



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI ED AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

**CHITOSANO, VARIETÀ RESISTENTI E APTAMERI COME
INNOVAZIONI NELLA PROTEZIONE DELLA VITE DALLA
PERONOSPORA**

***CHITOSAN, RESISTANT CULTIVARS AND APTAMERS AS
INNOVATIONS IN GRAPEVINE DOWNY MILDEW MANAGEMENT***

Studente:

MARCO SANTOLINI

Relatore:

PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

Correlatore:

DOTT. SIMONE PIANCATELLI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

INDICE

	Pag.
1 INTRODUZIONE	6
1.1 Cenni di viticoltura	6
1.2 Principali malattie crittogamiche della vite	6
2 LA PERONOSPORA DELLA VITE	7
2.1 Storia e classificazione	7
2.2 Sintomatologia	8
2.3 Ciclo biologico	14
<i>2.3.1 Infezioni primarie e secondarie</i>	16
2.4 Danni causati dal patogeno	17
3 PROTEZIONE DALLA PERONOSPORA DELLA VITE	18
3.1 Agricoltura integrata	21
3.2 Agricoltura biologica	23
4 MEZZI DI LOTTA CONTRO <i>PLASMOPARA VITICOLA</i>	25
4.1 Modelli previsionali	26
4.2 Mezzi agronomici	27
4.3 Mezzi genetici	28
<i>4.3.1 Meccanismi di difesa costitutivi</i>	30
<i>4.3.2 Meccanismi di difesa indotti</i>	31
4.4 Mezzi chimici	34
<i>4.4.1 Prodotti a base di rame</i>	35
<i>4.4.2 Prodotti organici di sintesi</i>	39
5 INNOVAZIONI NELLA PROTEZIONE DELLA VITE DALLA PERONOSPORA	42

5.1 Prodotti naturali alternativi	42
<i>5.1.1 Chitosano</i>	51
5.2 Varietà resistenti	55
5.3 Aptameri	58
6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	61
7 BIBLIOGRAFIA	66
8 SITOGRAFIA	73
9 RINGRAZIAMENTI	74

RIASSUNTO

Il lavoro di tesi si pone l'obiettivo di passare in rassegna le tecniche maggiormente utilizzate nella protezione della vite dalla peronospora, grave malattia causata dall'oomicete biotrofico *Plasmopara viticola* e di individuare le principali innovazioni in questo ambito. La peronospora della vite è una delle principali malattie della vite, in grado di causare gravi perdite economiche. Per contrastare le infezioni, ancora oggi, la difesa fitosanitaria si basa sull'applicazione massiccia di prodotti chimici, tra i quali i più importanti sono quelli a base di rame, soprattutto in agricoltura biologica. Questi prodotti hanno un'ottima efficacia nei confronti della peronospora, sono facilmente reperibili, hanno un basso costo, hanno un ampio spettro d'azione, sono di facile applicazione, hanno una bassa tossicità acuta e sono ben conosciuti dagli operatori agricoli. Tuttavia, l'utilizzo reiterato dei fungicidi cuprici può portare a rischi per la salute umana, l'ambiente e la qualità del prodotto finale perché il rame, essendo un metallo pesante, ha un profilo ecotossicologico non favorevole. In seguito all'individuazione di queste problematiche, sono state emesse delle limitazioni all'utilizzo di prodotti a base di rame in agricoltura, stimolando la ricerca di alternative e destando preoccupazione soprattutto tra gli agricoltori biologici, i quali vedono nel rame l'unica arma efficace nel contenere gli attacchi di *P. viticola*.

Alcune delle nuove strade aperte in questo contesto dalla ricerca vanno in tre direzioni: a) l'impiego di prodotti di origine naturale, come ad esempio il chitosano, che siano poco pericolosi per la salute umana e l'ambiente e dalla comprovata efficacia antimicrobica ed elicitante; b) lo sfruttamento della biodiversità genetica, cercando di produrre vitigni che possiedano geni di resistenza alle principali malattie e quindi gestibili da un punto di vista fitosanitario con un numero di interventi chimici minore durante l'anno; c) l'adozione di biotecnologie, come gli aptameri peptidici, in grado di colpire gli organismi bersaglio in maniera altamente specifica. Queste possibilità non rappresentano soluzioni univoche alle diverse situazioni, ma sicuramente potranno entrare a far parte dei programmi di protezione delle piante in un'ottica di produzione integrata e sostenibile.

ABSTRACT

The aim of this investigation is to review the techniques adopted in grapevine protection against downy mildew, an important disease caused by the biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* and to identify some of the main innovations in this field. Downy mildew is one of the main diseases of the grapevine worldwide and can cause serious economic losses. To contain these infections, even today, the protection is based on the massive application of chemical products, the most important of which are those based on copper, in particular in organic farming. These products show excellent effectiveness against downy mildew and present several positive characteristics, such as: common availability, low cost, broad spectrum of action, ease of use, low acute toxicity and finally, are well known among agricultural operators. However, the repeated use of copper fungicides can have negative consequences on human health, environment and quality of final product because copper, being a heavy metal, presents an unfavorable eco-toxicological profile. Following the identification of these issues, limitations have been placed on the use of copper-based products in agriculture, promoting the search of alternatives and causing concern especially among organic farmers, who see copper as the only effective weapon to prevent *P. viticola* attacks.

Some of the new strategies opened in this context by research mainly go in three directions:

(i) the use of products with natural-based active compounds, such as chitosan, which are not dangerous for human health or environment and with proven antimicrobial and eliciting properties; (ii) the exploitation of genetic biodiversity, through producing cultivars that possess genes of resistance against the causal agents of main diseases and therefore reducing the number of chemical treatments during the season; (iii) the adoption of peptide aptamers, that can interact with pathogenetic target-organisms in a highly specific way. These possibilities do not represent unique solutions to different situations and other research projects in this direction should be developed, but they will certainly be able to become part of plant protection programs in a viewpoint to integrated and sustainable food production.

