UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

Strategie innovative applicate a livello aziendale per la gestione della peronospora e della muffa grigia della vite

Innovative strategies applied on large scale for the management of grapevine downy mildew and gray mold

Relatore:
Prof. Gianfranco Romanazzi

Tesi di laurea di:
Giovanni Lucamarini

Correlatore:
Dott.ssa Marwa Moumni

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

		Pag.
	RIASSUNTO	
	ABSTRACT	
1	**INTRODUZIONE**	**7**
1.1	**LA VITICOLTURA IN ITALIA E NELLE MARCHE**	**7**
1.2	**LE PRINCIPALI MALATTIE DELLA VITE**	**8**
2	**LA PERONOSPORA DELLA VITE**	**9**
2.1	**CICLO BIOLOGICO DI *PLASMOPARA VITICOLA***	**9**
2.2	**EPIDEMIOLOGIA**	**12**
2.3	**SINTOMATOLOGIA E DANNI**	**13**
2.3.1	**Sintomi su foglie**	**13**
2.3.2	**Sintomi su infiorescenze e grappoli**	**15**
2.3.3	**Sintomi su altri organi verdi**	**16**
3	**L'OIDIO DELLA VITE**	**17**
3.1	**CICLO BIOLOGICO DI *ERYSIPHE NECATOR***	**17**
3.2	**EPIDEMIOLOGIA**	**19**
3.3	**SINTOMATOLOGIA E DANNI**	**20**
3.3.1	**Sintomi su foglie**	**20**
3.3.2	**Sintomi su infiorescenze e grappoli**	**21**
3.3.3	**Sintomi su germogli e tralci**	**22**
4	**LA MUFFA GRIGIA DELLA VITE**	**22**
4.1	**CICLO BIOLOGICO DI *BOTRYTIS CINEREA* E CICLO DELLA MALATTIA**	**22**
4.2	**SINTOMATOLOGIA E DANNI**	**24**
5	**GESTIONE DELLA PERONOSPORA, DELL'OIDIO E DELLA MUFFA GRIGIA DELLA VITE**	**25**
5.1	**LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA INTEGRATA**	**25**
5.2	**LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA BIOLOGICA**	**28**
5.3	**MEZZI AGRONOMICI**	**30**
5.4	**RESISTENZA VARIETALE**	**31**
5.5	**MEZZI CHIMICI**	**32**
5.5.1	**Prodotti a base di rame**	**34**
5.5.1.1	***Aspetti positivi e negativi del rame***	**37**

5.5.2 Prodotti a base di zolfo 40
5.6 ALTERNATIVE AI FUNGICIDI TRADIZIONALI 42
5.6.1 Molecole naturali con azione antifungina 43
5.6.2 Agenti di biocontrollo per l'oidio della vite 49
5.6.3 Agenti di biocontrollo per la muffa grigia della vite 51
5.7 L'INDUZIONE DI RESISTENZA PER LA PROTEZIONE DELLE COLTURE DALLE MALATTIE FUNGINE 53
6 OBIETTIVI DELLA RICERCA 60
7 MATERIALI E METODI 61
7.1 VIGNETO SPERIMENTALE 61
7.1.1 Prova1: efficacia antiperonosporica di strategie basate sull'impiego di chitosano 61
7.1.1.1 *Strategie saggiate e schema sperimentale* 62
7.1.1.2 *Trattamenti* 63
7.1.2 Prova 2: efficacia di strategie innovative per la gestione di *Botrytis cinerea* 65
7.1.2.1 *Strategie saggiate e schema sperimentale* 65
7.1.2.2 *Trattamenti* 68
7.1.3 Valutazione delle infezioni 69
7.2 APPROFONDIMENTI DI LABORATORIO 73
7.2.1 Isolamento e identificazione morfologica 73
7.2.2 Validazione del kit *Botrytis Alert* 74
8 RISULTATI 77
8.1 *CONDIZIONI METEOROLOGICHE* 77
8.2 VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI NELLA PROVA 1 78
8.2.1 Risultati dei rilievi riguardanti peronospora 78
8.2.1.1 *Risultati foglie* 78
8.2.1.2 *Risultati grappoli* 83
8.2.2 Risultati dei rilievi riguardanti oidio 89
8.2.2.1 *Risultati foglie* 89
8.2.2.2 *Risultati grappoli* 93
8.3 VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI NELLA PROVA 2 99
8.3.1 Risultati dei rilievi riguardanti peronospora 99
8.3.1.1 *Risultati folgie* 99

8.3.1.2 ***Risultati grappoli*** **100**
8.3.2 **Risultati dei rilievi riguardanti muffa grigia sui grappoli** **101**
8.3.3 **Risultati dei rilievi riguardanti *Aspergillus* spp. sui grappoli** **104**
8.4 **APPROFONDIMENTI DI LABORATORIO** **107**
8.4.1 **Isolamento e identificazione morfologica dei funghi** **107**
8.4.2 **Validazione del kit *Botrytis Alert*** **112**
9 **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI** **115**
10 **BIBLIOGRAFIA** **120**

RIASSUNTO

In seguito ai rischi per l'ambiente e la salute umana, causati dal ripetuto utilizzo di prodotti fitosanitari, l'Unione Europea ha imposto delle limitazioni sempre più severe per il loro impiego, stimolando la ricerca di soluzioni alternative nella protezione delle colture. In questa tesi è stata valutata l'efficacia di strategie innovative e a basso impatto ambientale per la protezione della vite dalla peronospora (Prova 1) e dalla muffa grigia (Prova 2) a livello aziendale. Inoltre, è stato validato il kit *Botrytis Alert* per la diagnosi rapida di infezioni da *Botrytis* spp. Le prove sono state condotte in due vigneti su *cv* Verdicchio, e per le malattie sono stati calcolati la diffusione, la gravità e l'indice di McKinney. Per la Prova 1 sono state saggiate due strategie: solo chitosano e chitosano alternato al rame, e la loro efficacia è stata confrontata con un testimone aziendale a base di rame ed un testimone non trattato. In questa prova è stato valutato anche un effetto collaterale su contenimento dell'oidio. Entrambe le strategie hanno ridotto l'indice di McKinney di peronospora e oidio sia su foglie sia sui grappoli, e l'alternato ha garantito livelli di protezioni uguali o superiori all'aziendale. Per quanto riguarda la Prova 2, sono state saggiate sette strategie a base di *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 1, cerevisane, laminarina, cerevisane + laminarina, *Metschnikowia fructicola, B. amyloliquefaciens* 2 e tutti i principi attivi sono stati applicati sia una volta che due per valutare anche l'utilità di un secondo intervento in invaiatura (2T). Prendendo in considerazione l'indice di McKinney è emerso che cerevisane, laminarina e *M. fructicola* – 2T sono risultate efficaci nel contenere le infezioni di *Botrytis* spp. rispetto al testimone non trattato in entrambi i rilievi condotti. Nel secondo rilievo, tutte le strategie hanno ridotto significativamente la percentuale rispetto al testimone non trattato, ad eccezione di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* 2 – 2T. In questa prova è stata rilevata anche la presenza di *Aspergillus* spp., che nel secondo rilievo è stato efficacemente contenuto da tutte le strategie. Non è sempre risultato conveniente effettuare il secondo intervento con i prodotti saggiati. La sensibilità del kit *Botrytis Alert* è stata validata utilizzando diverse diluizioni del mosto di grappoli *cv* Montepulciano con bassi livelli di diffusione di *Botrytis* spp. (<10%). Il kit è risultato efficace per una diagnosi certa e rapida. Alla luce dei risultati ottenuti, è possibile affermare che le sostanze a basso impatto ambientale potrebbero essere utili per affiancare o sostituire i prodotti chimici di sintesi, e le innovazioni saggiate possono contribuire ad innalzare la qualità dei vini.

ABSTRACT

Due to the risks for the environment and human health caused by the repeated application of plant protection products over time, the European Union has imposed increasingly strict restrictions on their use, stimulating the research for alternative solutions in crop protection. In this thesis was evaluated the effectiveness of innovative and sustainable strategies for the protection of grapevines against downy mildew (Trial 1) and gray mold (Trial 2) on commercial scale. It was also validated the sensitivity of kit *Botrytis Alert* which is used for the fast diagnosis of *Botrytis* spp. The trials were carried out in two *cv*. Verdicchio vineyards. For both diseases, the incidence, severity, and McKinney index were calculated. For Trial 1, two strategies were tested: chitosan alone and chitosan alternated with copper, and their efficacy was compared with a copper-based and with untreated control. Moreover, the effect of these strategies on powdery mildew control was recorded. The results showed that both strategies reduced the McKinney index of downy mildew and powdery mildew on leaves and grapes, and the alternate strategy provided equal or higher levels of protection than the farm strategy. In Trial 2, seven strategies based on *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 1, cerevisane, laminarin, cerevisane + laminarin, *Metschnikowia fructicola*, *B. amyloliquefaciens* 2 were tested and all active substances were applied once and twice to assess the usefulness of a second treatment at veraison (2T). Comparing the McKinney index of treatments, cerevisane, laminarin and *M. fructicola* - 2T resulted effective against *Botrytis* spp. infections, compared to the untreated control in both surveys. In the second survey, all strategies significantly reduced the McKinney index compared to the untreated control, except for *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* 2 - 2T. Similar results were observed in the second assessment of *Aspergillus* spp., where all strategies showed a disease reduction compared to untreated control. No significant difference on the effectiveness of these strategies appeared when they were applied once and twice. The sensitivity of the kit was validated using different must dilutions of *cv*. Montepulciano grapes with low levels of *Botrytis* spp. incidence (<10%). The kit was effective for a consistent and rapid diagnosis, and best results were observed, with low levels of infection, using lower must dilutions. According to the obtained results, it is possible to find evidence that low-impact substances can be useful when applied together and even replace synthetic pesticides, and the tested innovations can contribute to increase wine quality.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA VITICOLTURA IN ITALIA E NELLE MARCHE

Nelle Marche il settore vitivinicolo rappresenta una realtà importante data la singolare combinazione di più elementi strutturali: storici, sociali, geografici e culturali che si concentrano nella valorizzazione delle uve autoctone. Infatti, l'orografia della regione, la diversificata natura dei terreni, alcune pratiche tradizionali, come la moltiplicazione della vite per propaggine o la consociazione di più varietà nei vigneti, hanno reso il territorio un contesto eterogeneo e per questo rilevante nel panorama vitivinicolo italiano. La vite nelle Marche è la principale coltura arborea con circa 23,000 ha, di cui il 48% iscritti all'albo dei vigneti per la produzione dei vini Denominazione di Origine Controllata (DOC), distribuiti per lo più in aree collinari, per metà nelle province di Ascoli Piceno e Fermo e per un quarto in quella di Ancona. Nella regione esiste un'ampia variabilità genetica, con 206 varietà censite, ma i vitigni principalmente coltivati sono Sangiovese, Montepulciano, Verdicchio e Trebbiano Toscano, i quali interessano più del 70% della superficie vitata, seguiti da Pecorino, Passerina, Biancame e Maceratino o Ribona (a bacca bianca), Vernaccia nera e Lacrima (a bacca nera). Accanto a questi, sono presenti altri vitigni autoctoni di un certo interesse enologico e per i quali è in atto un lavoro di valorizzazione che, a partire dalla sperimentazione, coinvolge l'intera filiera. La vite, da sempre presente sul territorio marchigiano, ha trovato una razionalizzazione e valorizzazione in tempi relativamente recenti. Nelle Marche hanno ottenuto il riconoscimento della Denominazione di Origine Controllata e Garantita (DOCG) cinque vini: la Vernaccia di Serrapetrona, il Conero Riserva, il Verdicchio castelli di Jesi riserva, il Verdicchio di Matelica riserva e l'Offida. Oltre alle cinque DOCG, quasi tutto il territorio regionale è interessato da una o più delle 15 aree definite a DOC, consultabili in Figura 1. Fra queste le più importanti per numero di iscritti e dimensione territoriale risultano il Rosso Piceno e il Verdicchio dei Castelli di Jesi. Altrettanto significativi anche se con aree di diffusione più limitate sono: il Verdicchio di Matelica, il Falerio dei Colli Ascolani, i Colli Maceratesi, il Rosso Conero, l'Esino, i Colli Pesaresi e il Bianchello del Metauro. Vanno citate, infine, le DOC Lacrima di Morro d'Alba e la Vernaccia di Serrapetrona che, se pure limitate a territori comunali, stanno riscontrando un ottimo successo di mercato. Tra le aree DOC troviamo inoltre i Terreni di San Severino, Offida, e di recente quelli di Pergola e San Ginesio.

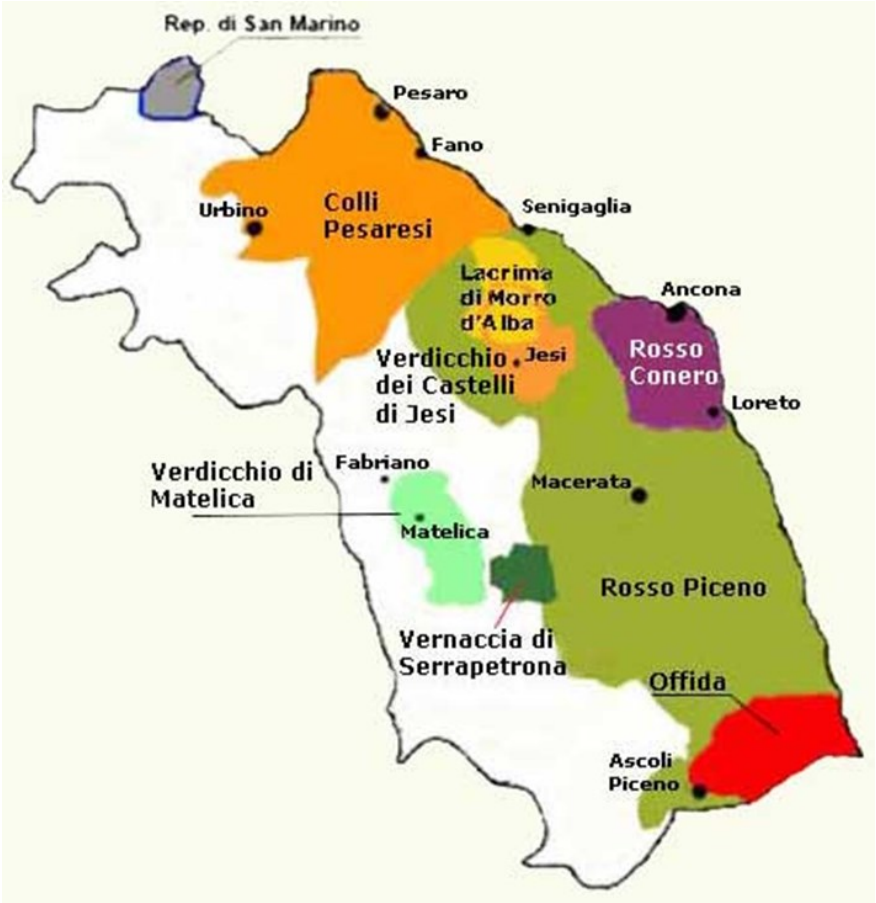

Figura 1 - Areali di produzione di vini DOC e DOCG della regione Marche.

1.2 LE PRINCIPALI MALATTIE DELLA VITE

La vite è una pianta che può essere soggetta a vari tipi di malattie, fra queste quelle dovute a patogeni di natura fungina, possono compromettere la vitalità della pianta, la quantità e la qualità della produzione (Tabella 1). Le più pericolose in questo senso sono sicuramente la peronospora e l'oidio. La presenza delle malattie su scala aziendale è legata a diversi fattori, soprattutto di tipo climatico, da aspetti riguardanti la gestione agronomica e dalla suscettibilità delle singole cultivar. Pertanto, risulta di primaria importanza l'adozione di strategie di protezione atte a contenere lo sviluppo dei patogeni, ad oggi basate sempre di più su criteri di lotta biologica e integrata, mediante l'utilizzo di principi attivi costantemente rinnovati e con il minore impatto ambientale possibile, senza riduzioni dell'efficacia. Le caratteristiche biologiche dei patogeni, l'adattabilità alle condizioni ambientali, la difficoltà di individuare i primi sintomi stagionali e il carattere spesso esplosivo delle epidemie, unite al loro potenziale distruttivo sui grappoli, fanno della peronospora e dell'oidio le malattie più difficili da controllare.

Tabella 1 - Principali avversità crittogamiche della vite.

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

2. LA PERONOSPORA DELLA VITE

2.1 CICLO BIOLOGICO DI *PLASMOPARA VITICOLA*

Plasmopara viticola, l'agente eziologico della peronospora della vite, appartiene al Regno *Straminipila,* classe *Peronosporomycetes* (Phylum *Oomycota*), ordine *Peronosporales*, famiglia *Peronosporaceae.* Come tutti gli oomiceti presenta notevoli differenze rispetto ai funghi propriamente detti, ma condivide con questi la capacità di formare un micelio costituito da ife cenocitiche ad accrescimento apicale, di assorbire sostanze nutritive e di riprodursi mediante spore.

P. viticola è un parassita obbligato, in grado di svilupparsi attivamente solo instaurando un rapporto biotrofico con le cellule vive del proprio ospite. Durante il riposo vegetativo della vite la sopravvivenza del patogeno è garantita dalle oospore, formatesi a seguito di riproduzione sessuata, nei tessuti infetti dell'ospite. Il patogeno sverna in genere nelle foglie colpite dalla malattia e rimaste sul terreno. Il ciclo di riproduzione sessuata, probabilmente stimolata dalla senescenza dei tessuti, avviene in estate inoltrata con la differenziazione degli anteridi, organi sessuali maschili, sottili ed allungati, e degli oogoni, organi sessuali femminili. Attraverso un tubetto di fertilizzazione generato dall'anteridio, i nuclei aploidi dello stesso passano nell'oogonio e, dall'appaiamento di uno di essi con il nucleo aploide dell'oogonio, inizia la differenziazione dell'oospora. Questa non è in grado di germinare subito ma solo alla fine di un periodo di maturazione. In questo lasso di tempo l'oospora sviluppa una struttura, caratterizzata da una spessa parete cellulare, sostanze di riserva ed un unico nucleo, che le consente di affrontare, senza perdere

vitalità, temperature ridotte e prolungati periodi di scarsa disponibilità idrica. Una volta concluso il periodo di maturazione, generalmente entro la fine di novembre – metà dicembre, la capacità di germinazione delle oospore tende gradualmente ad aumentare almeno fino alla metà di aprile. Una sufficiente umettazione del terreno e temperature medie giornaliere che si aggirano sui 10°C favoriscono la formazione dei macrosporangi. La prima pioggia utile facilita il loro trasferimento sugli organi recettivi della vite e la successiva germinazione e dispersione delle zoospore, formatesi al suo interno e responsabili delle infezioni primarie.

Le zoospore, prive di parete e munite di due flagelli di diversa lunghezza e struttura, in un breve lasso di tempo e in presenza di un velo liquido riescono a posizionarsi in prossimità delle aperture stomatiche, si incistano ed emettono un tubetto germinativo, il quale permette la penetrazione nei tessuti dell'ospite solo tramite le aperture naturali della pianta. Il patogeno, attraverso gli spazi intercellulari, riesce a diffondersi nell'ospite, soprattutto nel parenchima lacunoso, assorbendo le sostanze nutritive per mezzo di austori globulari. Il tempo che intercorre tra l'infezione e la comparsa dei primi sintomi è definito periodo di incubazione, sulla cui durata influiscono non solo temperatura e umidità relativa ma anche la tipologia del tessuto colonizzato dal patogeno. Completato il periodo di incubazione compaiono i sintomi dell'avvenuta infezione e, in presenza di almeno 4 ore di buio, temperature non inferiori ai 13°C ed elevata umidità relativa, dalle aperture stomatiche, si assiste all'evasione del patogeno sotto forma di efflorescenza muffosa biancastra, costituita da rami sporangiofori e sporangi, organi deputati alla riproduzione agamica (Figura 2). I rami sporangiofori, lunghi fino ad 1 millimetro, sono caratterizzati da ramificazioni laterali, poste ad angolo retto rispetto all'asse principale e provviste di minute appendici denominate sterigmi, che portano all'estremità gli sporangi, caratterizzati da una forma ovoidale – piriforme. La quantità di sporangi prodotti dai tessuti infetti aumenta proporzionalmente con la temperatura e tende a diminuire progressivamente superati i 20°C, fino quasi ad annullarsi in corrispondenza dei 30°C.

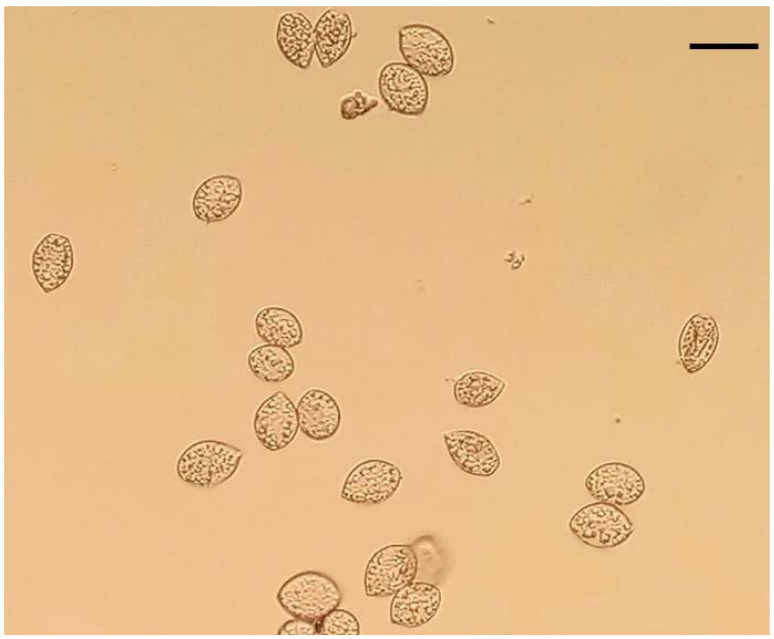

Figura 2 - Dettaglio al microscopio ottico degli sporangi di *Plasmopara viticola*. Barra della scala = 20 µm (Caproli, 2021).

Gli sporangi, per separarsi e sopravvivere, necessitano di elevata umidità relativa o di periodi di bagnatura. Se le condizioni ambientali sono favorevoli, gli stessi germinano e rilasciano, sulla vegetazione sana, le zoospore, che danno inizio al ciclo delle infezioni secondarie, che possono ripetersi più volte nel corso della stagione e si possono sommare a quelle primarie, per via della scalarità di germinazione delle oospore. Il ciclo biologico è rappresentato in Figura 3.

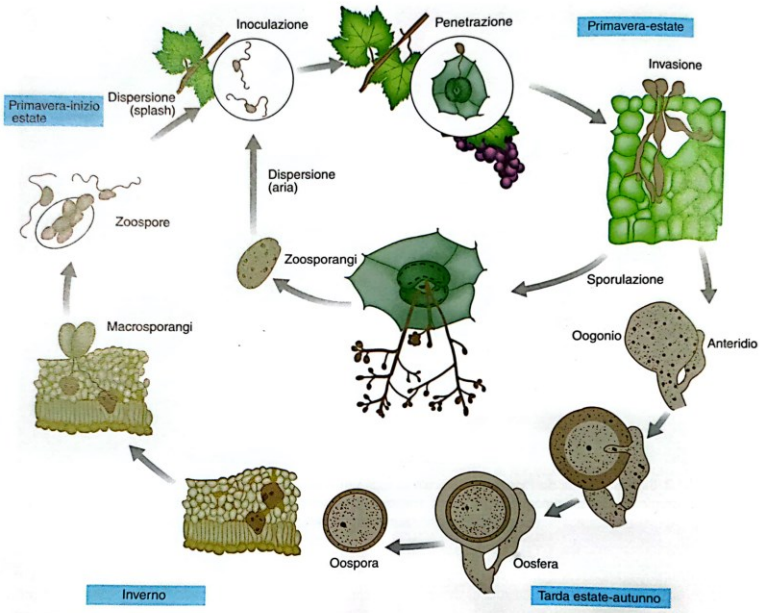

Figura 3 - Rappresentazione schematica del ciclo biologico di *Plasmopara viticola* (Caffi *et al*., 2021).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

L'inizio del ciclo biologico di *P. viticola* può essere definito con la germinazione delle oospore che con un andamento meteorologico a loro favorevole germineranno tra la fine di gennaio e la fine di aprile. Affinché possano così formarsi i macrosporangi sono necessarie condizioni di elevata umidità, motivo per il quale andando avanti poi con la stagione le germinazioni di oospore, seppur abbastanza scalari, tenderanno progressivamente a ridursi.

Anche per la formazione del macrosporangio sono necessarie particolari condizioni ambientali, le quali possono essere riassunte nella regola empirica "dei tre 10" messa a punto dal Baldacci nel 1947, che prevede l'avvio dell' infezione primaria al verificarsi di tre condizioni: temperatura stabilizzata intorno ai 10°C; si siano verificate una o più precipitazioni di almeno 10 mm di pioggia nelle ultime 24-48 ore; lunghezza dei germogli pari o superiore ai 10 cm (germoglio fotosinteticamente attivo e quindi suscettibile data la presenza di stomi aperti). Inoltre, l'andamento meteorologico influenza anche il periodo d'incubazione (lasso di tempo che intercorre tra il momento in cui avviene l'infezione e quello in cui compaiono i primi sintomi), infatti esso ha in genere una durata di 11-15 giorni in corrispondenza di temperature pari a 14°C, e diminuisce fino ad un minimo di 4-5 giorni con temperature comprese tra i 21°C e i 25°C. Con temperature superiori a quest'ultimo valore, la durata del periodo d'incubazione tende a diventare più lunga. Gli sporangi da cui derivano le infezioni secondarie invece si originano a seguito di almeno 4 ore di buio con temperatura maggiore di 13°C e umidità relativa intorno al 98%. Queste infezioni 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 riduzione drastica delle probabilità di infezione (Belli, 2012). Complessivamente è possibile affermare che un andamento meteorologico troppo caldo risulta essere un fattore limitante per lo sviluppo della peronospora. Sbalzi termici nel periodo invernale, possono causare una germinazione anticipata delle oospore, che in assenza di vegetazione recettiva non possono costituire un inoculo valido. Le alte temperature (superiori a 29-30°C) allungano la durata del periodo di incubazione oltre i 15 giorni e l'evasione del patogeno si arresta a 32°C. In primavera ed autunno la temperatura ottimale di 20-24°C riduce a soli 3-4 giorni il periodo d'incubazione (si tratta di una situazione eccezionale). Il clima tendenzialmente asciutto rappresenta il principale fattore di limitazione per la

pericolosità della peronospora sia perché le zoospore richiedono la presenza di un velo liquido per potersi muovere sia perché la siccità ostacola la germinazione delle spore in primavera, mentre nel periodo autunno-invernale ne ostacola la maturazione. Nelle zone più calde, come quelle del Sud Italia, le infezioni secondarie sono spesso bloccate durante l'estate per poi riprendere in autunno, in quanto la produzione dell'inoculo avviene solo in presenza di elevata umidità relativa.

2.3 SINTOMATOLOGIA E DANNI

Non essendo in grado di penetrare attivamente nei tessuti vegetali, *P. viticola* sfrutta le aperture naturali dell'ospite, come 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 più gravi possono compromettere il metabolismo generale della pianta, riducendone la capacità di produrre ed accumulare zuccheri, nonché aromi e altri componenti minori delle bacche, pregiudicando quindi la qualità del prodotto finale. La diminuzione dell'attività fotosintetica è 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 quindi diretti ed indiretti: i primi sono relativi agli attacchi sui grappoli che possono portare a una consistente perdita della produzione nell'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 in quella 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.

2.3.1 Sintomi su foglie

Le foglie giovani, con un diametro inferiore ai 2 cm, presentano aperture stomatiche non differenziate o poco numerose e sono quasi insensibili alla peronospora. Queste

diventano suscettibili quando presentano stomi funzionanti e, come conseguenza dell'infezione, compaiono delle chiazze tondeggianti sulla pagina superiore, con una colorazione che vira dal verde chiaro al giallastro.

Le macchie rappresentano il classico sintomo visibile dell'avvenuta infezione sulle foglie della vite e vengono chiamate "macchie d'olio": aree traslucide che compaiono dopo un periodo di incubazione variabile a seconda della temperatura ambientale e della natura dei tessuti vegetali (Figura 4). Se l'infezione è precoce, la macchia necrotizza a partire dal centro, determinando disseccamenti localizzati. Questo può portare ad una parziale defogliazione della pianta, che si traduce in un drastico peggioramento quanti-qualitativo della produzione in corso e si può ripercuotere anche sulle produzioni degli anni a seguire influenzando negativamente il processo di lignificazione dei tralci. In seguito, con l'aumentare dell'età, le foglie diventano meno sensibili agli attacchi di peronospora, con la crescita e l'ispessimento dei tessuti stessi tendono ad acquisire una resistenza ontogenetica. Lo sviluppo delle ife del patogeno risulta limitato in quanto le nervature creano delle barriere naturali e si manifestano degli ingiallimenti "a mosaico" tra una nervatura e l'altra. Con umidità ambientale elevata e temperature favorevoli, in corrispondenza delle "macchie d'olio", sulla pagina inferiore della foglia, si sviluppa un'efflorescenza muffosa biancastra costituita dalle strutture riproduttive agamiche del fungo (Figura 4).

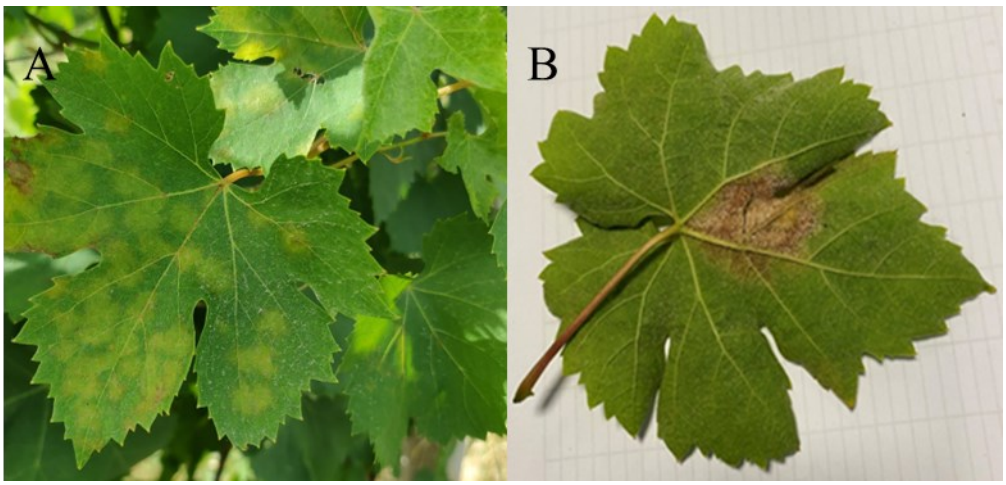

Figura 4 - Tipici sintomi di peronospora su foglie di Verdicchio con le tipiche "macchie d'olio" sulla pagina superiore (A); segni di sporulazione del patogeno sulla pagina inferiore (B). Foto vigneto sperimentale di Rosora (AN) del 16 giugno 2022.

2.3.2 Sintomi su infiorescenze e grappoli

Anche le infiorescenze risultano essere suscettibili a *P. viticola* e vi si possono riscontrare sintomi ben riconoscibili. A differenza delle foglie, l'ingiallimento che si riscontra avvenuta l'infezione primaria, è solitamente poco pronunciato, al contrario la sporulazione che ricopre fiori e rachide evidenzia la presenza del patogeno. Nel caso di attacchi precoci (dalla prefioritura fino a fine fioritura) si ha la necrosi dell'intera infiorescenza, in altri casi l'attacco al rachide induce un imbrunimento ed un incurvamento dello stesso che assume una tipica "forma ad esse" (Figura 5) causata dall'arresto della crescita dei tessuti infetti. Gli attacchi di peronospora sui grappoli sono estremamente temibili dal punto di vista produttivo, a carico delle infiorescenze le infezioni possono essere gravi e causare forti perdite soprattutto nelle annate più umide. La sindrome che comincia a comparire sul grappolo dopo l'allegagione, prende invece il nome di "peronospora larvata" e conferisce agli acini il caratteristico colore bruno senza la presenza del micelio. La peronospora larvata (Figura 6) si manifesta maggiormente nelle estati fresche e piovose, condizioni che consentono estesi attacchi tardivi (Pertot *et al*., 2005). In questa seconda forma non si osserva sporulazione, ciò è dovuto alla degenerazione degli stomi che impedisce la fuoriuscita dei rami sporangiofori dai tessuti colonizzati. La resistenza ontogenetica degli acini appena allegati si manifesta in maniera variabile in funzione sia della cultivar che delle variazioni stagionali che influenzano i tempi della fioritura. Su piante in produzione i danni maggiori sono provocati dagli attacchi in fioritura-allegagione in quanto in questa fase fenologica le infezioni ai grappoli riducono drasticamente la produzione.

Figura 5 - Imbrunimento e tipico ripiegamento ad "esse" del rachide di un'infiorescenza in seguito ad infezione peronosporica su Verdicchio. Foto vigneto sperimentale di Rosora (AN) del 16 giugno 2022.

Figura 6 - Tipici sintomi di peronospora larvata su grappolo di cv. Verdicchio. Foto vigneto sperimentale di Rosora (AN) del 29 giugno 2022.

2.3.3 Sintomi su altri organi verdi

Anche altre parti della pianta possono mostrare sintomi riconducibili alla peronospora, infatti tutti gli organi verdi, con stomi differenziati ed attivi, possono essere colpiti, ma le infezioni si manifestano molto più raramente rispetto a foglie e grappoli. I germogli erbacei sono attaccati soprattutto vicino ai nodi oppure

attraverso infezioni dei piccioli fogliari. In questo ultimo caso l'agostamento (lignificazione) 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 germoglio, restando spesso 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.

Per quanto riguarda invece la fase di lignificazione, questa può ugualmente essere interessata da fenomeni di infezione che provocano sintomi più lievi come limitate lesioni dei tessuti corticali e piccoli cancri.

In conclusione, si può dire che le conseguenze causate da un attacco peronosporico in qualsiasi organo della vite costituiscono un problema serio e possono ripercuotersi sulla produzione stagionale, nei casi più gravi anche in quella dell'anno seguente. Pertanto, risulta di fondamentale importanza l'impostazione di corrette strategie di protezione.

3 L'OIDIO DELLA VITE

3.1 CICLO BIOLOGICO DI *ERYSIPHE NECATOR*

L'oidio della vite è una malattia fungina causata dall'ascomicete *Erysiphe necator* Schwein (forma anamorfa *Oidium tuckeri* Berk), appartenente alla classe degli *Leotiomycetes*, ordine *Erysiphales*, famiglia *Erysiphaceae*. La malattia è attualmente diffusa in tutti gli areali di coltivazione della vite.

In Italia è ormai noto che l'agente patogeno può svernare in due forme: micelio latente nelle gemme (infettate tra la fine dell'estate e inizio autunno) o come cleistoteci nella corteccia (derivanti dalla riproduzione sessuata), quest'ultima è molto più prevalente rispetto alla prima. La prima forma di svernamento è tipica delle regioni con inverni molto miti ed è fortemente ostacolata dalle basse temperature invernali; infatti, temperature inferiori a -12°C possono provocare la morte del micelio all'interno della gemma di vite. Invece, la forma di svernamento tramite i cleistoteci è caratteristica di tutte le zone con inverni freddi.

A seconda del tipo di forma svernante, si possono distinguere due tipi di infezioni: conidiche e ascosporiche. Le infezioni conidiche si manifestano quando il patogeno sverna come micelio latente. Sono facilmente riconoscibili in quanto il micelio si localizza sugli abbozzi fogliari della gemma, e tra il germogliamento e la

fioritura sono ben visibili i germogli a bandiera che si trovano solitamente tra la terza e la quinta gemma dalla base del tralcio. Sul micelio si differenziano conidiofori e conidi che poi grazie al vento potranno essere dispersi. I conidi hanno la capacità di germinare a partire da livelli di umidità relativa molto bassa (20%) grazie alla presenza di grossi vacuoli contenenti acqua endogena. A seguito della germinazione, si formerà un tubo germinativo, poi un appressorio che entrando a contatto con l'ospite innescherà l'infezione.

Le infezioni ascosporiche si originano nel caso in cui il patogeno abbia svernato sotto forma di cleistoteci. Questi corpi fruttiferi contengono da 4 a 6 aschi a maturità, ciascuno dei quali contiene da 4 a 7 ascospore ialine ovato-globose. L'infezione ha inizio nel momento dell'apertura dei cleistoteci quando si disperdono le ascospore, che poi tramite il vento e le piogge arrivano sulla vite dalle fessure del ritidoma. Nelle zone con climi molto miti le ascospore possono essere rilasciate già dalla tarda estate, causando così infezioni tardive nella stessa stagione vegetativa. Comunque, in entrambe le tipologie di infezione, a seguito dell'infezione primaria il patogeno entra in un periodo di latenza, ovvero quel periodo che intercorre tra l'infezione e la sporulazione (Belli, 2012).

Il ciclo biologico (Figura 7) del patogeno può considerarsi concluso con la formazione dell'inoculo svernante che può essere: micelio latente nelle gemme oppure formazione di cleistoteci nella corteccia. Nel primo caso il micelio contamina le gemme precocemente, molto probabilmente tra le fasi fenologiche di 3-9 foglie sviluppate, dopo il suo insediamento rimane latente fino alla primavera successiva. Invece i cleistoteci si formano a seguito dell'incontro tra miceli sessualmente compatibili. Come *P. viticola*, anche *E. necator* è in grado di riprodursi asessualmente e generalmente compie più cicli di patogenesi durante la stagione vegetativa; per questo motivo viene definito, così come *P. viticola*, "patogeno policiclico".

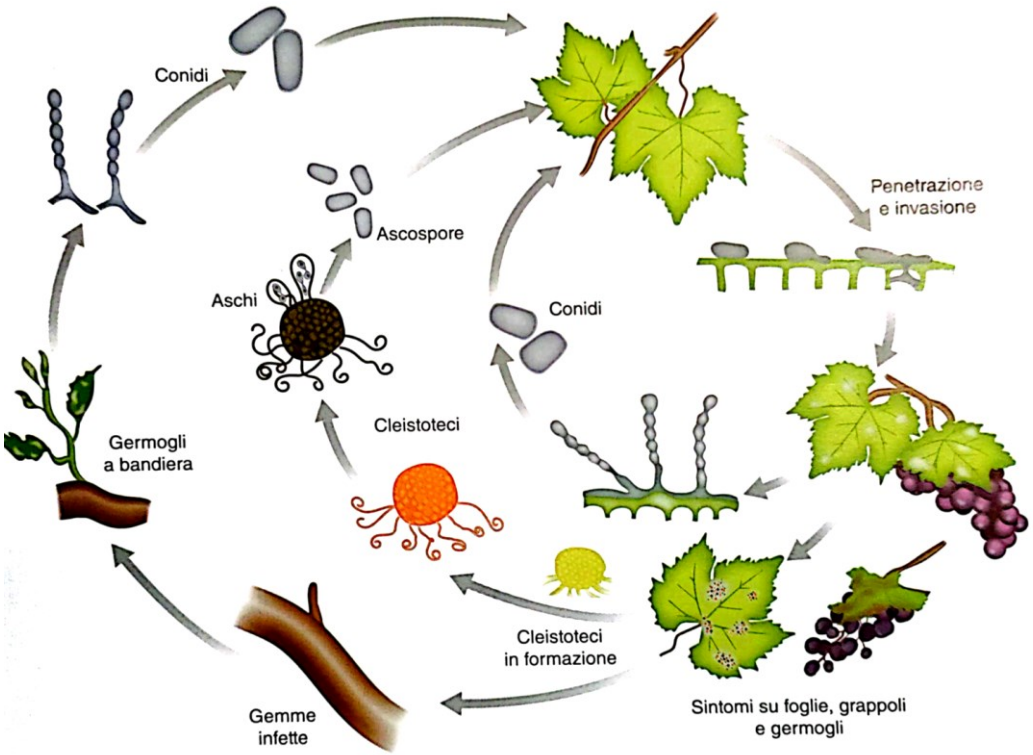

Figura 7 - Rappresentazione schematica del ciclo biologico di *Erysiphe necator* (Rossi e Caffi, 2021).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

Nonostante questo patogeno abbia una rilevanza mondiale per i danni economici che riesce a causare infettando *Vitis vinifera*, le conoscenze sulla sua epidemiologia sono abbastanza scarse data l'impossibilità di coltivare il fungo su substrati artificiali. Nella valutazione del rischio in uno specifico vigneto è opportuno distinguere due diversi ambienti:

- aree a basso rischio di infezione (aree fredde in cui sono frequenti e prolungati i tempi di bagnatura);
- aree ad alto rischio di infezione (aree in cui c'è scarsità di pioggia e temperatura medio/alta).

