alternati o combinati; infatti l'uso del rame nella prima metà della stagione, seguito dall'applicazione del chitosano sembra riuscire a contenere la malattia e a garantire una drastica riduzione della quantità di rame distribuita; allo stesso modo, la giusta combinazione di formulazioni di rame e chitosano, oltre a ridurre i dosaggi di rame, potrebbe permettere un effetto sinergico dei 2 componenti della miscela nei confronti della malattia. Per quanto

riguarda la contaminazione della produzione a causa del rame proveniente dai trattamenti antiparassitari, è stata condotta anche un'analisi sulle foglie della fascia produttiva, perché raccogliendo a macchina una quota di foglie può finire in cantina insieme ai grappoli e, avendo del rame sulla loro superficie, possono contaminare le bacche. Anche in questo caso il testimone aziendale ha mostrato i valori di rame residuo più elevati, ma solo la tesi trattata con chitosano ha ridotto la quantità del metallo pesante; quindi, le foglie "sporche" di rame possono rappresentare un'ulteriore fonte di contaminazione per le uve provenienti da impianti vendemmiati meccanicamente.

Alla luce delle analisi condotte sui vini prodotti dalle uve provenienti dal vigneto sperimentale, è possibile affermare come il chitosano non sembri influenzare le caratteristiche del prodotto finale. Tuttavia, va detto che in un paio di rilievi (08/10/2021 e 18/10/2021) sono state registrate delle differenze significative a carico di alcuni parametri, quali rispettivamente acidità totale ed SO₂ totale. Nel primo caso le differenze potrebbero essere dovute alla ridotta attività fotosintetica delle foglie del testimone non trattato a causa della maggiore pressione del patogeno su queste piante. Questi dati ci permettono di affermare che il chitosano può essere utile per affiancare e magari in un futuro più lontano sostituire i fungicidi cuprici, tant'è che oltre a garantire un buon livello di protezione dalla peronospora, sembra anche non alterare i parametri qualitativi delle uve, dei mosti e dei vini; anzi, in alcuni casi sembrerebbe addirittura migliorare le caratteristiche organolettiche dei vini, come dimostrato da un panel di esperti che ha assaggiato i vini prodotti nell'ambito del progetto Vitinnova dalla sperimentazione 2020 (Domenicone, 2020). Come è stato dimostrato, il rame infatti provoca problemi in fase di vinificazione (Zhou *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2016), che si ripercuotono sulla qualità sensoriale dei vini.

Questa ricerca ha dunque confermato la validità, anche su scala commerciale, del chitosano come alternativa al rame in viticoltura, in quanto non sembra influenzare negativamente le caratteristiche del prodotto finale. Il biopolimero, infatti, potrà in futuro trovare applicazione sia nella protezione dei vigneti, sia nella gestione della fisiologia delle viti, grazie alle sue proprietà fitoiatriche e antitranspiranti. L'azione antitranspirante del chitosano, che tende a limitare lo sviluppo vegetativo potrebbe assumere importanza considerando il cambiamento climatico in atto, che sta portando

a periodi di siccità prolungata, vendemmie sempre più precoci, contenuti zuccherini molto elevati e livelli di acidità molto bassi. Uno dei problemi che si sta presentando sempre più spesso nelle cantine, è infatti la presenza di mosti con livelli di acidità troppo bassi. Da questo punto di vista, l'impiego del chitosano come sostanza naturale antitrasspirante, può rappresentare una nuova frontiera di adattamento ed evoluzione della viticoltura in funzione dei cambiamenti climatici, anche se le tecniche di impiego, in termini di concentrazioni e volumi potrebbero variare in base all'obiettivo da raggiungere.

Come accennato in precedenza non è comunque esclusa, per il prossimo futuro, la possibilità di integrare l'affidabilità del rame nel contenere *P. viticola* con le proprietà del chitosano, mettendo a punto delle strategie di intervento come l'alternanza dei trattamenti o la miscelazione dei prodotti, volte a minimizzare gli apporti cuprici in vigneto, sfruttare l'azione sinergica e ad ottenere vini di qualità elevata sia in viticoltura biologica che integrata.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ash, G., (2000). *Downy mildew of grape*. The Plant Health Instructor.
- Abdul Malik, N. A., Kumar, I. S., & Nadarajah, K. (2020). Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (3), 963.
- Assoenologi Giovani (2019). *Chitina, chitosano e chitin-glucano*. (https://www.assoenologi.it/wpcontent/uploads/2019/10/assogiovani_chitosano_ottobre2019.pdf).
- 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 (11), 1188-1194.
- Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop protection*, 25 (2), 108-118.
- Belli, G. (2012). *Elementi di patologia vegetale*, seconda edizione, Padova, Piccin Editore.
- Bornet, A., & Teissedre, P. L. (2005). Applications and interest of chitin, chitosan and their derivatives in enology. *Oeno One*, 39 (4), 199-207.
- Boso, S., Santiago, J. L., & Martínez, M. C. (2005). A method to evaluate downy mildew resistance in grapevine. *Agronomy for Sustainable Development*, 25 (1), 163-165.
- Businelli, M. (2007). *Principi di Chimica del suolo*, Milano, Morlacchi Editore.
- Caffi, T., Giosuè, S., & Bugiani, R. (2008). A mechanistic model simulating primary infections of downy mildew in grapevine. *Ecological Modelling*, 212 (3-4), 480-491.
- Caproli, S. (2021). Nuove strategie di protezione della vite dalla peronospora in biologico: sperimentazione dell'applicazione di chitosano in protocolli aziendali. Tesi di Laurea Magistrale, Università Politecnica delle Marche, Ancona.
- Chinnici, F., Natali, N., & Riponi, C. (2014). Efficacy of chitosan in inhibiting the oxidation of (+)-catechin in white wine model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (40), 9868-9875.