1 INTRODUZIONE

1.1 Cenni di viticoltura

La vite è una pianta coltivata fin dall'antichità nei paesi del bacino del Mar Mediterraneo. In Italia, la viticoltura sarebbe giunta in Sicilia con i colonizzatori egeo-micenei e si sarebbe successivamente diffusa lungo le coste meridionali; alla diffusione nel centro e nel nord della penisola, avrebbero invece contribuito in massima parte gli Etruschi (Fregoni, 2005). La vite è coltivata in tutte le regioni italiane, dalla Valle d'Aosta alla Sicilia, in quanto, grazie alle numerose varietà ed ai relativi portainnesti, riesce ad adattarsi bene alle diverse situazioni di clima e terreno; tuttavia, negli ultimi decenni si è assistito ad una contrazione del comparto viticolo, per cui la superficie vitata nazionale è passata da 717.000 ha vitati nel 2000 a 632.000 ha vitati nel 2010 (Censimento agricoltura ISTAT, 2010). In aumento invece sono le superfici vitate condotte con sistemi di agricoltura biologica (Stoian e Caprita, 2019).

La vite europea (*Vitis vinifera*) appartiene al genere *Vitis*, famiglia *Vitaceae* o *Ampelidee*, ordine *Rhamnales*, sottoclasse *Archiclamidee*, classe Dicotiledoni ed è una delle piante coltivate più attaccate da parassiti fungini e animali (insetti, acari), per i quali diventano necessari svariati interventi chimici durante l'anno per poter assicurare una soddisfacente difesa fitosanitaria e quindi la redditività del vigneto; non è inoltre esente da attacchi di virus, micoplasmi e batteri.

1.2 Principali malattie crittogamiche della vite

Le malattie fungine che interessano la coltivazione della vite sono numerose e talvolta molto pericolose, perché possono azzerare la produzione o condurre a morte le piante. Ad ogni stagione vegetativa può esserci una prevalenza di una determinata malattia sulle altre in relazione all'andamento climatico, alla suscettibilità della cultivar e alle pratiche agronomiche effettuate. Nel corso del tempo sono aumentate le conoscenze riguardo agli agenti di malattia e si sono messe a punto strategie di lotta sempre più precise ed efficaci per contrastare lo sviluppo di questi patogeni. Tra le

malattie crittogamiche di maggiore interesse per la viticoltura troviamo oidio, muffa grigia, mal dell'esca e peronospora, oggetto di studio in questa tesi (Tabella 1).

Tabella 1 – Principali malattie crittogamiche che interessano la vite e relativi agenti causali.

Malattie fungine	Agente causale
Peronospora	<i>Plasmopara viticola</i>
Oidio	<i>Erysiphe necator</i>
Muffa grigia	<i>Botrytis cinerea</i>
Mal dell'esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> <i>Fomitipora mediterranea</i> <i>Phaeoacremonium ultimum</i>
Escoriosi	<i>Phomopsis viticola</i>
Verticillosi	<i>Verticillium dahliae</i>
Eutipiosi	<i>Eutypa lata</i>
Marciume nero	<i>Guignardia bidwelli</i>
Marciume radicale fibroso	<i>Armillarea mellea</i>
Marciume radicale lanoso	<i>Rosellina necatrix</i>

2 LA PERONOSPORA DELLA VITE

2.1 Storia e classificazione

La peronospora della vite rappresenta una delle più gravi malattie fungine della vite europea (*Vitis vinifera*). Questo patogeno è originario del Nord America ed è arrivato in Europa probabilmente con del materiale vivaistico importato in Francia per le attività di ibridazione successive all'avvento distruttivo della fillossera. L'anno della prima segnalazione nel vecchio continente è stato il 1878 in alcuni vivai della Francia (Belli, 2013), mentre l'anno successivo fu segnalato nel Nord Italia; nel giro di pochissimi anni la malattia si diffuse in tutto il continente ed in Turchia. La prima vera dimostrazione del suo potenziale distruttivo fu nel 1893, quando il 50% della produzione francese andò persa per un attacco epidemico; dall'inizio del secolo successivo, la malattia iniziò a manifestarsi in maniera regolare in funzione delle condizioni meteorologiche, causando danni

gravissimi ai vigneti e forti flessioni delle produzioni soprattutto nei paesi dell'Europa continentale, senza comunque risparmiare l'Italia.

La malattia è causata dall'oomicete biotrofico *Plasmopara viticola* (Gehmann, 1987), ed è una delle più gravi che colpiscono la vite nei climi relativamente caldi, con estati umide e piogge frequenti durante la tarda primavera e l'estate (Gessler *et al.*, 2011). *P. viticola* è un parassita obbligato appartenente all'ordine *Peronosporales*, il quale è composto da circa duemila specie, quasi tutte parassite di piante superiori; a questo ordine afferiscono tre famiglie molto importanti per la patologia vegetale: *Pythiaceae*, cui appartiene il genere *Phytophthora*; *Albuginaceae* e *Peronosporaceae*, comprendente, tra gli altri, anche *P. viticola*.

Il primo a descrivere la malattia e l'agente causale fu Farlow nel 1876, che lo chiamò *Peronospora viticola*; solo successivamente dal genere *Peronospora* è stato separato il genere *Plasmopara*. Molto più recente risulta invece la separazione degli oomiceti dal regno dei funghi, dai quali si differenziano per molti aspetti, tra i quali la parete cellulare composta da cellulosa e non da chitina, la presenza di nuclei diploidi e non aploidi o dicariotici e per la presenza di zoospore biflagellate. L'agente eziologico della peronospora della vite oggi è praticamente diffuso in tutto il mondo (Yin *et al.*, 2014).