Nelle aree a basso rischio (tipiche di molte zone di pianura e di fondovalle dell'Italia settentrionale) l'oidio si manifesta sporadicamente e la gravità dell'infezione è legata principalmente alla varietà coltivata. In quelle ad alto rischio (in zone settentrionali di collina ed in quelle meridionali) il fungo è presente in modo epidemico quasi tutti gli anni, con entrambe le tipologie di forme svernanti. La germinazione delle infezioni conidiche avviene in un intervallo termico tra i 6 e 33°C ed in particolare germina l'80% dei conidi tra 22-28°C. Mentre per le infezioni ascosporiche l'apertura dei cleistoteci avviene in seguito ad almeno 2,5

mm di pioggia, e la temperatura ottimale per avviare l'infezione primaria si attesta nell'intervallo 10-25°C sia con acqua sia con umidità relativa superiore al 54%. Quindi, è possibile affermare che il fungo può vegetare da 6 a 32°C, ma le temperature ottimali per le infezioni e lo sviluppo della malattia sono di 20-27°C. Le piogge sfavoriscono le infezioni oidiche. Al contrario di quanto visto per la peronospora, la presenza di acqua sulla pianta è un ostacolo alla germinazione dei conidi che spesso si deformano come conseguenza di un'eccessiva pressione dovuta al turgore cellulare. La pioggia contrasta lo sviluppo delle epidemie in quanto rimuove (dilavandoli) i conidi ed il micelio dalla superficie degli organi infetti. Però, l'aumento di umidità relativa che si ha dopo le piogge stimola una maggiore produzione di conidi. Raramente l'umidità diventa fattore limitante in quanto i conidi possono germinare già con valori di umidità relativa del 20-25%; valori del 40-60% sono sufficienti sia per la germinazione che per l'infezione.

3.3 SINTOMATOLOGIA E DANNI

3.3.1 Sintomi su foglie

L'oidio colpisce tutti gli organi verdi della vite, in particolare foglie e grappoli sono i due organi in cui generalmente vengono riscontrati maggiormente i sintomi e i danni più gravi. Le foglie possono essere attaccate sin dall'inizio della stagione vegetativa, e nelle fasi iniziali i sintomi non sono sempre facilmente visibili; perciò, è necessario prestare la massima attenzione nell' osservazione ed eventualmente avvalersi di una lente.

I primi sintomi specifici sulle foglie sono costituiti da aree più chiare sulle quali compare inizialmente una patina biancastra evanescente ed in seguito un'efflorescenza polverulenta. In caso di forti attacchi e con l'evolvere della malattia compaiono imbrunimenti delle nervature e punteggiature necrotiche. Osservando in controluce il tessuto fogliare, esso appare decolorato e traslucido. La lamina fogliare con il progredire della malattia si può riempire di bollosità e piegare verso l'alto assumendo la tipica forma a "coppa", in quanto le cellule colpite muoiono e la crescita dei tessuti sani non viene assecondata, portando alla formazione di queste malformazioni morfologiche. In seguito, la foglia ingiallisce, necrotizza e cade anticipatamente.

3.3.2 Sintomi su infiorescenze e grappoli

Le infiorescenze sono suscettibili già prima della fioritura. Gli attacchi precoci causano l'aborto e la caduta dei fiori o inibiscono la crescita dei grappolini, e nei casi più gravi, portano al disseccamento del grappolo. In seguito alle infezioni post-fiorali le cellule dell'epidermide degli acini colpiti dal patogeno necrotizzano con la formazione di reticolature bruno-nerastre visibili soprattutto nei vitigni a bacca bianca; nei casi più gravi gli acini non riescono ad assecondare la crescita in volume della polpa e di conseguenza si spaccano aprendo la strada ad altri agenti fitopatogeni (ad esempio *B. cinerea*) o altre avversità. In ogni caso, sugli acini compare quasi sempre la classica efflorescenza biancastra (Figura 8), dovuta ai rami conidiofori del patogeno.

Figura 8 - Comparsa di sporulazione oidica su grappolo di cv. Verdicchio. Foto vigneto sperimentale di Rosora (AN) del 29 giugno 2022.

3.3.3 Sintomi su germogli e tralci

Il fungo è in grado di infettare tutti gli organi erbacei, pertanto, anche questi organi vegetativi possono essere suscettibili alla malattia con la comparsa di sintomi differenti che sono in relazione allo stadio fenologico del tessuto colpito e alla quantità di inoculo presente. Sui germogli il sintomo è causato dalla rapida colonizzazione dei tessuti da parte del micelio svernante protetto dalle perule all'interno delle gemme. In primavera, i germogli infetti sono precocemente ricoperti dalla muffetta biancastra polverulenta e, poiché lo sviluppo della lamina fogliare è ridotto dall'attività del patogeno, assumono un aspetto particolare che è valsa loro la denominazione di "germogli a bandiera" dal termine inglese "flag-shoots" (Sall e Wrisinsky, 1982). Sui tralci, in seguito alla necrosi delle cellule superficiali dovuta all'azione del patogeno compaiono delle aree brune dall' aspetto reticolato che rimangono visibili anche dopo la lignificazione.

4 LA MUFFA GRIGIA DELLA VITE

4.1 CICLO BIOLOGICO DI *BOTRYTIS CINEREA* E CICLO DELLA MALATTIA

Botrytis cinerea, l'agente eziologico della muffa grigia della vite, appartiene alla classe *Discomycetes* (Phylum *Ascomycota*), ordine *Helotiales*, famiglia *Sclerotiniaceae*. È un fungo polifago e pleomorfo, con sistema di compatibilità sessuale di tipo eterotallico bipolare. *B. cinerea* è un patogeno ubiquitario, in grado di svilupparsi sia nelle zone tropicali e subtropicali, sia nelle aree più fredde. Il fungo può sopravvivere nell'ambiente come conidi, micelio allo stato saprotrofo o parassitario e come sclerozi. Al ripristino delle condizioni ottimali, dal micelio o dagli sclerozi si sviluppano i rami conidiofori da cui si liberano i conidi (Figura 9) che, dispersi da vento, pioggia e insetti, causano la diffusione della malattia in campo.

Figura 9 - Rami conidiofori e conidi di *Botrytis cinerea* osservati allo stereomicroscopio. Foto del 9 settembre 2022, Area di Protezione delle colture del D3A dell'Università Politecnica delle Marche.

I conidi generalmente germinano in presenza di acqua o elevata umidità relativa (superiore all'80- 90%), sebbene sia stata verificata la capacità del fungo di colonizzare i tessuti vegetali in contesti più aridi e in presenza di un ampio intervallo di temperatura (0-30 °C), con un optimum a 20-25 °C. *B. cinerea* penetra nell'ospite attivamente, per azione meccanica, mediante differenziazione di uno stiletto a partire dall'appressorio, e per azione enzimatica, mediante produzione di enzimi cutinolitici e pectinolitici, o passivamente, attraverso aperture naturali o lesioni di natura biotica o abiotica. Dopo la penetrazione, il fungo può rimanere in uno stato di quiescenza per un periodo di tempo variabile a seconda delle condizioni ambientali, o svilupparsi come micelio, con andamento intracellulare, intercellulare o superficiale. In presenza di elevata umidità, gli organi infetti si ricoprono di abbondanti sporificazioni che, disperdendosi, causano ulteriori infezioni. Sulla vite, *B. cinerea* può svernare come micelio nel ritidoma, come saprotrofo sui residui della vegetazione, sotto forma di sclerozi, differenziati generalmente su tralci che lignificano molto tardivamente, o come parassita su altre specie ospiti. Tra la fine della fioritura e la prechiusura del grappolo, il micelio del fungo può insediarsi come saprotrofo sui fiori non allegati e sui residui fiorali, o anche avviare infezioni alla base e all'apice delle giovani bacche, che possono necrotizzare, costituendo un'importante fonte di inoculo per l'avvio del processo patogenetico sui grappoli

maturi. Il micelio penetra nella bacca, si approfondisce per 1-2 mm, quindi si estende parallelamente alla superficie (la penetrazione negli strati inferiori è ostacolata dall'elevato contenuto zuccherino della polpa). In condizioni favorevoli (16-24°C) entro 48 ore forma macchie di 1-4 mm di diametro, dopodiché invade gran parte della buccia. Il fungo produce enzimi maceranti (pectinolitici, cellolusolitici e polifenolossidasici) che riducono la consistenza dei tessuti, separando la buccia dagli strati inferiori (buccia che si scortica, o *slip skin*). Le infezioni botritiche possono determinare sgradevoli odori di muffa nel vino e l'incremento di enzimi (laccasi, polifenolossidasi) che facilitano l'ossidazione delle sostanze coloranti e tanniche, causando l'instabilità del vino ed un conseguente notevole decadimento qualitativo.

4.2 SINTOMATOLOGIA E DANNI

Il nome della malattia, muffa grigia, deriva dalla tipica colorazione che assumono, nell'insieme, le sporificazioni del fungo che, in condizioni di elevata umidità, si sviluppano abbondantemente sugli organi infetti. Tutti gli organi epigei della pianta possono manifestare questi segni di malattia. Sulla vite, il fungo può essere responsabile di sintomi di marciume al verde. Alla ripresa vegetativa, sui giovani germogli si possono osservare infezioni apicali che causano imbrunimenti con conseguente necrosi e morte della porzione colpita; sui germogli più sviluppati, invece, si possono osservare imbrunimenti di nodi e internodi, che in condizioni favorevoli alla malattia possono ricoprirsi di sporificazioni del fungo. Sulle foglie, possono comparire macchie bruno cuoio, localizzate principalmente al margine della lamina fogliare, che necrotizzano, ricoprendosi o meno della tipica efflorescenza grigiastra. Le infezioni possono verificarsi anche a carico delle infiorescenze, che, come conseguenza, disseccano. Più importanti sono gli esiti delle infezioni sui grappoli che si osservano dopo l'invaiatura - inizio maturazione, quando gli acini divengono più suscettibili a causa dell'accumulo di zuccheri e della riduzione dell'acidità e delle capacità di difesa. Le bacche imbruniscono assumendo tonalità diverse a seconda dello stadio fenologico e della cultivar. Nelle fasi inziali i sintomi di muffa grigia possono essere discriminati da quelli di altre forme di marciume in quanto la buccia si stacca facilmente dai tessuti sottostanti semplicemente toccando l'area infetta con un polpastrello (*slip skin*), a causa degli enzimi litici prodotti da *B. cinerea*. Successivamente, se la stagione decorre secca,

le bacche avvizziscono, altrimenti si sviluppa il classico marciume molle su cui generalmente si forma la muffa grigia (Figura 10).

Figura 10 - Bacche di uva di *cv*. Verdicchio con sporificazioni di *Botrytis cinerea*. Foto vigneto sperimentale di Montecarotto (AN) del 7 settembre 2022.

5. GESTIONE DELLA PERONOSPORA, DELL'OIDIO E DELLA MUFFA GRIGIA DELLA VITE

5.1 LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA INTEGRATA

Il settore agricolo, nell'ambito della protezione fitosanitaria, si sta affacciando verso sistemi produttivi ecosostenibili che permettano di ridurre sempre di più l'impatto ambientale e l'agricoltura integrata è basata proprio su questi principi, utilizzando le risorse naturali finché possono sostituire adeguatamente i mezzi tecnici adottati nell'agricoltura convenzionale ricorrendo a questi ultimi solo quando sono strettamente necessari per ottimizzare il compromesso fra esigenze ambientali, sanitarie ed economiche. L'obiettivo prioritario della «difesa integrata» è la protezione delle colture con metodi che alterino il meno possibile gli ecosistemi naturali o agricoli e che promuovano i meccanismi naturali di controllo fitosanitario (articolo 3, Decreto Legislativo n. 150/2012). In merito alle tecniche disponibili, a parità di condizioni, la scelta ricade prioritariamente su quelle con un minore impatto e, ad ogni modo, esclude quelle ad elevato impatto. Il sistema di produzione

integrato ha trovato la sua più larga espressione nella protezione delle colture agricole. Le strategie di protezione si basano esclusivamente sull'impiego razionale di tutti i mezzi di protezione disponibili: biologici, fisici, biotecnici, agronomici, genetici e se necessari, chimici.

Con il passare degli anni, grazie anche ad una forte spinta delle attività di ricerca in questo ambito, la difesa fitosanitaria basata sull'utilizzo di prodotti chimici pericolosi sta passando sempre più in secondo piano, a favore di strategie di protezione innovative o alternative.

L'integrazione di tutti i mezzi di protezione disponibili, ha lo scopo primario di mantenere il livello della malattia al di sotto di specifiche soglie di intervento. Se poi a fronte di questi interventi si superi comunque la soglia economica di danno allora si può intervenire chimicamente utilizzando i prodotti ad azione diretta nei confronti del patogeno, selezionando quelli con i profili eco tossicologici più favorevoli. Nell'agricoltura integrata tra i prodotti chimici ammessi, oltre a tutti quelli consentiti in agricoltura biologica come rame e zolfo, ci sono anche i prodotti di sintesi, che però a causa del loro meccanismo d'azione monosito o oligosito possono far sviluppare fenomeni di resistenza nelle popolazioni di patogeni. Vengono quindi spesso affiancati da prodotti di copertura multisito che a differenza dei primi non sviluppano resistenza e non sono quindi soggetti a cali d'efficacia. Tra questi prodotti di copertura il rame svolge ancora oggi un ruolo fondamentale nella protezione antiperonosporica sia in agricoltura integrata che biologica. Le strategie di protezione integrata nella gestione della peronospora devono tener conto sia dell'elevata suscettibilità della vite nei suoi vari stadi fenologici verso questa malattia che della capacità del micete di diffondersi rapidamente e in maniera epidemica nel vigneto. Queste criticità impongono nel caso di peronospora, di non rischiare nell'aspettare la comparsa dei sintomi della malattia, perché a quel punto diventerebbe difficile controllarla pertanto, l'approccio dovrà essere di tipo cautelativo-preventivo con la programmazione di trattamenti quasi calendarizzati tenendo conto dell'andamento meteorologico. Già prima dell'infezione quindi dovranno essere previsti interventi anche in assenza di pioggia, 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 alla malattia, che una volta presente, può diffondersi in maniera molto rapida nel vigneto. I trattamenti su base cautelativa, quindi, assicurando la copertura della vegetazione durante l'intero periodo di

sviluppo del patogeno devono essere ripetuti ad intervalli più o meno regolari in funzione della persistenza del principio attivo utilizzato e dell'andamento meteorologico.

Anche per la protezione dall'oidio, le strategie devono essere impostate con criterio preventivo per evitare l'insediamento del patogeno nel vigneto. La protezione antioidica consiste principalmente nell' uso di fungicidi organici e inorganici, che possono essere suddivisi in due categorie: antioidici di superficie, che interferiscono con la germinazione delle spore e la crescita del micelio; antioidici penetranti, che penetrano nei tessuti della pianta, hanno attività curativa essendo in grado di bloccare le infezioni di oidio in atto. La pianta ha la maggiore suscettibilità agli attacchi oidici nelle fasi fenologiche comprese tra inizio-fioritura e chiusura del grappolo. In tutti i casi, almeno due interventi devono essere effettuati, in corrispondenza delle fasi fenologiche di inizio e fine fioritura; successivamente, i programmi di intervento devono essere proseguiti fino all'invaiatura in dipendenza della persistenza dei fungicidi impiegati e della pressione di malattia nella specifica situazione e a un dato momento (Santomauro *et al*., 1997, 2003).

In linea generale è possibile affermare che tutti gli areali viticoli che sono esposti a condizioni di elevata piovosità, elevati valori di umidità, sono più sensibili al rischio di infezioni peronosporiche rispetto agli areali viticoli con una prevalenza di stagioni caldo aride, in cui la sensibilità aumenta verso l'oidio.

Non è possibile individuare un modello generale decisionale nei confronti di *P. viticola* ed *E. necator*, ma linea guida comune è la ricerca di un compromesso fra l'obiettivo di evitare interventi agronomici superflui e non superare il livello di rischio infettivo che possa mettere a repentaglio la produttività della coltura. A livello tecnico la programmazione agronomica deve prevedere un'utilizzazione di modelli previsionali di tipo climatico che si basino su algoritmi e che mettano in relazione i dati meteorologici (pioggia, temperatura, umidità relativa, bagnatura fogliare) con i parametri di sviluppo dei funghi (es. maturazione, germinazione, dispersione delle spore) per individuare il momento di avvio delle infezioni e la loro evasione dal tessuto vegetale. Inoltre, tra gli accorgimenti preventivi risultano importanti tutti quegli interventi che sfavoriscano la malattia, ad esempio gestendo in maniera corretta la nutrizione azotata e l'irrigazione, onde evitare un eccessivo rigoglio vegetativo; l'eliminazione delle femminelle nel momento della potatura di produzione, che rappresentano facili bersagli per gli inoculi; importanti risultano

anche l'adozione di forme di allevamento che garantiscano una buona aereazione dei filari come il cordone speronato e il guyot e la gestione dell' inerbimento del terreno, che contribuisce ad un controllo efficace dei valori di umidità.

L'ampia variabilità genetica e l'elevata capacità di adattamento alle più diverse condizioni ambientali che caratterizzano *B. cinerea* contribuiscono a rendere difficoltosa la gestione della muffa grigia in campo. La protezione chimica rappresenta il principale mezzo attualmente disponibile per contenere la malattia; i composti comunemente impiegati appartengono alle famiglie dei fenilpirroli, delle anilinopirimidine, dei fungicidi inibitori della biosintesi degli steroli di gruppo III (SBI-III) e inibitori della succinato deidrogenasi (SDHI). Su vite, il metodo di difesa più utilizzato è quello fenologico-climatico che individua i momenti in cui è maggiore il rischio di infezione o in cui gli interventi chimici possono avere un migliore effetto preventivo. Essi sono:

a) fine della fioritura, effettuato solamente nelle aree più umide;

b) prechiusura del grappolo, con finalità eradicante per devitalizzare l'inoculo presente al suo interno;

c) invaiatura, momento in cui il grappolo diventa più suscettibile;

d) preraccolta, con un numero di trattamenti variabile a seconda dell'andamento stagionale, del momento della raccolta e della persistenza dei fungicidi impiegati.

Approcci indiretti, quali metodi agronomici, genetici o biologici, risultano comunque di ausilio per limitare i danni causati dal patogeno. È fondamentale prestare attenzione alla scelta della cultivar e della forma di allevamento, evitare elevate densità d'impianto, limitare le concimazioni, soprattutto azotate, e i volumi di irrigazione al fine di evitare eccessivi livelli di umidità, che possono favorire le infezioni. Utile ai fini del contenimento della malattia nei vigneti è la potatura verde, con la quale vengono eliminate le foglie che circondano i grappoli, al fine di ridurre l'umidità nel microambiente. L'impiego di agenti di biocontrollo (*Bacillus* spp., *Aureobasidium pullulans*) per il contenimento della muffa grigia è una pratica sempre più diffusa, anche in risposta ai problemi di acquisizione di resistenza ai fungicidi, sempre più frequenti nelle popolazioni di *B. cinerea.*

5.2 LA PROTEZIONE IN AGRICOLTURA BIOLOGICA

L'agricoltura biologica è un sistema di agricoltura alternativo, sviluppatosi parallelamente a quello integrato, per tutto ciò che riguarda sia la gestione aziendale che la produzione agricola. In Europa è disciplinata dal Regolamento CE 834/2007

e dalle sue modalità applicative riportate nel Regolamento CE 889/2008, norme che hanno sostituito, a partire dal 1° gennaio 2009, il Regolamento CE 2092/91.

Conosciuta anche come agricoltura "bio", non ha come scopo principale il raggiungimento di elevate produzioni; infatti, è stato evidenziato come i suoli bio producano spesso una resa media di circa il 20-25% più bassa di quella che si avrebbe attraverso la produzione integrata (Mondelaers *et al*., 2009; Tuomisto *et al*., 2012). Tutto ciò comporta che per avere la stessa produzione occorre coltivare, nel caso del biologico, mediamente il 20% in più di suolo. Obiettivi principali dell'agricoltura biologica sono il mantenimento e l'aumento dei livelli di sostanza organica nei suoli e la conservazione della biodiversità, grazie alla riduzione dell'uso dei fertilizzanti, d'erbicidi e di fitofarmaci di sintesi per combattere parassiti e patogeni. In regime biologico la protezione delle colture agrarie si basa soprattutto sulla capacità di autoregolazione degli agroecosistemi, che per svolgere tale funzione devono essere mantenuti in equilibrio e con elevati livelli di biodiversità, sia agraria che naturale. L'agricoltura biologica, dunque, ha un duplice obiettivo: da un lato quello di rispondere alla richiesta sempre più forte da parte del consumatore di alimenti salubri e sicuri, dall'altro fornire beni che contribuiscano alla tutela dell'ambiente, al benessere degli animali e allo sviluppo rurale. Tutti i regolamenti emanati fino ad ora contengono una serie di disposizioni comuni che riguardano metodi di produzione, etichettatura, provvedimenti finanziari a sostegno del biologico fino al sistema dei controlli e tutte le misure adottate per il sostegno della biodiversità. Nel 2012 è stato anche istituito il SIB (Sistema Informativo Biologico) per la gestione informatizzata di tutto l'iter amministrativo che gli operatori sottoposti al regime di controllo devono rispettare. Tuttavia, soprattutto in alcuni casi, l'intervento dell'uomo attraverso input chimici esterni risulta fondamentale per assicurare la produzione. Per il controllo di *P. viticola* in biologico, ad esempio, sono ancora oggi necessari svariati trattamenti fungicidi durante l'anno. Gli unici principi attivi efficaci e autorizzati in bio sono quelli a base di rame, un metallo pesante normalmente presente a certe concentrazioni negli ambienti naturali, che agisce come prodotto di copertura sulla superficie trattata e deve perciò essere distribuito più volte nel corso dell'annata per proteggere la vite. Allo stesso modo, la protezione antioidica della vite in agricoltura biologica non può prescindere dall'applicazione di prodotti a base di zolfo. Spesso, sono addirittura necessari più trattamenti per anno rispetto all'agricoltura integrata, proprio perché non possono essere impiegati agrofarmaci di sintesi e questi

fungicidi inorganici agiscono prevalentemente in maniera preventiva e non curativa.

5.3 MEZZI AGRONOMICI

Le pratiche agronomiche possono contribuire positivamente al contenimento delle malattie sia a livello di singola pianta che di vigneto e all'impostazione di una strategia di protezione che sia il più efficace possibile contribuendo al contenimento dei danni. La lotta alla peronospora, all'oidio e alla muffa grigia parte al momento dell'impianto della coltura, pertanto sono da evitare le zone di fondovalle e le zone dove in generale tendono a verificarsi frequenti ristagni idrici e situazioni di prolungata bagnatura fogliare, particolarmente favorevole alla peronospora. Un altro fattore da tenere in considerazione in fase d'impianto è l'eventuale presenza di vigneti abbandonati che costituendo una notevole fonte di inoculo avvantaggerebbero la diffusione dei patogeni rappresentando un pericolo per gli impianti sani nelle vicinanze; risulta quindi fondamentale l'eliminazione di questi vigneti. Poi, a seconda delle condizioni pedoclimatiche di ciascun sito deve essere scelta la varietà adatta e il portinnesto più opportuno. Per quanto riguarda invece gli interventi da fare in fase di gestione del vigneto, è opportuno favorire la penetrazione della luce e dell'aria all'interno della chioma e intorno al grappolo in modo da rendere la pianta meno predisposta all'insorgenza delle malattie fungine in generale per via del microclima che si crea al suo interno. Gli accorgimenti tecnici riguardano il mantenimento di una giusta carica di gemme durante la potatura invernale, effettuare la potatura verde per eliminare i germogli in eccesso e cimare quelli portanti i grappoli; effettuare la defogliazione (dopo la fioritura) nella parete del filare meno esposta alla luce del sole per scoprire i grappoli; evitare ristagni di acqua con opportune lavorazioni del terreno. Altre pratiche agronomiche di importanza rilevante riguardano la corretta gestione dell'interfila e dei residui di potatura. Si deve cercare di evitare tutte quelle operazioni che favoriscono un vigoroso sviluppo vegetativo che renderebbero la vite più sensibile alle malattie perché favoriscono ombreggiamento e scarso ricambio d'aria; quindi, sono importanti gli interventi estivi di potatura in quanto l'esposizione dei grappoli alla luce diretta inibisce la germinazione dei conidi di oidio, favorendo allo stesso tempo uno sviluppo ottimale degli acini. Comunque, le pratiche agronomiche non sono risolutive, ma sono utili per evitare l'insorgenza di condizioni predisponenti le

malattie, o a crearne di sfavorevoli per i patogeni, ma da sole non sono quasi mai sufficienti a garantire un controllo efficace.

5.4 Resistenza varietale

Lo sfruttamento delle risorse genetiche viene visto come una possibilità aggiuntiva per la difesa delle colture dai patogeni. Molti lavori di ricerca sono incentrati verso la costituzione di nuovi vitigni ibridi geneticamente resistenti a peronospora e oidio (Crespan *et al*., 2021). L'elevata suscettibilità nei confronti di *P. viticola*, ad esempio, accomuna tutte le varietà di *V. vinifera*. L'interazione ospite patogeno è sempre sotto un controllo di segnali legati alla diversificazione a loro volta dovuti all'evoluzione della specie e purtroppo la *V. vinifera*, specie di origine eurasiatica non è coevoluta con *P. viticola* prima della fine del XIX secolo; pertanto, non possiede basi genetiche di resistenza e in entrambe le sottospecie di vite europea, la *sativa* e la *silvestris*, la colonizzazione del mesofillo da parte del patogeno non trova ostacoli. Tuttavia all'interno del genere *Vitis* sono state anche osservate differenti interazioni ospite-patogeno che corrispondono a diverse strade evolutive (Jürges *et al*., 2009); queste specie appartenenti soprattutto al ceppo americano (*V. rotundifolia*, *V. riparia*, *V. cordifolia*, *V. rupestris* e *V. berlandieri*), pur essendo inadatte alla produzione di vino, sono geneticamente predisposte ad una resistenza nei confronti del patogeno a seguito di una forte selezione dovuta alle condizioni ambientali in cui si sono sviluppate, infatti è stato analizzato come l'inibizione dello sviluppo del patogeno si verifichi in modo molto rapido dopo l'incistamento delle zoospore.

Le soluzioni possibili contro i principali agenti fungini della vite in questo senso possono essere la costituzione di nuove varietà resistenti alle malattie ottenute attraverso un processo di miglioramento genetico tradizionale: incrocio e successiva selezione. Nella regione Marche, attraverso l'ASSAM (Agenzia Servizi Settore Agroalimentare Marche), dal 2015, nell'ambito di un progetto di ricerca relativo ai vitigni resistenti, si sta prendendo in considerazione l'adattamento e la rispondenza sul nostro territorio regionale sia sotto il profilo agronomico sia enologico di alcune varietà resistenti a peronospora, oidio e muffa grigia iscritte nel catalogo nazionale delle varietà di vite, e di altre in corso di iscrizione. Le analisi di resistenza fino ad ora sono relative alle due principali crittogame (peronospora e oidio), anche se in un contesto monocolturale, antropizzato e a ridotta biodiversità, si rende necessario monitorare anche eventuali altre avversità fungine oltre a

fitofagi e virosi. Lo scopo è quello di dare ai viticoltori l'opportunità di intervenire a monte della malattia e al contempo l'uso di queste varietà resistenti va considerato come mezzo complementare e non sostitutivo dei mezzi di lotta antiparassitaria agronomici, chimici e biologici. La diffusione a livello nazionale delle varietà resistenti viene ostacolata dal timore che esse possano soppiantare i vitigni autoctoni, producendo vini qualitativamente inferiori, vista la contaminazione del genoma *V. vinifera* con quello di specie meno adatte alla produzione di vino. Al momento a livello regionale, come evidenziato dalle sperimentazioni in campo effettuate dall'ASSAM, i vitigni resistenti che meglio si adattano alle condizioni pedoclimatiche del territorio sono: Trebbiano T. R4, Passerina VCR 450, Montepulciano VCR 456 e Sangiovese R10.

Atre possibilità sono inoltre offerte dall'ingegneria genetica, ad esempio la modificazione di vecchie varietà tramite cisgenesi (con la quale viene inserito un gene di un organismo della stessa specie). Strettamente legata a quest'ultima è poi il *genome editing*, una tecnica altamente specifica intesa come "correttore di errori genetici" del DNA con cui sono state ottenute alcune varietà resistenti. Un'altra strada percorribile è quella di analizzare il patogeno andando a neutralizzare la sua virulenza, ad esempio applicando molecole in grado di inattivare o silenziare i geni responsabili dell'infezione (Haile *et al*., 2021).

5.5 MEZZI CHIMICI

Nel momento in cui l'integrazione di tutti i mezzi di protezione disponibili non arrivi a garantire una sufficiente protezione delle colture, tenendo conto sempre del primario obiettivo di utilizzare metodi di controllo che offrano le migliori garanzie in termini di sostenibilità dal punto di vista della salute umana e dell'ambiente, si dovrà ricorrere all'utilizzo dei mezzi chimici, scegliendo fra quelli con profili eco tossicologici più favorevoli. La scelta del prodotto da utilizzare è di primaria importanza al fine di ridurre al minimo gli effetti indesiderati relativi alle specie ed alle superfici non bersaglio dell'intervento, inclusi gli antagonisti delle specie dannose, gli impollinatori e la complessa micro/macro fauna del terreno. La decisione della sostanza da utilizzare dovrà essere indirizzata verso quelle che, oltre ad essere dotate di un'adeguata efficacia nel contenimento dell'avversità, sia anche la più possibile selettiva verso gli organismi *non-target*. I mezzi chimici propriamente detti sono i prodotti fitosanitari che agiscono direttamente sul patogeno ed in cui la sostanza attiva può essere costituita da molecole di sintesi o

naturali, addizionata in genere con uno o più coformulanti. In base alle loro caratteristiche di modalità d'azione possono essere classificati in: fungicidi di copertura, che rimangono all'esterno del vegetale e svolgono un'azione preventiva; citotropici e translaminari, che vengono assorbiti dal vegetale e si ridistribuiscono localmente all'interno dei tessuti fino ad attraversare la lamina fogliare, svolgendo un'azione curativa nei confronti delle infezioni in atto; mentre i sistemici entrano nei tessuti conduttori e possono essere traslocati a distanza notevole dal punto di applicazione raggiungendo i vari organi vegetali. I penetranti (citotropici, translaminari e sistemici) sono in grado di bloccare delle infezioni in atto, ma solo in casi estremi si tende a sfruttare le capacità eradicanti di questi prodotti ed è buona norma utilizzare i composti endoterapici solo in miscela con prodotti di superficie e con diverso meccanismo di azione dove almeno una sostanza attiva abbia caratteristiche di copertura, poiché i fungicidi curativi vanno in genere ad agire su specifiche vie metaboliche dell'organismo, con elevati rischi di selezione di ceppi resistenti.

Per la protezione della vite dalla peronospora da sempre rivestono un ruolo fondamentale e ad oggi sono diventati indispensabili i prodotti a base di rame sia in agricoltura integrata che biologica, poiché nel primo caso sono sempre meno i prodotti organici di sintesi di copertura ad azione multisito (ad esempio il mancozeb è stato bandito a partire da gennaio 2022), mentre nel secondo caso rappresentano l'unica arma veramente efficace nei confronti della malattia (dato che in biologico non possono essere affiancati da prodotti di sintesi ad azione curativa).

Anche la protezione della vite dall'oidio si basa essenzialmente sull'applicazione massiccia di mezzi chimici, dato che anche in questo caso l'approccio è di tipo cautelativo-preventivo. L'antioidico per eccellenza è lo zolfo, che avendo un meccanismo d'azione multisito danneggia diversi aspetti della biologia del fungo non permettendo, di conseguenza la comparsa di fenomeni di resistenza (Hewitt, 1998). Considerato da alcuni l'anticrittogamico più antico è stato impiegato contro l'oidio sin dalla seconda metà del XIX secolo e rappresenta ancora oggi il mezzo più economico ed utilizzato in agricoltura. Anche in questo caso, in agricoltura biologica rappresenta l'unica arma efficace che gli agricoltori hanno nei confronti della malattia, mentre in agricoltura integrata può essere affiancato da fungicidi di sintesi.

Per la gestione della muffa grigia la protezione chimica rappresenta il principale mezzo attualmente disponibile per contenere la malattia; i composti comunemente

impiegati appartengono alle famiglie dei fenilpirroli, delle anilinopirimidine, dei fungicidi inibitori della biosintesi degli steroli di gruppo III (SBI-III) e inibitori del succinato deidrogenasi (SDHI).

5.5.1 Prodotti a base di rame

La scoperta del rame risale al 1882, quando Pierre Millardet, un professore di botanica dell'università di Bordeaux, si accorse che le piante di vite che erano state imbrattate con un miscuglio di rame e calce per scoraggiare alcuni ladri, erano meno ammalate di quelle non sporcate dalla suddetta poltiglia. Dopo varie prove, che con grande intuizione il professore condusse per ben dosare il rapporto tra il solfato di rame e la calce, ebbe origine quella che poi fu da tutti chiamata «poltiglia bordolese» proprio perché sperimentata negli areali viticoli di Bordeaux. Oggi, a distanza di oltre 130 anni da tale scoperta, il rame riveste tuttora un importante ruolo nella protezione da diverse patologie di origine fungina e batterica ma il suo impiego «storico» è quello per la lotta agli oomiceti, in particolare alla peronospora della vite. 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 variabile. I composti del rame che oggi possono essere utilizzati a livello europeo sono raggruppabili in 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 formulati in cui il rame (soprattutto come ossicloruro) è miscelato con fungicidi organici. La Figura 11 schematizza le proprietà delle quattro principali sostanze attive a base di rame.

- ***Poltiglia bordolese ($CuSO_4$ / $3Cu(OH)_2$ / $3CaSO_4$)***

È stato il prodotto scoperto per primo, 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 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.

- ***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.

- ***Ossicloruro di rame [Cu_2Cl $(OH)_3$]***

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

- ***Solfato di rame tribasico ($CuSO_4$ $5H_2O$)***

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 prestare attenzione alle dosi e alle modalità di utilizzo.

Il meccanismo d'azione del rame è basato sulla tossicità apportata dagli ioni Cu^{++} alle cellule dell'organismo bersaglio, che interferiscono con le spore a diversi livelli. Lo ione rame viene assorbito con grande facilità dalle spore in fase di germinazione ("meccanismo suicida") esplicando 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. È opportuno 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 legata alla capacità del prodotto di liberare gli ioni stessi nell'acqua, che venendo a contatto con le spore verranno assorbiti. Alla luce di quanto detto finora appare chiaro che il rame, con il suo meccanismo agisce sulle spore in fase di germinazione, svolgendo esclusivamente azione preventiva. Per questo motivo, i formulati rameici vengono impiegati come prodotti di copertura e riveste un'importanza 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. È 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, del tipo di rame e della formulazione impiegata.

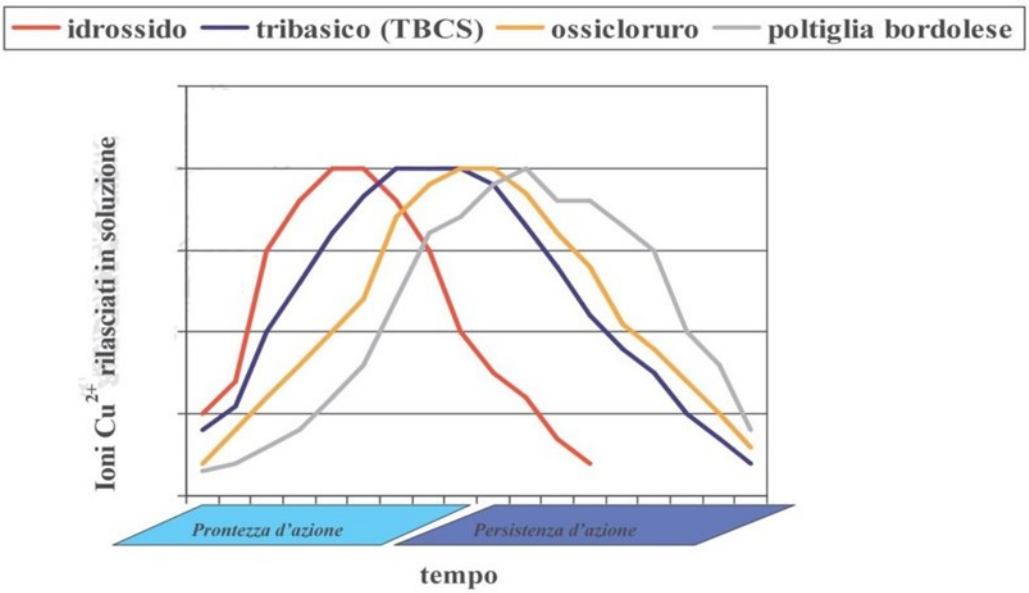

Figura 11 - Rappresentazione grafica sulle differenze tra vari prodotti cuprici ed il loro rapporto tra ioni Cu^{++} rilasciati in soluzione e tempo, che comprende prontezza d'azione e persistenza.

5.5.1.1 Aspetti positivi e negativi del rame

Il rame presenta delle caratteristiche e delle proprietà che sono alla base del suo successo come fungicida: sicuramente vanno considerati l'elevata efficacia nel controllo delle malattie causate da oomiceti; l'elevata efficacia anche a basse dosi (5 ppm inibiscono la germinazione di una zoospora di *Phytophthora* spp.); la bassa tossicità per la vite; il fatto che questi prodotti siano ben conosciuti fra gli operatori agricoli; il basso costo e l'ampio spettro d'azione. Infine, ma non per importanza è doveroso citare la particolare, se non esclusiva attività antibatterica. I prodotti cuprici svolgono un'azione preventiva in quanto agiscono sulle strutture riproduttive del patogeno e mirano quindi a limitare il più possibile le infezioni, riducendo il ricorso ad eventuali interventi curativi. Essi, inoltre, svolgono un'azione tossica multisito, che previene l'insorgenza di resistenze nei patogeni, aspetto da non trascurare soprattutto in agricoltura integrata in cui l'eventuale abbandono del rame potrebbe portare a dover gestire anche le problematiche legate all' insorgere di resistenze per la preferenza di molecole ad azione curativa. Inoltre, possono contribuire a irrobustire la cuticola fogliare e la buccia dei frutti e renderli così meno suscettibili a ferite e conseguenti attacchi di altri patogeni. Questi aspetti hanno reso il rame uno dei principali mezzi di protezione adottati in agricoltura, soprattutto nella viticoltura.