- Dagostin, S., Schärer, H. J., Pertot, I., & Tamm, L. (2011). Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection*, 30 (7), 776-788.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21 (6), 703-714.
- Di Bonaventura, C. (2021). Wine Salad (Scuola del Vino). *Montepulciano: vitigno, stili di vino, caratteristiche, abbinamenti e curiosità*. (<https://thewinesalad.com/blog/2020/6/1/montepulciano-vitigno-stili-di-vino-caratteristiche-abbinamenti-e-curiosita>).
- Domenicone, P. (2020). Effetto dei trattamenti con rame e chitosano sulle caratteristiche di mosti e vini delle varietà Montepulciano e Verdicchio. Tesi di Laurea, Università Politecnica delle Marche, Ancona.
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8 (4), 968-987.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., & Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82 (4), 398-402.
- Feliziani, E., Landi, L., Romanazzi, G. (2015). Preharvest treatments with chitosan and other alternatives to conventional fungicides to control postharvest decay of strawberry. *Carbohydrate Polymers* 132, 111–117.
- Ferrara, L. A., Caruso, M., Gallo, D., Naviglio, D. (2017). Chitosano, applicazione nel settore agroalimentare. *Aracne*.
- Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (2018). Regolamento di esecuzione (UE) 2018/1981 della Commissione.
- Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (2014). Regolamento di esecuzione (UE) 563/2014 della Commissione.
- Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea (2012). Regolamento di esecuzione (UE) 315/2012 della Commissione.
- Gazzetta Ufficiale della Comunità europea (2002). Regolamento (CE) 473/2002 della Commissione.

- García-Esparza, M. A., Capri, E., Pirzadeh, P., & Trevisan, M. (2006). Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Additives and Contaminants*, 23 (3), 274-280.
- Garde-Cerdán, T., Mancini, V., Carrasco-Quiroz, M., Servili, A., Gutiérrez-Gamboa, G., Foglia, R., Romanazzi, G. (2017). Chitosan and laminarin as alternatives to copper for *Plasmopara viticola* control: effect on grape amino acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (34), 7379-7386.
- Giavedoni, F. (2016). *Guida ai vitigni d'Italia, storia e caratteristiche di 700 varietà autoctone*. Montepulciano, 285-287. Slow Food Editore.
- Gobbin, D. (2004). Redefining *Plasmopara viticola* epidemiological cycle by molecular genetics (*Vitis*). Dissertation, Zürich. Swiss Federal Institute of Technology.
- 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 (9), 827-837.
- Goy, R. C., Morais, S. T., & Assis, O. B. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 122-127.
- Grape SRL (Gruppo Ricerche Avanzate Per l'Enologia), (2020). *Chitosano: il principale alleato con il Brettanomyces*. (<https://www.grapesrl.it/2020/11/chitosano-il-principale-alleato-contro-il-brettanomyces/>).
- Hamiduzzaman, M. (2005). β -aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew (*Plasmopara viticola*). (Doctoral dissertation, Université de Neuchâtel, France).
- 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 (2), 263-269.
- Jackson, R.S. (2008). Wine science: principles and applications. *Academic Press*, 108-238.
- Juang, R. S., & Shao, H. J. (2002). A simplified equilibrium model for sorption of heavy metal ions from aqueous solutions on chitosan. *Water Research*, 36 (12), 2999-3008.