2.2 Sintomatologia

La peronospora colpisce tutti gli organi erbacei della vite: foglie, germogli, infiorescenze ed infruttescenze. Il primo sintomo visibile dell'avvenuta infezione si nota sulle foglie con la comparsa di chiazze tondeggianti sulla pagina superiore, con colorazioni che vanno dal verde chiaro al giallastro. Con l'avanzare dell'incubazione e lo sviluppo del micelio, i tessuti vegetali infetti assumono un aspetto traslucido e questo sintomo prende il nome di "macchia d'olio" (Figura 2). In condizioni di elevata umidità, sulla pagina inferiore delle foglie, in corrispondenza delle macchie d'olio compaiono delle fruttificazioni agamiche (rami sporangiofori) che formano un tipico feltro biancastro facilmente riconoscibile (Figura 3). Con il progredire della malattia e l'avanzare della

stagione estiva, per il completamento del ciclo fungino, l'area colpita necrotizza e si può assistere alla caduta delle foglie: attacchi massicci di peronospora possono, infatti, determinare gravi filloptosi, fino ad arrivare alla perdita totale delle foglie nei casi più gravi. In condizioni ambientali particolarmente favorevoli alla malattia, sulle foglie si possono osservare sia la sporulazione, sia la necrosi senza la precedente formazione della macchia d'olio.



Figura 2 – Tipici sintomi “a macchia d’olio” presenti sulla pagina superiore di una foglia di vite, a seguito di un attacco di *P. viticola*.



Figura 3 – Sporulazione di *P. viticola* visibile sulla pagina inferiore di una foglia di vite in corrispondenza delle macchie d’olio.

Un altro quadro sintomatologico osservabile sulle foglie è quello che viene comunemente denominato a “mosaico”, tipico della stagione estiva, nel quale i sintomi si manifestano come piccole macchie clorotiche localizzate soprattutto vicino alle nervature e sparse su tutto il lembo. Anche in questo caso sulla pagina inferiore della foglia si notano piccoli ciuffi di micelio in corrispondenza della mosaicatura.

Sui grappoli gli attacchi di peronospora sono particolarmente gravi in quanto determinano una riduzione della produzione sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo. L’infezione precoce a carico dell’infiorescenza determina imbrunimento e ripiegamento ad uncino (o ad “esse”) della parte terminale del raspo (Figura 4). Similmente a quanto avviene sulle foglie, in caso di pioggia o elevata umidità, raspo e racimoli vengono ricoperti dalle fruttificazioni agamiche e biancastre del patogeno.



Figura 4 – Giovane grappolo affetto da peronospora in cui è possibile osservare il tipico ripiegamento ad uncino.

Gli attacchi di *P. viticola* sui grappoli in post-fioritura possono manifestare due diverse sindromi (marciume grigio e marciume bruno) in funzione dell'epoca d'attacco, dell'età dei grappoli e dell'umidità ambientale. Nei grappoli giovani la via di entrata del patogeno è rappresentata dagli stomi degli acini, dei raspi, dei racimoli e dal cercine calcinare. L'infezione del giovane grappolo determina allungamento e ripiegamento ad "esse" del rachide. In seguito, compare una muffa bianco-grigiastra che fuoriesce dagli stomi e dalle fessurazioni della buccia degli acini. Questa manifestazione (marciume grigio) è tipica delle infezioni primaverili (Figura 5). Non appena l'acino raggiunge un diametro di circa 2 mm, i suoi stomi atrofizzano e quindi l'acino può essere infettato solo per via indiretta attraverso il peduncolo; in questo caso la colonizzazione degli acini è possibile fino all'invaiaitura e si manifesta con una sintomatologia conosciuta come marciume bruno o "peronospora larvata" poiché non porta allo sviluppo di muffa sulla superficie esterna degli organi

colpiti (Figura 6): gli acini imbruniscono, perdono di turgore e avvizziscono fino al disseccamento. La peronospora larvata si manifesta solitamente nelle estati fresche e piovose, cioè in condizioni che consentono estesi attacchi tardivi.



Figura 5 – Marciume grigio, tipico sintomo delle infezioni primaverili di *P. viticola*, osservabile su un giovane grappolo affetto da peronospora.



Figura 6 – Marciume bruno o “peronospora larvata”, tipico sintomo delle infezioni estive di *P. viticola*, osservabile su un grappolo affetto da peronospora.

Gli altri organi verdi della pianta, come ad esempio i germogli o i giovani tralci, subiscono infezioni da *P. viticola* più raramente rispetto alle foglie ed ai grappoli. Tuttavia, quando vengono attaccati il primo sintomo che si evidenzia è una leggera clorosi, raramente seguita dalla tipica sporulazione dell'oomicete. L'infezione solitamente avviene in prossimità degli internodi oppure, in maniera indiretta, nei piccioli delle foglie (Figura 7). Il patogeno in entrambi i casi provoca un'infezione che raramente interessa l'intera circonferenza del tralcio e molto spesso invece resta confinata nei tessuti superficiali dell'organo colpito. Con il progredire della malattia i tralci tendono ad assumere un andamento contorto e presentano fenomeni di ipertrofia cellulare. È proprio questa ipertrofia che causa una differenza di sviluppo tra la parte sana e la parte infetta facendo assumere al tralcio una tipica “forma ad esse”. La parte infetta inoltre tende a necrotizzare. Sicuramente la fase di maggiore recettività di questi organi è durante la stagione vegetativa e in particolare quando sono in funzione gli stomi. 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.



Figura 7 – Sintomi di peronospora osservabili a carico di un germoglio in prossimità dell'internodo, a seguito di un attacco di *P. viticola*.

2.3 Ciclo biologico

Plasmopara viticola, essendo un parassita obbligato, ha bisogno dell'ospite per potersi sviluppare, per riprodursi e quindi per poter svolgere il proprio ciclo biologico (Figura 8), il quale si compone di due fasi (una asessuata ed una sessuata). La diffusione della malattia durante l'anno nel vigneto è legata alla ripetizione dei cicli asessuati che si perpetuano durante la stagione vegetativa in presenza di condizioni favorevoli, quindi con estati umide e temperate. Durante la fase asessuata e parassitaria, il patogeno forma un micelio cenocitico (privo di setti) nella foglia e dal micelio stesso vengono formati gli austori, strutture di forma sferica specializzate ad instaurare un rapporto biotrofico con i tessuti dell'ospite. Il completamento del ciclo biologico di *P. viticola* è successivamente garantito dalle oospore, strutture di svernamento che si formano a seguito della riproduzione sessuale e permettono al parassita di sopravvivere in assenza dei tessuti recettivi dell'ospite, durante la stagione avversa. La riproduzione sessuata avviene negli organi infetti dell'ospite tra la fine dell'estate e la fase di filloptosi, grazie ad anteridi e oogoni. Le oospore acquisiscono la capacità di germinare al termine di un periodo di maturazione che generalmente viene conseguito tra la fine di novembre e l'inizio di dicembre.