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 (Duca *et al*, 2016) 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 elemento non subisce nessuna degradazione, né chimica né fotolitica ma neanche nessuna metabolizzazione: l'unica asportazione rilevante è data dall'azione dilavante della pioggia; nel terreno, lo ione rameico interagisce con le argille e la sostanza organica, per formare composti insolubili (Businelli *et al*., 2007). A pH >7, il rame precipita sotto forma di idrossido [$Cu(OH)_2$], che è praticamente insolubile in acqua. Quando il pH del suolo diminuisce, 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.

Nonostante il rame sia considerato un microelemento della nutrizione vegetale, elevate concentrazioni possono risultare fitotossiche (Figura 12) (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 cerose 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 in funzione della quantità di prodotto assorbito. Il rilascio dello ione rame deve quindi essere preferibilmente graduale, non solo per evitare o

ridurre l'eventuale fitotossicità, ma soprattutto per assicurare una persistenza più duratura dell'attività fungicida. Altro aspetto negativo tutt'altro che trascurabile riguarda le contaminazioni dell'uva con residui del metallo pesante i quali, oltre ad essere pericolosi per la salute del consumatore, hanno una serie di risvolti negativi in fase di vinificazione sulle caratteristiche aromatiche dei vini stessi (Garde-Cerdán *et al*., 2017). Per ultimo ma pur sempre importante, gli agrofarmaci a base di rame possono rappresentare un pericolo per la salute degli operatori del settore agricolo, i quali sono spesso esposti al contatto con questi prodotti. Alla luce di queste problematiche i quantitativi di rame utilizzabili in agricoltura hanno subito delle progressive limitazioni negli anni, dapprima con il Regolamento CE n. 473/2002, per arrivare poi alla situazione attuale, dove con il Regolamento UE 1981/2018, è stato fissato un limite medio all'impiego di rame in agricoltura di 4 kg/ha per anno (ovvero 28 kg ammessi nei 7 anni di rinnovo con un massimo assoluto di 6 kg/ha per annata). Inoltre, i composti a base di rame sono stati inseriti nella lista delle sostanze attive candidate alla sostituzione. Tutto ciò ha disorientato soprattutto le aziende viticole a conduzione biologica, che vedono nel rame l'unica arma efficace ed utilizzabile nei confronti della peronospora della vite, stimolando negli anni la ricerca di soluzioni alternative per la protezione delle piante.

Al momento, pur essendo allo studio soluzioni alternative al suo utilizzo, in viticoltura il rame riveste ancora un ruolo fondamentale per la protezione dalla peronospora. L'industria chimica già da tempo ha in atto un processo di rinnovamento delle formulazioni, e i prodotti rameici sono quindi oggetto di una continua evoluzione tecnologica, permettendo alle industrie agrofarmaceutiche di ottenere formulati rameici efficaci a dosi sempre più basse di rame con lo sviluppo, parallelamente, di strategie di utilizzo a basso dosaggio di rame (Romanazzi *et al*., 2010).

Figura 12 - Sintomi di fitotossicità da rame su foglia di vite (www.informatoreagrario.it).

5.5.2 Prodotti a base di zolfo

Considerato da alcuni l'anticrittogamico più antico, lo zolfo è la molecola più importante per la protezione dall'oidio. Agisce allo stato elementare come vapore sul micelio e sulle spore del parassita. La sua azione multisito danneggia diversi aspetti della biologia del fungo non permettendo, di conseguenza, l'insorgere di fenomeni di resistenza. Penetra nella cellula fungina grazie alla sua liposolubilità ed agisce danneggiando la membrana cellulare e determinando la fuoriuscita dell'acqua. La morte del fungo avviene quindi principalmente per disidratazione. L'azione anticrittogamica dello zolfo varia in funzione della temperatura, dell'umidita relativa ambientale e della finezza delle particelle. Poiché lo zolfo funziona in fase di vapore, le basse temperature e l'elevata umidità relativa ne riducono l'efficacia. Con temperature elevate (oltre i 25°C) lo zolfo sublima velocemente e garantisce una copertura per tempi limitati (4 o 5 giorni), mentre con temperature più basse resta attivo fino a 6 o 7 giorni. L'azione fungicida inizia ad esplicarsi a 10-12°C con zolfi fini e a 18-20°C con quelli più grossolani. La dimensione delle particelle incide sulla velocità di sublimazione, sull' uniformità di copertura della vegetazione e sulla persistenza del fungicida: se le dimensioni sono eccessive, questo si distribuisce irregolarmente sulla vegetazione, sublima lentamente ed è più persistente; al contrario, particelle di ridotte dimensioni garantiscono una copertura uniforme della vegetazione, una sublimazione rapida

ma una minore persistenza e con il rischio di effetto fitotossico. Per ridurre il rischio di danni da fitotossicità, è opportuno effettuare i trattamenti nelle ore più fresche della giornata, soprattutto in estate. Sul mercato è disponibile una vasta gamma di prodotti contenenti zolfo in diverse formulazioni:

- Zolfo bagnabile, un anticrittogamico idrosospendibile;
- Zolfo bagnabile e cere terpeniche, si tratta di un fungicida contenente zolfo bagnabile con l'aggiunta di alcoli terpenici per migliorare l'adesività e la persistenza del prodotto, riducendo nel contempo i rischi di fitotossicità; zolfo micronizzato (la formulazione è polvere bagnabile ed è costituito da particelle di 3-5 μ che si ottengono per macinazione di zolfi sublimati);
- Zolfo polverulento ventilato, formulato come polvere secca e la distribuzione deve essere eseguita con impolveratrici meccanici ad erogazione regolabile per ottenere una nube che investa la vegetazione, ricoprendola uniformemente;
- Zolfo colloidale, costituito da particelle molto fini con caratteristiche colloidali. In questo tipo di prodotto lo zolfo è mescolato ad altre sostanze di varia natura quali composti rameici o composti proteici (proteinato di zolfo). In genere, gli zolfi colloidali sono più fitotossici e meno persistenti rispetto alle formulazioni polverulente;
- Zolfo bentonitico, che si ottiene facendo adsorbire lo zolfo fuso da argilla bentonitica. È una formulazione poco conosciuta e diffusa a causa del complesso processo di produzione.

Gli zolfi per trattamenti liquidi richiedono apporti quantitativi più bassi rispetto ai prodotti pulverulenti che hanno il vantaggio di penetrare meglio attraverso la vegetazione (Muccinelli, 2000). Lo zolfo è un prodotto non compatibile con oli minerali e antiparassitari a reazione alcalina ed ha un'azione secondaria contro gli acari. Inoltre, può interferire sui processi di fermentazione se presente in grande quantità sui grappoli soprattutto nel caso di vitigni bianchi a maturazione anticipata. Relativamente alle strategie di impiego dello zolfo, sono da preferire applicazioni con zolfo polverulento nel periodo antecedente la fioritura ed in fase di prechiusura grappolo, limitandone al massimo l'uso nell'ultimo periodo della stagione al fine di evitare inconvenienti durante la vinificazione. Attualmente, a differenza di quanto è avvenuto per il rame l'impiego dello zolfo non trova restrizioni nella viticoltura. Tuttavia, sono noti i suoi effetti tossici nei confronti dell'uomo e

dell'entomofauna utile. Anche lo zolfo è oggi sempre più visto come una fonte d'inquinamento, con conseguenze per la salute del suolo e degli ecosistemi acquatici probabilmente simili a quelle note per le piogge acide. Lo zolfo utilizzato come fungicida e immesso nell'ecosistema è, infatti, soggetto a varie trasformazioni, e va ad aumentare la concentrazione di solfato nella soluzione circolante del suolo e poi nelle acque superficiali, con conseguenti effetti negativi sui processi biogeochimici dapprima a livello locale e poi diffuso (Hinckley *et al.*, 2020).

5.6 ALTERNATIVE AI FUNGICIDI TRADIZIONALI

La protezione delle colture è basata ancora oggi soprattutto sull'utilizzo di sostanze chimiche che agiscono direttamente contro i patogeni per poterne contenere la loro diffusione. Purtroppo, però, l'uso di agrofarmaci ha danneggiato l'equilibrio dei vari comparti biologici, più in generale dell'ecosistema, in quanto l'introduzione di queste molecole estranee ai processi biologici ha causato effetti negativi a carico dell'ambiente e degli organismi non bersaglio dei fitofarmaci; inoltre, anche la salute dell'uomo è messa a rischio dall'applicazione di agrofarmaci, sia considerando gli operatori che svolgono i trattamenti, sia i consumatori finali. Proprio sulla base dei rischi legati all'utilizzazione dei mezzi chimici per la protezione delle colture, nel maggio 2020, la Commissione europea ha presentato, contemporaneamente alla "strategia per la biodiversità", la strategia "*Farm to Fork*", la quale si compone di una serie di obiettivi da raggiungere entro il 2030, tra i quali: ridurre del 50% l'uso dei pesticidi di sintesi chimica o pericolosi e destinare almeno il 25% della superficie agricola all'agricoltura biologica. Tutto ciò riguarda anche i prodotti rameici, i quali vengono ancora ampiamente utilizzati in agricoltura integrata, ma soprattutto in agricoltura biologica dove, ad oggi, rappresentano i soli in grado di garantire dei livelli di protezione accettabili da alcune malattie fungine come la peronospora della vite. Sempre di più, la sperimentazione è quanto mai indirizzata verso la ricerca di soluzioni alternative che possano sostituire o almeno ridurre l'uso di agrofarmaci, come in questo caso rame e zolfo, allo scopo di ridurre l'inquinamento dovuto alle pratiche agricole, ma allo stesso tempo di proporre delle soluzioni che permettano agli agricoltori di mantenere un reddito. In particolare, i campi più indagati riguardano: l'ingegneria genetica, con l'introduzione di geni di resistenza in piante che ne sono sprovviste; la possibilità di aumentare le difese naturali della pianta attraverso l'induzione di resistenza, dove l'uso di estratti

vegetali sembra influire positivamente; l'utilizzo di agenti di biocontrollo (microrganismi antagonisti), che possano contrastare lo sviluppo dei patogeni tramite meccanismi di antagonismo naturale. Inoltre, la resistenza delle piante alle malattie è condizionata anche da numerosi fattori ambientali ed agronomici, pertanto, dovranno essere attuati o mantenuti tutti gli accorgimenti agronomici e tecnici volti a sfavorire lo sviluppo dei patogeni, o a evitare le condizioni predisponenti alla malattia. Tutto ciò deve esser fatto senza ridurre l'efficacia della protezione delle colture, e mantenendo elevata la qualità e la quantità delle produzioni.

5.6.1 Molecole naturali con azione antifungina

- ***Il chitosano***

Il chitosano è un biopolimero naturale, ottenuto per deacetilazione della chitina mediante esposizione a soluzioni alcaline di NaOH o per idrolisi enzimatica in presenza di chitina deacetilasi. È formato da D-glucosamina e N-acetil-D glucosammina che sono tenute insieme da legami glucosidici β-1,4 (Figura 13). È una molecola ottenuta dall'esoscheletro dei crostacei ed è largamente utilizzato in diverse applicazioni come soluzioni, gel o film e fibre. È utilizzato negli ambiti più disparati come quello della cosmesi, della biomedicina, delle biotecnologie e dell'industria alimentare, oltre che nel settore agricolo per la protezione delle colture dalle malattie. Per quanto riguarda l'agricoltura il chitosano trova applicazione per la sua efficacia nel controllo delle malattie di frutta e ortaggi (Romanazzi *et al*., 2017). Il chitosano cloridrato è stato uno dei primi composti di origine naturale ad essere registrato nella lista delle SdB (sostanze di base) approvate dall'Unione Europea per fini fitosanitari ai sensi del Regolamento UE 2014/563, sia per l'agricoltura biologica sia per quella integrata. Grazie alla sua bassa tossicità è stato approvato come sostanza GRAS (*Generally Recognized As Safe*) negli Stati Uniti dalla FDA (Hu *et al*., 2019; Romanazzi *et al*., 2022) e la sua applicazione è ritenuta dunque sicura per il consumatore e l'ambiente. Molti autori hanno studiato le applicazioni del chitosano con risultati positivi nel postraccolta per la protezione di derrate alimentari facilmente deperibili (Romanazzi e Moumni 2022), come uva da tavola (Meng *et al*., 2008) e fragole (Romanazzi *et al*., 2013). Il chitosano è uno degli elicitori più studiati per il controllo di *P. viticola* e altri funghi fitopatogeni della vite come *B. cinerea* ed *E. necator* (Romanazzi *et al*., 2016). L'efficacia fitoiatrica è dovuta alla sua triplice attività: antimicrobica,

filmogena ed elicitante (Romanazzi *et al*., 2018). L'azione antimicrobica è resa possibile dalle cariche elettriche positive del biopolimero che vanno ad interagire con le cariche elettriche negative tipiche della superficie cellulare di batteri e funghi, alterando la loro permeabilità cellulare; l'azione filmogena invece consiste nella formazione di un film semipermeabile attorno ai tessuti, che blocca l'infezione e lo sviluppo dei parassiti, ma che al contempo tende a ridurre la traspirazione delle superfici vegetali trattate. Infine, è considerato un potente elicitore in quanto è in grado di indurre nei tessuti vegetali trattati una risposta di difesa. Quando viene applicato sui tessuti vegetali simula la presenza del patogeno e stimola l'attivazione di una serie di meccanismi di difesa endogeni delle piante (perché la struttura del chitosano è chimicamente simile alla struttura delle pareti cellulari fungine in fase di degradazione e di altri costituenti fungini), come: sintesi di fitoalessine nelle cellule vegetali; formazione di lignina; produzione di inibitori della proteasi; variazioni del flusso ionico; acidificazione del citoplasma; depolarizzazione della membrana e fosforilazione delle proteine; attivazione di chitinasi e glucanasi; generazione di specie reattive dell'ossigeno; formazione di callosio; biosintesi di acido jasmonico; espressione di geni correlati alle risposte di difesa (Amborabé *et al*., 2008; El Hadrami *et al*., 2010). Inoltre, *in vitro* è stato dimostrato come l'applicazione del chitosano influisca positivamente nell'accumulo di trans e cis-resveratrolo e Ɛ-viniferina nelle foglie di *V. vinifera* (Aziz *et al*., 2006), che svolgono naturalmente una funzione di difesa della pianta contro i microrganismi patogeni, soprattutto fungini. Il chitosano può potenziare le difese delle piante e indurre la resistenza dell'ospite sia nelle specie monocotiledoni che in quelle dicotiledoni. Altri effetti ascrivibili ad applicazioni di chitosano sulla fisiologia dei vegetali possono essere: maggior potere germinativo ed emergenza precoce, riduzione dello stress idrico, aumento della biomassa prodotta in rapporto all'acqua consumata, miglior sviluppo delle radici, aumento del raccolto, aroma più intenso dei frutti, maggiore crescita vegetale e formazione di micorrize ed infine aumento della *shelf life* di prodotti ortofrutticoli freschi. Il chitosano è stato utilizzato anche nella lotta ai fitoplasmi, come nel caso del legno nero, dove è emerso un tasso di remissione dei sintomi leggermente superiore ai testimoni non trattati, sebbene altri formulati commerciali abbiano mostrato delle risposte molto più efficaci (Romanazzi *et al*., 2010, 2013). Il chitosano è una molecola sicura e biodegradabile, non presenta tossicità né verso l'uomo né verso le specie vegetali e, tra i vari prodotti naturali, attualmente rappresenta il candidato principale per affiancare e in

qualche caso sostituire i fungicidi tradizionali a base di rame nelle strategie di protezione della vite in agricoltura biologica ed integrata.

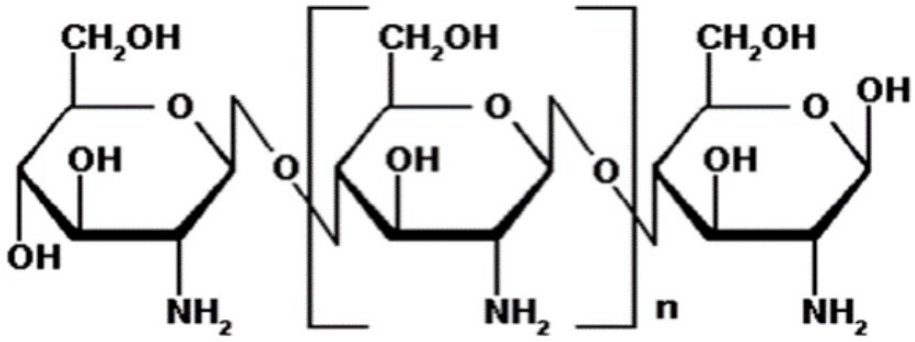

Figura 13 - Rappresentazione della struttura chimica del chitosano. (Younes *et al*., 2015).

- ***Fosfiti e fosfonati***

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

- ***Acido salicilico***

È un composto naturale che stimola le difese endogene ed è presente all'interno delle piante in piccole quantità, attiva la sintesi di determinate proteine e partecipa

alla distruzione cellulare e all'induzione della SAR. Può essere considerato un prodotto alternativo al rame nella protezione antiperonosporica ma la sua efficacia è sicuramente più limitata poiché riesce a garantire un buon controllo solo in caso di bassa pressione della malattia. Rispetto ai prodotti cuprici ha il vantaggio di poter essere distribuito in tutte le fasi fenologiche della vite dal momento che assicura la copertura anche in fioritura, dove invece il rame è altamente problematico.

- ***Bicarbonati di sodio e potassio***

Il bicarbonato di sodio è un sottoprodotto della soda che presenta una buona azione contro l'oidio. Non è tossico e non è considerato un antiparassitario. Il sale di potassio invece è un prodotto sintetizzato partendo dall'idrossido di potassio. Esperienze positive si sono avute nel campo della viticoltura con l'utilizzo di concimi fogliari a base di potassio che in molti casi hanno evidenziato un'attività pari a quella dei normali prodotti antioidici di sintesi. L'azione dei bicarbonati sembra dovuta al danneggiamento della membrana delle cellule nelle spore e dall'innalzamento del pH a livello della superficie fogliare che crea un ambiente inadatto alla germinazione delle spore del patogeno (Pertot *et al.*, 2005). I cristalli di bicarbonato formano una barriera meccanica per le ife germinanti, ritardando lo sviluppo del micelio ed incrementando la flora batterica. Questi prodotti hanno un meccanismo ad azione preventiva: il momento e la dose di utilizzo sono molto importanti. Un uso non corretto del bicarbonato di sodio può, infatti, comportare la comparsa di ustioni fogliari e accumulo di sodio nel suolo con conseguente alterazione del pH e rallentamento della crescita delle piante. Generalmente i bicarbonati si impiegano alla dose di 0,5-1,0% prima della fioritura e 1,0-1,5% dopo la fioritura, evitando di miscelarli con preparati acidi. L 'attività del bicarbonato di sodio non è molto persistente; viene, infatti, facilmente dilavato anche da abbondanti rugiade. Per favorirne la corretta distribuzione sulle foglie è spesso applicato alla pianta con l'aggiunta di un bagnante.

- ***Propoli***

È un prodotto derivante dalle api che elaborano un gran numero di sostanze resinose, cerose e gommose presenti negli organi vegetali di piante quali castagno, salice, ippocastano, pioppo, abete, quercia e frassino. Contiene composti di natura fenolica (flavoni, flavonoidi e flavononi) che manifestano proprietà fitostimolanti, favoriscono l'autodifesa della pianta e potenziano l'azione di alcuni antiparassitari

ma senza alcun effetto diretto verso il parassita di natura fungina. L'impiego della propoli da sola è sconsigliato a causa della sua inefficacia ma può essere interessante la distribuzione di una miscela contenente zolfo o sali di rame di cui potenzia l'azione e ne permette un uso in concentrazioni limitate.

- ***Cerevisane***

Cerevisane è una sostanza inerte costituita dalle pareti cellulari del lievito *Saccharomyces cerevisiae* ceppo LAS117, brevettata nel 2006. *Saccharomyces cerevisiae* è un lievito ubiquitario presente in natura, da sempre utilizzato dall'uomo come strumento biologico nel campo alimentare. Il cerevisane è stato inserito nell'All. del REG. EU 540/2011 come sostanza a basso rischio ed è ammesso in agricoltura biologica. È in grado di indurre nei tessuti vegetali trattati una risposta di difesa, quando viene applicato sui tessuti vegetali simula la presenza del patogeno e stimola l'attivazione di una serie di meccanismi di difesa endogeni delle piante (perché la sua struttura è chimicamente simile alla struttura delle pareti cellulari fungine in fase di degradazione e di altri costituenti fungini). Viene utilizzato per la protezione della vite da *B. cinerea*, *P. viticola* e *E. necator* con risultati soddisfacenti (Pujos *et al*., 2014).

- ***Laminarina***

La *β*-1,3-glucan laminarina deriva dall'alga marrone *Laminaria digitata*. Ha dimostrato di essere un efficiente elicitore delle difese endogene delle cellule della vite e di essere in grado di controllare lo sviluppo e le infezioni di *B. cinerea* e *P. viticola* (Aziz *et al*., 2003). Nei confronti della peronospora è stata esclusa la sua azione diretta su zoospore e su sporangi. Interessate però è il fatto che le piante normalmente suscettibili alla peronospora trattate con la laminaria solfato, abbiano mostrato la stessa risposta dei vitigni resistenti alla malattia come il Solaris (Trouvelot *et al*., 2008). L'applicazione di questo prodotto sulla parete fogliare non ha indotto la morte delle cellule vegetali ed ha dimostrato un controllo di *B. cinerea* e *P. viticola* rispettivamente del 55% e del 75% circa. Spesso vengono associate a estratti microbici di *Saccharomyces* (Romanazzi *et al*., 2021). I componenti di questa sostanza sono analoghi a quanto si trova nella composizione della parete cellulare dei funghi.

- ***Silicati di sodio e potassio***

Sono composti a base di sali dell'acido salicilico derivante dalla fusione di sabbia di quarzo con silicato di sodio e silicato di potassio. Formano un film di protezione meccanica e incrementano la resistenza al patogeno attraverso l'irrobustimento delle cellule dell'epidermide, svolgendo un'azione preventiva e protettiva. Tali prodotti sono utilizzabili normalmente in combinazione con zolfo, ricordando di non impiegarli durante la fioritura. C'è il rischio di sintomi di fitotossicità sulle foglie più vecchie e sul grappolo sottoforma di necrosi e ritardi di maturazione sulle varietà sensibili.

- ***Polisolfuro di calcio***

Il polisolfuro di calcio è un composto inorganico a base di zolfo e calcio dotato di proprietà insetticida e fungicida. È un prodotto semplice che, una volta esplicata la sua azione, subisce processi di degradazione elementari senza lasciare residui nell'ambiente e quindi non è pericoloso per l'uomo, gli animali e gli insetti utili. L'azione fungicida si ha a carico di alcune crittogame, fra cui corineo, bolla, oidio e ticchiolatura. Il polisolfuro, sulla pianta libera zolfo allo stato nascente (derivante cioè da una reazione di scissione molecolare dei solfuri, a seguito di fenomeni ossidativi di queste molecole) che è tossico per molti funghi.

- ***Olio di neem***

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

- ***Reynoutria sachalinensis***

L'estratto di questa pianta ha dimostrato proprietà antioidiche su diverse piante ornamentali. Il meccanismo di azione si basa sul rafforzamento del sistema naturale di difesa della pianta attraverso una stimolazione della produzione di fenoli, fino a cinque volte superiore la norma in seguito al trattamento.

5.6.2 Agenti di biocontrollo per l'oidio della vite

Gli agenti di biocontrollo sono microrganismi presenti in natura che possono contenere la crescita del patogeno, mantenendo la sua presenza al di sotto della soglia di danno economico, sono cioè degli antagonisti che non eliminano totalmente il parassita, ma ne limitano lo sviluppo (Kiss, 2003). Questi microrganismi vengono spesso isolati dall' ambiente naturale, non sono tossici per l'uomo e l'ambiente e sono prodotti industrialmente mediante colture su substrato solido o liquido. I microrganismi antagonisti agiscono contro il patogeno utilizzando uno o più meccanismi d'azione: iperparassitismo, in cui l'antagonista vive nutrendosi del patogeno; competizione per spazio e/o nutrienti; produzione di molecole sgradite al patogeno; rilascio di sostanze antibiotiche o tossiche; induzione di meccanismi di difesa nella pianta. Il principale vantaggio degli agenti di biocontrollo è dato dal fatto che, essendo microrganismi presenti naturalmente nell'ambiente, sono facilmente degradabili e non lasciano residui sui prodotti destinati all'alimentazione; hanno una ridotta persistenza e non c'è nessun rischio di inquinamento ambientale e delle falde acquifere. Sono selezionati escludendo i produttori di antibiotici e tossine e quindi sono innocui per la salute umana; con il loro impiego l'utilizzatore non viene esposto a sostanze chimiche nocive durante i trattamenti e non avendo dei tempi di carenza possono essere impiegati anche in prossimità della raccolta.

Purtroppo, per numerose ragioni, il più delle volte di natura normativa, economica o commerciale, questi preparati microbiologici faticano ad imporsi sul mercato. Le maggiori difficoltà che si riscontrano nella loro applicazione pratica sono: la ridotta persistenza; l'efficacia non alla pari a quella dei fungicidi tradizionali; la variabilità dei risultati; la necessità di essere applicati la sera o il mattino presto per evitare che le alte temperature e i raggi ultravioletti possano inattivarli; la non miscibilità con i vari fungicidi ed infine la complessità operativa che deriva dalla manipolazione di formulati che comunque contengono degli esseri viventi e non solo sostanze chimiche (ad esempio, anche la conservazione deve essere gestita in maniera appropriata). Contro l'oidio essi rappresentano comunque una potenziale alternativa all'utilizzo dello zolfo e dei fungicidi di sintesi, non solo in agricoltura biologica, ma anche in quella integrata. Tra i prodotti a base microbica con attività antioidica autorizzati su vite, troviamo attualmente tre specie: *Ampelomyces quisqualis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*.

La capacità di *A. quisqualis* di parassitizzare gli oidi è nota fin dal 1852 e già nel 1932 si ipotizzò una sua potenzialità per controllare queste malattie. Può attaccare numerose specie appartenenti alle *Erysiphales*, tra cui *E. necator* agente dell'oidio della vite. Agisce penetrando nelle ife del patogeno e assorbendone le sostanze nutritive. La sua attività parassitaria indebolisce il patogeno che rallenta la sua crescita e riduce o azzera la sporulazione, ma non lo elimina mai completamente. Il meccanismo è lento, per cui poco si adatta alle fasi di rapido sviluppo della malattia. Può anche colonizzare i cleistoteci che si formano dai primi abbassamenti termici, ma solo quando sono immaturi (da colore bianco fino al giallo scuro), per ridurre l'inoculo svernante che si traduce in infezioni primarie più deboli nella primavera successiva. Poiché una volta germinati i conidi di *A. quisqualis*, se non trovano l'ospite muoiono rapidamente e sono molto sensibili al disseccamento e alle alte temperature, è necessario trattare alla comparsa dei primissimi sintomi, in modo particolare nelle prime ore del mattino o in serata affinché la penetrazione nel micelio dell'oidio avvenga più rapidamente e in condizioni favorevoli. La sospensione non deve essere preparata con troppo anticipo, in quanto i conidi perdono vitalità dopo 12 ore.

Al genere *Bacillus* appartengono diversi ceppi registrati come principi attivi contro l'oidio, soprattutto appartenenti alle specie *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*. Sono batteri a forma di bastoncello, che esercitano un'antibiosi diretta verso un ampio gruppo di patogeni, grazie a vari metaboliti, tra cui i più importanti sono i lipopeptidi (surfactina, iturina, fengicina) e alcuni antibiotici come subtilina, bacillosina. Alcuni di questi metaboliti inducono anche resistenza nella pianta soprattutto con trattamenti radicali nelle serre, mentre in misura minimale con i trattamenti fogliari, per cui questo meccanismo è meno rilevante sulla vite. La caratteristica di tutti i prodotti a base di *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* è quella di avere un effetto rapido, ma una persistenza molto limitata; inoltre, va fatta attenzione alla previsione di piogge in quanto sono facilmente dilavabili. Essendo dei batteri hanno in genere una buona miscibilità con i fungicidi, ma in ogni caso la compatibilità va sempre verificata in etichetta. I ceppi di *Bacillus* sono efficaci in un ampio intervallo di temperature, pur rimanendo sempre valido il consiglio di applicarli in estate nelle ore più fresche. Bisogna inoltre fare attenzione nell' utilizzo di acque eccessivamente clorurate, che possono nuocere ai batteri.

5.6.3 Agenti di biocontrollo per la muffa grigia della vite

Gli agenti patogeni sono la causa del 20-30% delle perdite globali di resa delle colture (Savary *et al*., 2019). Per garantire una resa sufficiente e costante delle colture come la vite spesso dipendiamo dall'utilizzo di prodotti chimici. Tuttavia, sono urgentemente necessari fungicidi sicuri per controllare i patogeni, perché i fungicidi sintetici rappresentano una minaccia per la salute dell'uomo e per l'ambiente. Inoltre, la resistenza ai fungicidi è una delle principali sfide nella gestione del patogeno *B. cinerea*, infatti questa specie è riconosciuta dal FRAC come ad alto rischio di sviluppo di resistenze ai fungicidi monosito a causa dell'elevato numero di spore che produce e per gli eventi di ricombinazione genica (Matta *et al*., 2017). L'uso ripetuto di fungicidi monosito per intere stagioni porta alla rapida comparsa di resistenze ai fungicidi nelle popolazioni di *B. cinerea* e porta anche ad un elevato rischio di residui di fungicidi sull'uva alla vendemmia (Rotolo *et al*., 2018). Per tutti questi motivi e per la crescente consapevolezza e preoccupazione degli esperti e dell'opinione pubblica sui rischi e gli effetti collaterali negativi associati ai prodotti chimici, è aumentata la richiesta di ridurre queste sostanze. Un'alternativa promettente per proteggere le colture è la lotta biologica con l'utilizzo di prodotti a base microbica classificati con il nome di agenti di biocontrollo, che hanno dimostrato, anche grazie alle diverse prove di campo effettuate, di avere un'efficacia spesso paragonabile alle strategie chimiche.

- ***Bacillus subtilis***

B. subtilis è un batterio Gram-positivo a forma di bastoncello, in alcune fasi che fa parte del phylum batterico *Firmicutes*. *B. subtilis* in natura si trova comunemente nel suolo, nelle radici delle piante, negli alimenti e negli ambienti acquatici. *B. subtilis* può formare endospore, il che garantisce la fattibilità del suo commercio perché si possono produrre dei prodotti con requisiti di conservazione ridotti e di lunga durata. Questo microrganismo può colonizzare la superficie o le ferite dei frutti, e le principali modalità d'azione contro il patogeno *B. cinerea* sono la produzione di lipopeptidi, la formazione di biofilm (Chen *et al.*, 2019) e l'induzione di resistenza (Ongena e Jacques, 2008).

- ***Bacillus amyloliquefaciens***

B. amyloliquefaciens è un batterio sporigeno Gram-positivo appartenente al phylum *Firmicutes*, scoperto nel 1943 da uno scienziato giapponese di nome Fukumoto che

ha dato questo nome al batterio perché scoprì che produceva (faciens) l'enzima amilasi (amylo) responsabile della degradazione (lique) di zuccheri complessi in zuccheri semplici (Fukumoto, 1943). Per questo motivo viene molto utilizzato nei processi industriali per la produzione di enzimi. In natura, il batterio si trova comunemente nel suolo e sulla vegetazione. Questo microrganismo può formare spore resistenti, e grazie ad esse si possono trovare in commercio diversi prodotti a base di *B. amyloliquefaciens* con requisiti di conservazione abbastanza ridotti. Le spore una volta miscelate in acqua iniziano i processi germinativi che si concludono sulla superficie della coltura da proteggere. Questo batterio è considerato sicuro, infatti non manifesta patogenicità per l'uomo e gli animali (EFSA, 2007). L'utilizzo di *B. amyloliquefaciens* è uno strumento promettente per ridurre l'uso di sostanze chimiche contro il patogeno *B. cinerea* (Samaras *et al*., 20219. Applicato in trattamenti preventivi per via fogliare, può agire direttamente e indirettamente sui patogeni attraverso tre principali modalità d'azione, simili a quelle di *B. subtilis*: la competizione (con formazione di biofilm), l'antibiosi con rilascio di metaboliti secondari (produzione di lipopeptidi) e la stimolazione dei meccanismi di difesa della pianta.

- ***Aureobasidium pullulans***

A. pullulans è un fungo ascomicete appartenente alla famiglia delle *Dothioraceae* che si può trovare in diversi ambienti, ad esempio nel suolo, sulla vegetazione e in acqua. Può essere epifita o endofita di diverse specie vegetali, vite compresa, senza causare sintomi di malattia. È caratterizzato da una forma riproduttiva asessuata, e si propaga producendo blastospore. Può anche formare clamidospore con funzione di sopravvivenza. In condizioni di campo *A. pullulans* è in grado di fornire un livello di controllo elevato della muffa grigia, grazie alla sua elevata tolleranza a diversi stress ecologici e alla sua elevata attività antagonista (Galli *et al*., 2021). I principali meccanismi d'azione di contro il patogeno *B. cinerea* sono la competizione per lo spazio e gli elementi nutritivi e la produzione di enzimi e composti organici volatili. *A. pullulans* può colonizzare la superficie e le microlesioni che si possono formare sugli acini d'uva, che rappresentano anche la principale via di penetrazione del patogeno (Pertot *et al*., 2017). Questo agente di biocontrollo colonizzando le superfici agisce quindi come uno scudo naturale proteggendo i grappoli dal patogeno, andando a competere sia per lo spazio sia per i nutrienti nel sito di

infezione che sono essenziali per la proliferazione e la colonizzazione del patogeno sulla pianta.

- ***Metschnikowia fructicola***

M. fructicola è un lievito biofungicida che agisce entrando in competizione con le crittogame bersaglio per lo spazio vitale e gli elementi nutritivi; si insedia sulle superfici e, crescendo più rapidamente rispetto ai patogeni, ne impedisce lo sviluppo. Questo lievito antagonista produce inoltre capsule di polisaccaridi extracellulari che ne favoriscono l'adesione alla superficie della pianta e del frutto formando un biofilm che copre l'intera area trattata. La sua efficacia nel contenimento di *B. cinerea* è stata dimostrata sia in campo sia in postraccolta (Kurtzman e Droby, 2001; Tasin *et al*., 2009).

5.7 L'INDUZIONE DI RESISTENZA PER LA PROTEZIONE DELLE COLTURE DALLE MALATTIE FUNGINE

Le piante sono spesso esposte ai patogeni, ma entro certi limiti, sono riuscite a sviluppare meccanismi di resistenza nei loro confronti nel corso dell'evoluzione. La pianta "non ospite", è incapace di soddisfare le esigenze vitali del patogeno e/o possiede barriere strutturali e chimiche che non permettono l'infezione, alternativamente la pianta può riconoscere il patogeno e attiva meccanismi di resistenza che bloccano l'infezione (resistenza dell'ospite), oppure la pianta è suscettibile al patogeno (compatibile) tuttavia vi sono condizioni ambientali che non permettono l'instaurarsi dell'infezione. Le piante superiori hanno due meccanismi di difesa: le "difese passive" (costitutive) ovvero barriere strutturali e chimiche precostituite che hanno il ruolo di escludere la maggior parte dei microrganismi e le difese attive (o inducibili) che solo al bisogno, ad esempio su stimolo di molecole estranee, innescano una risposta rapida di difesa. Ciascuna delle due linee di difesa è costituita da altre due sezioni a seconda che le difese siano chimiche o strutturali. Le difese passive strutturali sono rappresentate dai tessuti e dalle strutture cellulari che si frappongono fisicamente al patogeno: stomi, epidermide costituita da cellule appiattite tenute insieme dalla pectina (che è un polisaccaride la cui unità monomerica è l'acido galatturonico che può essere variamente esterificato al fine di rendere più difficoltosa la lisi enzimatica da parte del patogeno); anche tricomi e cuticola sono costituiti da composti che fungono da barriera per i microrganismi grazie rispettivamente a isoprenoidi mono e diterpenici

e monolignoli parzialmente uniti tra loro ed esterificati con acidi grassi idrossilati. Le difese passive chimiche comprendono una serie di metaboliti secondari aventi una generica attività biocida. Alcuni di essi sono presenti nella cellula integra mentre altri si ritrovano in forma di precursori inattivi che poi a loro volta sono attivati da enzimi che vengono liberati dalla pianta solo ed esclusivamente in seguito al danneggiamento di un comparto cellulare. La loro localizzazione è spesso concentrata negli strati cellulari più esterni dei vari organi della pianta, nei quali risulta più facile poter interferire con i patogeni. Tra questi composti chimici vi sono le saponine, i glucosidi caiogenici, i glucosinolati, i lattoni insaturi, i fenoli. Esiste anche un gruppo di sostanze proteiche come le tionine, le taumatine e le difensine rinvenute per lo più nei semi e negli organi di riserva che hanno il ruolo di alterare la permeabilità della membrana dei patogeni andando complessivamente a contribuire alla resistenza della pianta.