- 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*, 11 (6), 886-898.
- Kennelly, M. M., Gadoury, D. M., Wilcox, W. F., Magarey, P. A., & Seem, R. C. (2005). Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology*, 95 (12), 1445-1452.
- Khanafari, A., Marandi, R., Sanatei, S.H. (2008). Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering*, 6, 19-24.
- Kassemeyer, H. H., Büche, C., Unger, S., Kiefer, B., Löffel, K., Nick, P., ... & Rumbolz, J. (2002). Biology of *Plasmopara viticola*-approach to a biological control of grapevine downy mildew. In *10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture*. Weinsberg, Germany, 4-7 February 2002 (pp. 127-129).
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (1), 51-63.
- Landi, L., Feliziani, E., & Romanazzi, G. (2014). Expression of defense genes in strawberry fruits treated with different resistance inducers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (14), 3047-3056.
- La Torre, A. (2010). Evaluation of anti-downy mildew effectiveness and economic sustainability of substances of natural origin. *Petria* 20, 46-48.
- La Torre, A., Iovino, V., & Caradonia, F. (2018). Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea*, 57 (2), 201-236.
- Manjunatha, G., Roopa, K. S., Prashanth, G. N., & Shekar Shetty, H. (2008). Chitosan enhances disease resistance in pearl millet against downy mildew caused by *Sclerospora graminicola* and defence-related enzyme activation. *Pest Management Science*, 64 (12), 1250-1257.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., & Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grapefruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106 (2), 501-508.

- Miotto, A., Ceretta, C. A., Brunetto, G., Nicoloso, F. T., Giroto, E., Farias, J. G., ... & Trentin, G. (2014). Copper uptake, accumulation and physiological changes in adult grapevines in response to excess copper in soil. *Plant and Soil*, 374 (1), 593-610.
- Moolenaar, S.W., Beltrami, P. (1998). Heavy metal balances of an Italian soil as affected by sewage sludge and Bordeaux mixture applications. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. 27 (4), 828-835.
- Muzzarelli, R. A., & Rocchetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5 (6), 461-472.
- 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 (4-6), 188-194.
- Nardella, I.A., Bartolozzi, F., Bignami, M., Gnudi, G., A. Maresca. (2016). Terra e Vita (2016). Speciale: Impiego sostenibile del rame in agricoltura. (<https://www.chimiberg.com/UserFiles/File/com-tecnichenuove-terraevita-tv-2016-117.pdf>).
- OIV (Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino) (2016). *International code of oenological practices*.
- Oliveira Junior, E. N. D., Melo, I. S. D., & Franco, T. T. (2012). Changes in hyphal morphology due to chitosan treatment in some fungal species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55 (5), 637-646.
- Owen, C.A. (1981). Copper deficiency and toxicity: acquired and inherited, in plants, animals and man. *Noyes Publications*.
- Pacheco, N., Garnica-González, M., Ramírez-Hernández, J. Y., Flores-Albino, B., Gimeno, M., Bárzana, E., & Shirai, K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource technology*, 100 (11), 2849-2854.
- Peñas, E., Di Lorenzo, C., Uberti, F., & Restani, P. (2015). Allergenic proteins in enology: A review on technological applications and safety aspects. *Molecules*, 20 (7), 13144-13164.

- Pertot, I., Dagostin, S., Ferrari, A., Gobbin, D., Prodorutti, D., Gessler, C. (2005). La peronospora della vite. Istituto Agrario di San Michele all'Adige.
- Piancatelli, S. (2018). Formulati alternativi al rame per il controllo della peronospora della vite in agricoltura biologica. Tesi di Laurea, Università Politecnica delle Marche, Ancona.
- Poggio, L. (2016). *Un'alternativa all'uso dei solfiti in enologia, proprietà ed applicabilità del chitosano*. Torino. Edizioni accademiche italiane.
- Pontiroli, R., Rizzotti, R., Zerbotta, F. (2001). *Prove di difesa antiperonosporica in viticoltura biologica. Informatore Fitopatologico*, 10, 62-66.
- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (12), 3764-3773.
- Raafat, D., Sahl, H.G. (2009). Chitosan and antimicrobial potential – a critical literature survey. *Microbial Biotechnology* 2, 186-201.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smaghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4 (6), 1457-1465.
- 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*, 20 (1), 563-582.
- Ravanetti, A. (2020). Winedharma. *Montepulciano d'Abruzzo: il vino, il vitigno e le caratteristiche*. (www.winedharma.com/it/vitigno/montepulciano-dabruzzo-il-vino-il-vitigno-le-caratteristiche/).
- Ribèreau-Gayon, P., Dubourdieu, B., Donèche, A., Lonvaud, M. (2007). Trattato di enologia, vol.1: Microbiologia del vino e vinificazioni. Edagricole.
- Ribèreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Glories, Y., Maujean, A. (2007). Trattato di enologia, vol. 2: Chimica del vino, stabilizzazione e trattamenti. Edagricole.
- RISOLUZIONE OIV/ENO 368/2009. Monografia sul chitosano.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Divenere, D., & Salerno, M. (2002). Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67 (5), 1862-1867.