Le oospore mature, sopravvissute alla stagione sfavorevole, germinano in presenza di un'adeguata umidità del terreno e temperature al suolo intorno i 10-12°C, producendo un macrozoosporangio. La germinazione si può protrarre per alcuni mesi, anche se ha un picco in primavera. Particolare importanza assumono le precipitazioni di una certa intensità, perché, insieme al vento, riescono a disperdere le strutture del patogeno dal terreno sulla chioma delle piante, dando la possibilità alle zoospore di germinare nel velo d'acqua presente sulla superficie delle foglie della vite. Il macrozoosporangio, una volta giunto sulla superficie fogliare, rilascia le zoospore che danno origine all'infezione primaria. Principalmente, le condizioni che influenzano la riuscita delle infezioni primarie sono tre: la natura e la quantità dell'inoculo iniziale in termini di macrosporangi vitali; le condizioni ambientali, in particolare disponibilità di acqua e di temperature adeguate; infine, la presenza di organi recettivi nell'ospite; quest'ultima condizione prevede che le foglie siano

fotosinteticamente attive, dotate quindi di stomi aperti e disposte in maniera distesa per favorire la formazione di un velo d'acqua sulla pagina inferiore, in modo che le zoospore riescano a muoversi nel fluido e raggiungere i numerosi stomi presenti in questa regione della foglia.

Le zoospore penetrano attraverso le aperture stomatiche della pagina inferiore delle foglie all'interno della camera sottostomatica, come già verificato nel 1911 da Müller-Thurgau, e cominciano lo sviluppo del micelio che si ramifica velocemente e produce le strutture austoriali necessarie a sottrarre nutrienti alle cellule del mesofillo, senza però in genere determinarne la morte. Il rapporto parassitario instaurato, infatti, si basa essenzialmente su una continuità tra la membrana plasmatica delle cellule della pianta ospite e gli austori che assorbono le molecole necessarie allo sviluppo del patogeno. L'oomicete colonizza tutto lo spazio intercellulare grazie alle ife ramificate ed in 6-7 giorni, è in grado di produrre rami sporangiofori che fuoriescono dalle aperture stomatiche, portando all'apice zoosporangi limoniformi. Infatti, in seguito alla germinazione degli zoosporangi e quindi delle zoospore, si verificano le infezioni secondarie. In questo caso, la sporulazione del patogeno richiede un intervallo di temperatura maggiore rispetto all'infezione primaria, un'umidità relativa molto elevata e porta alla formazione di una muffa biancastra visibile sulla pagina inferiore delle foglie in corrispondenza delle classiche "macchie d'olio", osservabili invece sulla pagina superiore. A fine stagione, nelle foglie con "peronospora a mosaico", il patogeno si riproduce per via sessuata eterogamica; lo spermatozita feconda l'oosfera contenuta nell'oogonio che dunque si trasforma in oospora. Le oospore, poi, restano nelle foglie morte che cadono al suolo e durante l'inverno maturano se sottoposte a condizioni ambientali freddo-umide, mantenendo la loro vitalità per almeno due anni.

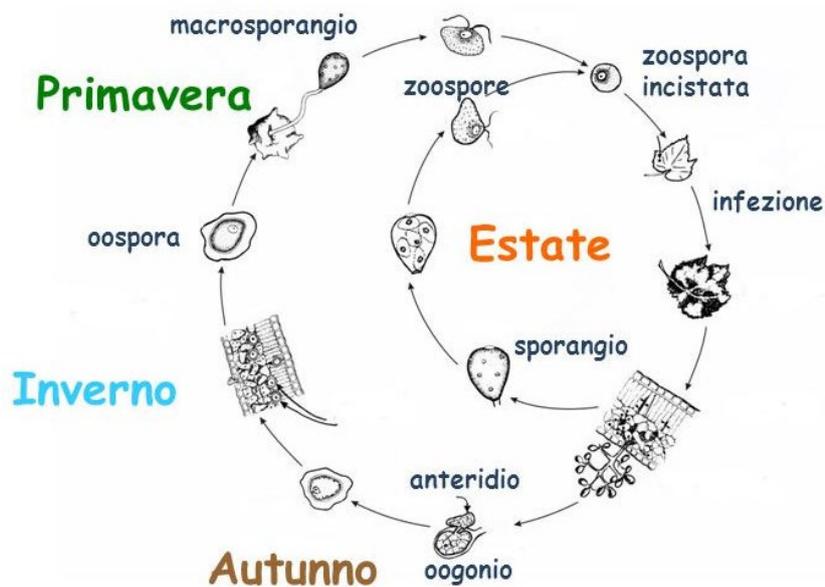


Figura 8 – Schematizzazione del ciclo biologico di *P. viticola* (Belli, 2007).