La risposta attiva dipende dalla capacità della pianta di riconoscere il patogeno attraverso i propri recettori situati all'esterno e all'interno della cellula e l'efficacia di tale azione dipenderà per gran parte dalla velocità di tale risposta. Le difese attive sono quelle che vengono messe in atto nel momento in cui la pianta riconosce il patogeno; ne derivano una serie di eventi a livello cellulare e biochimico nei quali sono coinvolti una serie di messaggeri secondari che a loro volta sono responsabili della trasduzione di vari segnali molecolari che a livello nucleare inducono la trascrizione di geni codificanti per proteine di difesa ed enzimi coinvolti nelle difese inducibili. Le difese attive strutturali della pianta sono confinate nel punto d'ingresso del patogeno e sono rappresentate dalla formazione di callosio e risposte di ipersensibilità. Si tratta di una specie di "suicidio programmato" meglio conosciuto come "*hypersensitive response"* (HR) condotto attivamente della cellula vegetale a seguito del contatto con il patogeno. Nel giro di 24 ore dal contatto con l'agente scatenante, la cellula vegetale attraverso l'accumulo e/o il rilascio di composti tossici in particolare rappresentati dai prodotti di reazioni di ossidazioni (*reactive oxygen species* – ROS: anioni superossido, perossido di idrogeno, radicali idrossilici), crea le condizioni poco ospitali per il patogeno che viene, se non ucciso, compartimentalizzato nel punto di contatto. Le difese attive chimiche invece possono distinguersi in: sintesi di fitoalessine e produzione di proteine PR (*pathogenesis-related proteins*). Le fitoalessine sono dei composti a basso peso molecolare come fenoli e terpenoidi, ad azione antimicrobica, prodotti dalle piante in seguito ad inoculazioni o contatto con microrganismi; la loro azione è aspecifica

verso un ampio spettro di patogeni e riescono ad essere attive solo nei primi stadi dell'infezione. Le proteine PR, sono utilizzate dalle piante contro i fattori di stress, hanno un ruolo molto importante nella difesa; sono accumulate a livello apoplastico e sono stabili a pH acido e resistenti alle proteasi. Il loro accumulo è generalmente associato all'istaurarsi della resistenza sistemica acquisita. Vengono suddivise in 17 famiglie, tutte coinvolte nell'attività difensiva della pianta contro diversi organi bersaglio del patogeno. La sintesi *ex novo* di questi composti tossici per il patogeno è innescata dalla presenza del patogeno e/o dalle interazioni pianta-patogeno con sostanze dette elicitori. Inizialmente, il termine elicitore veniva utilizzato solamente per descrivere molecole in grado di indurre la produzione di fitoalessine, ma ad oggi comprende tutti quei composti in grado di stimolare una qualsiasi forma di difesa nella pianta (Eder e Cosio, 1994). Gli elicitori possono essere classificati in diversi modi, ad esempio si suddividono in aspecifici e specifici: i primi sono in grado di stimolare una resistenza non ospite-specifica, mentre i secondi inducono tipicamente una resistenza ospite-specifica; oppure possono essere suddivisi in biotici o abiotici in base alla loro origine. Gli elicitori aspecifici si suddividono in esogeni, ossia prodotti dal patogeno, ed endogeni, ovvero provenienti dalla pianta in seguito all'interazione con il patogeno. Tutti gli elicitori, tuttavia, innescano una serie di segnali molecolari in grado di attivare la trascrizione di geni di difesa. Gli elicitori aspecifici esogeni sono frammenti di parete cellulare, frammenti di flagelli, acidi grassi, steroli, proteine e glicopeptidi; gli elicitori aspecifici endogeni sono principalmente frammenti della parete cellulare vegetale, rilasciati in seguito all'aggressione degli enzimi litici del patogeno, ad esempio gli oligogalatturonidi. Gli elicitori specifici sono molecole prodotte esclusivamente da determinati ceppi di patogeni solo verso alcune varietà di piante; sono i prodotti dei geni di avirulenza del patogeno, i quali inducono una resistenza ospite specifica in seguito all'interazione con dei recettori codificati dai geni di resistenza della pianta. Sono rappresentati per lo più da proteine, peptidi e siringolidi.

Complessivamente, quindi, le piante possono mettere in atto tre tipi di risposte attive di difesa: primarie, secondarie e terziarie. Le risposte primarie, riconducibili all'HR, si concentrano nelle cellule a diretto contatto con il patogeno e si manifestano con necrosi dei tessuti dell'area toccata dall'infezione. Le risposte secondarie si evidenziano nelle zone limitrofe a quelle interessate dalle risposte primarie e sono indotte da segnali generati da queste ultime ("*local acquired resistance*", LAR); le molecole segnale sono per lo più forme reattive dell'ossigeno

e dell'azoto, tali composti fungono anche da elicitori per la morte cellulare programmata. Successivamente a queste due forme di difesa si verifica un accumulo di acido salicilico che raggiungendo i vari organi, funge da segnale di attivazione per la resistenza sistemica acquisita ("*systemic acquired resistance*", SAR). La SAR si sviluppa dopo intervalli di tempo anche ampi (1-2 e più giorni) e può essere innescata sia da elicitori biotici che abiotici a livello radicale o epigeo e comporta una risposta sistemica totale. La risposta terziaria invece, è indotta da rizobatteri quindi solo da elicitori biotici nelle radici, generando una risposta simile alla SAR, denominata resistenza sistemica indotta ("*induced systemic resistance*", ISR) mediata principalmente da acido jasmonico ed etilene (Figura 14). La produzione di acido jasmonico e di etilene è determinata da agenti necrotrofici mentre quella dell'acido salicilico da patogeni biotrofici. Quindi, le piante possono attivare diverse vie di difesa a seconda del tipo di patogeno presente (Garcia-Brugger *et al*., 2006). SAR e ISR sono attualmente i due principali sistemi conosciuti di resistenza indotta.

Questi meccanismi di resistenza naturali che le piante hanno sviluppato nei secoli col processo evolutivo, possono essere sfruttati in diversi modi dall'uomo in ambito agricolo. Ad esempio, attraverso degli appositi formulati commerciali (induttori di resistenza) è possibile stimolare l'attivazione di geni di difesa presenti nel corredo genetico di una pianta prima che questa venga a contatto con il patogeno; inoltre, la biodiversità genetica può essere utile anche per il miglioramento genetico, ad esempio introducendo dei geni di resistenza desiderati da individui che li possiedono alle piante coltivate che magari ne sono prive; a tal proposito la ricerca è sempre più orientata verso l'ottenimento di nuovi vitigni ibridi geneticamente resistenti a peronospora e oidio (Crespan *et al*., 2021).

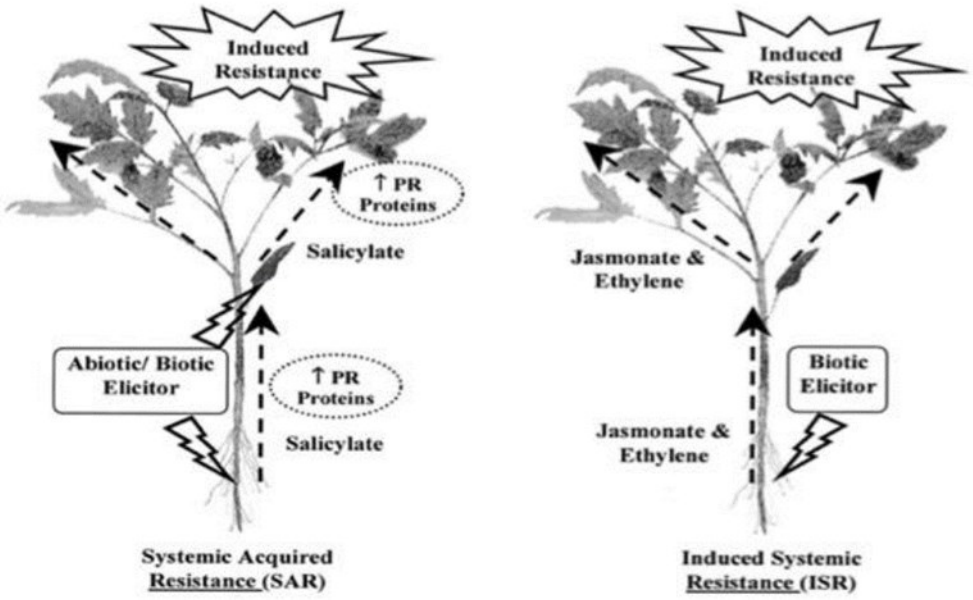

Figura 14 - Raffigurazione schematica dell'azione e dell'influenza di diversi elicitori sulle risposte di difesa SAR (*Systemic Acquired Resistance*) e ISR (*Induced Systemic Resistance*) (Vallad e Goodman, 2004).

Un importante contributo alla protezione integrata delle colture dalle malattie fungine può derivare da sostanze attive di nuova generazione in grado di indurre meccanismi di difesa nelle piante. Numerose sostanze, naturali o di sintesi, sono note per la capacità di indurre resistenza a malattie fungine. Due analoghi funzionali dell'acido salicilico, l'acido isonicotinico (INA) e il benzotiadiazolo (BTH o acibenzolar-S-methyl), sono noti induttori di resistenza sistemica acquisita (SAR) in numerose combinazioni pianta-patogeno. Il BTH, presenta un ampio spettro d'azione ed il suo uso su alcune colture è autorizzato in Italia. Numerosi composti inorganici, possono agire da attivatori delle difese delle piante. Tra questi rientrano i sali di fosforo e silicio, zuccheri e vitamine come la riboflavina. Un altro induttore di resistenza, l'acido β-amminobutirrico (BABA), è efficace contro diversi agenti causali di peronospora e, a differenza di molti induttori chimici, mostra qualche effetto curativo (Silué *et al*., 2002). È nota e sperimentata l'attività del chitosano per la protezione da diverse malattie fungine. Possono inoltre agire da elicitori alcuni acidi polinsaturi, come l'acido arachidonico e proteine di origine batterica, le arpine, la cui attività è stata anche accertata verso funghi fitopatogeni. Risultati incoraggianti sono stati ottenuti con alcuni induttori di origine vegetale, come oligogalatturonidi, cellodestrine che, ad esempio, inducono resistenza a *B. cinerea* su vite e oligosaccarine che migliorano la resistenza inducendo nelle piante la

sintesi di fitoalessine. Una nuova molecola, 3-acetonyl-3-hydroxyoxindole, estratta da una pianta ornamentale, su tabacco induce resistenza a *Erysiphe cichoracearum* (Li *et al*., 2008). La laminarina, glucano derivato da alghe brune, per il contenimento dell'oidio su graminacee, è nota per attivare anche le difese della vite da *B. cinerea* e *P. viticola* (Aziz *et al*., 2003). Inoltre, probenazole, un fungicida da tempo impiegato per la protezione del riso da patogeni fungini, ha mostrato una debole attività antifungina e ad oggi è più propriamente considerato un induttore di resistenza.

In un'ottica di sostenibilità, tutela dell'ambiente e sicurezza alimentare, gli induttori di resistenza rappresentano un approccio alternativo e potenzialmente promettente nella gestione delle avversità delle piante. Tuttavia, va detto che la loro efficacia è inferiore a quella dei fungicidi tradizionali, nonostante ciò, ben si prestano ad essere impiegati in programmi di protezione integrata dalle malattie fungine risultando di particolare ausilio per patogeni non efficacemente controllati con i metodi tradizionali e verso patogeni ad elevato rischio di acquisizione di resistenza a fungicidi o in grado di adattarsi facilmente a genotipi di piante resistenti.

Tabella 2 - Alcuni esempi di induttori di resistenza, loro efficacia e disponibilità di formulazioni commerciali (Baccelli *et al*., 2022).

Induttori di resistenza	**Efficacia degli induttori di resistenza e presenza di prodotti disponibili**				
	Chromista	**Funghi**	**Batteri**	**Virus**	**Fitoplasmi**
Benzotiadiazolo (BTH)	X	X	X (PPP)	X	X
Acido β-amminobutirrico (BABA)	X	X	X	X	
Cerevisane	X (PPP)	X (PPP)			
Chitosano*	X	X (PPP/NR)	X	X	X
Glutatione+ oligosaccarine	X				X
Acido isonicotinico (INA)	X	X	X		
Acido jasmonico, Metil jasmonato (JA, MeJA)		X			
Laminarina	X	X			
Fosetil-alluminio	X (PPP)	X (PPP)	X (PPP)		X
Fosfito di potassio	X (PPP/NR)	X			
Calcio proesadione			X		X
Idrolizzati proteici	X	X			
Acido salicilico (SA)	X	X	X	X	X
Estratti di lievito	X	X			
Oli essenziali o terpeni	X (PPP/NR)	X (PPP/NR)	X	X	X

*Registrato come sostanza di base secondo il Regolamento UE 1107/2009
X: molecola riportata in letteratura come efficace contro alcuni dei patogeni appartenenti a quel regno, classe o gruppo.
PPP: prodotto registrato come prodotto fitosanitario (*plant protection product*, PPP) o in corso di registrazione.
NR: prodotti presenti sul mercato ma non registrati come PPP (*not registered*, NR), ma spesso come ammendanti o fertilizzanti.
PPP/NR: prodotti registrati e non registrati come PPP sono entrambi presenti sul mercato con lo stesso principio attivo.

Al momento non esiste una specifica categoria di prodotti che agiscono come induttori di resistenza, ma questi possono essere disponibili in commercio come prodotti fitosanitari (fra i quali rientrano le sostanze attive a basso rischio), biostimolanti, fertilizzanti, sostanze di base e agenti di biocontrollo, oppure non essere ancora disponibili sottoforma di formulazioni commerciali.

6. OBIETTIVI DELLA RICERCA

A seguito dei rischi per la salute umana e delle conseguenze sull'ambiente, negli ultimi anni è emersa la necessità di ridurre e regolamentare l'utilizzo dei prodotti chimici in agricoltura. La transizione verso un sistema economico sostenibile in Europa è guidata dall'*European Green Deal*, il quale mira a minimizzare o addirittura azzerare l'impatto ambientale delle attività antropiche. All'interno del *Green Deal* sono pubblicate delle strategie specifiche per ogni settore: in ambito agricolo, fa fede la strategia *Farm to Fork*, la quale pone una serie di ambiziosi obiettivi da raggiungere entro il 2030, come ad esempio quello di dimezzare l'impiego di agrofarmaci considerati pericolosi e quello di aumentare del 25% le superfici agricole destinate ad agricoltura biologica. Tuttavia, mentre da un lato questo processo virtuoso di eliminazione delle sostanze più pericolose e impattanti dal sistema agricolo risulta fondamentale per il raggiungimento di tali obiettivi, il rovescio della medaglia prevede che gli agricoltori si trovino in difficoltà, poiché devono affrontare le stesse avversità, o addirittura di più, con sempre meno "armi" a disposizione per proteggere le colture. Inoltre, di recente sono state poste delle pesanti limitazioni anche nei confronti dei composti a base di rame, i quali sono stati inseriti nella lista delle sostanze attive candidate alla sostituzione (attualmente autorizzati fino al 31 dicembre 2025) ed il quantitativo di rame utilizzabile in agricoltura è stato ridotto a 28 kg/ha nell'arco di sette anni, che corrispondono ad una media di 4 kg/ha all'anno. Questa situazione ha disorientato soprattutto il comparto biologico, in quanto i fungicidi rameici sono attualmente gli unici ammessi e in grado di assicurare un'efficace protezione dalla peronospora in viticoltura biologica. Alla luce di questa situazione, risulta di fondamentale importanza la ricerca di nuove strategie di protezione delle colture, che siano altrettanto efficaci, meno impattanti sull'ambiente, non pericolose per l'uomo ed in grado di assicurare un reddito agli agricoltori. Il presente elaborato ha perseguito diversi obiettivi. Il primo obiettivo è stato quello di valutare su scala commerciale l'efficacia nei confronti della peronospora e della muffa grigia della vite di strategie di protezione innovative basate sull'impiego di chitosano, agenti di biocontrollo e di composti che agiscono come induttori di resistenza. I prodotti oggetto di indagine sono stati saggiati a livello aziendale, in due prove distinte. Per il controllo della peronospora è stato utilizzato il chitosano, sia da solo che in associazione a prodotti cuprici, per diminuire le quantità di rame distribuite nell'arco di una stagione. Per

il controllo della muffa grigia sono state saggiate 14 strategie a base di *Bacillus subtilis*, due ceppi di *Bacillus amyloliquefaciens*, cerevisane, laminarina, e *Metschnikowia fructicola*, con il duplice scopo di valutare l'efficacia intrinseca delle sostanze attive in prova e verificare eventuali differenze in funzione del numero di trattamenti effettuati. Il secondo obiettivo di questa ricerca è stato perseguito in laboratorio, attraverso l'identificazione morfologica dei diversi agenti patogeni presenti in uno dei due vigneti sperimentali e attraverso la validazione del kit *Botrytis Alert* per la diagnosi rapida delle infezioni di *Botrytis* spp., in funzione della percentuale di diffusione.

7. MATERIALI E METODI

7.1 VIGNETI SPERIMENTALI

Le prove sperimentali oggetto di tesi sono state condotte in due diversi vigneti marchigiani, entrambi in provincia di Ancona. Uno ubicato a Rosora e uno a Montecarotto. Entrambi sono gestiti dalla cooperativa agricola "Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr.". Le prove sono state condotte nella stagione 2022, nell'arco temporale che va da giugno a settembre. Inoltre, sono state analizzate le condizioni meteorologiche, secondo i dati meteo forniti dall'Agenzia per l'Innovazione nel Settore Agroalimentare e della Pesca "Marche Agricoltura Pesca" (AMAP), così da rapportare il livello d'infezione in base all'andamento meteorologico. I dati climatici sono stati raccolti attraverso il Bollettino Agrometeorologico che elabora settimanalmente il Servizio Agrometeo Regionale dell'AMAP. Sono stati raccolti i dati di temperatura, umidità, e precipitazioni dalla stazione meteorologica di Castelplanio (AN), la più vicina ad entrambi i campi sperimentali.

7.1.1 Prova1: efficacia antiperonosporica di strategie basate sull'impiego di chitosano

La sperimentazione è stata svolta nel vigneto Fondiglie situato a Rosora (AN), particolarmente suscettibile alla peronospora (Figura 15). Il vigneto è stato impiantato nel 2004 ed è costituito interamente dalla cultivar Verdicchio, allevato a guyot con un sesto d'impianto di 2,6 m tra le file e 1 m sulla fila. L'appezzamento ha una superficie complessiva di 45540 m^2, ha esposizione Nord-Ovest con altitudine di 357 metri sul livello del mare. La prova è stata sviluppata su una superficie pari a 5840 m^2 circa, interessando complessivamente 38 filari di lunghezza differente.

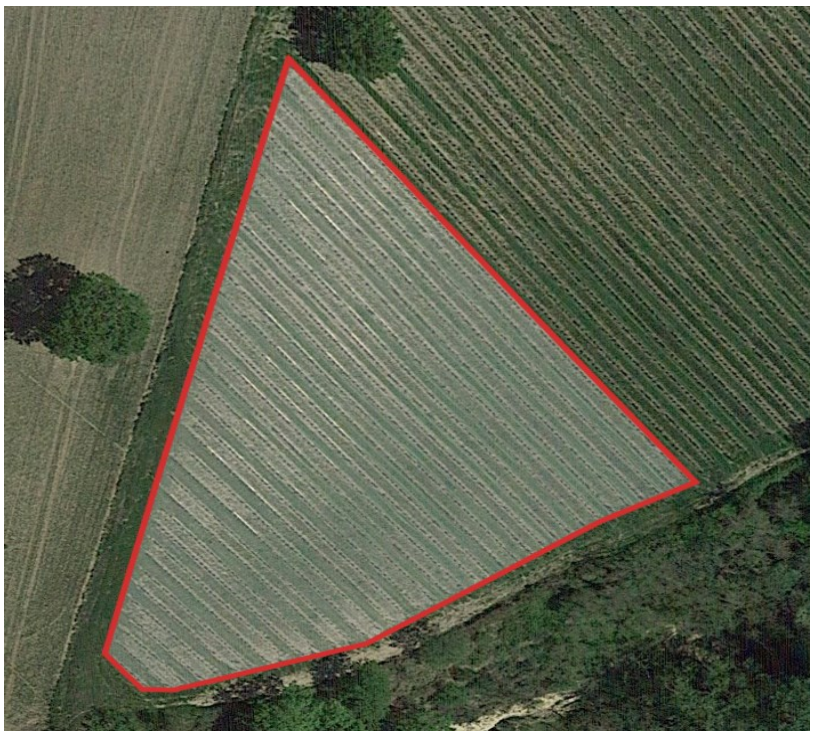

Figura 15 – Area del vigneto sperimentale di Fondiglie a Rosora (AN) interessata dalla prova antiperonosporica, foto aerea ottenuta tramite Google Earth.

7.1.1.1 Strategie saggiate e schema sperimentale

Complessivamente sono state oggetto di indagine due strategie di protezione della vite dalla peronospora (Tabella 3), comprendenti un formulato innovativo a base di chitosano cloridrato e lo stesso formulato alternato alla strategia aziendale. L'efficacia delle strategie in prova è stata confrontata con un testimone non trattato e un testimone aziendale.

Tabella 3 - Dettaglio delle strategie di protezione saggiate nei confronti della peronospora della vite (*cv*. Verdicchio) nel vigneto di Fondiglie a Rosora (AN), con relativi principi attivi, formulati commerciali e dosi di applicazione.

Strategie	**Principi attivi (concentrazione)**	**Formulati commerciali, distributore**	**Dosi saggiate**
Aziendale[1]	Poltiglia bordolese (124 g/L)	Biocupro, Corteva Agriscience Italia s.r.l	Dose standard aziendale di etichetta
	Ossido rameoso (75 %)	Cobre Nordox 75 WG, Comercial Quimica Masso	
	Cerevisane (94,1%)	Romeo, Sumitomo Chemical Italia s.r.l.	
Chitosano	Chitosono cloroidrato (50 %)	Chitosano denso, Agrilaete	0,5 %
Alternato[2]	Aziendale[1] poi chitosano cloroidrato (50 %)	Aziendale[1] poi Chitosano denso, Agrilaete	Aziendale[1] poi chitosano 0,5%
Non trattato	-	-	

[1] I trattamenti aziendali sono stati effettuati miscelando diversi prodotti ad ogni trattamento, dosi e volumi sono stati calibrati in base alla fase fenologica e alla pressione della malattia. I trattamenti aziendali comprendevano anche formulati a base di zolfo per la gestione dell'oidio.
[2] Trattamenti aziendali fino alla fioritura (12/06/2022), poi trattamento con chitosano 0,5%.

Entrambe le strategie sono state applicate su dieci filari così come l'aziendale, mentre otto filari sono stati lasciati come testimone non trattato. Le strategie sono state distribuite in campo secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni (blocco 1 nella parte iniziale del filare situata a monte, blocco 2 al centro del filare, ed infine blocco 3 nella parte terminale del filare, posta a valle del vigneto). Dividendo l'appezzamento in tre blocchi omogenei in termini di condizioni ambientali, tutte le tesi sono state disposte e quindi confrontate nelle stesse condizioni ambientali, così da ridurre l'effetto gradiente dato dalla pendenza del vigneto e in modo da mettere in evidenza l'effetto dei diversi trattamenti.

7.1.1.2 Trattamenti

I trattamenti riguardanti le strategie in prova sono stati eseguiti nel periodo compreso dal 29 aprile al 4 agosto e si sono susseguiti con cadenza regolare, ad

intervalli regolari di 7 – 12 giorni. In totale sono stati eseguiti cinque trattamenti antiperonosporici (Tabella 4).

Tabella 4 - Dettaglio sul numero di interventi antiperonosporici effettuati nel vigneto sperimentale Fondigli di Rosora (AN) e data di esecuzione dei trattamenti.

Trattamento	Data
1	02/05/2022
2	12/05/2022
3	03/06/2022
4	12/06/2022
5	06/07/2022

I trattamenti sono stati effettuati con un atomizzatore portato ad aspirazione anteriore (Bravo 500 dell'azienda Tifone, Figura 16), lavorando ad una velocità costante di 7-8 km/h e con pressioni regolate in base alla fase fenologica del germoglio. Tutti i trattamenti con chitosano sono stati effettuati con volume d'irrorazione di riferimento standard per i trattamenti su vite, di 1000 L/ha. I trattamenti della strategia aziendale sono stati effettuati con volumi di irrorazione variabili da 150 a 400 L/ha a seconda della lunghezza dei germogli.

Figura 16 - Atomizzatore portato Tifone, modello Bravo 500 utilizzato per i trattamenti nei vigneti sperimentali di Rosora (AN) e Montecarotto (AN).

7.1.2 Prova 2: efficacia di strategie innovative per la gestione di *Botryis cinerea*

La sperimentazione è stata svolta nel vigneto Fossato situato a Montecarotto (AN), gestito e messo a disposizione dell'azienda agricola "Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr." (Figura 17). Il vigneto è costituito interamente dalla cultivar Verdicchio, allevato a doppio capovolto con un sesto d'impianto di 3 m tra le file e 1,5 m sulla fila. L'appezzamento ha una superficie complessiva di 72000 m^2, ha esposizione Nord-Est con altitudine di 150 metri sul livello del mare. La prova è stata sviluppata su una superficie pari a 12110 m^2 circa, interessando complessivamente trentasei filari di lunghezza differente.

Figura 17 - Foto aerea ottenuta tramite Google Earth dell'area del vigneto sperimentale di Fossato a Montecarotto (AN) interessata dalla prova di protezione dalla muffa grigia.

7.1.2.1 Strategie saggiate e schema sperimentale

Complessivamente sono state oggetto di indagine 14 strategie di protezione della vite dalla muffa grigia (o tesi, descritte in Tabella 5), basate sull'utilizzo di *Bacillus subtilis* ceppo QST 713, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ceppo D747,

un induttore di resistenza a base di cerevisane, un induttore a base di laminarina, una combinazione dei due induttori di resistenza, un prodotto a base di *Metschnikowia fructicola* ceppo NRRL Y-27328 e un prodotto a base di *B. amyloliquefaciens* ceppo FZB24. Queste sette sostanze attive sono state valutate sia in applicazione singola in prechiusura grappolo (BBCH 75, Lorenz *et al*., 1994), che trattando due volte, nelle fasi di prechiusura grappolo e invaiatura (BBCH 81, Lorenz *et al*., 1994). Tutte le strategie sono state sempre confrontate con un testimone non trattato.

Tabella 5 - Dettaglio delle strategie di protezione saggiate nei confronti della muffa grigia della vite (*cv*. Verdicchio), con relativi principi attivi, formulati commerciali, dosi di applicazione e numero di interventi.

Strategie	**Principi attivi (concentrazione)**	**Formulati commerciali, distributore**	**Dosi saggiate**	**Numero interventi**
Bacillus subtilis	*B. subtilis,* ceppo QST 713 (14,1 g/L)	Serenade Aso, Bayer CropScience S.r.l.	4 L/ha	1
Bacillus amyloliquefaciens 1	*B. amyloliquefaciens* sottospecie *plantarum* ceppo D747 (25%)	Amylo-X, CBC (Europe) S.r.l.	2,5 kg/ha	1
Cerevisane	Cerevisane (94,1%)	Romeo, Sumitomo Chemical Italia S.r.l.	0,25 kg/ha	1
Laminarina	Laminarina (45 g/L)	Vacciplant, Arysta LifeScience Italia S.r.l.	2 L/ha	1
Cerevisane + Laminarina	Cerevisane (94,1 g/100g)	Romeo, Sumitomo Chemical Italia S.r.l.	0,25 kg/ha	1
	Laminarina (45 g/L)	Vacciplant, Arysta LifeScience Italia S.r.l.	2 L/ha	
Metschnikowia fructicola	*M. fructicola* ceppo NRRL Y-27328 (58%)	Noli, Koppert Italia S.r.l.	2 kg/ha	1
Bacillus amyloliquefaciens 2	*B. amyloliquefaciens* ceppo FZB24 (13%)	Taegro, Syngenta Italia S.p.A.	370 g/ha	1
Bacillus subtilis - 2T	*B. subtilis* ceppo QST 713 (14,1 g/L)	Serenade Aso, Bayer CropScience S.r.l.	4 L/ha	2
Bacillus amyloliquefaciens 1 – 2T	*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ceppo D747 (25 %)	Amylo-X, CBC (Europe) S.r.l.	2,5 kg/ha	2
Cerevisane – 2T	Cerevisane (94,1%)	Romeo, Sumitomo Chemical Italia S.r.l.	0,25 kg/ha	2
Laminarina – 2T	Laminarina (45 g/L)	Vacciplant, Arysta LifeScience Italia S.r.l.	2 L/ha	2
Cerevisane + Laminarina – 2T	Cerevisane (94,1%)	Romeo, Sumitomo Chemical Italia S.r.l.	0,25 kg/ha	2
	Laminarina (45 g/L)	Vacciplant, Arysta LifeScience Italia S.r.l.	2 L/ha	
Metschnikowia fructicola – 2T	*M. fructicola* ceppo NRRL Y-27328 (58%)	Noli, Koppert Italia S.r.l.	2 kg/ha	2
Bacillus amyloliquefaciens 2 – 2T	*B. amyloliquefaciens* ceppo FZB24 (13%)	Taegro, Syngenta Italia S.p.A.	370 g/ha	2
Non trattato	-	-	-	-

Ogni strategia di difesa per la muffa grigia ha interessato due filari ad eccezione di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* 2 - 2T che hanno interessato tre filari. Il testimone non trattato è stato distribuito su sei filari.

Le strategie sono state distribuite in campo secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni (blocco 1 nella parte iniziale del filare situata a monte, blocco 2 al centro del filare, ed infine blocco 3 nella parte terminale del filare, posta a valle del vigneto). Ogni blocco di ogni tesi interessa due o tre filari, la metà delle file è stata trattata una sola volta e l'altra metà ha subito due trattamenti. Dividendo l'appezzamento in tre blocchi omogenei in termini di condizioni ambientali, tutte le tesi sono state disposte e quindi confrontate nelle stesse condizioni ambientali, così da ridurre l'effetto gradiente dato dalla pendenza del vigneto e in modo da mettere in evidenza l'effetto dei diversi trattamenti effettuati.

7.1.2.2 Trattamenti

I trattamenti riguardanti le strategie in prova sono stati eseguiti nel periodo compreso tra il 22 giugno al 3 agosto. I trattamenti sono stati effettuati con un atomizzatore portato ad aspirazione anteriore Bravo 500 dell'azienda Tifone (Figura 18), lavorando ad una velocità costante di 7-8 km/h e con pressioni regolate in base alla fase fenologica del germoglio. Tutti i trattamenti sono stati effettuati con volume d'irrorazione di riferimento standard per i trattamenti su vite, di 1000 L/ha.

Figura 18 - Atomizzatore portato Tifone, modello Bravo 500 in azione nel vigneto "Fossato" di Montecarotto (AN).

7.1.3 Valutazione delle infezioni

- ***Prova 1***

Oggetto della tesi sono state le valutazioni d'efficacia dei trattamenti svolti durante l'anno, a carico delle infezioni di peronospora. Dato che durante le visite in campo sono emersi diversi sintomi di oidio si è deciso di effettuare i rilievi anche per questa avversità per verificare eventuali effetti collaterali delle strategie di protezione antiperonosporica.

I rilievi sono stati effettuati complessivamente su 45 piante dislocate su tre filari per ogni tesi, prendendo in considerazione cinque piante per fila per blocco, per un totale di 15 piante/blocco. L'effetto deriva è stato arginato selezionando i tre filari interessati nella parte centrale di ogni tesi. 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. Inoltre, ad ogni rilievo sono stati effettuati dei monitoraggi sulla vegetazione per la

determinazione delle fasi fenologiche e l'individuazione dei primi sintomi di malattia.

I rilievi sono stati condotti su foglie e su grappoli sia per peronospora che per oidio nelle seguenti date e fasi fenologiche:

- 16/06/2022 a BBCH 73
- 29/06/2022 a BBCH 75
- 12/07/2022 a BBCH 77-79
- 02/08/2022 a BBCH 81
- 30/08/2022 a BBCH 89

➢ ***Prova 2***

Oggetto della tesi sono state le valutazioni d'efficacia dei trattamenti svolti durante l'anno, a carico delle infezioni di muffa grigia. Sono stati condotti degli approfondimenti di laboratorio su alcuni grappoli affetti da marciumi secondari ed è stata individuata la presenza di *Aspergillus* spp. (dettaglio nel paragrafo successivo). Si è deciso di effettuare dei rilievi anche nei confronti di questa avversità per verificare eventuali effetti collaterali delle strategie in prova per la muffa grigia.

Per ogni tesi, i rilievi sono stati effettuati complessivamente su 45 piante dislocate su due filari, prendendo in considerazione sette o otto piante per blocco da ogni fila, per un totale di 15 piante/blocco.

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. Inoltre, ad ogni rilievo o trattamento sono stati effettuati dei monitoraggi sulla vegetazione per la determinazione delle fasi fenologiche e l'individuazione dei primi sintomi di malattia.

I rilievi sono stati condotti nelle seguenti date e fasi fenologiche:

- 19/07/2022 a BBCH 81 (su foglie e su grappoli per peronospora)
- 12/09/2022 a BBCH 85 (su grappoli per muffa grigia e *Aspergillus* spp.)
- 19/09/2022 a BBCH 89 (su grappoli per muffa grigia e *Aspergillus* spp.)

Sono state prese in considerazione le infezioni peronosporiche a carico sia delle foglie che dei grappoli e le infezioni di muffa grigia e di *Aspergillus* spp. a carico dei grappoli.

Per valutare l'entità delle infezioni, sia della Prova 1 che della Prova 2 sono state adoperate scale empiriche suddivise in più classi di gravità in base alla percentuale di superficie fogliare colpita dai sintomi della malattia o al numero di bacche infette per ogni grappolo. Per quanto riguarda le foglie, ai fini dello studio si considera che le piante prese in esame abbiano in totale una media di 100 foglie ciascuna, classificando quelle malate con 11 differenti classi di gravità della malattia (Tabella 6).

Tabella 6 – Scala empirica utilizzata per il rilievo delle malattie 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%

Il numero di grappoli invece è stato contato per ogni pianta e sono state attribuite 8 classi di gravità (Tabella 7).

Tabella 7 - Scala empirica utilizzata per il rilievo delle malattie 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%

L'adozione di scale empiriche ha consentito 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 di bacche/foglie infette

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

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

c: valore classe empirica

f: frequenza della classe

N: numero totale delle osservazioni

X: valore della classe massima della scala empirica.

Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica secondo il disegno sperimentale a blocchi randomizzati. Tutti i dati sono stati prima testati per la normalità secondo il test di Shapiro-Wilk con $P \leq 0,05$. In presenza di dati con distribuzione non normale, anche in seguito alla trasformazione f(x)= asin(sqrt(x)) sono stati applicati test non parametrici. In particolare, il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Mann-Whitney (sempre con $P \leq 0,05$) per determinare le differenze statisticamente significative tra le strategie saggiate. Quando la distribuzione normale è stata confermata, i dati sono stati testati per l'omogeneità delle varianze secondo il test di Levene ($P \leq 0,05$). Con omogeneità confermata, è stata eseguita l'analisi ANOVA unidirezionale e le medie sono state separate in base al test LSD di Fisher ($P \leq 0,05$).

Quando l'omogeneità delle varianze non è stata confermata, è stata eseguita l'analisi di Welch e le medie sono state separate utilizzando il test post hoc di Games-Howell ($P \leq 0,05$). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (Statistical Package for Social Science, versione 20, IBM, Ar-monk, NY, USA) e il software RStudio.

7.2 APPROFONDIMENTI DI LABORATORIO

In questa parte di analisi di laboratorio sono stati effettuati due tipi di lavoro differenti: isolamento e identificazione morfologica e validazione kit *Botrytis Alert*.

7.2.1 Isolamento e identificazione morfologica

Nella Prova 2 sono state prelevate 61 bacche infette, che manifestavano uno o più sintomi comunemente rinvenuti nel campo sperimentale, per isolare agenti eziologici da associare ai sintomi osservati e da sottoporre ad analisi morfologiche macro e microscopiche per il riconoscimento. Le bacche sono state catalogate con le informazioni relative la tesi e il blocco di provenienza. Tali campioni rinvenuti sono stati analizzati nei Laboratori dell'Area Protezione delle Piante del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche. Ogni bacca è stata osservata allo stereomicroscopio per studiare meglio i sintomi di malattia ed osservare eventuali segni della presenza di patogeni. Successivamente, sono state asportate le strutture riproduttive dei funghi per un'ulteriore osservazione al microscopio ottico. Infine, i propaguli dei funghi sono stati inseminati con il bisturi sterile in piastre Petri contenenti un substrato di *potato dextrose agar* (PDA). Questi Petri sono stati poi incubati per 7 giorni a 22 ± 2 °C per ottenere un'ulteriore conferma dell'identificazione, basandosi anche su caratteri morfologici della colonia (forma, colore…). Dopo l'isolamento e l'identificazione morfologica dei funghi, sono stati effettuati isolamenti da singole spore per la conservazione dei funghi in laboratorio per ulteriori analisi (es. identificazione molecolare) o prove. Per prima cosa, sono stati inseriti 400 µL di acqua distillata sterilizzata nelle piastre contenenti il fungo, poi con un'ansa da batteriologia è stato stimolato il distacco delle spore dal micelio, che si disperdono nell'acqua. A questo punto si può verificare la presenza o meno di spore con il microscopio andando a prelevare una piccola quantità di acqua da mettere in un vetrino da microscopia. Se la presenza di spore viene confermata si preleva tutto il liquido presente nella piastra e si raccoglie in una provetta Eppendorf che costituirà

lo stock di partenza. In base al quantitativo di spore riscontrate al microscopio si procede a diluire lo stock con acqua distillata per avere una Eppendorf contenente quattro-cinque spore in 60 µL. La soluzione della provetta Eppendorf in questione viene distribuita su una piastra Petri contenente PDA e viene lasciata in un incubatore a 20 °C per circa 15-24 ore. Una volta trascorso il tempo necessario alle spore per germinare, esse sono state individuate con il microscopio sulla piastra e si è proceduto con il trasferimento del micelio germinato dalla singola spora in una nuova piastra Petri contenente PDA.

7.2.2 Validazione del kit *Botrytis Alert*

- ***Descrizione attrezzature e protocollo standard***

Il *Botrytis Alert* è un test *lateral flow* rapido per la diagnosi della muffa grigia, prodotto dall'azienda inglese Mologic Ltd (Figura 19).

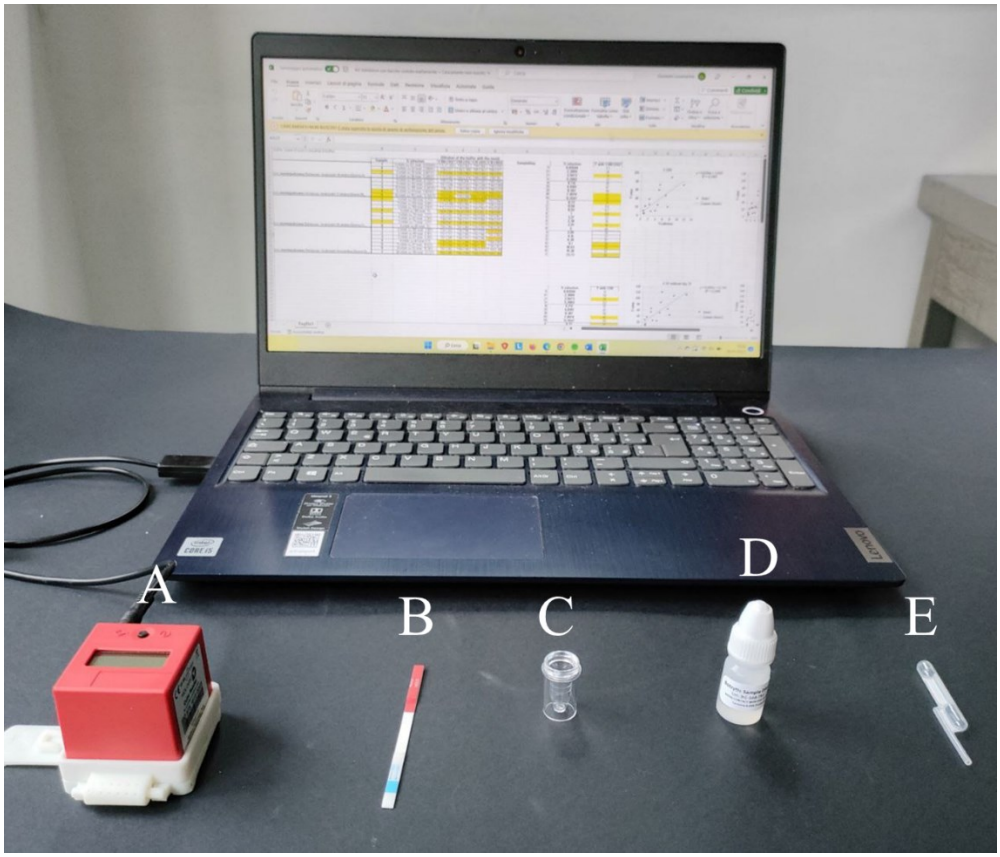

Figura 19 – Componenti del kit *Botrytis Alert* dell'azienda Mologic Ltd. e relativo lettore per la diagnosi rapida della muffa grigia. **A**. un lettore di intensità del segnale, **B**. stick tampone, **C**. piccoli recipienti di vetro, **D**. boccette di plastica da 4 mL di liquido buffer, **E**. pipette a bulbo di plastica tarate per 40 µL.