- Romanazzi, G., Gabler, F. M., Margosan, D., Mackey, B. E., & Smilanick, J. L. (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology*, 99, 1028-1036.
- Romanazzi, G. (2010). Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries. *Fresh Produce*, 4(1), 111-115.
- Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F. M., & Smilanick, J. L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63, 141-147.
- 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 (4), 739-748.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Baños, S. B., & Sivakumar, D. (2017). Shelf-life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (3), 579-601.
- 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, 3261-3268.
- Rumbolz, J., Wirtz, S., Kassemeyer, H. H., Guggenheim, R., Schäfer, E., & Büche, C. (2002). Sporulation of *Plasmopara viticola*: differentiation and light regulation. *Plant Biology*, 4 (03), 413-422.
- Rusjan, D., Strlič, M., Pucko, D., & Korošec-Koruza, Z. (2007). Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. *Geoderma*, 141 (1-2), 111-118.

- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10 (2), 37-51.
- Sharathchandra, R. G., Raj, S. N., Shetty, N. P., Amruthesh, K. N., & Shetty, H. S. (2004). A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection*, 23 (10), 881-888.
- Sicheri, G. (2015). *ENOLOGIA; con elementi di chimica viticolo-enologica*. Padova. Libreriauniversitaria.it edizioni.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Food Science and Nutrition*, 43, 145-171.
- Sun, X., Liu, L., Zhao, Y., Ma, T., Zhao, F., Huang, W., & Zhan, J. (2016). Effect of copper stress on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* and the pathway of copper adsorption during wine fermentation. *Food Chemistry*, 192, 43-52.
- Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J. B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., & Brandam, C. (2015). Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 118 (1), 123-131.
- Tariba, B. (2011). Metals in wine impact on wine quality and health outcomes. *Biological Trace Element Research*, 144 (1), 143-156.
- Teissedre, P. L. (2008). Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology*, 226 (4), 681-689.
- Vesentini, D., Steward, D., Singh, A. P., Ball, R., Daniel, G., & Franich, R. (2007). Chitosan-mediated changes in cell wall composition, morphology and ultrastructure in two wood-inhabiting fungi. *Mycological Research*, 111 (8), 875-890.
- Zhou, J., Du, B., Liu, H., Zhang, W., Liang, J. (2019). Health risks to local residents from the exposure of heavy metals around the largest copper smelter in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 329-336.

7. RINGRAZIAMENTI

Chi avrebbe mai pensato che sarei potuto arrivare fin qui?

Molte volte, durante questo percorso, me lo sono chiesto persino io.

Da un istituto professionale, come la scuola alberghiera ho avuto il coraggio di intraprendere la strada dell'Università, senza essere completamente a conoscenza di ciò che mi attendeva, senza metodi.

In questi anni ho avuto il piacere di vivere nuove esperienze, conoscere gente nuova e studiare materie di cui non conoscevo assolutamente nulla.

Tengo molto a ringraziare tutti i colleghi di corso che ho conosciuto e mi hanno accompagnato in questo percorso, i coinquilini, tutti i professori e tutto il personale studentesco e non dell'Università Politecnica delle Marche.

Un doveroso ringraziamento va al Professor Gianfranco Romanazzi, relatore di questa tesi, che ha reso possibile lo svolgimento di tutto il programma sperimentale, esprimo con sincerità la mia gratitudine per la sua umanità, pazienza e passione che impiega e trasmette.

Ringrazio poi il mio professore di enologia, il Professor Roberto Potentini, che mi ha proposto per primo questa tipologia di tesi ed è sempre stato a disposizione per chiarimenti o dubbi in merito.

Ringrazio di cuore il Dott. Simone Piancatelli e la Dott.ssa Marwa Mounni, che nonostante l'elevata quantità di lavoro giornaliero sono stati costantemente presenti e mi hanno guidato sia nell'attività sperimentale in campo che nella stesura della tesi. Si sono dimostrati entrambi due grandi professionisti, auguro a loro il miglior futuro possibile nel campo della ricerca e dell'insegnamento.

Un grazie speciale va anche a tutto il personale del progetto "Vitinnova" e dell'Azienda "Terre Cortesi Moncaro", in particolare al Presidente Assoenologi Marche Enol. Giuliano D'Ignazi, il Dott. Enol. Giulio Piazzini e la biologa responsabile delle analisi enologiche Dott.ssa Vittoria Durastanti.

Infine, ma non per importanza, vorrei ringraziare tutta la mia famiglia: mio padre, mia madre, mia sorella e tutti i parenti che mi sono stati accanto, mi hanno sempre sostenuto in questo percorso e hanno creduto in me nonostante tutte le difficoltà ed i problemi che ho incontrato, fino al traguardo finale. Grazie.