2.3.1 Infezioni primarie e secondarie

La differenza consistente che c'è tra i due tipi di infezione dipende dal fatto che le infezioni primarie sono causate dalle zoospore derivanti dal ciclo sessuale mentre le infezioni secondarie sono causate dagli sporangi, i quali derivano invece dal ciclo asessuale di *P. viticola*. Le condizioni necessarie per far sì che avvengano le infezioni primarie sono riassunte nella cosiddetta regola empirica “dei tre dieci” messa a punto da Baldacci nel 1947: essa prevede che la contaminazione dovuta all'inoculo prodotto dalle oospore svernanti avvenga quando la temperatura minima sia intorno ai 10° C, che sia caduta una pioggia di almeno 10 mm in due eventi piovosi nel giro di 24-48 ore e la lunghezza dei tralci sia di almeno 10 cm (Belli, 2013). Sono necessari non uno ma due eventi piovosi, perché la prima precipitazione determina la germinazione delle oospore, mentre la seconda provvede alla dispersione dell'inoculo. Quest'ultimo, formatosi a seguito della germinazione delle oospore, può dar luogo a più ondate successive di infezioni primarie nel caso in cui ci siano condizioni favorevoli, ossia prolungata umidità della vegetazione provocata da eventi piovosi ripetuti. Una volta avvenuta l'infezione primaria si va incontro ad un periodo di incubazione (lasso di tempo tra il

momento dell'infezione e la comparsa della macchia d'olio) che ha durata variabile dai 4 ai 15 giorni in relazione alle condizioni metereologiche. Alla fine del periodo di incubazione, in condizioni favorevoli, può avvenire la formazione degli sporangi. Questi sono i responsabili delle infezioni secondarie e si originano a seguito di almeno 4 ore di buio con temperatura compresa tra 13°C e 19°C (ottimale 18°C) e umidità relativa che si aggira intorno al 98%. In questo caso è sufficiente una bagnatura anche da rugiada di qualche ora (2-3 ore); la durata è in funzione della temperatura. Indice di Blaeser $h \times T = 50$ ($T < 25^\circ\text{C}$) mette in correlazione la durata della bagnatura degli organi recettivi della vite con la temperatura necessaria perché avvenga l'infezione secondaria. I rami sporangiofori, che si manifestano come muffa bianca sulla pagina inferiore delle foglie in corrispondenza delle macchie d'olio, producono i microsporangi che contengono le zoospore, le quali vengono disperse da acqua e aria. Sicuramente la dispersione con le precipitazioni è quella più efficace perché è in grado di liberare lo sporangio dal ramo sporangioforo e allo stesso tempo l'acqua fa da vettore e aiuta l'infezione nel nuovo organo della pianta. Anche il vento può effettuare queste azioni di distacco e trasporto ma l'intensità deve essere elevata e l'infezione risulta meno efficace in quanto viene a mancare l'umettazione sull'organo verde dell'ospite. In ogni caso le infezioni secondarie sono strettamente legate alla temperatura in quanto se si presentano valori inferiori a 5° C o superiori a 29° C si ha una perdita di vitalità degli sporangi e una riduzione drastica delle probabilità di infezione.

2.3 Danni causati dal patogeno

I danni causati dalle infezioni del patogeno sono molteplici e possono riguardare vari organi, in base alla fase fenologica ed al momento dell'infezione. Infatti, dato che il patogeno può attaccare solo i tessuti verdi della vite, ove sono presenti gli stomi, le conseguenze di infezioni gravi possono compromettere il metabolismo generale delle piante. Questa patologia determina un generale deperimento sanitario della pianta che diventa più suscettibile ad altre fitopatie e causa una riduzione delle riserve nutritive della pianta determinando una potenziale perdita di produzione anche nelle annate seguenti. La diminuzione dell'attività fotosintetica è ovviamente la conseguenza più evidente

della colonizzazione delle foglie e si ripercuote sia sulla nutrizione dei grappoli in accrescimento che sulle riserve negli organi legnosi e nelle radici. La malattia ha però anche effetti sulla fisiologia generale della pianta, ad esempio sugli scambi gassosi. Studi sulla regolazione stomatica hanno dimostrato che gli stomi dei tessuti infetti restano aperti anche al buio e durante stress idrici, aumentando molto i livelli di traspirazione (Pertot, 2007). Questo fenomeno, non sistemico, è stato collegato alla produzione, da parte del patogeno o dei tessuti colonizzati della vite, di una sostanza che agisce sulla regolazione stomatica alterandola o all'anormale livello di pressione delle cellule epidermiche. A carico delle infiorescenze le infezioni possono essere gravi e causare forti perdite nelle annate più umide; sui peduncoli e sui fiori compaiono macchie olivastre e successivamente un feltro miceliare biancastro. I danni diretti sui grappoli colpiti possono essere gravi nelle annate favorevoli allo sviluppo della malattia, anche quando le infezioni sono tardive. In conclusione, si può affermare che le conseguenze causate da un attacco peronosporico in qualsiasi organo della vite possano avere gravi risvolti e generare problematiche sia per la produzione dell'anno in corso che per le produzioni degli anni successivi e pertanto bisogna conoscere il patogeno e sviluppare strategie di difesa efficaci e rispettose dell'ambiente e della salute umana per contenerlo.

3 PROTEZIONE DALLA PERONOSPORA

Plasmopara viticola risulta essere ancora oggi di difficile controllo sia in agricoltura integrata che in agricoltura biologica e rappresenta una delle principali avversità della vite, in quanto in determinate condizioni può portare ad importanti perdite di produzione sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo. Per poter applicare misure razionali di contenimento di una data malattia occorre prima essere certi della diagnosi effettuata, conoscere le caratteristiche del patogeno in questione, le condizioni ambientali che lo favoriscono, le eventuali difese naturali della specie o della varietà presa in esame. Inoltre, qualsiasi sia la metodologia di lotta adottata, si deve sempre tener conto di due principi fondamentali:

-la salvaguardia della salute delle persone sia in termini di operatori che svolgono l'attività di difesa sia in termini di consumatori finali che richiedono un prodotto sano;

-il rispetto degli equilibri ecologici che in molti casi garantiscono un contenimento naturale di patogeni e fitofagi economicamente dannosi per l'attività agricola.

Proprio per la difesa delle cultivar tradizionali di vite vengono utilizzate annualmente circa 62.000 t di fungicidi, pari al 65% di tutti quelli impiegati in agricoltura, su un'area vitata che è pari al 3% della superficie agricola (EUROSTAT, 2007).