Questo test è pensato per essere utilizzato direttamente in campo senza il bisogno di attrezzature da laboratorio o competenze in ambito microbico. *Botrytis Alert*

utilizza l'anticorpo monoclonale BC-12.CA4 in un flusso laterale a doppio anticorpo. Il monoclonale BC-12.CA4 di *Botrytis* spp. ha dimostrato di marcare fortemente e in maniera altamente specifica la parete miceliare della *Botrytis* spp..La procedura di utilizzo del Kit *Botrytis Alert* è la seguente: si estrae e filtra il mosto dal grappolo, si prelevano con la pipetta 40 µL da miscelare (Figura 19 E) con i 4 mL di buffer (Figura 19 D) per avere una diluizione 1:100 e si versano cinque gocce di questa soluzione in un recipiente di vetro (Figura 19 C). A questo punto viene immerso lo stick (Figura 19 B) nel liquido per 15 secondi e poi si attendono 10 minuti per far comparire le bande Test e Controllo sullo stick tampone. La presenza della banda Test segnala presenza di *Botrytis* spp. nel campione (Figura 20). Inoltre, è possibile effettuare anche un'analisi quantitativa tramite un lettore di intensità del segnale (Figura 19 A) che quantifica la presenza del micelio di *Botrytis* spp. tramite l'intensità della tonalità delle bande presenti sugli stick. L'intensità di queste bande viene definita tramite il lettore che ci mostra numericamente la quantità di micelio test e controllo.

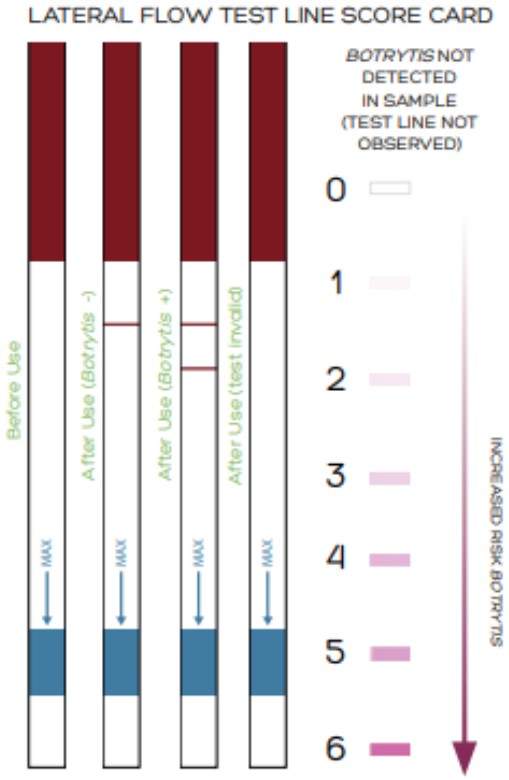

Figura 20 – Stick tampone del kit *Botrytis Alert* con i diversi risultati osservabili e le diverse intensità delle bande. L'intensità delle bande a volte non è distinguibile ad occhio nudo, soprattutto per campioni poco infetti. Per questo, al protocollo convenzionale può essere abbinata una lettura del risultato con un apposito *reader*.

- ***Validazione del kit con bassi livelli di infezione***

Inizialmente, per testare il kit, è stata utilizzata la diluizione 1:100 suggerita dall'azienda su dei grappoli di *cv*. Verdicchio (Figura 21) presi dal vigneto sperimentale Fossato a Montecarotto (AN), della Prova 2. Questi grappoli avevano diversi livelli di infezione da muffa grigia con una diffusione dallo 0 al 50 %.

Figura 21 - Grappolo di *cv*. Verdicchio del vigneto sperimentale Fossato di Montecarotto (AN) con una diffusione del 5-6% di *Botrytis* spp. utilizzato per testare il kit *Botrytis Alert*.

Il kit si basa sulla quantità di micelio di *Botrytis* spp. e lo scopo di questa analisi è stato quello di validare il kit (mediante l'ausilio del lettore), associando la percentuale di diffusione di *Botrytis* spp. su singoli grappoli all'intensità del colore della banda sulla cartina, per poter individuare a priori la diluizione ideale da utilizzare in base al livello d'infezione atteso. Questo sarebbe utile, sia a livello sperimentale per successive prove che nelle cantine per le analisi delle uve all'ingresso. Per la validazione del kit, sono state testate diverse diluizioni con diversi livelli d'infezione. Questo, per verificare quale è la condizione ottimale di diluizione per saggiare i campioni in base al livello d'infezione atteso e avere un risultato significativo anche in presenza di bassi livelli d'infezione. I grappoli utilizzati come campioni in questa analisi sono 17, tutti di varietà Montepulciano,

e provenienti da due vigneti dell'azienda agricola "Terre Cortesi Moncaro sSoc. Coop. Agr." entrambi situati ad Ancona. I grappoli sono stati selezionati con bassi livelli di infezione di muffa grigia (generalmente meno del 10%). Per ogni grappolo è stato determinato il numero totale di bacche e il numero di bacche infette così da arrivare alla percentuale di diffusione di malattia. Ogni campione è stato analizzato con quattro diluizioni differenti del mosto: 1:100, come suggerito dall'azienda produttrice, 1:50, 1:25 e 1:10.

- ***Correlazione tra acido glucanico e Botrytis* spp.**

Le analisi convenzionali per la determinazione del livello d'infezione di *B. cinerea* nei mosti sono basate sulla quantificazione del contenuto di acido gluconico. Questo tipo di analisi viene generalmente considerata specifica per determinare il livello d'infezione di *B. cinerea* dell'uva. Ovviamente, il livello d'infezione influisce sulla qualità del prodotto finale e quindi uve con diversi livelli d'infezione (o mosti con diversi livelli di acido glucanico) possono essere destinati a linee di produzione differenti. Presso i laboratori di "Terre Cortesi Moncaro Soc. Coop. Agr." sono state svolte delle analisi convenzionali con lo strumento FOSS WineScan su 18 campioni di mosto, che presentavano diversi livelli d'infezione da *Botrytis* spp. I livelli d'infezione sono stati stimati su ogni carico d'uva all'ingresso in cantina e classificati in basso, medio e alto. Quindi si è proceduto in primo luogo a valutare la specificità dell'analisi dei glucani, valutando un'eventuale correlazione tra i valori ottenuti dall'analisi dei glucani e il livello di infezione. Successivamente, si è cercato di valutare l'eventuale correlazione tra la presenza dei glucani e i risultati ottenuti con il kit *Botrytis Alert* sugli stessi campioni di mosto prelevati dalle 18 partite. L'obiettivo di questa analisi, alla fine, è stato quello di valutare quale tipo di analisi, tra quella con il kit e quella dell'acido glucanico, è più accurata e specifica per la quantificazione del livello d'infezione nei mosti all'ingresso in cantina.

8. RISULTATI

8.1 CONDIZIONI METEOROLOGICHE

Complessivamente, l'andamento meteorologico stagionale, caratterizzato da scarse precipitazioni durante il periodo primaverile-estivo è risultato poco favorevole alle malattie fungine. Tuttavia, precipitazioni estive nell'entroterra marchigiano hanno permesso lo sviluppo di *P. viticola* nel sito di Rosora, mentre gli eventi piovosi

registrati in tarda estate hanno permesso la comparsa delle infezioni di muffa grigia ad inizio settembre. L'elevata umidità riscontrabile nel sito sperimentale ha consentito poi un loro sviluppo verso la fine del mese. I dati meteorologici medi settimanali sono riportati in Figura 22 e sono stati forniti dalla stazione metereologica di Castelplanio (AN) dell'AMAP.

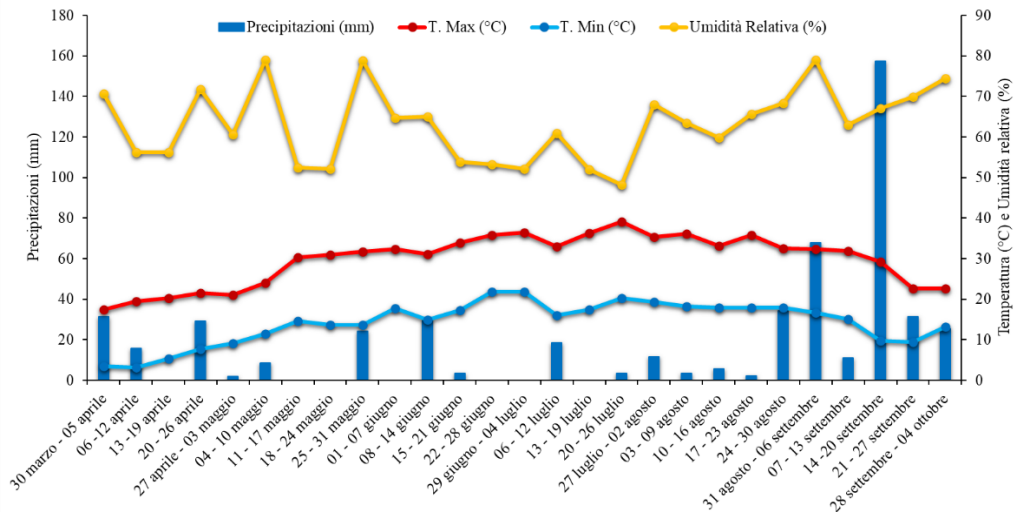

Figura 22 - Grafico dell'andamento meteorologico stagionale del 2022 nell'area delle prove sperimentali. I dati sono registrati nel periodo che va dal 30 marzo al 04 ottobre 2022 dalla stazione metereologica di Castelplanio (AN). Fonte dati: AMAP.

8.2 VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI NELLA PROVA 1

La prova 1 riguarda l'efficacia antiperonosporica di strategie basate sull'uso del chitosano su scala commerciale, nel vigneto sperimentale di Rosora (AN).

8.2.1 Risultati dei rilievi riguardanti peronospora

8.2.1.1 Risultati foglie

Rilievo 1 del 16 giugno 2022

Dal primo rilievo sono apparse subito differenze statisticamente significative riguardo la diffusione nelle diverse strategie (Figura 23 A). Tutte le strategie hanno ridotto in maniera statisticamente significativa i tre parametri considerati rispetto al testimone non tratatto. La diffusione maggiore è stata riscontrata nel testimone non trattato che è risultato significativamente diverso dalle altre tesi. Analogamente anche la gravità (Figura 23 B) della malattia e l'indice di McKinney (Figura 23 C) mostrano una differenza significativa tra il testimone non trattato e le altre strategie

e il chitosano rimane significativamente differente dall'alternato e il testimone aziendale.

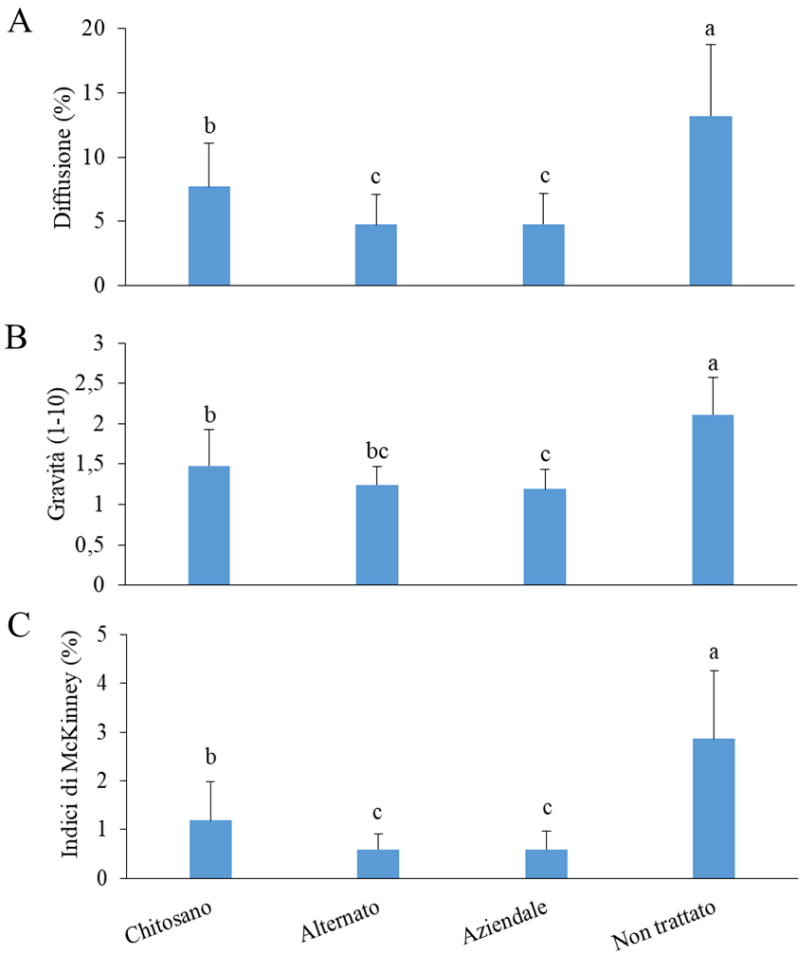

Figura 23 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 16 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 2 del 29 giugno 2022

In questo rilievo, così come per quello del 16 giugno, è possibile osservare come il testimone non trattato si differenzi significativamente dalle altre strategie con valori maggiori per quanto riguarda la diffusione, la gravità e l'indice di McKinney (Figura 24). Il chitosano è risultato sempre statisticamente diverso dalla strategia alternato, avendo valori maggiori per tutti i parametri. Non sono emerse invece differenze statisticamente significative tra chitosano e aziendale per quanto riguarda la gravità dei sintomi (Figura 24 B). L'alternato ha garantiti il livello di protezione maggiore rispetto a tutte le altre strategie in prova, con valori statisticamente simili all'aziendale (Figura 24 C).

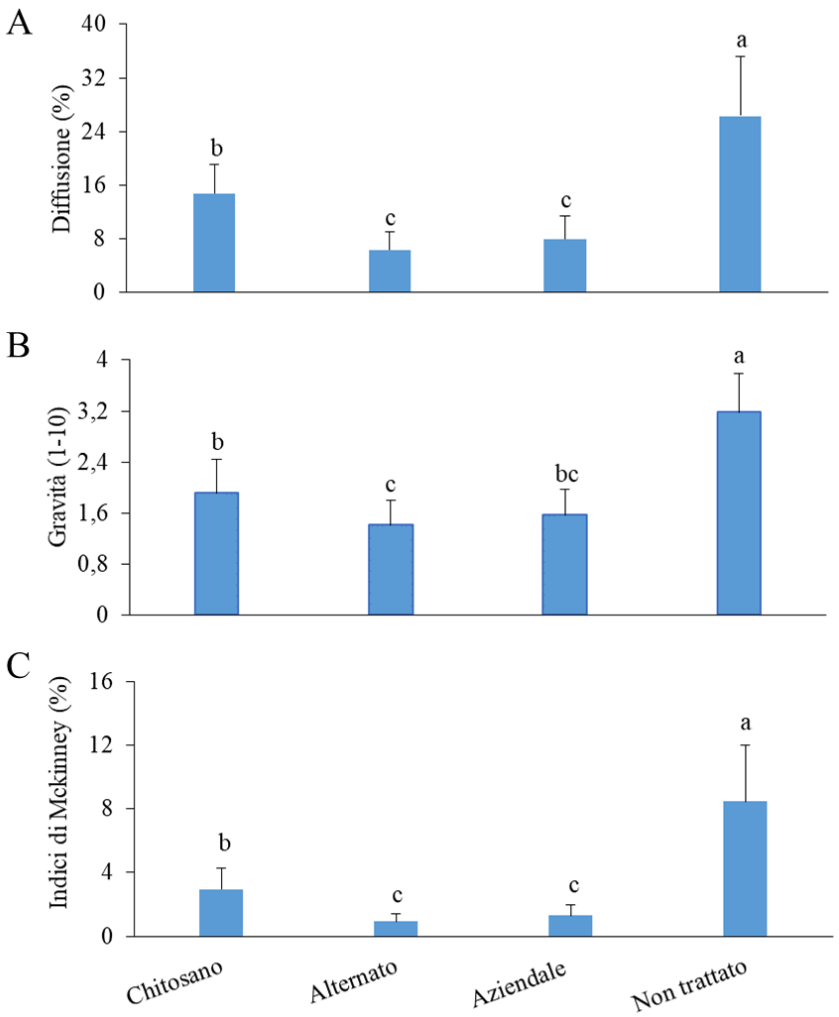

Figura 24 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 29 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 3 del 12 luglio 2022

Nel terzo rilievo si nota nuovamente che le strategie chitosano e alternato sono significativamente diverse dal testimone non trattato sia per quanto riguarda la diffusione, che la gravità e l'indice di McKinney (Figura 25). Infatti il testimone non trattato risulta avere valori significativamente maggiori rispetto a tutte le altre strategie. L'alternato risulta avere valori inferiori e significativamente differenti per tutti e tre gli indicatori rispetto al chitosano, mentre non si notano differenze tra alternato e aziendale.

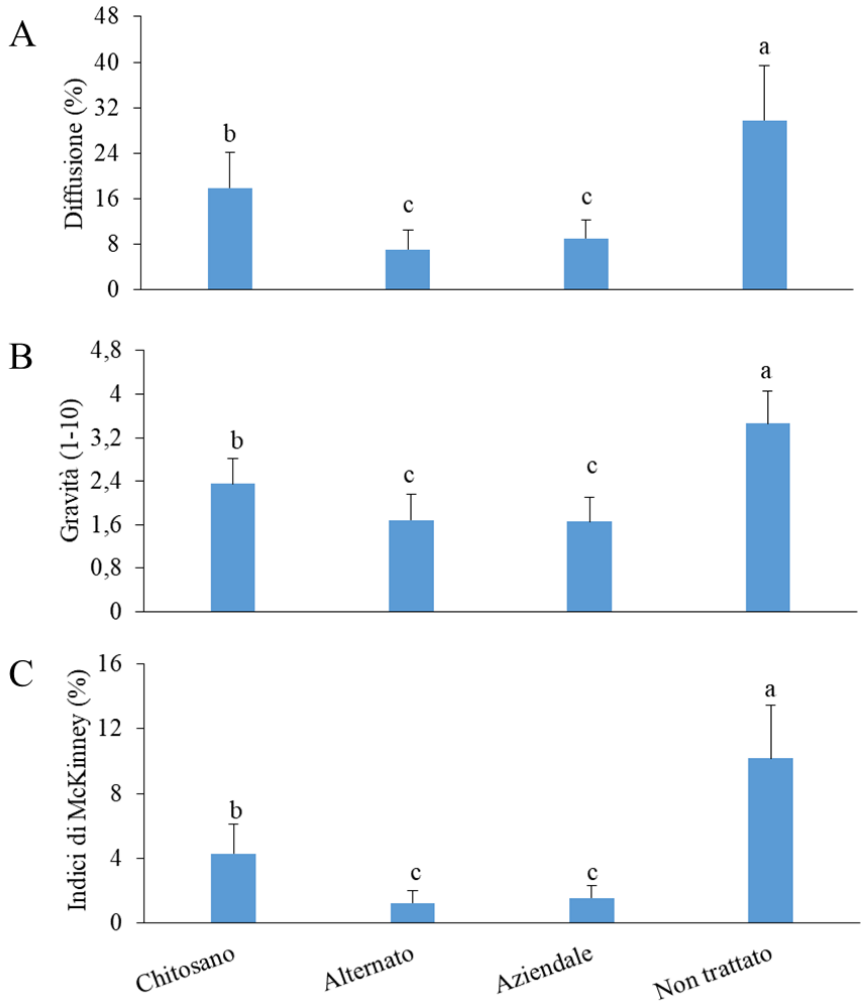

Figura 25 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 12 luglio 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 4 del 2 agosto 2022

Tutte le strategie hanno protetto in maniera statisticamente significativa la vegetazione dalla peronospora rispetto al testimone non trattato anche nel quarto rilievo. Il chitosano e l'alternato sono significativamente diversi dal testimone non trattato, che mostra i valori più elevati per quanto riguarda la diffusione, la gravità e l'indice di McKinney (Figura 26). L'alternato mostra valori inferiori e significativamente differenti per tutti gli indicatori rispetto al chitosano. Inoltre, si noti come l'associazione di rame e chitosano abbia ridotto significativamente la diffusione e l'indice di McKinney della peronospora sulle foglie rispetto ai trattamenti convenzionali.

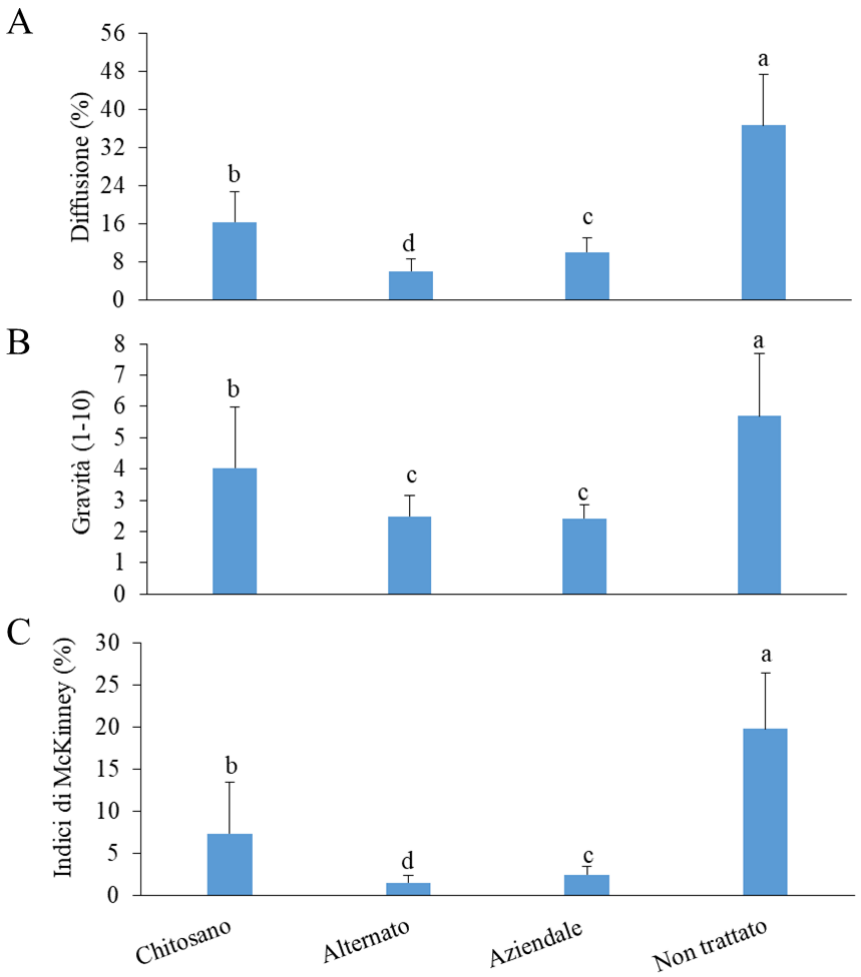

Figura 26 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 2 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 5 del 30 agosto 2022

Nell'ultimo rilievo condotto sulle foglie, i trattamenti con rame seguiti dall'applicazione di chitosano hanno nuovamente garantito i migliori livelli di protezione. Questa strategia si è distinta dalle altre per valori significativamente minori di diffusione, gravità e indice di McKinney (Figura 27). Al contrario, il testimone non trattato ha mostrato ancora una volta i valori maggiori e significativamente diversi dalle altre strategie per quanto riguarda tutti e tre i parametri. Il chitosano non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto al testimone aziendale per quanto riguarda la gravità dei sintomi (Figura 27 B), mentre risulta significativamente differente da esso rispetto a diffusione (Figura 27 A) e indice di McKinney (Figura 27 C).

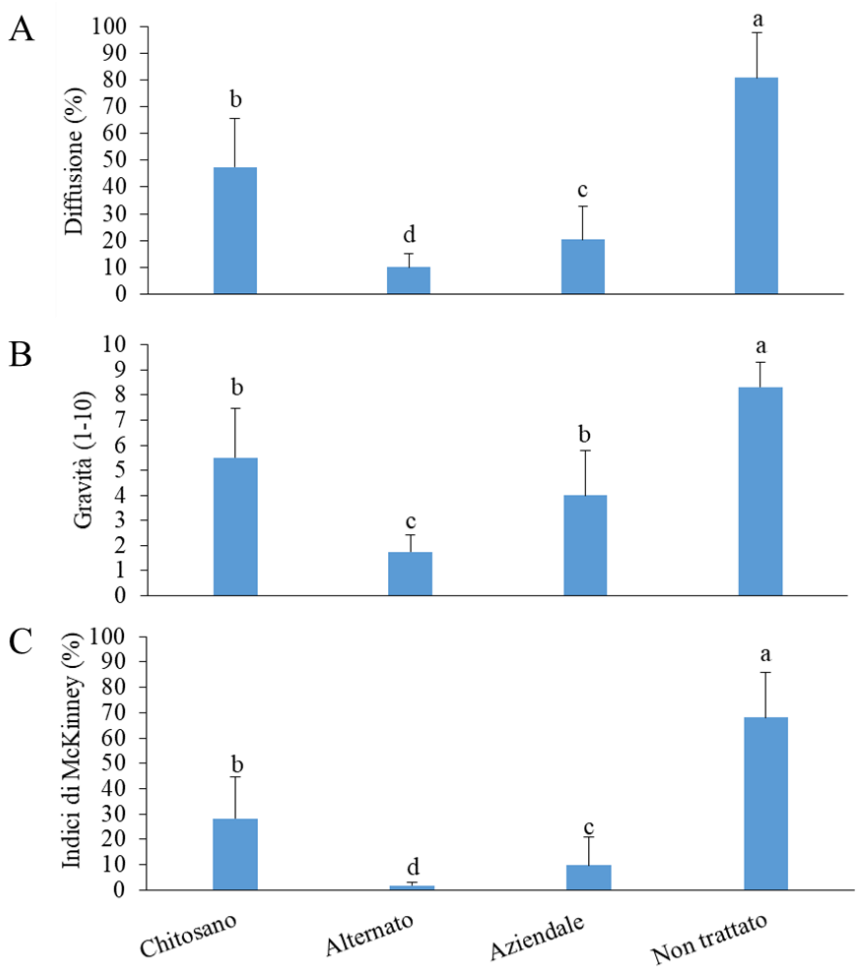

Figura 27 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 2 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

8.2.1.2 Risultati grappoli

Rilievo 1 del 16 giugno 2022

Nel primo rilievo sui grappoli la pressione di malattia è risultata bassa, tuttavia, per quanto riguarda la gravità (Figura 28 B) tutte le strategie sono risultate significativamente differenti tra loro con valori crescenti per aziendale, alternato, chitosano e testimone non trattato. Invece, per quanto riguarda diffusione (Figura 28 A) e indice di McKinney (Figura 28 C) non è emersa alcuna differenza tra chitosano, alternato e testimone aziendale, ma queste si differenziano tutte significativamente dal testimone non trattato.

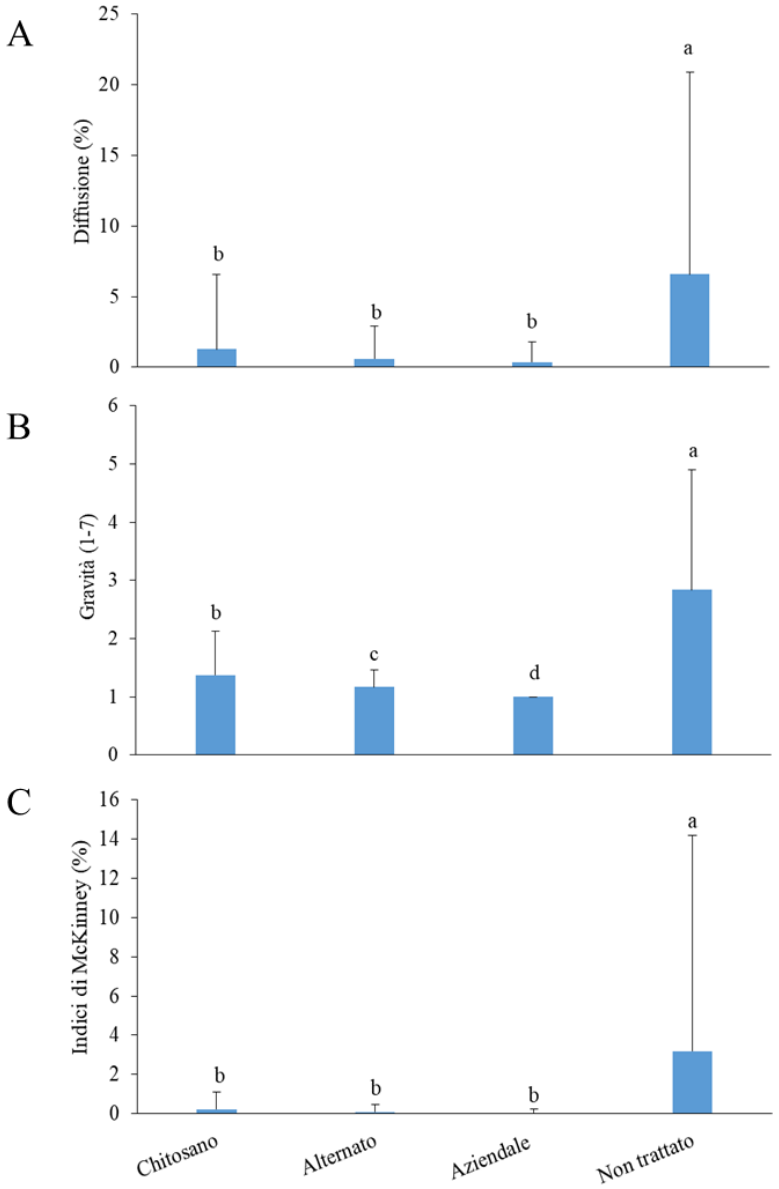

Figura 28 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 16 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 2 del 29 giugno 2022

Nel secondo rilievo si osserva come la pressione di malattia sia notevolmente aumentata rispetto al precedente. Osservando il grafico della diffusione (Figura 29 A) si nota che non ci sono differenze tra il chitosano e il testimone non trattato e tra l'alternato e il testimone aziendale, ma le prime due strategie risultano significativamente differenti dalle seconde due. Per quanto riguarda la gravità (Figura 29 B) della malattia notiamo che il testimone non trattato ha valori significativamente superiori alle altre strategie, il chitosano appare

significativamente differente dall'alternato mentre il testimone aziendale non mostra differenze significative con il chitosano applicato da solo o in seguito al rame. Riguardo l'indice di McKinney (Figura 29 C), la percentuale più alta è stata osservata nel non trattato, valore che è significativamente diverso da tutte le altre strategie; il chitosano risulta avere una percentuale maggiore e significativamente differente rispetto all'alternato e al testimone aziendale.

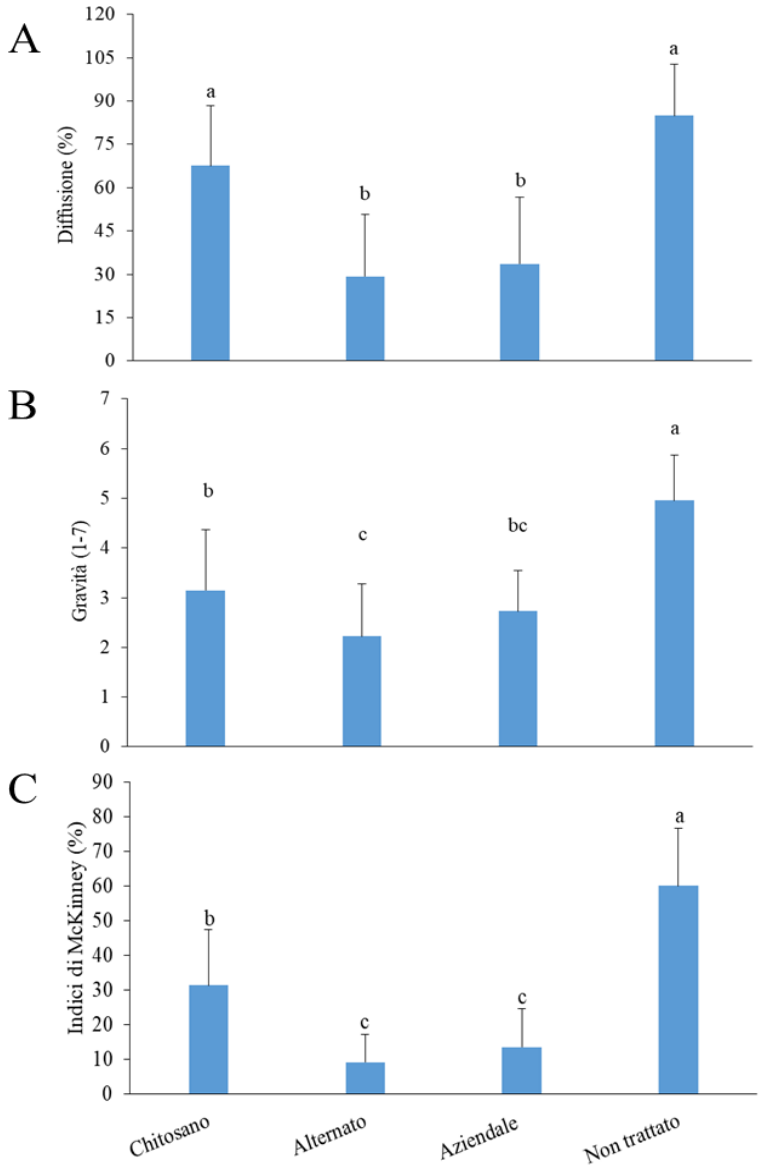

Figura 29 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 29 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 3 del 12 luglio 2022

Nel terzo rilievo del 12 luglio si nota che tutte le strategie hanno protetto in maniera significativa i grappoli rispetto al testimone non trattato. Quest'ultimo ha valori superiori e significativamente diversi dalle altre strategie per diffusione, gravità e indice di McKinney (Figura 30), il chitosano risulta significativamente differente da alternato e aziendale per tutti e tre gli indicatori.

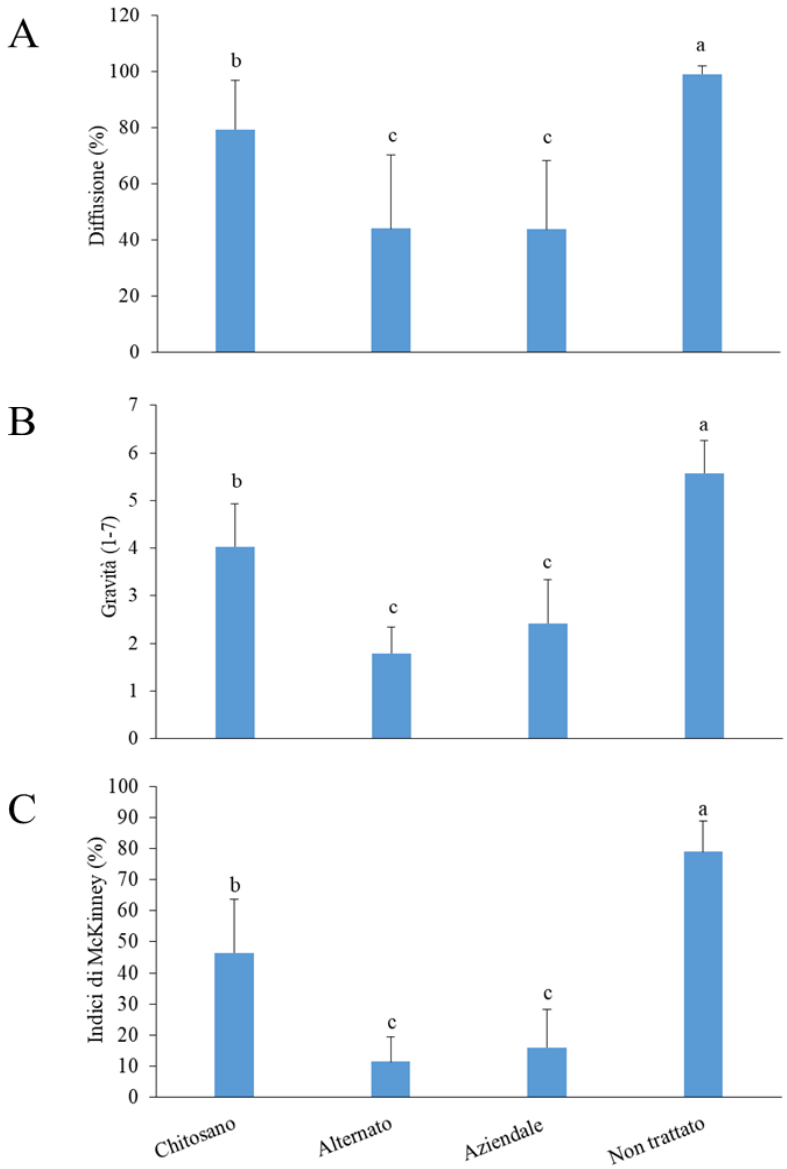

Figura 30 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 12 luglio 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 4 del 2 agosto 2022

Analogamente al rilievo precedente, nel rilievo del 2 agosto s i osserva che tutte le strategie hanno ridotto significativamente i tre parametri rispetto ai grappoli non trattati. Il testimone ha valori superiori e significativamente diversi dalle altre strategie per diffusione, gravità e indice di McKinney (Figura 31), il chitosano risulta significativamente differente da alternato e aziendale per tutti e tre gli indicatori.

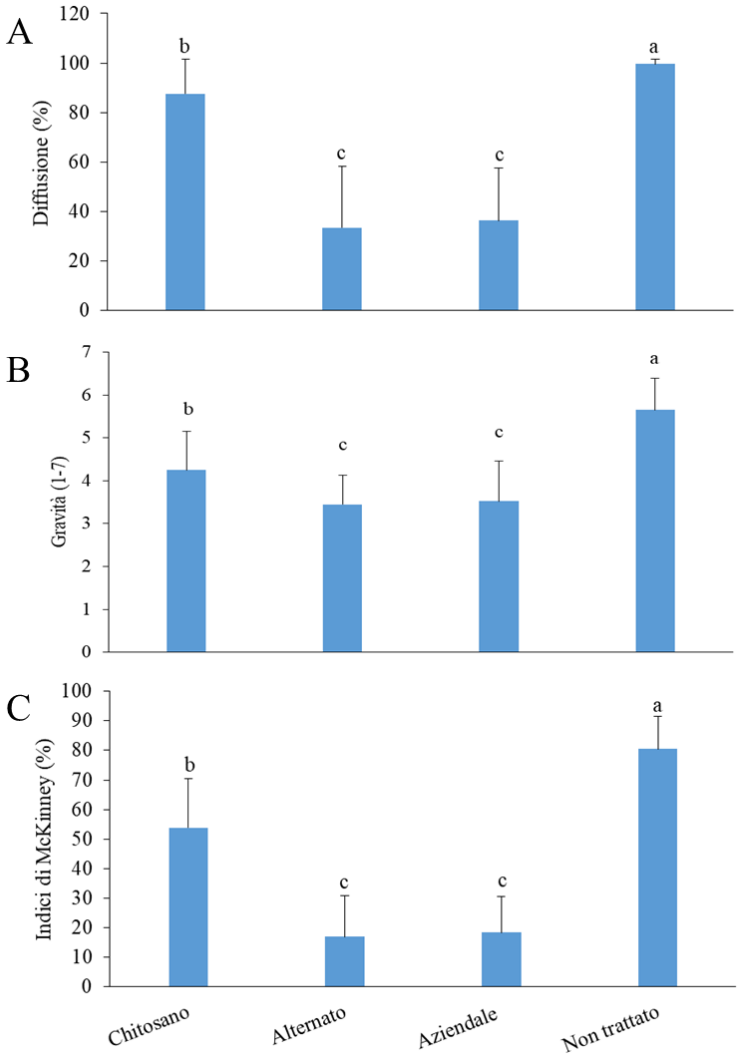

Figura 31 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 2 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$) per diffusione e gravità e secondo il test di Fisher LSD ($P \leq 0,05$) per indice di McKinney.