Da sempre, il rame rappresenta il principale prodotto chimico utilizzato per contrastare la peronospora. I prodotti a base di rame presentano numerosi aspetti positivi che ne hanno determinato il successo, tra cui: svolgono un'azione tossica multisito, in modo da evitare l'insorgenza di resistenze nei patogeni; sono definiti prodotti preventivi, cioè mirano a limitare il più possibile le infezioni scongiurando eventuali interventi curativi; hanno un basso costo; presentano elevata efficacia nel controllo della malattia ed una bassa tossicità per le piante; possono contribuire a irrobustire la cuticola fogliare o la buccia dei frutti e renderli così meno suscettibili a ferite e conseguenti attacchi di altri patogeni, come i marciumi dei frutti; hanno un ampio spettro d'azione e sono ben conosciuti dagli operatori agricoli. Tuttavia, sono emerse delle criticità legate alla natura intrinseca del rame: essendo un metallo pesante, esso tende ad accumularsi nelle catene trofiche e nel terreno, soprattutto negli strati più superficiali, interferendo negativamente con gli organismi che popolano il suolo. A causa dell'uso ripetuto nel tempo di prodotti contenenti rame, in molti terreni viticoli la concentrazione di rame ha raggiunto livelli elevati, soprattutto negli strati più superficiali (Deluisa *et al.*, 2007), dove viene trattenuto dalla sostanza organica e dai colloidali. In queste situazioni, a subire le maggiori conseguenze negative sono proprio gli organismi che vivono nel suolo, come ad esempio i lombrichi, come riportato da alcuni studi sul campo in cui sono stati mostrati chiari collegamenti tra l'aumento delle concentrazioni di rame nel suolo e la riduzione delle popolazioni di lombrichi (Paoletti *et al.*, 1998; Wightwick *et al.*, 2008). Inoltre, nonostante il rame sia classificato come un microelemento della nutrizione vegetale, alte concentrazioni possono portare a fitotossicità per le viti

stesse: ridotta crescita di giovani radici e germogli, possibili clorosi fogliari e riduzione della capacità di assorbimento di acqua e nutrienti (Dagostin *et al.*, 2011; Juang *et al.*, 2012; Miotto *et al.*, 2014). Altro aspetto di negatività, ma non meno importante, 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 (Provenzano *et al.*, 2010; Schut *et al.*, 2011; Garde-Cerdán *et al.*, 2017). Proprio a seguito di queste problematiche i prodotti rameici sono stati e sono tutt'ora oggetto di una continua evoluzione tecnologica, che ha permesso alle industrie agrofarmaceutiche di ottenere formulati rameici efficaci a dosi sempre più basse di rame e si sono sviluppate strategie di utilizzo a basso dosaggio di rame (Romanazzi *et al.*, 2010). Ciò è stato possibile attraverso formulazioni e granulometrie capaci di aumentare l'adesività e la persistenza del rame sugli organi trattati, ma anche di velocizzare la disponibilità degli ioni Cu^{++} . Considerando comunque i rischi legati all'impiego reiterato nel tempo di prodotti contenenti rame, il loro utilizzo in agricoltura è stato soggetto a diverse restrizioni nel corso degli anni, fino ad arrivare alla situazione attuale dove, dato che il rame soddisfa i criteri di tossicità e di bioaccumulo, è stato inserito nella lista dei prodotti candidati alla sostituzione, ovvero la lista dei prodotti che destano preoccupazioni per le loro caratteristiche intrinseche (La Torre *et al.*, 2018). In aggiunta, il periodo di approvazione per il rame è stato fissato a 7 anni e le quantità ammesse in agricoltura sono state limitate a 28 kg ad ettaro, cioè una media di 4 kg/ha per ogni anno tramite il regolamento Reg. (EU) 2018/1981; alcuni paesi dell'Unione Europea hanno già azzerato gli apporti rameici in agricoltura (La Torre *et al.*, 2018). Inoltre, sulla base dei rischi legati all'utilizzazione dei mezzi chimici nella protezione dei vegetali di interesse agronomico, nel maggio 2020, la Commissione europea ha presentato, contemporaneamente alla "strategia per la biodiversità", la strategia "Farm to Fork", la quale si compone di una serie di obiettivi da raggiungere entro il 2030, tra cui: ridurre del 50% l'uso dei pesticidi di sintesi chimica o pericolosi; ridurre le perdite di nutrienti di almeno il 50%, garantendo allo stesso tempo che non si verifichi un deterioramento della fertilità del suolo; in tal modo l'uso dei fertilizzanti sarà ridotto di almeno il 20%; ridurre del 50% le vendite di antimicrobici per gli animali da allevamento e per

l'acquacoltura; destinare almeno il 25% della superficie agricola all'agricoltura biologica. Tutto ciò riguarda anche i prodotti rameici, i quali vengono ampiamente utilizzati sia in agricoltura integrata sia in agricoltura biologica, dove però ancora oggi, rappresentano i soli in grado di garantire dei livelli di protezione accettabili da alcune malattie come la peronospora della vite.

3.1 Agricoltura integrata

In Italia, il Decreto Legislativo n. 150 del 14 agosto 2012, che recepisce la Direttiva 2009/128/CE, sancisce l'obbligo della difesa integrata per tutti gli utilizzatori professionali di prodotti fitosanitari e definisce la lotta integrata come *“l’attenta considerazione di tutti i metodi di protezione fitosanitaria disponibili e conseguente integrazione di misure appropriate intese a contenere lo sviluppo di popolazioni di organismi nocivi e che mantengono l’uso dei prodotti fitosanitari e altre forme d’intervento a livelli che siano giustificati in termini economici ed ecologici e che riducono o minimizzano i rischi per la salute umana e per l’ambiente. L’obiettivo prioritario della difesa integrata è la produzione di colture difese con metodi che perturbino il meno possibile gli ecosistemi agricoli e che promuovano i meccanismi naturali di controllo fitosanitario”* (articolo 3, Decreto Legislativo n. 150/2012). In sintesi, i concetti o criteri basilari della difesa integrata sono suddivisibili in otto punti salienti:

1. La prevenzione attraverso misure agronomiche;
2. Conoscenza e monitoraggio degli organismi nocivi;
3. Valutazione della necessità del trattamento e del momento dell'intervento;
4. Preferenza di metodi o prodotti non di sintesi chimica;
5. Criteri di scelta del prodotto fitosanitario;
6. Ottimizzazione delle quantità distribuite;
7. Gestione della resistenza;
8. Verifica dell'efficacia della strategia di difesa adottata.