Rilievo 5 del 30 agosto 2022

Nell'ultimo rilievo, il non trattato presenta ancora valori superiori e significativamente diversi dalle altre strategie per diffusione (Figura 32 A), gravità

(Figura 32 B) e indice di McKinney (Figura 32 C). L'alternato non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto all'aziendale per tutti i parametri considerati, mentre il chitosano da solo ha contenuto la gravità dei sintomi come le altre due strategie contenenti rame.

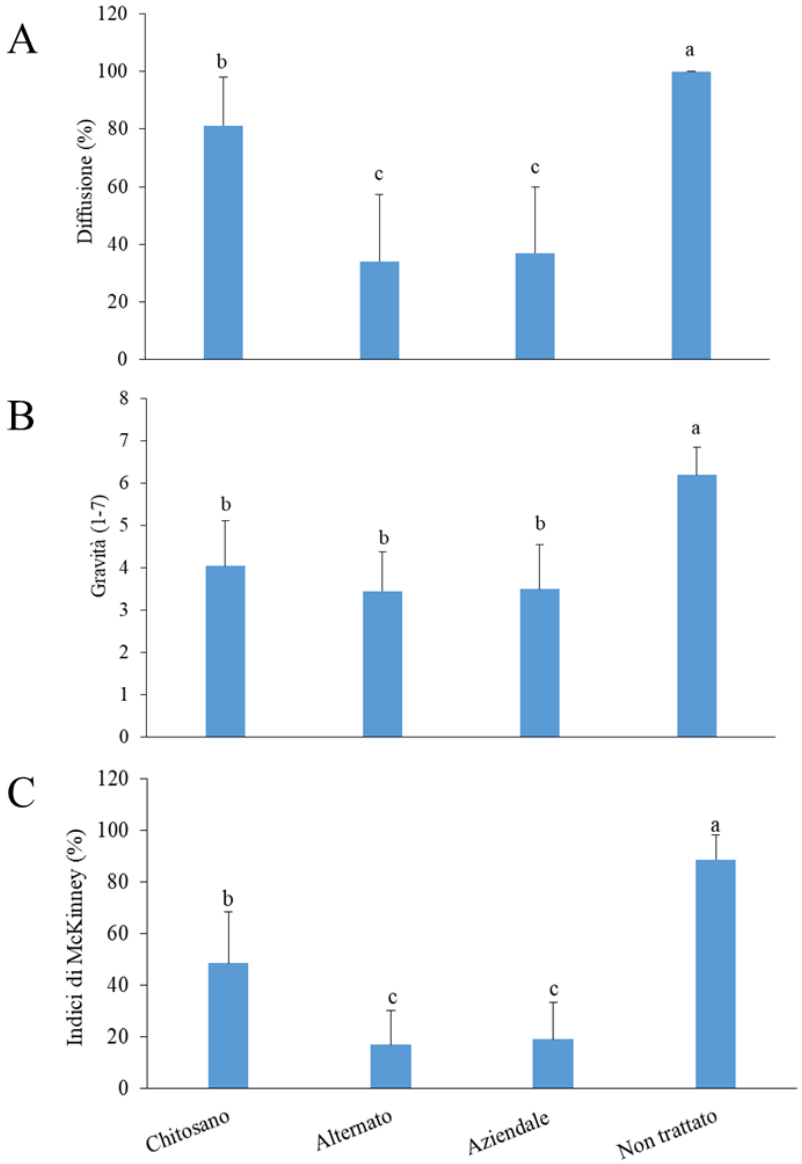

Figura 32 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 30 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

8.2.2 Risultati dei rilievi riguardanti oidio

8.2.2.1 Risultati foglie

Rilievo 1 del 16 giugno 2022

Nel primo rilievo la pressione della malattia è risultata molto bassa, non è stato rilevato alcun sintomo di oidio nell'alternato (Figura 33) mentre non vediamo differenze significative tra chitosano e non trattato per quanto riguarda la diffusione (Figura 33 A) e l'indice di McKinney (Figura 33 C).

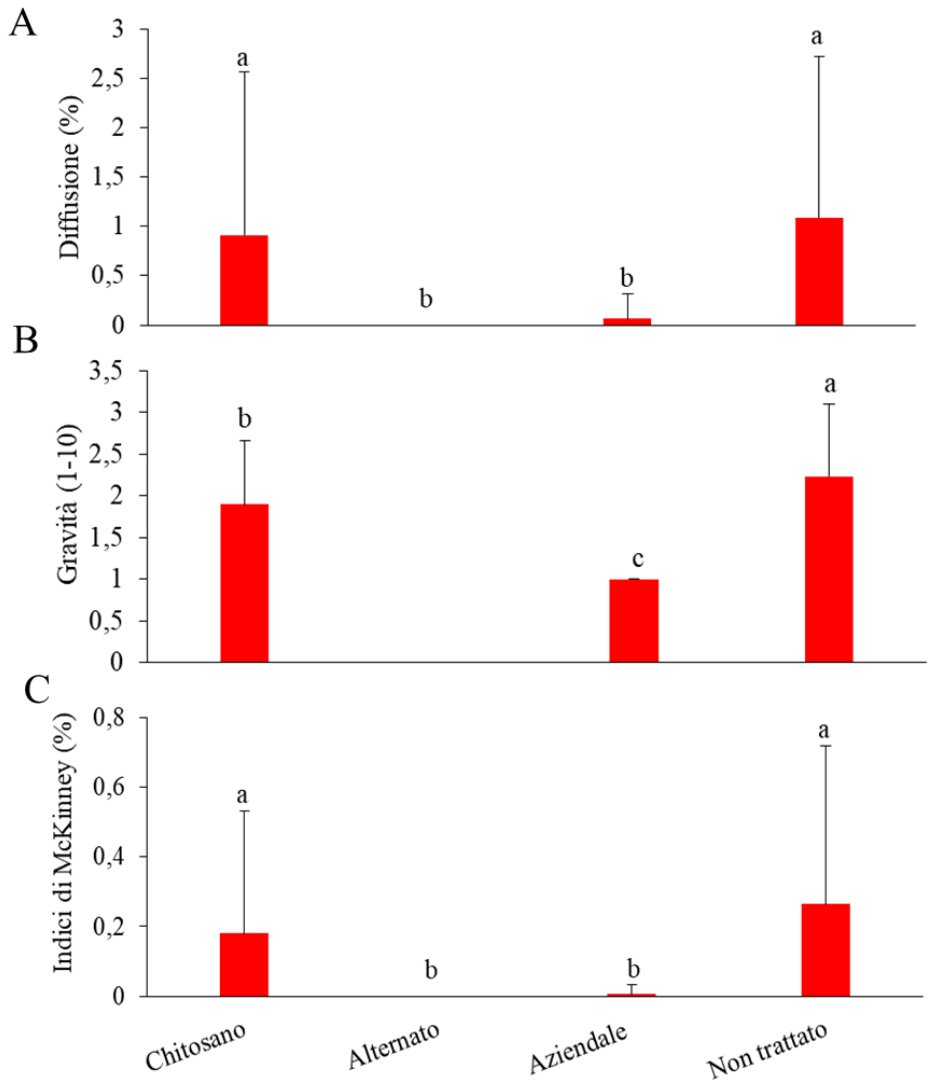

Figura 33 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 16 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 2 del 29 giugno 2022

Nel secondo rilievo si nota come tra il chitosano e il non trattato non ci siano differenze significative in tutti e tre gli indicatori (Figura 34), l'alternato è risultato significativamente inferiore al chitosano e al non trattato per tutti gli indicatori e differisce dall'aziendale solo per la gravità (Figura 34 B).

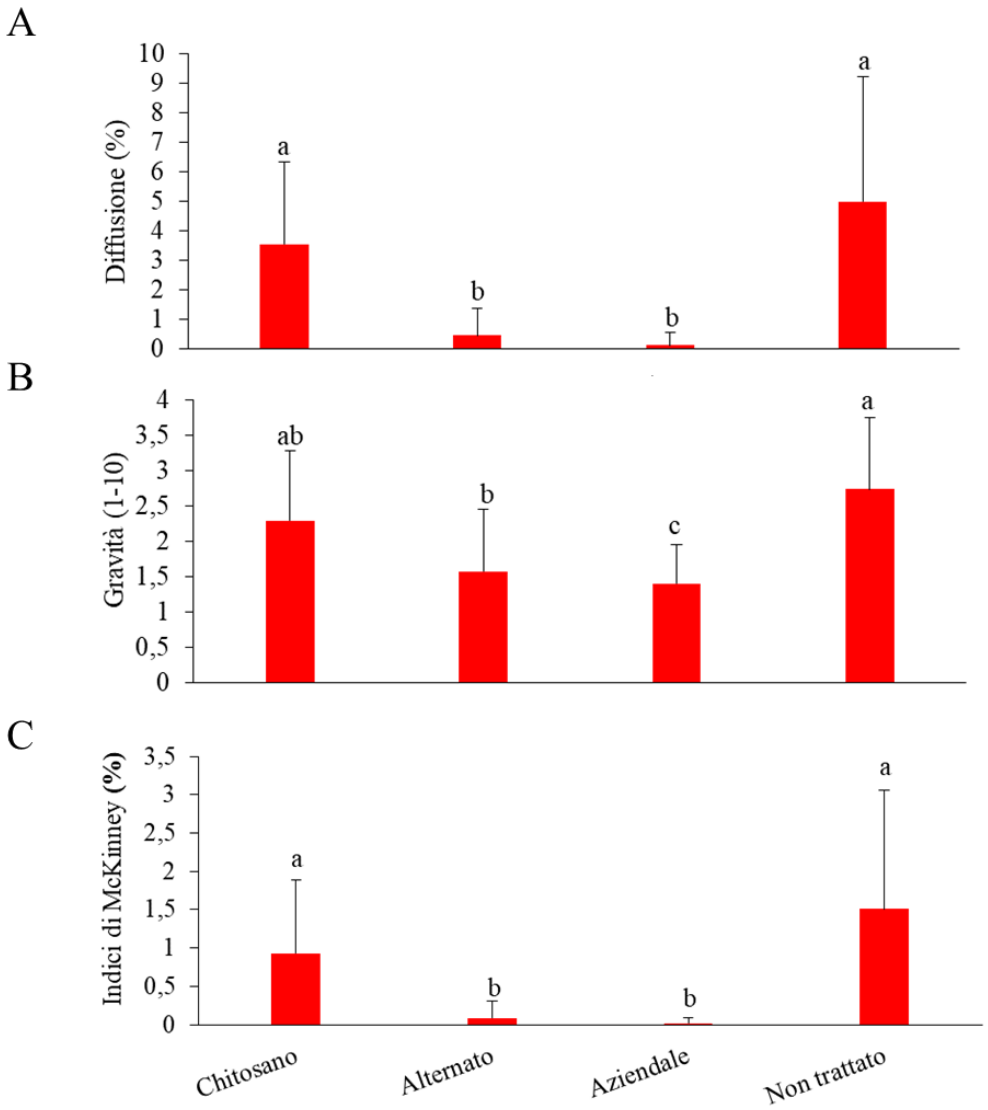

Figura 34 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 29 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 3 del 12 luglio 2022

Nel terzo rilievo nell'aziendale non è stata riscontrata la malattia, chitosano e non trattato non mostrano differenze significative mentre l'alternato risulta essere

significativamente inferiore rispetto ad essi per tutti e tre gli indicatori (Figura 35). Alternato e aziendale non sono risultati statisticamente dissimili.

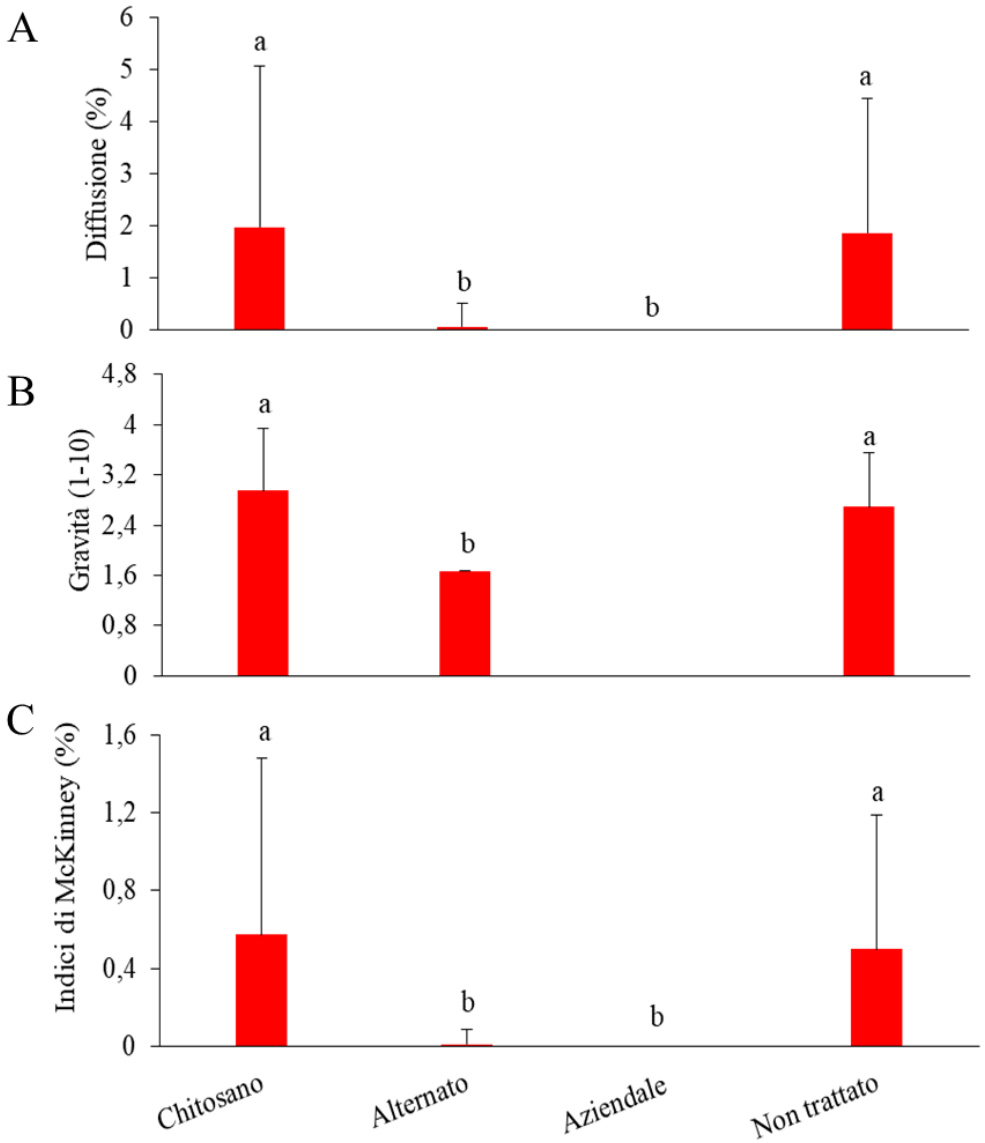

Figura 35 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 12 luglio 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 4 del 2 agosto 2022

In questo rilievo si osserva come il non trattato abbia mostrato valori significativamente maggiori per diffusione (Figura 36 A), gravità (Figura 36 B) e indice di McKinney (Figura 36 C). Per quanto riguarda la diffusione e l'indice di

McKinney tutte le strategie non mostrano differenze tra loro ma risultano significativamente inferiori al non trattato.

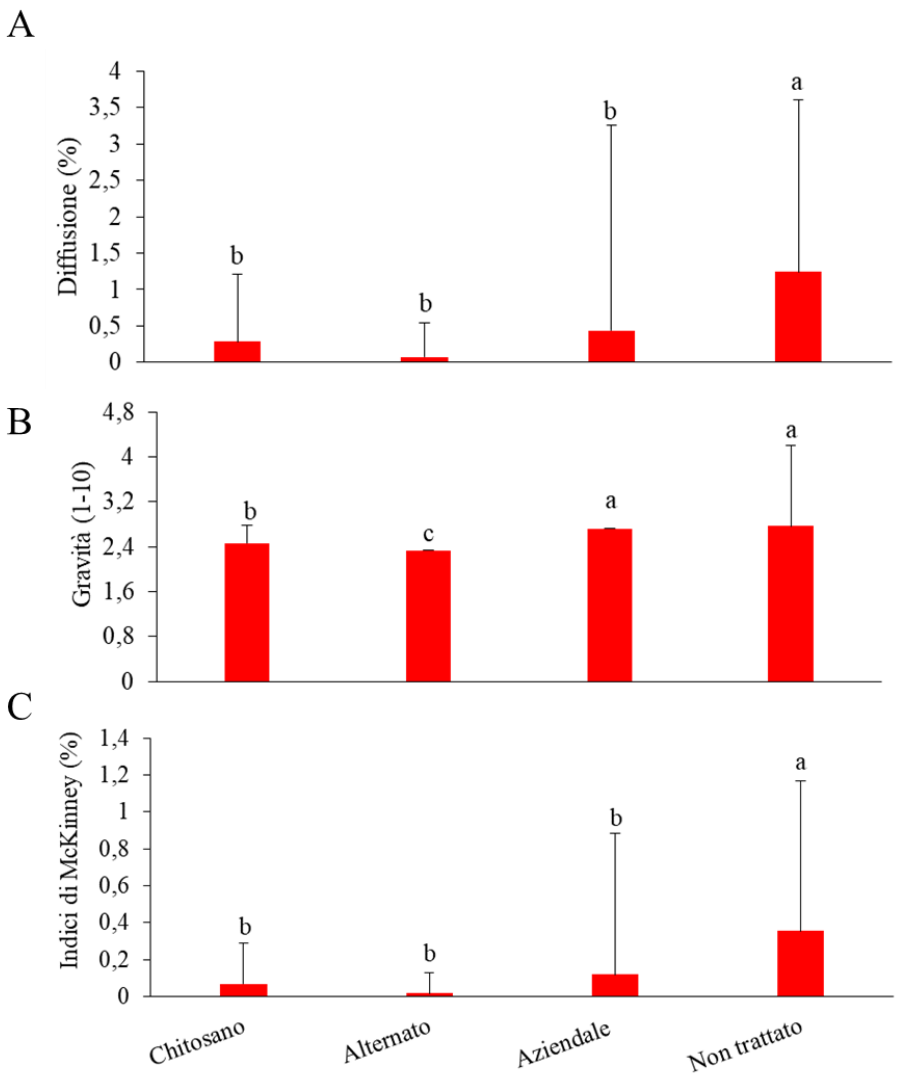

Figura 36 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 2 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 5 del 30 agosto 2022

Anche nell'ultimo rilievo tutte le strategie saggiate hanno ridotto significativamente diffusione, gravità e indice di McKinney rispetto al testimone non trattato (Figura). Per quanto riguarda la diffusione (Figura 37 A) e l'indice di McKinney (Figura 37 C), il chitosano è significativamente inferiore al non trattato ma significativamente maggiore ad alternato ed aziendale.

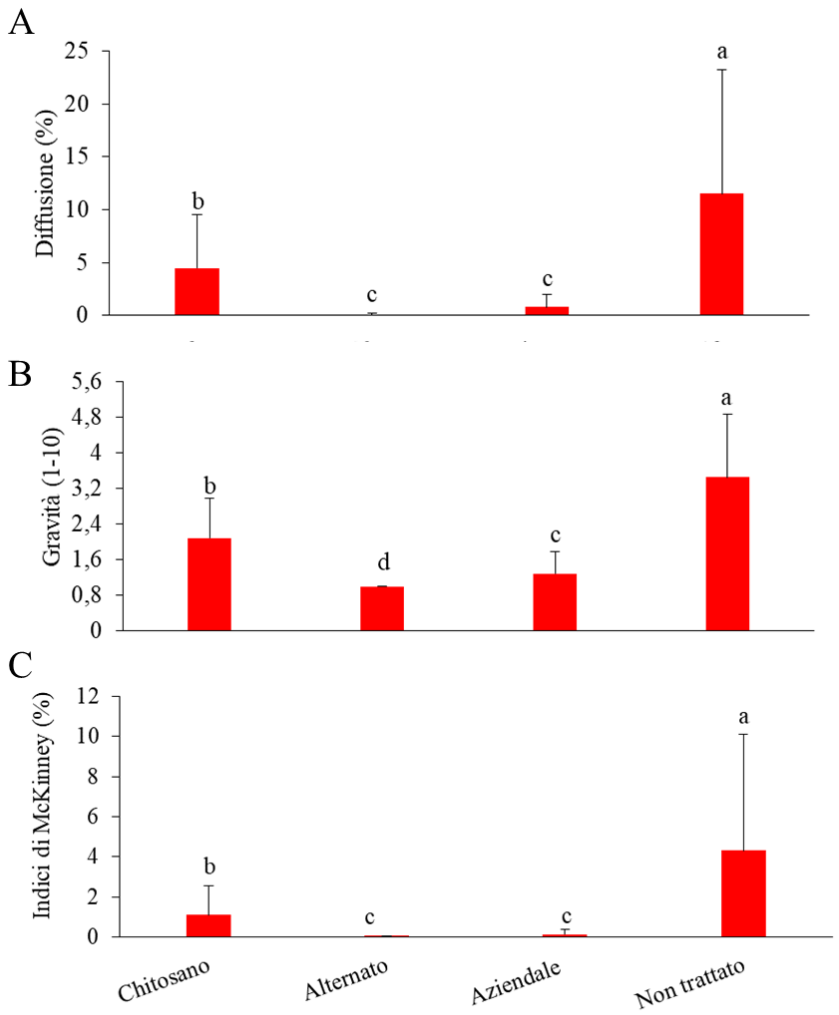

Figura 37 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 30 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

8.2.2.2 Risultati grappoli

Rilievo 1 del 16 giugno 2022

Nel primo rilievo si osserva come la diffusione (Figura 38 A) maggiore si riscontra nel non trattato che si differenzia significativamente dal chitosano, alternato e aziendale. Alternato e aziendale sono risultati statisticamente diversi dal chitosano e uguali tra loro. Per la gravità (Figura 38 B) si nota come l'alternato sia significativamente inferiore al chitosano e al non trattato. Il valore più elevato dell'indice di McKinney (Figura 38 C) è quello dei grappoli non trattati. Complessivamente tutte le strategie hanno ridotto significativamente l'intensità

media ponderata della malattia. Inoltre, alternato e aziendale sono risultati significativamente inferiori al chitosano e uguali fra loro.

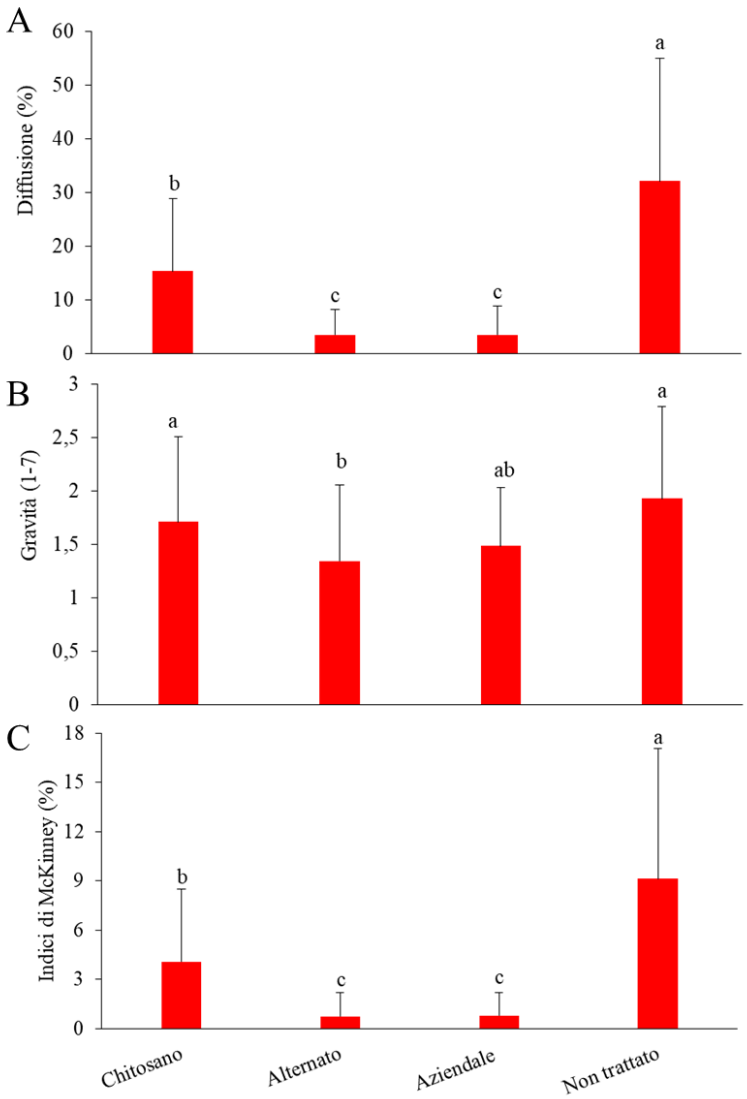

Figura 38 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 16 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 2 del 29 giugno 2022

Nel secondo rilievo si nota come per la diffusione (Figura 39 A) e l'indice di McKinney (Figura 39 C) i valori maggiori si riscontrano nel non trattato, il

chitosano è significativamente inferiore a quest'ultimo mentre alternato e aziendale sono risultati significativamente inferiori al chitosano. La gravità dei sintomi è stata contenuta in maniera statisticamente significativa solo dalle strategie alternato e aziendale (Figura 39 B).

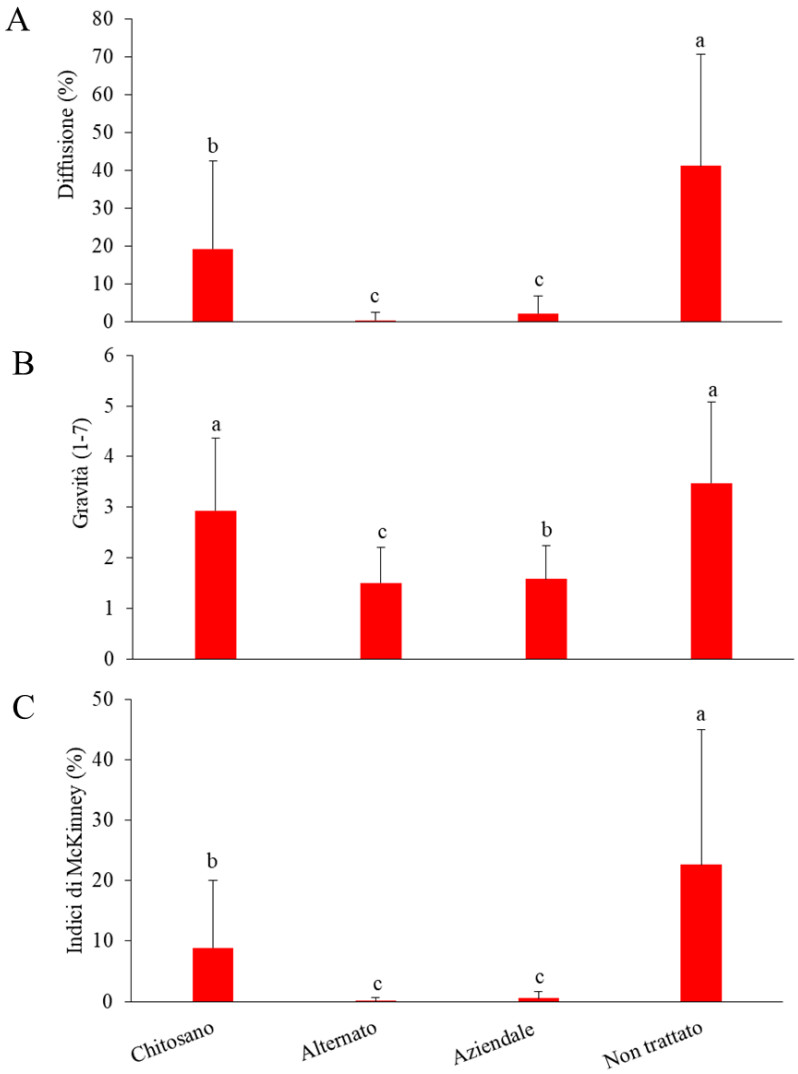

Figura 39 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 29 giugno 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 3 del 12 luglio 2022

Nel terzo rilievo per tutti e tre i parametri (Figura 40) non sono emerse differenze tra chitosano e testimone non trattato. Alternato e aziendale sono significativamente inferiori rispetto al testimone non trattato e uguali tra loro.

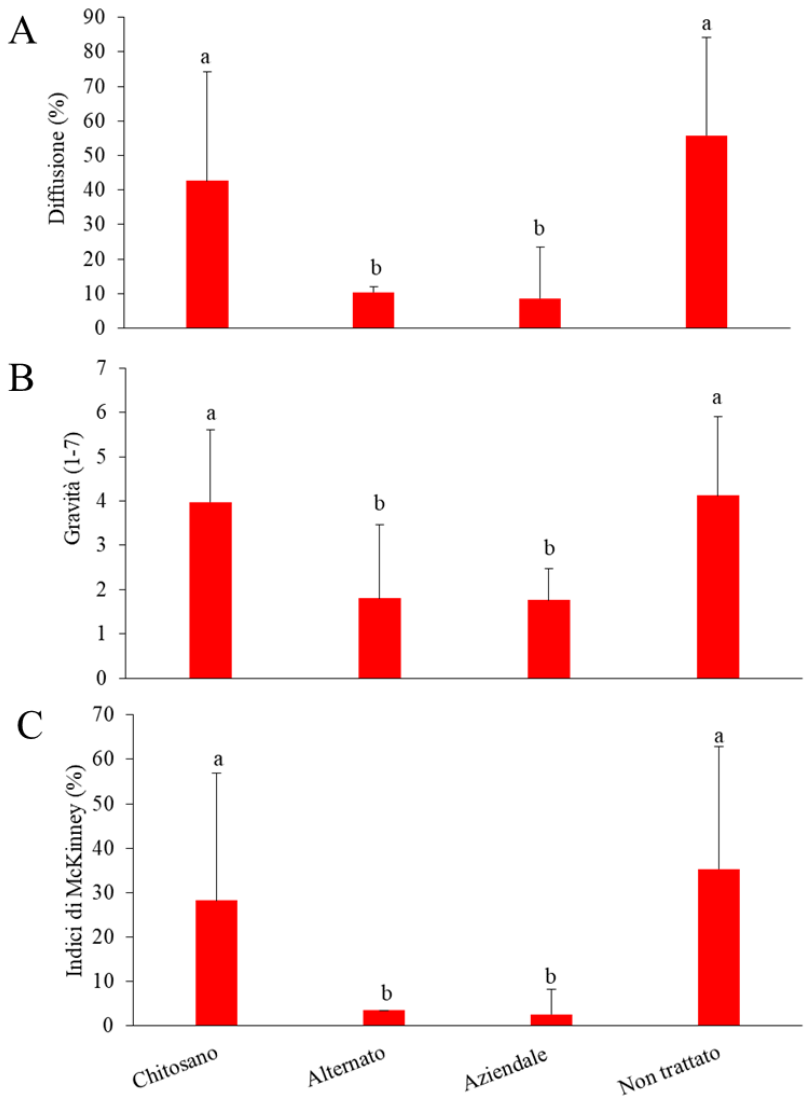

Figura 40 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 12 luglio 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 4 del 2 agosto 2022

In questo rilievo la diffusione (Figura 41 A) è stata ridotta in maniera statisticamente significativa solo con rame associato al chitosano. Per quanto riguarda la gravità (Figura 41 B) e l'indice di McKinney (Figura 41 C) si osserva che non ci sono differenze tra chitosano e non trattato, le qualli hanno registrato i

valori maggiori, mentre l'alternato risulta avere i valori inferiori differenziandosi significativamente anche dall'aziendale.

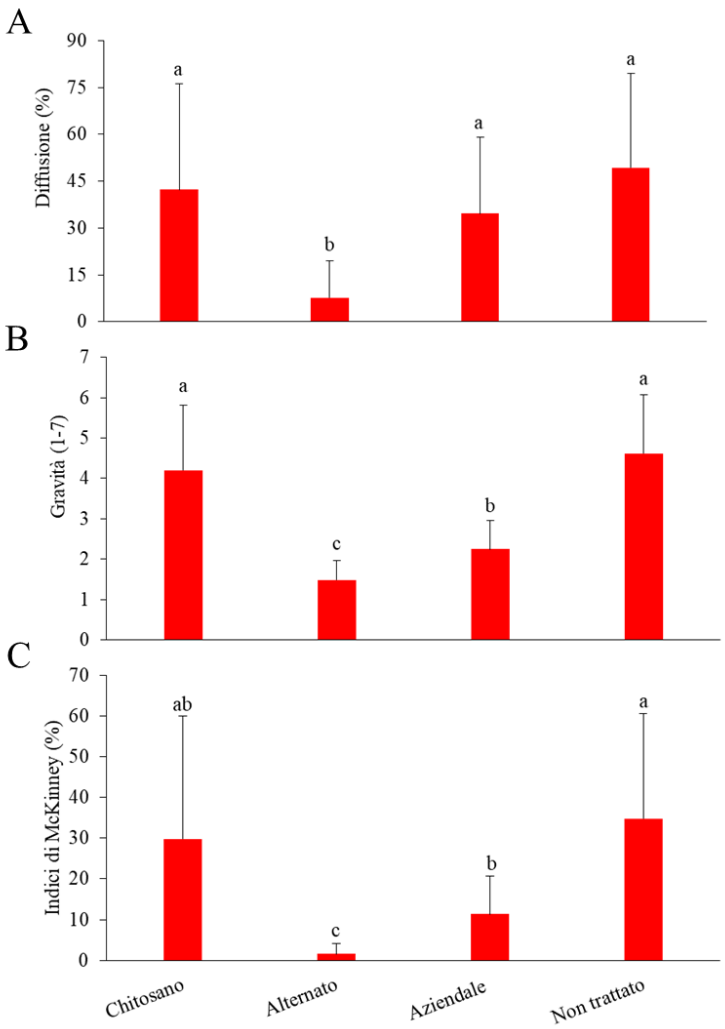

Figura 41 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 2 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 5 del 30 agosto 2022

Nell'ultimo rilievo i valori più elevati di diffusione (Figura 42 A), gravità (Figura 42 B) e indice di McKinney (Figura 42 C) sono stati registrati nei grappoli non trattati. I valori più bassi per tutti e tre gli indicatori si osservano nell'alternato, che si differenzia statisticamente da tutte le altre strategie tranne che dall'aziendale per quanto riguarda la gravità. Il chitosano applicato da solo non ha mostrato differenze significative rispetto all'aziendale per nessun parametro ad eccezione della gravità,

mentre si è distinto con significatività statistica dal testimone non trattato nel contenimento della gravità.

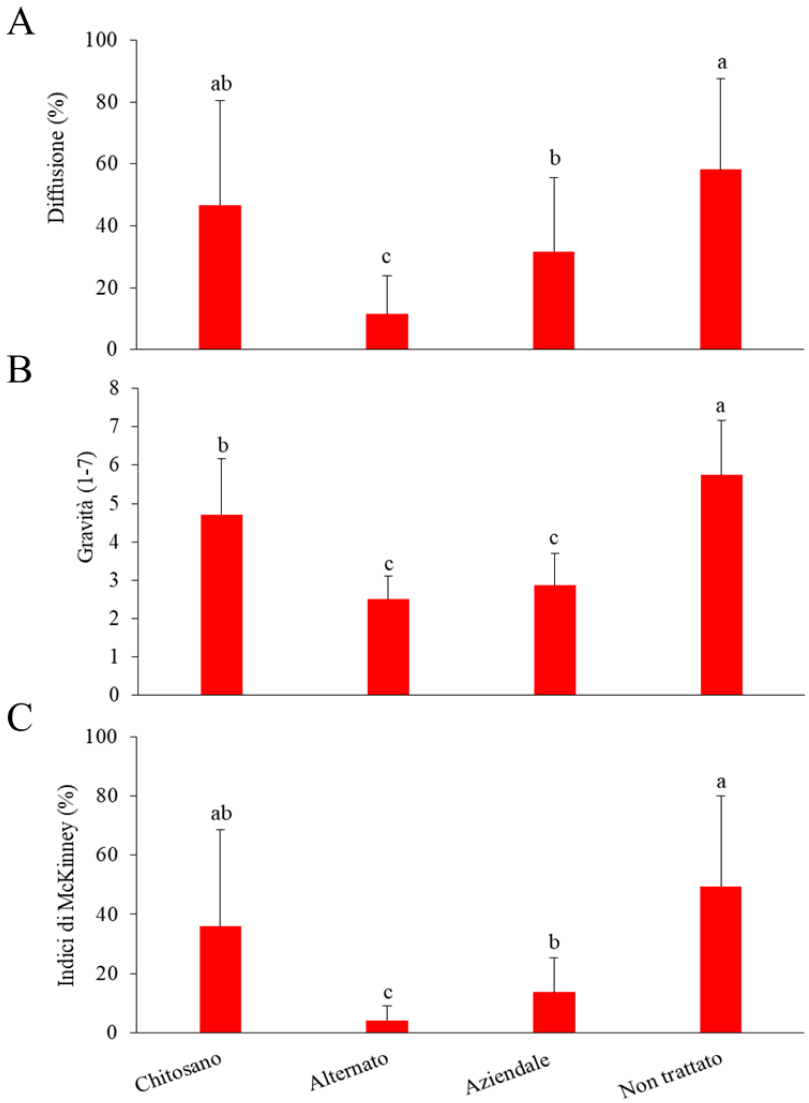

Figura 42 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di oidio su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 30 agosto 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

8.3 VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI NELLA PROVA 2

La prova 2 riguarda l'efficacia di strategie innovative per la gestione di *Botrytis cinerea* su scala commerciale nel vigneto sperimentale di Montecarotto (AN).