Con questi criteri quindi si definisce l'obbligo di puntare verso sistemi agricoli sostenibili e a basso impatto ambientale. Questo tipo di concetto è sicuramente recente ed ha preso campo grazie ad una sempre maggiore sensibilità verso l'ambiente e grazie anche alla constatazione che le strategie di lotta messe in atto in passato presentavano molti punti critici. In particolare, era molto diffuso un approccio calendarizzato alla difesa fitosanitaria ed era pratica comune l'uso ripetuto ed esclusivo di mezzi chimici per il contenimento di organismi dannosi alle colture con conseguenze negative per l'ambiente, gli organismi non-target e la salute umana. In aggiunta, in questo contesto si sono sempre più diffusi fenomeni di resistenza ai vari principi attivi fra i patogeni stessi, con la necessità quindi di immettere continuamente nel mercato nuove sostanze attive. Inoltre, non di minore importanza, il continuo ricorso agli input chimici porta con sé problemi dal punto di vista degli eccessivi residui dei principi attivi sia nella produzione destinata all'uso alimentare sia nell'ambiente, provocando gravi danni agli ecosistemi naturali. Infine, va considerato che l'eccessivo impiego di mezzi chimici comporta un'esposizione maggiore degli operatori agricoli a rischi per la propria salute. Sulla base di questi concetti, la ricerca in questo campo ha come obiettivo quello di valutare le possibilità di applicazione di altre strategie di difesa fitosanitaria meno impattanti e pericolose, che in alcuni casi hanno già mostrato ottimi risultati dal punto di vista dell'efficacia e della sostenibilità ambientale, sanitaria o economica. Nella lotta integrata dunque sono coinvolti sia mezzi diretti che indiretti nei confronti delle avversità e in campo ci si può avvalere, in particolare, di mezzi agronomici, genetici, biotecnologici e biologici ad integrazione o sostituzione dei mezzi chimici. I mezzi agronomici riguardano gli interventi effettuati sia in fase di preimpianto sia con coltura in atto; spesso non sono risolutivi ma preventivi e possono disincentivare fortemente lo sviluppo dei patogeni, creando condizioni sfavorevoli o evitando l'instaurarsi di quelle favorevoli agli organismi dannosi, e di conseguenza ridurre il rischio di infezione. Strettamente legato alla ricerca è l'impiego di piante resistenti che può portare a un drastico calo degli interventi con prodotti chimici. I mezzi biologici invece sono riferiti all'utilizzo di organismi antagonisti dei patogeni. Infine, un altro pilastro della lotta integrata è l'impiego di materiale di propagazione sano che garantisce l'assenza di organismi

dannosi all'impianto. L'integrazione di tutte queste strategie ha lo scopo di contenere lo sviluppo delle malattie sotto determinate soglie di tolleranza, evitando trattamenti chimici superflui ed intervenendo con il mezzo chimico solo ed esclusivamente al superamento di una soglia economica di intervento o, per alcune malattie di più difficile gestione, in presenza di un rischio reale o molto probabile di infezione, con prodotti di elevata qualità dal punto di vista eco-tossicologico.

La difesa integrata, ormai resa obbligatoria a livello comunitario dal 2014, è stata successivamente affiancata dall'idea di produzione integrata: “un sistema di produzione agricola che produce cibo e altri prodotti di alta qualità utilizzando principalmente risorse e meccanismi di regolazione naturali al fine di sostituire gli input inquinanti e assicurare la sostenibilità dell'attività agricola” (Boller, 2004). L'adozione di strategie di difesa e di produzione integrata hanno evidenziato la necessità di individuare prodotti efficaci che possano andare a sostituire i fungicidi tradizionali, tra cui anche il rame utilizzato nella protezione antiperonosporica. Dunque, risulta molto importante la ricerca e la sperimentazione in campo fitosanitario, al fine di trovare degli anticrittogamici alternativi a quelli attualmente in uso nella lotta ai patogeni che possano essere utilizzati nel rispetto dell'ecosistema agroambientale.

3.2 Agricoltura biologica

La vite è una delle prime colture che ha interessato gli agricoltori biologici dell'area mediterranea. In Europa la produzione biologica è disciplinata dal regolamento CE n. 834/2007 e dal successivo regolamento d'esecuzione CE n. 889/2008. In questo sono riportati due principi fondamentali:

- *“la produzione biologica vegetale si basa sul principio che le piante debbano essere essenzialmente nutrite attraverso l'ecosistema del suolo”;*

- *“l'impiego di pesticidi che possono avere conseguenze nocive per l'ambiente o dare origine a residui nei prodotti agricoli deve essere fortemente limitato. È opportuno dare la preferenza all'applicazione di misure preventive nella lotta contro i parassiti, le malattie e le erbe infestanti”.* Con questi principi risultano chiari gli obiettivi dell'agricoltura biologica che non mira ad avere una produzione