8.3.1 Risultati dei rilievi riguardanti peronospora

8.3.1.1 Risultati foglie

Rilievo del 19 luglio 2022

In questo rilievo non appaiono differenze importanti tra le strategie saggiate, per tutti i parametri valutati (Figura 43). I valori maggiori sono stati riscontrati in genere nel testimone non trattato, mentre i valori inferiori sono risultati quelli del cerevisane. Per l'indice di McKinney (Figura 43 C) si differenziano significativamente dal non trattato *B. amyloliquefaciens* 1, cerevisane, laminarina, cerevisane + laminarina e *M. fructicola.*

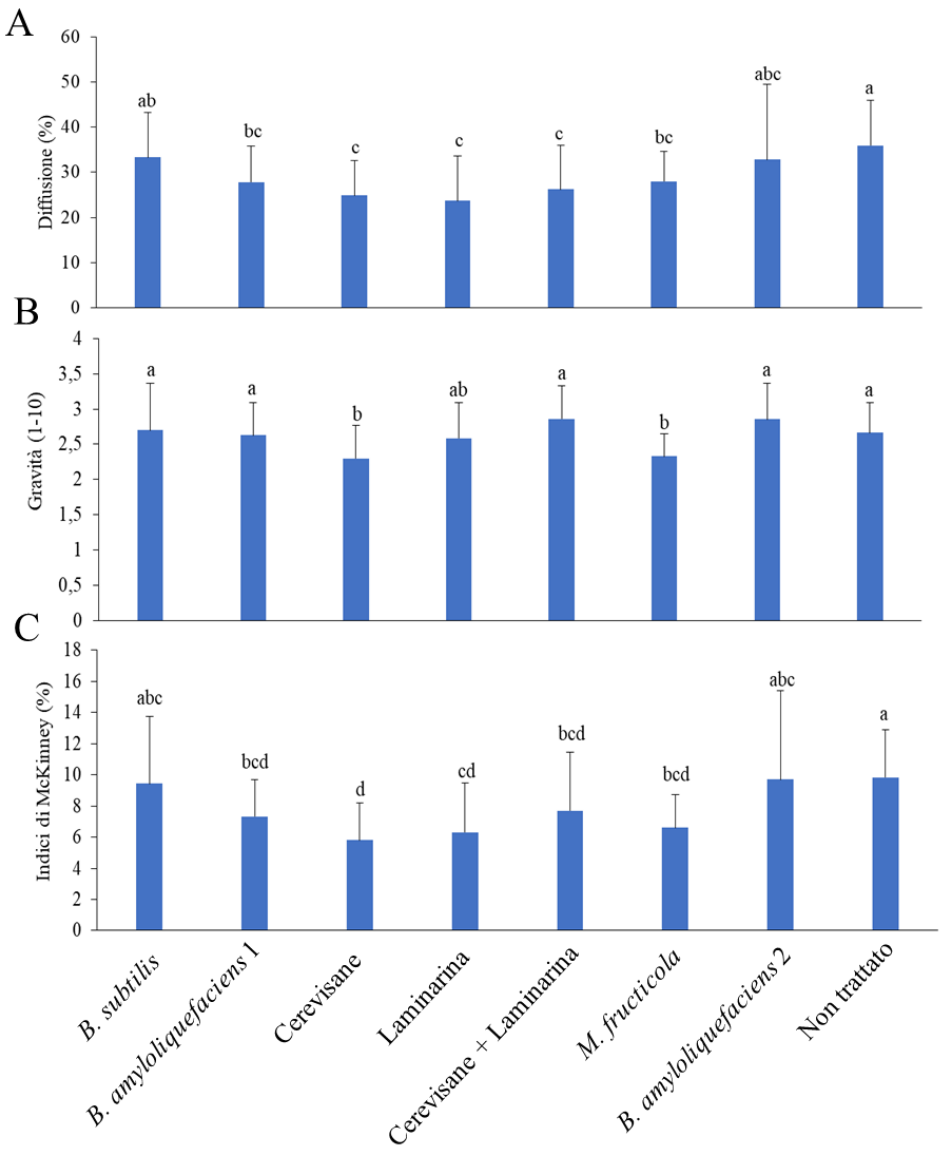

Figura 43 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-10) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su foglie di Verdicchio; rilievo condotto in data 19 luglio 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo

il test di Mann-Whitney (P ≤ 0,05) per diffusione e indice di McKinney e secondo il test di Game-Howell (P ≤ 0,05) per la gravità.

8.3.1.2 Risultati grappoli

Rilievo del 19 luglio 2022

Anche per quando riguarda l'efficacia nei confronti della peronospora sui grappoli le strategie per la protezione dalla muffa grigia non hanno mostrato differenze significative (Figura 44), in tutti i parametri valutati.

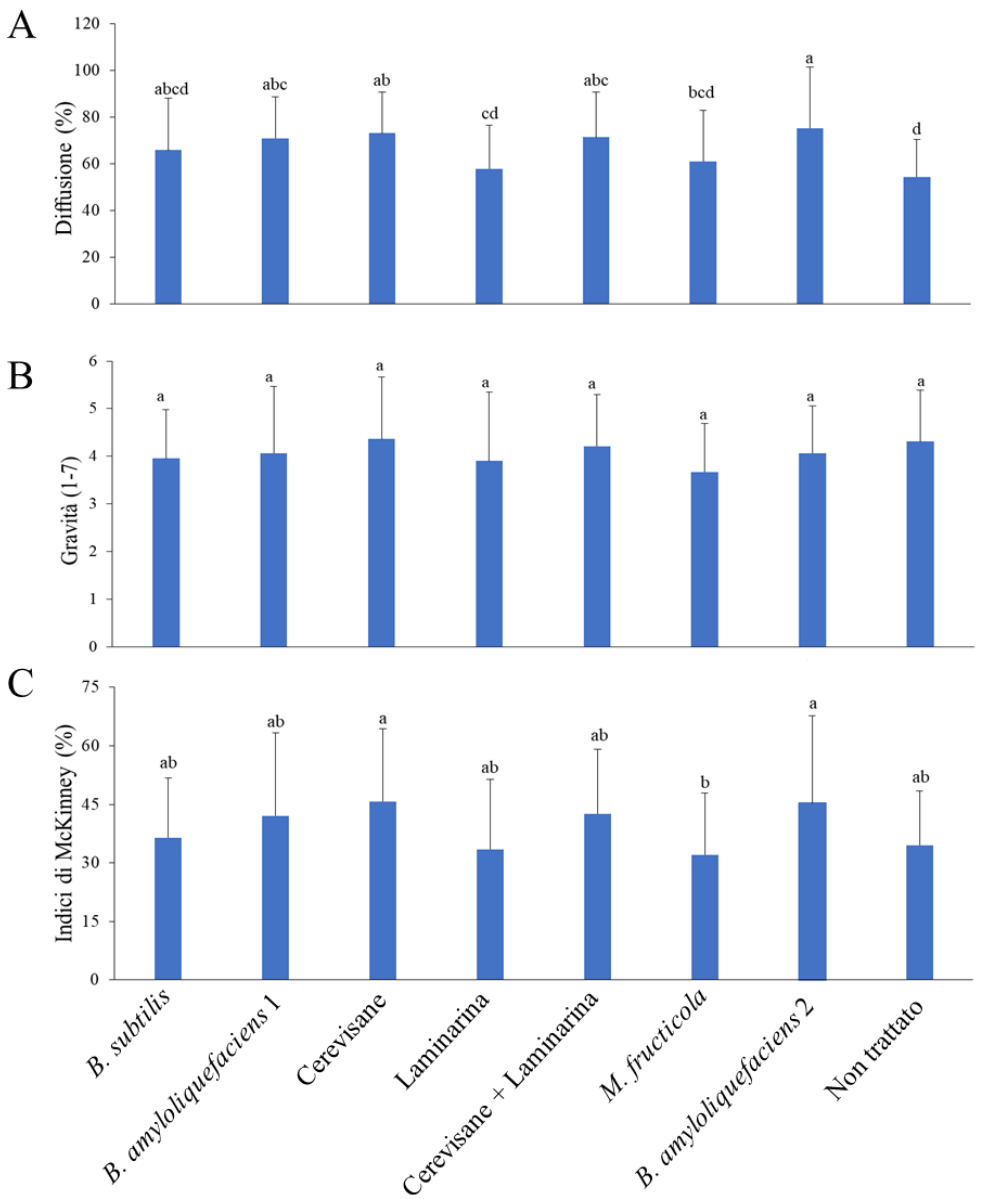

Figura 44 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di peronospora su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 19 luglio 2022. Gli

istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

8.3.2 Risultati dei rilievi riguardanti muffa grigia sui grappoli

Rilievo 1 del 13 settembre 2022

Nel primo rilievo, tutte le strategie hanno ridotto la diffusione e l'indice di McKinney rispetto al testimone non trattato, anche se non tutte le riduzioni osservate sono risultate statisticamente significative. Riduzioni significative sono state osservate trattando i grappoli con cerevisane, laminarina e *M. fructicola* – 2T (Figura 45 A). I valori più elevati dell'indice di McKinney (Figura 45 C) si osservano nel non trattato e nel *B. amyloliquefaciens* 2 – 2T, mentre cerevisane, laminarina e *M. fructicola* – 2T hanno i valori minori e sono significativamente diversi da essi. La gravità più alta si registra su *B. amyloliquefaciens* 2 – 2T che diverge significativamente da cerevisane, laminarina, cerevisane + laminarina, *M. fructicola,* e *B. subtilis* - 2T (Figura 45 B).

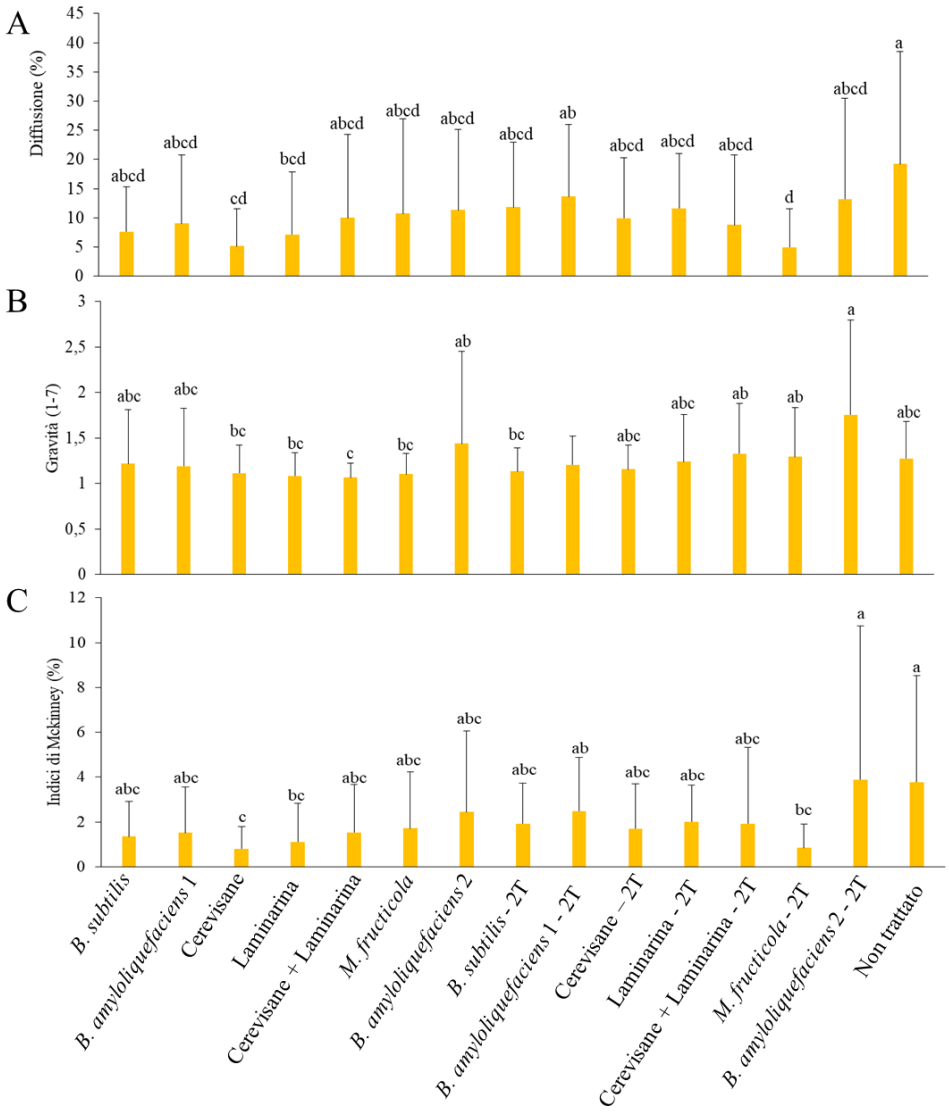

Figura 45 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di muffa grigia su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 13 settembre 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 2 del 19 settembre 2022

Nel secondo rilievo, con una pressione della malattia maggiore, tutte le strategie hanno ridotto, anche se non sempre in maniera statisticamente significativa, i parametri patometrici considerati rispetto al testimone non trattato, che ha i valori più elevati di diffusione (Figura 46 A), gravità (Figura 46 B) e indice di McKinney (Figura 46 C). Per la diffusione, tali riduzioni non sono risultate significative nelle strategie *B. subtilis*, cerevisane + laminarina -2T e *B. amyloliquefaciens* 2 -2T. Per

la gravità, non hanno raggiunto la soglia della significatività statistica le riduzioni registrate con le seguenti strategie: *B. amyloliquefaciens* 2, *B. amyloliquefaciens* 1 2-T e *B. amyloliquefaciens* 2 -2T. Tutte le strategie, tranne *B. subtilis* e *B. amyloliquefacens* 2 – 2T, hanno ridotto l'indice di McKinney in maniera statisticamente significativa rispetto al testimone non trattato. Non sono emerse particolari differenze fra le strategie a singolo o a doppio trattamento

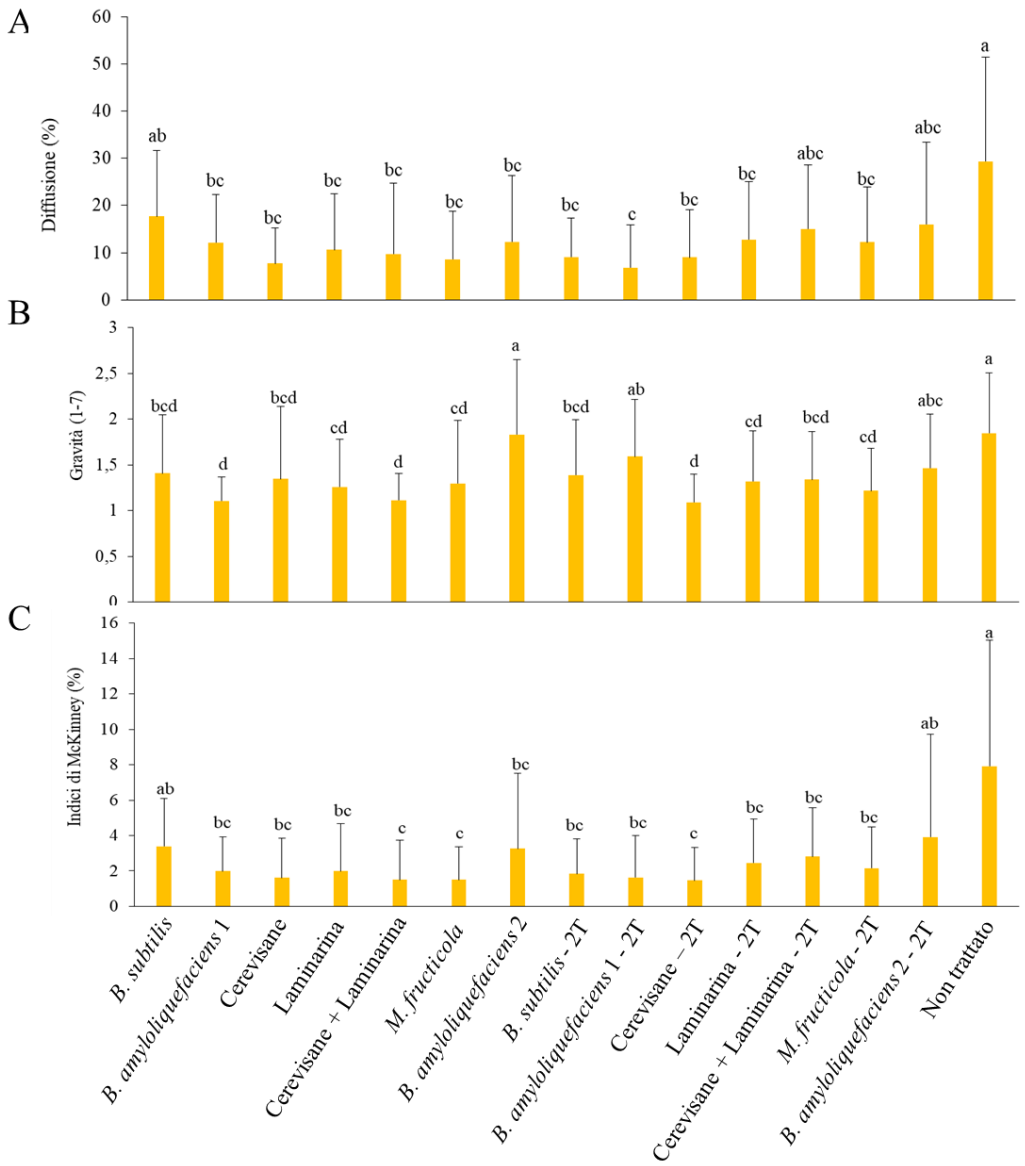

Figura 46 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di muffa grigia su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 19 settembre 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

8.3.3 Risultati dei rilievi riguardanti *Aspergillus* spp. sui grappoli

Rilievo 1 del 13 settembre 2022

Durante i rilievi per la muffa grigia sono state individuati dei marciumi secondari dovuti a delle infezioni di *Aspergillus* spp. In questo primo rilievo la pressione di malattia è risultata essere bassa. Si nota che la diffusione maggiore è stata riscontrata in cerevisane + laminarina, *B. amyloliquefacens* 2 – 2T e testimone non trattato (Figura 47 A). Per la gravità (Figura 47 B) i valori più elevati sono stati osservati nelle strategie *B. subtilis* – 2T, laminarina – 2T, cerevisane + laminarina – 2T e *B. amyloliquefacens* 2 – 2T mentre tutte le altre strategie si differenziano significativamente da queste. Il grafico dell'indice di McKinney (Figura 47 C) evidenzia la percentuale più elevata per *B. amyloliquefacens* 2 – 2T. Valori significativamente più bassi sono stati registrati su *B. subtilis*, cerevisane, laminarina, *M. fructicola* singolo e doppio trattamento, *B. amyloliquefacens* 2 e cerevisane + laminarina – 2T. Non è stata riscontrata alcuna infezione su *B. amyloliquefances* 1.

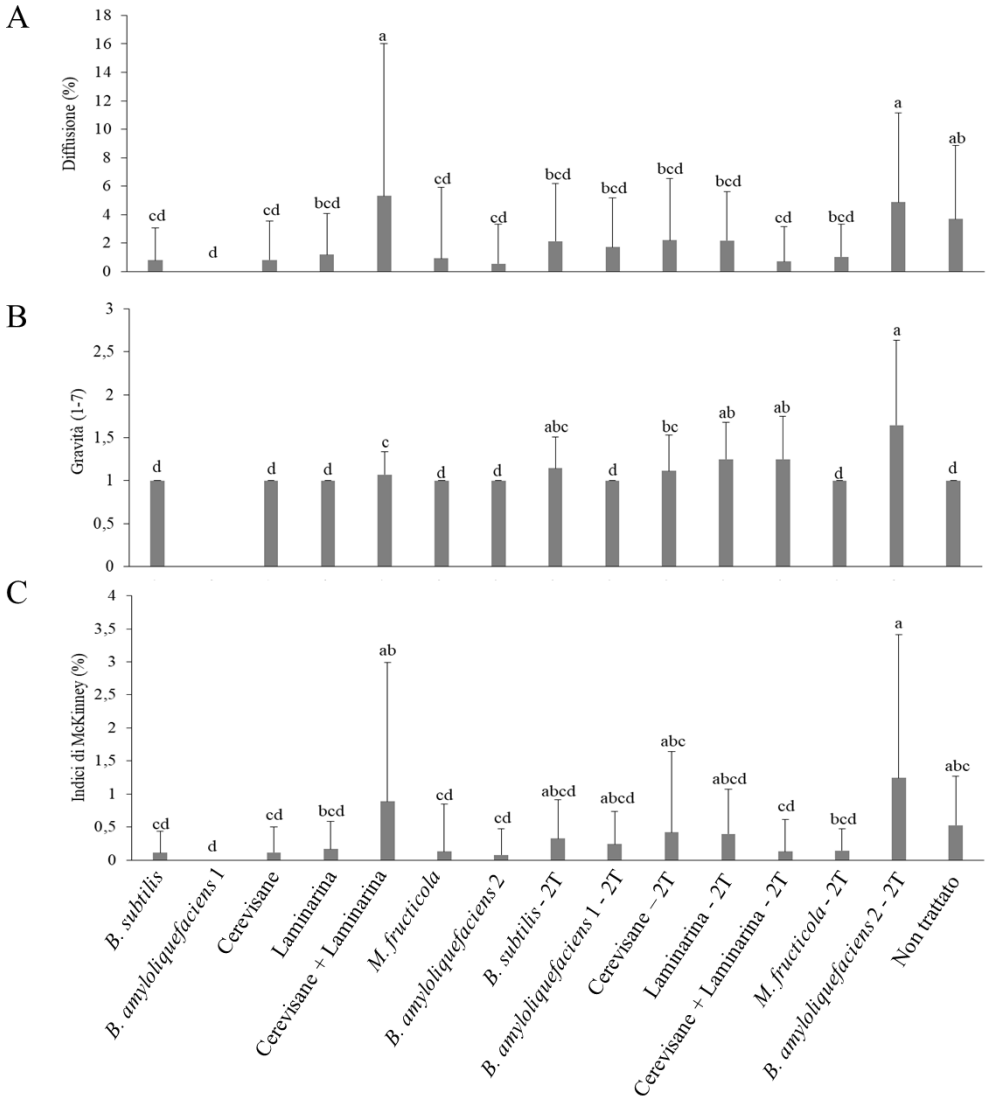

Figura 47 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di *Aspergillus* spp. su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 13 settembre 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

Rilievo 2 del 19 settembre 2022

Nell'ultimo rilievo si osserva come tutte le strategie saggiate abbiano protetto in maniera statisticamente significativa i grappoli dal marciume secondario causato da *Aspergillus* spp., mostrando riduzioni statisticamente significative per tutti i parametri patometrici considerati. Tutte le strategie hanno ridotto significativamente la percentuale di diffusione rispetto al controllo (Figura 48 A), senza differire significativamente tra loro a livello statistico. Tutte le strategie hanno contenuto la gravità dei sintomi (Figura 48 B) rispetto ai grappoli non trattati,

anche se *B. subtilis*, cerevisane, laminarina, *B. amyloliquefaciens* 2, *B. subtilis* -2T e *B. amyloliquefaciens* 1 -2T non in maniera statisticamente significativa. Analogamente alla diffusione, tutte le strategie hanno significativamente ridotto l'intensità media ponderata del marciume secondario rispetto al testimone non trattato. Tra le strategie saggiate non sono emerse differenze statisticamente significative, se non tra *B. amyloliquefacens* 1 – 2T e *M. fructicola* – 2T, strategia con la percentuale più bassa. Anche in questo caso, non sono state riscontrate differenze particolari in funzione del numero dei trattamenti.

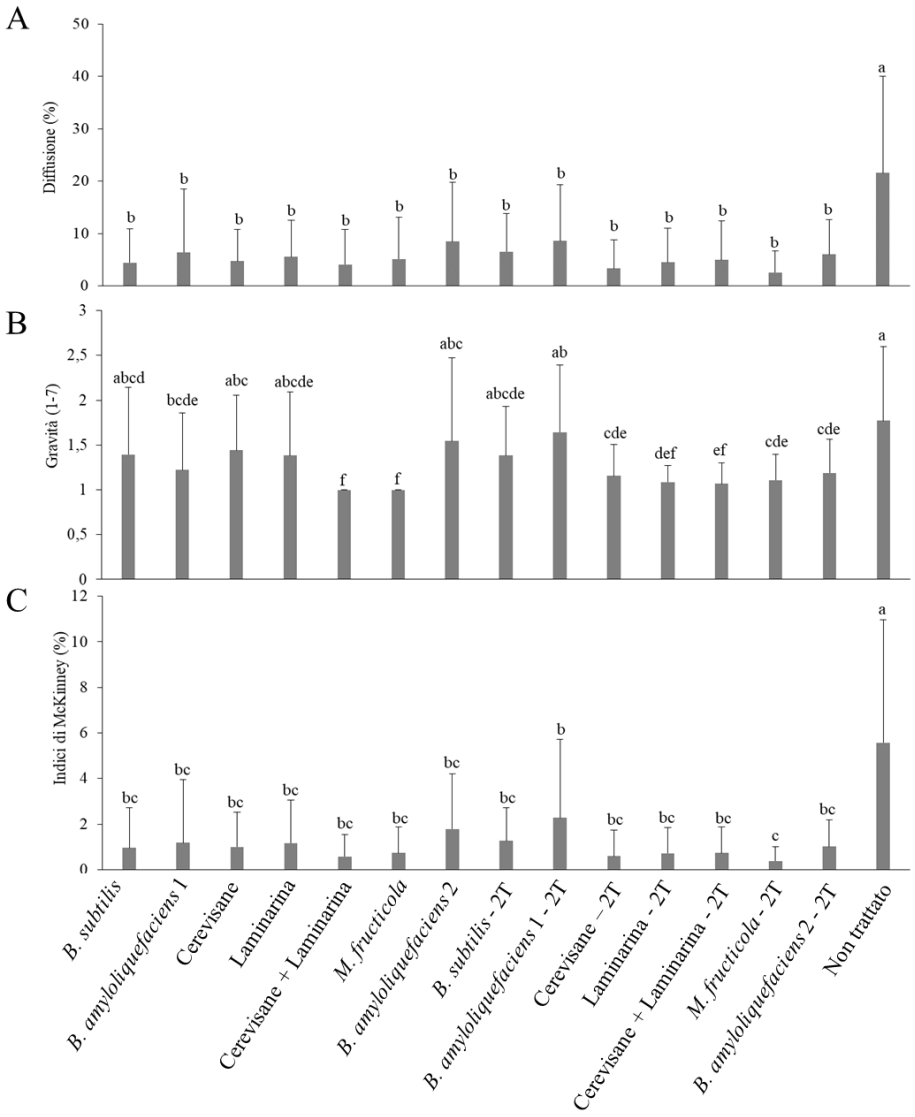

Figura 48 – A. Diffusione (%), B. Gravità (1-7) e C. Indice di McKinney (%) di *Aspergillus* spp. su grappoli di Verdicchio; rilievo condotto in data 19 settembre 2022. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test di Mann- Whitney ($P \leq 0,05$).

8.4 APPROFONDIMENTI DI LABORATORIO

8.4.1 Isolamento e identificazione morfologica dei funghi

Alternaria alternata

Le bacche prese come campioni mostravano del micelio scuro, da marrone a nero, e compatto come si vede dall'immagine scattata sotto stereomicroscopio (Figura 49 A). Utilizzando il microscopio sono stati osservati lunghe catene di conidi tipiche della specie *Alternaria alternata* (Figura 49 B). I conidi di *A. alternata* sono molto variabili nella forma (da ovale a cilindrica), dimensione e numero di setti (trasversali e longitudinali). È stato isolato un campione di tessuto fungino e posto su una piastra Petri contenente PDA, dopo 7 giorni di incubazione a 22 ± 2 °C, il fungo ha prodotto una colonia grigio scuro (Figura 49 D).

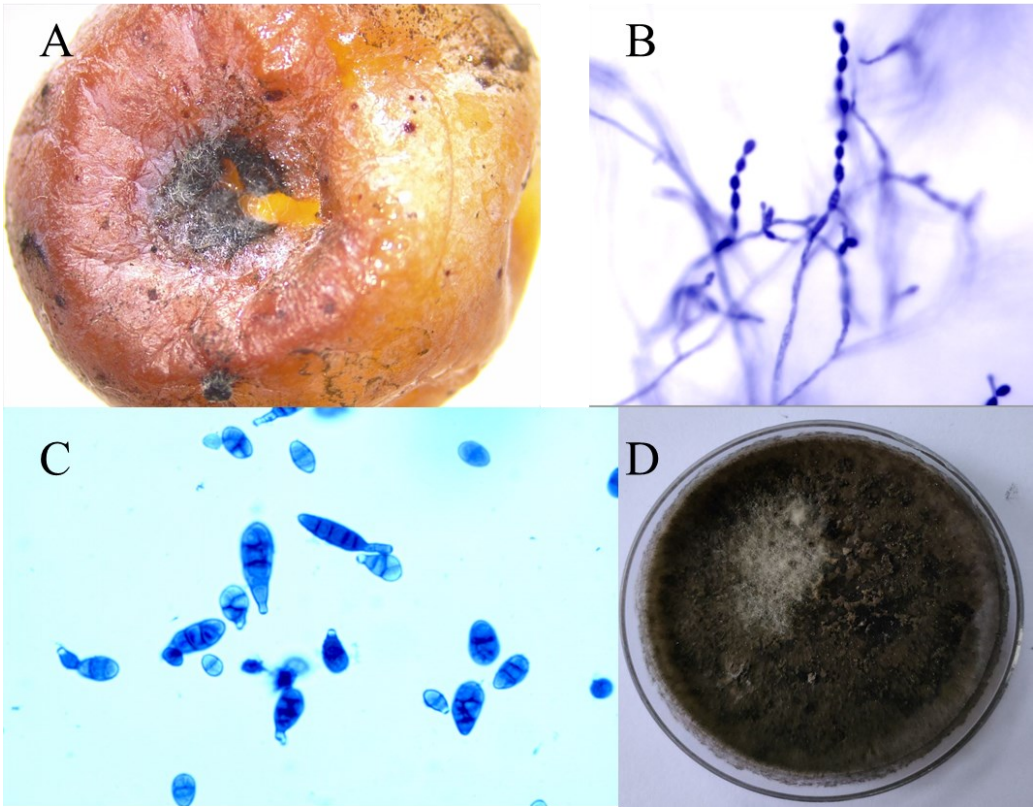

Figura 49 – Dettaglio allo stereomicroscopio di *Alternaria alternata* su una bacca di *cv*. Verdicchio (A) e Conidi di *A. alternata* in catena (B); Conidi di *A. alternata* in diverse forme al microscopio (C); Micelio di *A. alternata* su piastra Petri contenente PDA, dopo 7 giorni di incubazione a 22 ± 2 °C (D).

***Aspergillus* spp.**

Alcune bacche affette da marciume risultavano coperte da micelio polverulento di colorazione da marrone scuro a nero (Figura 50 A). Allo streomicroscopio è stato

possibile riconoscere i tipici conidi di *Aspergillus* spp., formati da teste globose scure ruvide su lunghi e eretti conidiofori ialini disposti in piccoli gruppi (Figura 50 B). Utilizzando il microscopio sono stati osservati i conidi di questa specie (Figura 50 C) che sono rotondi con dei margini irregolari. È stato isolato un campione di tessuto fungino e posto su una piastra Petri contenente PDA, dopo 7-10 giorni a 22 ± 2 °C il fungo ha prodotto una colonia nera (Figura 50 D).

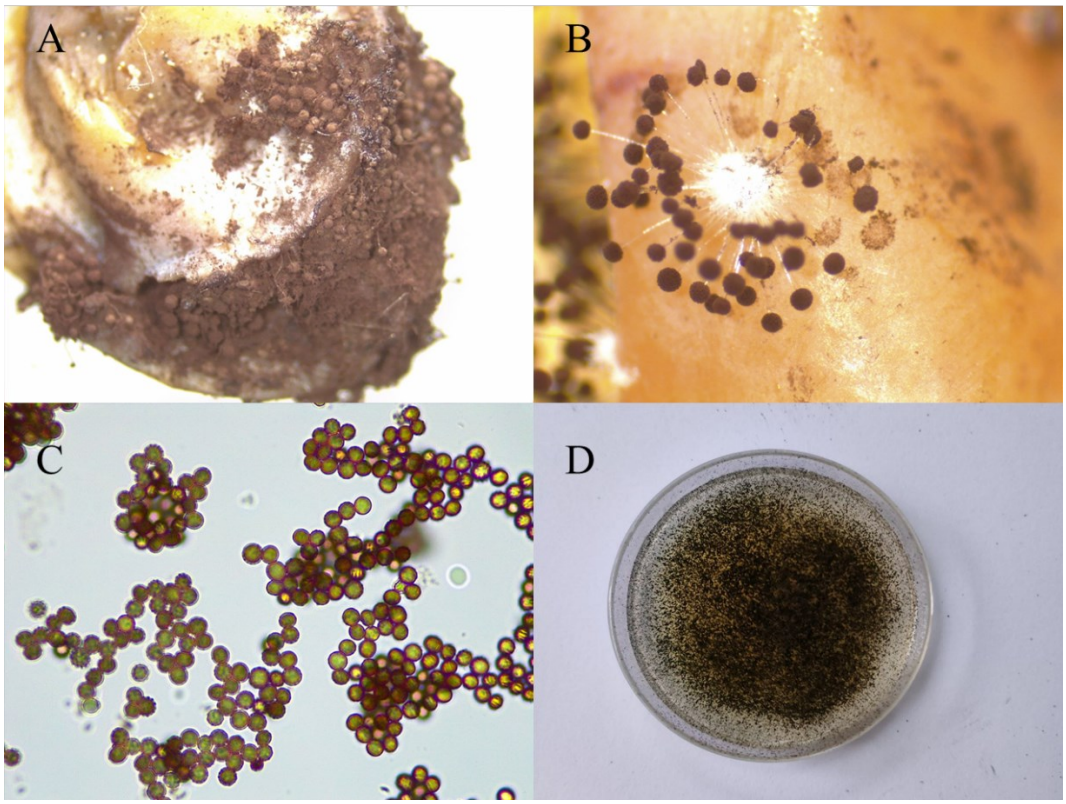

Figura 50 – Dettaglio allo stereomicroscopio di *Aspergillus* spp. su una bacca di *cv*. Verdicchio (A) e conidi e conidiofori di *Aspergillus* spp. allo stereomicroscopio (B); Conidi dello stesso fungo osservati al microscopio (C); Micelio di *Aspergillus* spp. su piastra Petri contenente PDA, dopo 7-10 giorni di incubazione a 22 ± 2 °C (D).

Botrytis cinerea

Le bacche affette da marciume prese come campioni mostravano del micelio grigiastro filamentoso, come si vede dall'immagine catturata allo streomicroscopio (Figura 51 A). Con lo stesso strumento è stato possibile distinguere i conidiofori lunghi e marroni che ramificano ripetutamente e portano mazzetti di conidi di colore da grigio cenere a marrone grigiastro (Figura 51 B). Utilizzando il microscopio sono stati osservati i conidi di questa specie (Figura 51 C) che sono ellissoidali od ovoidali, lisci, con un ilo leggermente protuberante, da incolori a marrone chiaro.

È stato isolato un campione di tessuto fungino e posto su una piastra Petri contenente PDA, dopo 7-10 giorni a 22 ± 2 °C il fungo ha prodotto una colonia grigiastra (Figura 51 D). Le colonie ottenute nelle piastre Petri sono state utilizzate per degli isolamenti monoconidici, i quali andranno ad ampliare la collezione del dipartimento e potranno essere utili per analisi o prove future.

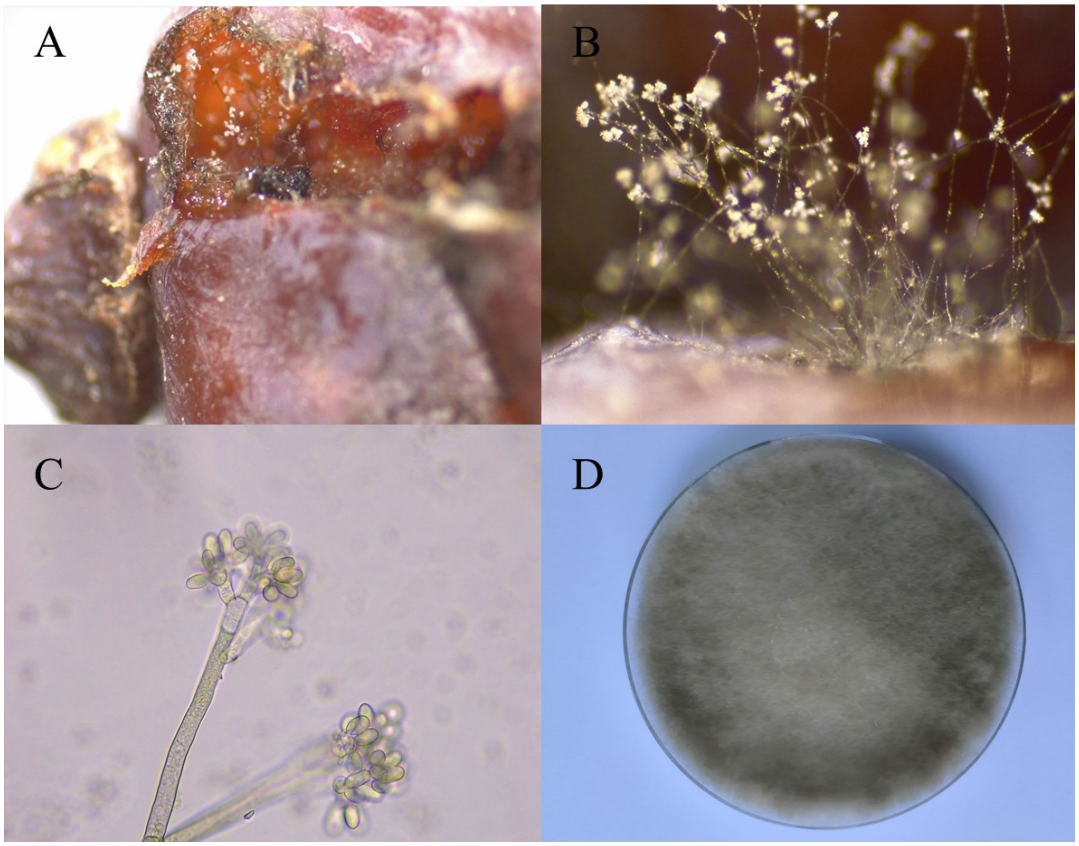

Figura 51 – Dettaglio allo stereomicroscopio di *Botrytis cinerea* su una bacca di *cv*. Verdicchio (A) e conidi e conidiofori di *B. cinerea* allo stereomicroscopio (B); conidi e conidiofori dello stesso fungo osservati al microscopio (C); Micelio di *B. cinerea* su piastra Petri contenente PDA, dopo 7-10 giorni di incubazione a 22 ± 2 °C (D).

***Cladosporium* spp.**

Le bacche mostravano del micelio marrone grigiastro (Figura 52 A), utilizzando il microscopio sono stati osservati i conidi di questa specie (Figura 52 C) che sono ramificati in catene e portati da conidiofori che generalmente non sono ramificati. I conidi sono globosi o sub globosi e di colore marrone olivaceo da medio a scuro. È stato isolato un campione di tessuto fungino e posto su una piastra Petri contenente *PDA*, dopo 7-10 giorni a 22 ± 2 °C il fungo ha prodotto una colonia verdastra (Figura 52 B).

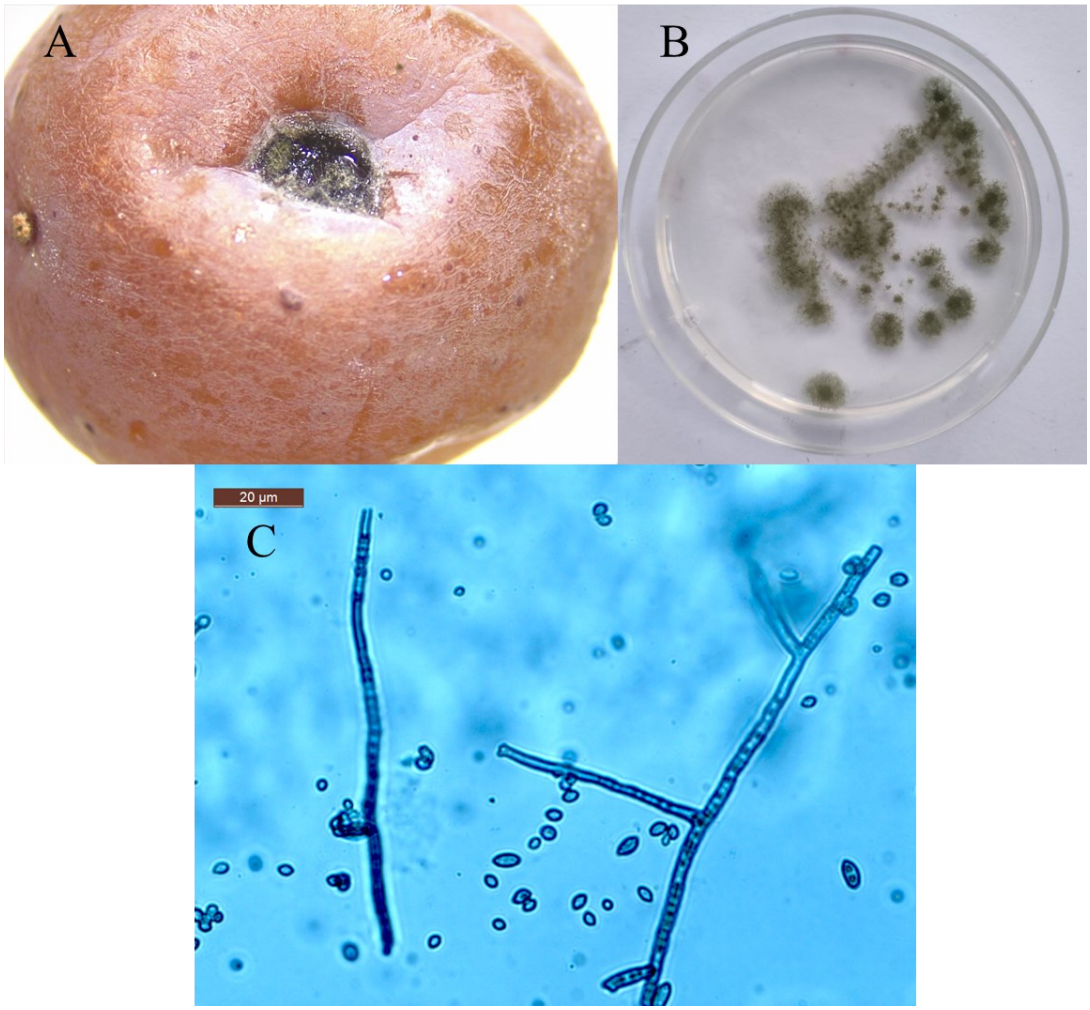

Figura 52 – Immagine di *Cladosporium* spp. su una bacca di *cv.* Verdicchio (A) allo stereomicroscopio; conidi e conidiofori dello stesso fungo osservati al microscopio (C); micelio di *Cladosporium* spp. su piastra Petri contenente PDA dopo 7-10 giorni di incubazione a 22 ± 2 °C (B).

***Penicillium* spp.**

Altri sintomi di marciumi secondari sono stati osservati in vigneto. In questo caso le bacche risultavano coperte da micelio di colorazione biancastra (Figura 53 A), e utilizzando il microscopio sono stati osservati i conidi di *Penicillium* spp. (Figura 53 C), i quali sono organizzati in catene e portati dai conidiofori ramificati all'apice: ne risulta nel complesso un aspetto di pennello. È stato isolato un campione di tessuto fungino e posto su una piastra Petri contenente PDA, dopo 7-10 giorni a 22 ± 2 °C il fungo ha prodotto una colonia nera (Figura 53 B).

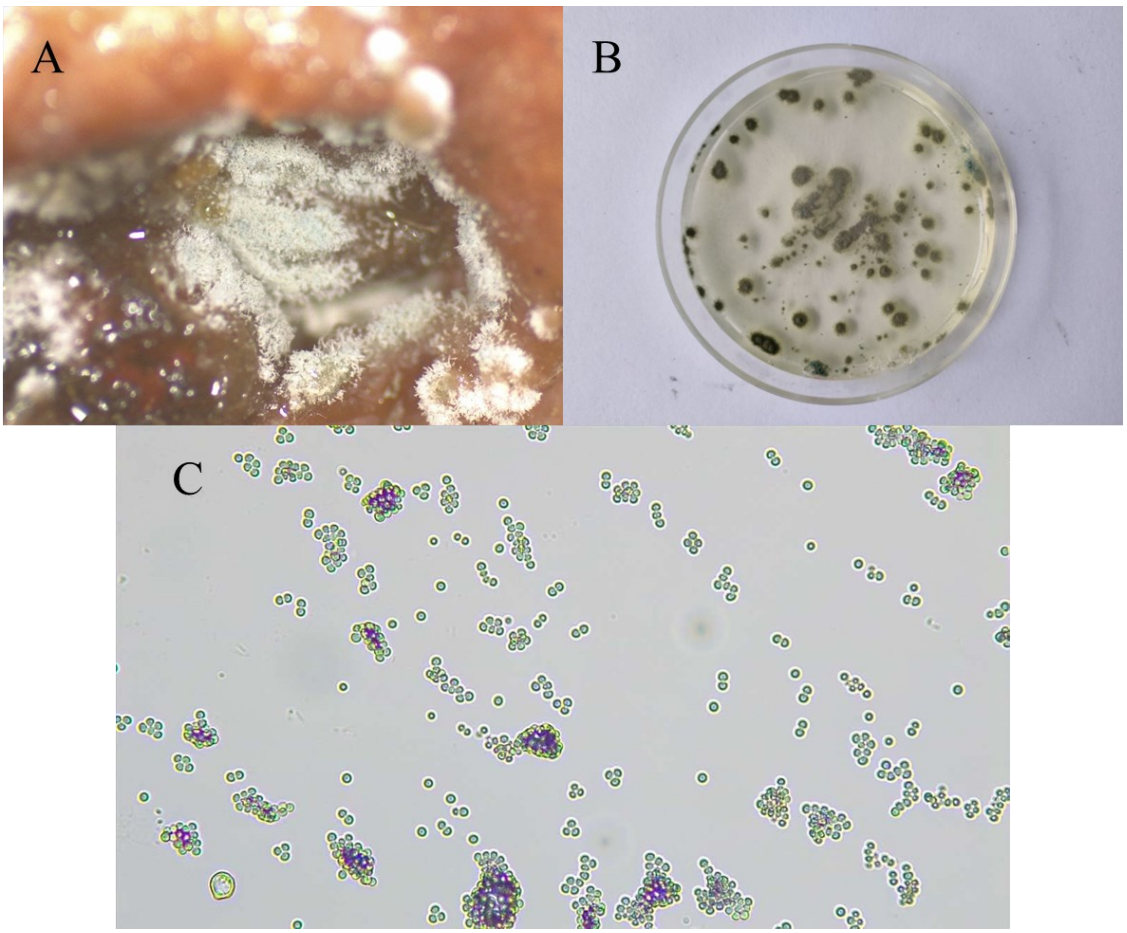

Figura 53 – Immagine di *Penicillium* spp. su una bacca di *cv*. Verdicchio (A) allo stereomicroscopio; conidi dello stesso fungo osservati al microscopio (C); micelio di *Penicillium* spp. su piastra Petri contenente PDA dopo 7-10 giorni di incubazione a 22 ± 2 °C (B).

8.4.2 Validazione del kit *Botrytis Alert*

- ***Verifica del kit con diversi livelli di infezione***

Preliminarmente è stato testato il kit con grappoli di *cv*. Verdicchio con diverse percentuali di diffusione di *Botrytis* spp. (da 0 al 50 %) stimate in campo e si è visto che l'intensità della banda diminuisce per livelli di infezione minori e con livelli di diffusione inferiori al 10 % non si riescono a cogliere differenze ad occhio nudo (Figura 54); per questo è stata impostata la seguente sperimentazione.

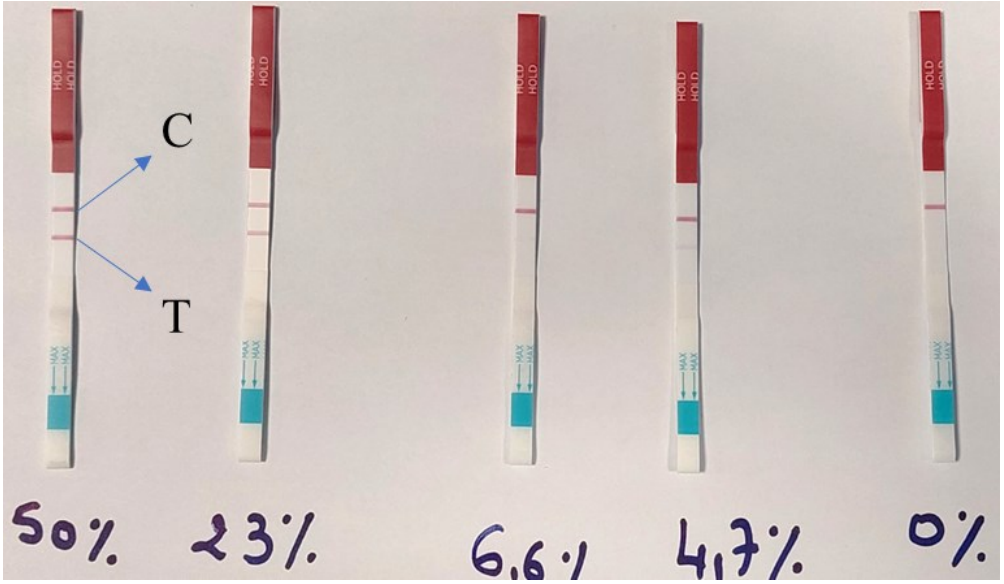

Figura 54 - Stick tampone del kit *Botrytis Alert* utilizzati per la diagnosi su grappoli di *cv*. Verdicchio infetti da *Botrytis* spp. con livelli di diffusione dallo 0 al 50 %; C: controllo; T: campione.

I 17 grappoli di *cv*. Montepulciano, per i quali la percentuale di diffusione è stata determinata esattamente contando le bacche, analizzati tramite il kit *Botrytis Alert*, hanno mostrato una correlazione positiva tra il valore di T fornito dal lettore di intensità del segnale (T value) e la percentuale di infezione da *Botrytis* spp. per tutte le diluizioni saggiate. Per la diluizione 1:100 tra mosto e buffer si osserva una correlazione positiva (Figura 55 A) con valore di $R^2 = 0,59$. Anche per la diluizione 1:50 tra mosto e buffer (Figura 55 B) si osserva una correlazione positiva tra il valore di T e la % di infezione da *Botrytis* spp., con un valore di $R^2 = 0,59$, in leggero aumento rispetto alla diluizione 1:100. Aumentando la diluzione a 1:25 (Figura 55 C) si osserva un incremento del valore di $R^2 = 0,68$, questo sottolinea una forte correlazione positiva tra il valore di T e la percentuale di infezione da *Botrytis* spp. Con la diluizione a 1:10 (Figura 55 D) tra mosto e buffer si nota un valore di $R^2 = 0,68$ stabile rispetto alla diluizione 1:25 e risulta confermata quindi la forte correlazione tra il valore di T e la % di infezione da *Botrytis* spp. Complessivamente, per bassi livelli d'infezione, la sensibilità dello strumento aumenta all'aumentare della diluizione del mosto.

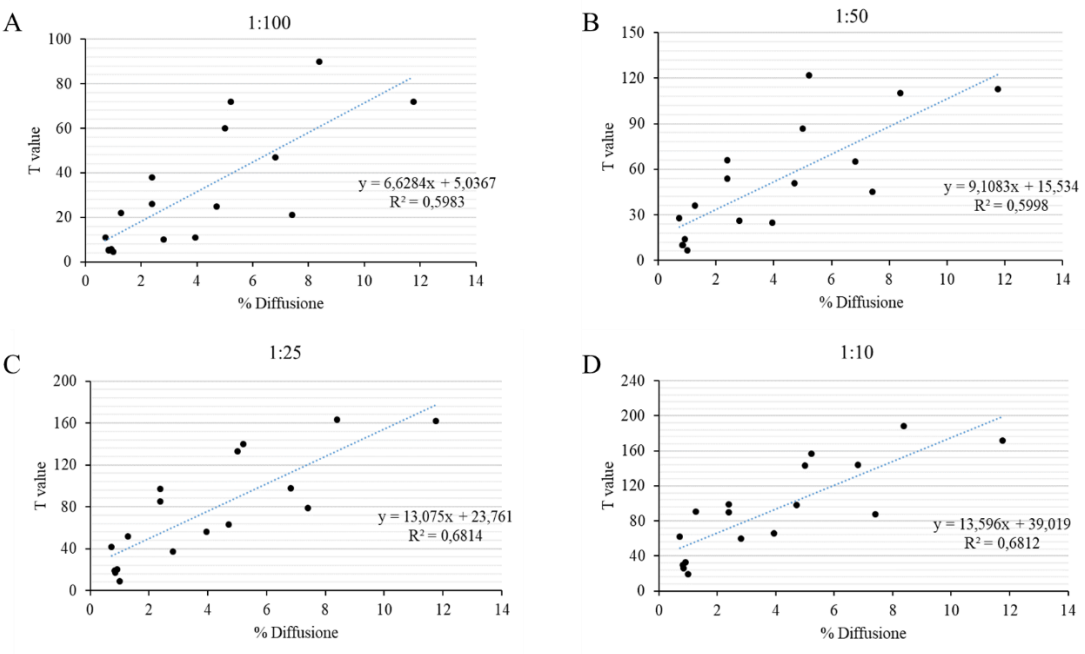

Figura 55 - Correlazione tra il valore Test dato dal lettore di intensità del segnale del kit *Botrytis Alert* (T value) e la percentuale di infezione da *Botrytis* spp. dei grappoli di *cv*. Montepulciano (% Diffusione). Il mosto è stato diluito con il buffer 1:100 (A), 1:50 (B), 1:25 (C) e 1:10 (D).

- ***Correlazione tra acido glucanico e* Botrytis *spp.***

Poiché la diluizione del buffer 1:25 ha mostrato valori elevati di R^2, è stata considerata idonea per effettuare dei test attendibili anche in presenza di bassi livelli d'infezione. Inoltre, al contrario della diluizione 1:10 che ha mostrato dei livelli di R^2 simili, risulta più pratica e rapida. Con questa diluizione del buffer è stata studiata la correlazione tra il livello d'infezione di alcune partite d'uva all'ingresso in cantina, per le quali la diffusione di *Botrytis* spp. era stata stimata a vista e il T value dei campioni di mosto analizzati. Inoltre, tale analisi è stata confrontata con la presenza di acido gluconico (Tabella 8) nei campioni di mosto, per verificare quale delle due risultasse più specifica per la diagnosi rapida di *B. cinerea*. I risultati, riportati in tabella 8, mostrano come non siano state osservate correlazioni positive (R^2= 0,0511).

Tabella 8 – Livello di infezione da *Botrytis* spp. dei campioni di mosto, valore Test dato dal lettore di intensità del segnale del kit *Botrytis Alert* e la quantità di acido glucanico (g/L) nei campioni di mosto infetti da *Botrytis* spp. Per l'analisi con il kit *Botrytis Alert* il mosto è stato diluito 1:25 con il buffer.

Livello di infezione	T value	Acido gluconico (g/L)
basso	184	2,5
medio	183	4,14
basso	106	3,16
basso	159	1,48
medio	111	7,17
basso	169	2,71
basso	46	3,28
medio	178	4,34
basso	107	2,18
alto	151	6,56
medio	186	4,56
basso	166	3,88
medio	154	1,51
medio	198	1,99
medio	176	2,4
medio	160	0,8
basso	181	2,3
basso	198	1,15

9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La peronospora e la muffa grigia della vite rappresentano ancora oggi due fra le avversità principali per la vite e, ogni anno, se non vengono contenute tramite delle accurate strategie di protezione, possono causare la perdita della produzione. Ancora oggi, i mezzi chimici rappresentano il principale mezzo di protezione da queste malattie. La velocità di diffusione, in modo epidemico, di queste malattie impone l'attuazione di strategie impostate con un criterio preventivo in modo da impedire l'insediamento dei patogeni nel vigneto. Questo approccio di tipo cautelativo presuppone un elevato numero di trattamenti durante la stagione e di conseguenza un massiccio utilizzo di fungicidi chimici per contenerle. Tuttavia, negli ultimi anni, l'uso dei fungicidi tradizionali è costantemente sotto la lente d'ingrandimento dell'opinione pubblica e dei legislatori. Recentemente, in Europa

è stato approvato il *Green Deal* europeo che, con la strategia *Farm to Fork*, prevede la riduzione del 50% dell'utilizzo di fitofarmaci di origine chimica e di destinare almeno il 25% della superficie agricola europea all'agricoltura biologica. Riduzione che andrebbe ad aggiungersi a un processo virtuoso di eliminazione dal mercato delle molecole pericolose, già in atto in alcuni paesi come l'Italia da diversi anni. Il rovescio della medaglia di questa transizione prevede che gli agricoltori si trovino nel giro di poco tempo privati di mezzi tecnici fondamentali per continuare a garantire la redditività di alcune colture. Ad esempio, al centro dell'interesse di tutto il comparto vitivinicolo, in particolare quello biologico, c'è il problema della sostituzione del rame, molecola da sempre cardine della protezione antiperonosporica, ma che recentemente è stata soggetta a pesanti limitazioni. Infatti, oltre ad essere state inserite nella lista delle sostanze attive candidate alla sostituzione, il quantitativo di rame utilizzabile in agricoltura è stato ridotto a 28 kg/ha nell'arco di sette anni, che corrispondono ad una media di 4 kg/ha all'anno (REG. UE 1981/2018), per evitare le conseguenze negative dovute al ripetuto utilizzo di questo metallo pesante. Il rame, infatti, può avere effetti negativi nei confronti della salute umana, dell'ambiente, nonché della qualità del vino (García-Esparza *et al.,* 2006). Alla luce di queste problematiche, la comunità scientifica sta cercando di sviluppare alternative sostenibili a livello economico e ambientale sviluppando sostanze attive e formulati innovativi che necessitano di una valutazione a livello aziendale, in seguito a quella di laboratorio, per quanto riguarda la loro efficacia. In questa sperimentazione l'obiettivo principale è stato quello di valutare l'efficacia, su scala commerciale, di strategie di protezione innovative basate sull'uso di sostanze a basso o nullo impatto ambientale.

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti nella Prova 1 a Rosora, circa la capacità dei vari trattamenti di contenere la peronospora della vite, va precisato che la strategia chitosano e il testimone non trattato sono state valutate in condizioni sfavorevoli, poiché in questi filari non è stata condotta un'accurata gestione agronomica (non è stato né sfalciato l'interfila né diradata la vegetazione) e non sono stati effettuati trattamenti nei confronti di altre avversità, come l'oidio. Tuttavia, nonostante lo "*stress-test*" in condizioni estreme, il chitosano ha mostrato dei risultati promettenti, contenendo sia peronospora che oidio in maniera efficace rispetto al testimone non trattato, e in alcuni casi assicurando dei livelli di protezione non statisticamente dissimili dalla strategia aziendale, dove i filari sono stati gestiti in maniera ottimale sotto tutti i punti di vista. I risultati migliori, sia sulle

foglie che sui grappoli, sono stati riscontrati nella strategia alternato, che prevedeva l'utilizzo di composti a base di rame fino alla fase di fioritura e poi la somministrazione di chitosano. Questa strategia ha dimostrato di avere uguale o maggiore efficacia nei confronti di *P. viticola*, rispetto alla strategia aziendale a base di solo rame. Inoltre, la sospensione del rame dalla fioritura in poi è particolarmente apprezzata in cantina, poiché la presenza di rame sulle bacche porta alla contaminazione del mosto con scadimenti qualitativi (Garde-Cerdan *et al*., 2017). Le strategie che prevedevano l'utilizzo del chitosano hanno mostrato anche un effetto collaterale nel contenimento dell'oidio. Il chitosano da solo ha assicurato un certo livello di protezione rispetto alle piante non trattate, anche se con risultati meno soddisfacenti rispetto al contenimento della peronospora. L'alternato, invece, si è dimostrata anche in questo caso la strategia più efficace sia sulle foglie che sui grappoli, con valori dei parametri considerati uguali o inferiori all'aziendale, anche contro questa malattia. Si conferma l'efficacia dell'alternanza di chitosano e rame, già comprovata in altri lavori di tesi (Caproli, 2021). L'attività antimicrobica del chitosano unita alle capacità di stimolazione delle difese dell'ospite e di formazione di un biofilm sono state d'aiuto nel contrastare le infezioni di peronospora e oidio (Romanazzi *et al*., 2018). I risultati ottenuti suggeriscono un effetto sinergico tra il chitosano e il rame, sia per quanto riguarda la protezione dalla peronospora che dall'oidio. Infatti, anche se il rame non ha proprietà antioidiche, potrebbe avere un effetto indiretto nei confronti della malattia irrobustendo i tessuti trattati a causa della sua fitotossicità. Precedenti sperimentazioni hanno dimostrato una discreta efficacia del chitosano nel contenimento della peronospora della vite (Aziz et al., 2006; La Torre et al., 2010; Dagostin et al., 2011; Romanazzi *et al*., 2016, 2021), oltre alla capacità di controllare anche numerose patologie fungine pre e postraccolta su prodotti ortofrutticoli (Romanazzi et al., 2010; Rajestary et al., 2021), come ad esempio quelle causate da *B. cinerea* sull'uva da tavola (Romanazzi, 2002, 2012; Trotel-Aziz, 2006; Meng et al., 2008). La sua azione di contenimento della malattia potrebbe essere dovuta, oltre che alla attività antimicrobica, anche alla sua capacità di induzione di resistenza (ISR) nella pianta ospite, nonché alla sua comprovata attività antitraspirante, dovuta alla creazione di un sottile film sulle superfici vegetali trattate (Romanazzi *et al*., 2018).

Per quanto riguarda l'obiettivo della Prova 2 a Montecarotto, il contenimento di *B. cinerea*, e prendendo in esame i valori dell'indice di McKinney, si nota come le strategie cerevisane, laminarina e *M. fructicola* – 2T siano state efficaci in entrambi

i rilievi nel contenimento della malattia rispetto al testimone non trattato; le restanti strategie ad eccezione di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* 2 – 2T nel secondo rilievo, dove la pressione della malattia è risultata più elevata, hanno ridotto, di almeno il 60% l'indice di McKinney rispetto al testimone non trattato. Nelle condizioni operative della prova sperimentale, non sono emerse differenze significative riguardo all'efficacia di effettuare due trattamenti, uno nella fase di prechiusura grappolo e l'altro all'invaiatura, per tutte le sostanze attive saggiate, ad eccezione di *B. subtilis*, il quale con il secondo intervento è risultato più efficace rispetto all'intervento singolo. Questo risultato è pienamente in linea con gli obiettivi di sostenibilità ambientale ed economica, in quanto permetterebbe di ridurre gli interventi fungicidi e quindi diminuire l'impatto ambientale e avere un risparmio economico per l'agricoltore. Tutte le strategie saggiate hanno garantito anche un efficace contenimento di *Aspergillus* spp., in termini di intensità media ponderata dei sintomi ad esso associati. Inoltre, non sono emerse differenze nell'applicare una sola volta o due le sostanze attive in prova. Complessivamente, è possibile affermare che non è emersa la convenienza nell'applicare i prodotti due volte poiché l'efficacia non subisce variazioni rispetto alle strategie a singolo intervento. Inoltre, in questa prova non si è osservato alcun effetto collaterale nel contenimento della peronospora da parte delle diverse strategie. Il rilievo per questa malattia è stato effettuato prima del secondo trattamento all'invaiatura e quindi solo su sette strategie, per valutare l'efficacia delle singole sostanze attive. Non avendo osservato un controllo significativo della peronospora, è stato ritenuto superfluo procedere con ulteriori rilievi anche dopo il trattamento all'invaiatura. Precedenti sperimentazioni hanno dimostrato l'efficacia della laminarina nel contenimento di *B. cinerea* (Aziz *et al*., 2003) e la sua attività biostimolante (Khan *et al*., 2009). È stata studiata anche la capacità del cerevisane di contenere la muffa grigia della vite (Pujos *et al*., 2014), così come altri lavori riportano l'attività di biocontrollo per *M. fructicola* (Kurtzman e Droby, 2001) nel contenere malattie sia in campo che in post raccolta (Keren-Zur *et al*., 2002).

Durante i rilievi della Prova 2, oltre alla valutazione delle infezioni di *Botrytis* spp. sui grappoli in campo, sono stati rilevati diversi funghi patogeni come *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp, alcuni dei quali responsabili di marciumi secondari e in grado di produrre pericolose sostanze per l'uomo. In particolare, *Aspergillus* spp. si trova diffusamente nei vigneti (Arfaoui *et al*., 2019) e rappresenta una minaccia per la sua produzione di

micotossine che possiamo ritrovare nei vini (Somma *et al*., 2012). Per quanto riguarda *Alternaria* spp. e *Claudosporium* spp., rinvenuti generalmente in infezioni miste su bacche lesionate, è noto come facciano parte della riserva di funghi endofiti della vite e che possono influenzare la crescita, lo stato di salute e la produzione di uva (Knapp *et al*., 2021). Altre sperimentazioni hanno evidenziato come *Penicillium* spp. sia ubiquitario, nonché la causa di comuni malattie post raccolta dell'uva e altri vegetali (Jahani *et al*., 2020).

Nell'ottica della riduzione dei fungici per la protezione delle colture, risulta fondamentale una diagnosi rapida e precoce delle malattie prima del raggiungimento delle soglie di danno e con bassi livelli di infezione. In particolare, *Botrytis* spp. ha una elevata capacità di sporulazione fin dalle prime fasi di infezione, questo rende impossibile attendere la comparsa dei sintomi per evitare la diffusione del patogeno nell'intero vigneto. Il kit *Botrytis Alert* è risultato adatto al raggiungimento di tali obiettivi tramite diagnosi certe, rapide e senza la necessità di particolari competenze o costose attrezzature. In questa tesi è stato condotto un lavoro di validazione per definire la migliore diluizione da utilizzare in funzione al grado di infezione, così da poter individuare un attacco di *B. cinerea* anche quando i sintomi risultano essere poco o per niente visibili e quindi in modo da poter prevenire i danni da muffa grigia. Questo strumento può risultare utile anche nelle fasi successive la raccolta, per verificare in cantina la qualità del mosto di una determinata partita di uva e quindi destinarla all'appropriata linea di produzione in base alle sue caratteristiche enologiche. Con questo scopo è stata valutata un'eventuale corrispondenza tra i dati forniti dal kit e le analisi convenzionali sui mosti per il rilievo e la quantificazione di *Botrytis* spp. I valori del kit *Botrytis Alert* sono risultati correlati al livello di diffusione della malattia e quindi risulta essere uno strumento altamente specifico per *Botrytis* spp. Con questa certezza si è visto che il valore dell'acido glucanico non è risultato correlato alla presenza di *Botrytis* spp. e ai risultati ottenuti tramite il kit *Botrytis Alert*. Questo può essere dovuto alla scarsa precisione con cui è stato definito il livello di infezione delle partite d'uva all'ingresso in cantina o dal fatto che tale elemento non sia un componente strettamente specifico di *Botrytis* spp., ma possa essere proprio anche di altri fattori presenti nel mosto delle uve.

I risultati di questo lavoro di tesi mirano ad aumentare la sostenibilità ambientale, nonché la resilienza economica, delle aziende del settore vitivinicolo, che è il principale utilizzatore di fungicidi in agricoltura. Si è voluto dimostrare che prodotti

microbiologici e di origine naturale, che agiscono per antagonismo verso i parassiti o come elicitanti, possono essere efficaci anche a livello aziendale e non solo in prove parcellari. Inoltre, è stata confermata la validità del chitosano nella protezione della vite dalla peronospora e ciò lo rende uno dei principali candidati ad affiancare o a sostituire il rame nel prossimo futuro. La possibilità di sostituire o limitare fortemente gli apporti cuprici in vigneto, andando verso l'applicazione di prodotti ad impatto ambientale nullo, si fa quindi sempre più reale. Inoltre, viene messa in risalto la necessità di far agire in concerto più fasi della produzione, come la diagnosi e il controllo delle infezioni, per intervenire in maniera mirata, rapida ed efficace evitando sprechi, danni alle colture, inquinamento ambientale e spese superflue. È noto, infatti, che attraverso l'uso coordinato e razionale di tutti i fattori della produzione è possibile ridurre al minimo il ricorso a mezzi tecnici che hanno un impatto sull'ambiente o sulla salute dei consumatori, nonché aumentare la qualità delle produzioni agricole.

10. BIBLIOGRAFIA

Amborabé, B.E., Bonmort, J., Pierrette F.L., Roblin, G. (2008). Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 9, 2317-2324.

Arfaoui, M., Vallance, J., Bruez, E., Rezgui, A., Melki, I., Chebil, S., ..., Rey, P. (2019). Isolation, identification and in vitro characterization of grapevine rhizobacteria to control ochratoxigenic *Aspergillus* spp. on grapes. *Biological Control*, 129, 201-211.

Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bezier, A., Lambert,´ B., Joubert, J. M., Pugin, A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 1118−1128.

Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., Vernet, G. (2006). Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*, 96, 1188−1194.

Bacelli, I., Romanazzi, G., Sanzani, S. M. (2022). Induzione di resistenza e defense priming. In: Reverbieri, M., Ruocco, M., Covarelli, L., Sella, L. *Patologia vegetale molecolare,* Piccin, 520-537.

Belli, G. (2012). Elementi di Patologia vegetale.

Businelli, D., Massaccesi, L., Said-Pullicino, D., Gigliotti, G. (2009). Long-term distribution, mobility and plant availability of compost-derived heavy metals in a landfill covering soil. *Science of the Total Environment*, 407(4), 1426-1435.

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 in Scienze Agrarie e del Territorio, Università Politecnica delle Marche, Relatore Prof. Gianfranco Romanazzi].

Chen, X., Wang, Y., Gao, Y., Gao, T. e Zhang D. (2019). Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *The Plant Pathology Journal* 35, 425–436.

Crespan, M., Migliaro, D., Larger, S., Pindo, M., Palmisano, M., Manni, A., Camilli, G. (2021). Grapevine (*Vitis vinifera* L.) varietal assortment and evolution in the Marche region (central Italy). *OENO One*, 55, 4628.

Dagostin, S., Scharer, H. J., Pertot, I., Tamm, L. (2011). Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection*, 30, 776−788.

Duca, D., Toscano, G., Pizzi, A., Rossini, G., Fabrizi, S., Lucesoli, G., Mengarelli, C. (2016). Evaluation of the characteristics of vineyard pruning residues for energy applications: effect of different copper-based treatments. *Journal of Agricultural Engineering*, 47, 22-27.

Eder, J., Cosio, E.G. (1994). Elicitors of plant defense responses. In *International Review of Cytology*, 148, 1-36.

EFSA. (2007). Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 587, 1-16.

El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., Daayf, F. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8, 968-987.

Galli, V., Romboli, Y., Barbato, D., Mari, E., Venturi, M., Guerrini, S., Granchi, L. (2021). Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries. *Sustainability 2021*,13, 9389.

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 711-724.

García-Esparza, M. A., Capri, E., Pirzadeh, P., e 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, 7379-7386.

Gentili, M. (2022). Utilizzo degli agenti di biocontrollo nella lotta contro *Botrytis cinerea* su vite [Tesi di laurea triennale, Università degli Studi di Padova].

Haile, Z. M., Gebremichael, D. E., Capriotti, L., Molesini, B., Negrini, F., Collina, M., Baraldi, E. (2021). Double-stranded RNA targeting dicer-like genes compromises the pathogenicity of *Plasmopara viticola* on grapevine. *Frontiers in Plant Science*, 12.

Hewitt, H.G. (1998). *Fungicides in crop protection*. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Hinckley, E.L.S., Crawford, J.T., Fakhraei, H. (2020). A shift in sulfur-cycle manipulation from atmospheric emissions to agricultural additions. *Nature Geoscience*, 13, 597-604.

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

Jahani, M., Beheshti, M., Aminifard, M. H., Hosseini, A. (2020). Effects of essential oils to control *Penicillium* sp. in in vitro and in in vivo on grapevine (*Vitis vinifera* L.) fruit. *International Journal of Fruit Science*, 20, 812-826.

Keren-Zur, M., Lazare, M., Khusid, A., Bercovitz, A., Rebhun, M., Cohen, L., ..., Tezcan, H. (2002). Development and commercial testing of the yeast *Metschnikowia fructicola* for the control of pre and postharvest diseases. *IOBC WPRS Bulletin*, 25(10), 197-198.

Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 386−399.

Kiss L. (2003). A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science*, 59, 475-483.

Knapp, D. G., Lázár, A., Molnár, A., Vajna, B., Karácsony, Z., Váczy, K. Z., & Kovacs, G. M. (2021). Above-ground parts of white grapevine *Vitis vinifera* cv. Furmint share core members of the fungal microbiome. *Environmental Microbiology Reports*, *13*(4), 509-520.

Kurtzman, C. P., Droby, S. (2001). Metschnikowia fructicola, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology*, 24 (3) (2001), pp. 395-399

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

Li, Y., Zhang, Z., Jia, Y., Shen, Y., He, H., Fang, R., Chen, X., Hao, X. (2008) 3-acetonyl-3-hydroxyoxindole: a new inducer of systemic acquired resistance in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 6, 301-308.

Locci, R., (1969). *Marcatura di ife fungine mediante sostanze fluorescenti*.

Lorenz, D. H., Eichhorn, K. W., Bleiholder, H., Klose, R., Meier, U., Weber, E. (1994). Phänologische entwicklungsstadien der weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Codierung und beschreibung nach der erweiterten BBCH-skala. *Wein-Wissenschaft*, 49, 66-70.

Matta, A., Buonaurio, R., Favaron, F., Scala A., Scala, F. (2017). Fondamenti di patologia vegetale. Bologna, *Pàtron Editore.*

Meng, X., Li, B., Liu, J., Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 2, 501-508.

Mondelaers, K., Aertsens, J., Van Huylenbroeck, G., (2009). A meta-analysis of the differences in environmental impacts between organic and conventional farming. *British Food Journal*, 111, 1098-1119.

Ongena, M., Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16, 115–125.

Pertot, I., Gobbin, D., Dagostin, S., Ferrari, A., e Gessler, C. (2005). I fungicidi a base di rame. *La peronospora della vite*, 27-31.

Pertot, I., Dagostin, S., Ferrari, A., Gobbin, D., Prodorutti, D., Gessler, C., (2007). *La peronospora della vite*. Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Edizione 2, 1-78.

Pertot, I., Giovannini, O., Benanchi, M., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L. (2017). Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*, 97, 85–93.

Pujos P., Martin A., Farabullini F., Pizzi M. (2014). RomeoTM, cerevisane-based biofungicide against the main diseases of grape and of other crops: general description. *Atti, Giornate Fitopatologiche*, 2, 51-56.

Rajestary, R., Landi, L., Romanazzi, G. (2021). Chitosan and postharvest decay of fresh fruit: Meta-analysis of disease control and antimicrobial and eliciting activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1, 563-582.

Romanazzi, G., Nigro, E., Ippolito, A., Di Venere, D., Salerno, M. (2002). Effects of pre- and post-harvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grape. *Journal of Food Science*, 67, 1862-1867.

Romanazzi, G., Santini, M., Murolo, S., Masciulli, A., D'Ercole, G., Patrizio, F. (2010). Evaluation of the effectiveness of copper formulations used at reduced rates and of alternative compounds in the control of *Plasmopara viticola. Petria*, 20, 9-12.

Romanazzi, G., Murolo, S., Mancini, V., Feliziani, E. (2012). Valutazione dell'efficacia contro la peronospora della vite di molecole classiche e innovative. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 451-458.

Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., Landi, L. (2013). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 24-27.

Romanazzi, G., Mancini, V., Feliziani, E., Servili, A., Endeshaw, S., Neri, D. (2016). Impact of alternative fungicides on grape downy mildew control and vine growth and development. *Plant Disease*, 100, 739−748.

Romanazzi, G., Feliziani, E., Bautista Banos, S., Sivakumar, D. (2017). Shelf-life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 57, 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., 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.

Romanazzi, G., Moumni, M. (2022). Chitosan and other edible coatings to extend shelf life, manage postharvest decay, and reduce loss and waste of fresh fruits and vegetables. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102834.

Romanazzi, G., Orçonneau, Y., Moumni, M., Davillerd, Y., e Marchand, P. A. (2022). Basic substances, a sustainable tool to complement and eventually replace synthetic pesticides in the management of pre and postharvest diseases: Reviewed instructions for users. *Molecules*, 27(11), 3484.

Rotolo, C., De Miccolis Angelini, R. M., Dongiovanni, C., Pollastro, S., Fumarola, G., Di Carolo, M., Perrelli, D., Natale, P. e Faretra, F. (2018). Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards. *Pest Management Science*, 74, 715–725.

Sall, M., Wyrsinski, J. (1982). Perennation of powdery mildew in bud of grapevines. *Plant Disease*, 66, 678.

Samaras, A., Hadjipetrou, C., e Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* strain QST713 may contribute to the management of SDHI resistance in *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, *77*, 1316-1327.

Santomauro, A., Faretra, F., Tauro, G., Lospalluti, M., (1997). Miglioramenti nella protezione dell'uva da tavola dall'oidio. *Difesa delle Piante*, 20, 117-141.

Santomauro, A., Casulli, F., Gatto, M.A., Faretra, F., (2003). Powdery mildew control with natural compounds on cucurbits. *Informatore Fitopatologico*, 53, 36-43.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., e Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, 3, 430-439.

Silué, D., Pajot, E., Cohen, Y. (2002). Induction of resistance to downy mildew in cauliflower by DL-amino-*n*-butanoic acid. *Plant Pathology*, 51, 97-102.

Somma, S., Perrone, G., Logrieco, A. F. (2012). Diversity of black *Aspergini* and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 131-147.

Tasin, M., Sicher, C., Zeqiri, A., Simeone, V., Pertot, I. (2009). Double role of *Metschnikowia fructicola:* biocontrol agent of *Botrytis cinerea* and repellant to *Lobesia botrana*. *IOBC/WPRS Bulletin*, 43, 263-266.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 405−413.

Trouvelot, S., Varnier, A. L., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.-M., Pugin, A., Daire, X. (2008). A β-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 232-243.

Tuomisto, H. L., Hodge, I. D., Riordan, P., Macdonald, D. W. (2012). Does organic farming reduce environmental impacts? A meta-analysis of European research. *Journal of Environmental Management*, 112, 309–320.

Vallad, G. E., Goodman, R. M. (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44, 1920-1934.

Vannacci G., Bianco, P.A., Bonanomi, G., Brunelli, A., Gonthier, P., Lorito, M., Polizzi, G., Rossi, V., Sarocco, S., Scortichini, M. (2021). Patologia vegetale, *EdiSES Edizioni*, Napoli.

Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties, and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174.