quantitativamente importante, ma pone più l'attenzione negli aspetti che riguardano il contenuto di sostanza organica nel suolo, l'ecosistema in termini di biodiversità (spesso minacciata dallo sfruttamento intensivo delle superfici) e la limitazione quasi totale dei mezzi tecnici di sintesi a favore di pratiche agronomiche preventive, mezzi di origine naturale e sfruttamento dei meccanismi di autoregolazione degli ecosistemi per la difesa delle colture dalle avversità. È proprio in quest'ambito che assume un'importanza fondamentale il rapporto pianta-ambiente che può portare importanti vantaggi in caso di scelta oculata. Nonostante i buoni propositi, ci sono dei patogeni che risultano essere difficilmente controllabili con i mezzi di lotta diversi da quelli chimici e tra questi si può trovare proprio *P. viticola*, il quale in annate favorevoli richiede un elevato numero di interventi fitoiatrici. Attualmente in viticoltura biologica, a differenza di quella integrata, il rame è l'unico antiperonosporico ammesso per l'utilizzo e di accertata efficacia, nonché l'unica arma a disposizione degli agricoltori per contrastare la malattia, in quanto non sono presenti alternative chimiche da poter applicare (Dagostin e Pertot, 2007) e le altre pratiche adottabili in biologico non sono altrettanto efficaci. L'uso di prodotti rameici comunque è alla base anche della difesa antiperonosporica in agricoltura integrata perché, evitano l'insorgenza di resistenze nei patogeni, grazie alla loro azione tossica multisito. Tuttavia, come accennato in precedenza, non è da dimenticare che il rame, essendo un metallo pesante, può essere accumulato sia nei frutti, determinando un peggioramento qualitativo, sia nel terreno dove provoca un'inibizione dello sviluppo dei microrganismi giungendo talvolta a concentrazioni tossiche per la vite stessa. Pertanto, l'uso di rame in agricoltura biologica è stato limitato prima dal Regolamento dell'Unione Europea (UE) N° 473/2002 (Regolamento della Commissione Europea, 2002), e più recentemente dall'UE Regolamento 2018/1981. Questo nuovo Regolamento UE limita l'uso del rame per l'agricoltura nei paesi europei ad un quantitativo massimo di applicazione di 28 kg di rame / ha per un periodo di 7 anni (ovvero, una media di 4 kg di rame/ha/anno) e un periodo di rinnovo più breve, rispetto ai normali 15 anni; inoltre, alcuni paesi del vecchio continente, hanno già azzerato l'impiego del rame in agricoltura (La Torre *et al.*, 2018). Queste limitazioni mettono in grossa difficoltà soprattutto le aziende a conduzione biologica, dove

appunto il rame rappresenta ancora oggi l'unico mezzo di lotta in grado di proteggere la vite in maniera efficace dalla peronospora, assicurando un reddito ai viticoltori ogni anno.

4 MEZZI DI LOTTA CONTRO *PLASMOPARA VITICOLA*

Tutti i vitigni di *V. vinifera* sono suscettibili alla peronospora ed è impossibile ottenere una produzione quantitativamente e qualitativamente valida, da un punto di vista economico, senza ricorrere all'uso di mezzi di difesa attivi. Nella gestione di questa malattia è opportuno considerare preliminarmente il livello base di rischio peronosporico collegato alle caratteristiche pedologiche dell'area in cui si opera. La pericolosità del patogeno varia in base alle condizioni ambientali, infatti si presenta molto elevata nelle aree più umide, mentre bassa nelle aree più asciutte e con una differenziazione anche in rapporto con l'andamento climatico. Gli ambienti più soggetti agli attacchi sono quelli nelle aree di pianura delle regioni settentrionali, dove le precipitazioni sono in genere più abbondanti e hanno un effetto favorevole più marcato sul ciclo biologico del patogeno. Per una protezione efficace della vite dal patogeno, ancora oggi, si rende necessario ricorrere ai trattamenti chimici adottando una impostazione cautelativa-preventiva e laddove è possibile avere a disposizione un'ampia gamma di fungicidi con diverse caratteristiche, è opportuno adottare strategie di intervento anti-resistenza. La razionalizzazione degli interventi fitosanitari risulta difficoltosa, specialmente nella fase iniziale (difficoltà di previsione delle infezioni primarie). Questa difficoltà nella razionalizzazione della difesa è dovuta principalmente da tre motivi:

- 1- Elevata variabilità nell'epoca della comparsa delle infezioni primaverili (infezioni primarie);
- 2- Impossibilità di attendere la comparsa dei primi sintomi per l'inizio dei trattamenti;
- 3- Indicazioni non sempre attendibili da parte dei criteri di stima delle infezioni primarie (es. regola empirica dei 3 dieci).

4.1 Modelli previsionali

Nel corso degli anni, l'assistenza tecnica alle aziende agricole, ha subito profondi mutamenti avvalendosi della crescente professionalità dei tecnici del settore e dell'utilizzo di strumenti e supporti sempre più precisi. I modelli epidemiologici sono gli strumenti più moderni che si hanno attualmente a disposizione per razionalizzare gli interventi antiperonosporici in funzione del reale rischio infettivo. L'attività si concretizza nel fornire ai viticoltori, attraverso un puntuale sistema di avvertimento, indicazioni tempestive sulle linee di difesa da adottare, in relazione all'epoca d'intervento e ai prodotti fitosanitari più appropriati nelle varie situazioni. I modelli previsionali legati alle patologie fungine si basano su algoritmi che mettono in relazione i dati meteorologici (pioggia, temperatura, umidità relativa, bagnatura fogliare) con parametri di sviluppo dei funghi (es. maturazione, germinazione, dispersione delle oospore) per individuare il momento di avvio delle infezioni e la loro evasione sul tessuto vegetale. Molti di questi sono stati sviluppati per una migliore gestione dei trattamenti fungicidi, in particolare per il controllo delle infezioni primarie (Rossi *et al.*, 2007). Tra i principali modelli previsionali in uso per il monitoraggio di *P. viticola* troviamo sicuramente i modelli IPI e UCSC. Il modello IPI (Indice Potenziale Infettivo) fornisce indicazioni sulla prima pioggia potenzialmente infettante, in sostituzione della vecchia «regola dei tre dieci» mentre il modello UCSC (Downy Mildew Grape Primary Infection) offre un disegno di tutte le infezioni primarie che si verificano nel corso della stagione. Per fare questo, il modello UCSC utilizza dati orari di temperatura dell'aria, umidità relativa, pioggia e bagnatura fogliare per simulare dettagliatamente i processi infettivi. Il modello, di tipo meccanicistico, si basa sul concetto fondamentale secondo cui la popolazione di *P. viticola* all'interno di un vigneto è composta da diverse famiglie di oospore che, durante il periodo invernale, si trovano in fase di quiescenza. Queste famiglie devono superare un determinato e graduale periodo di latenza, dopo il quale iniziano a germinare. Il processo di simulazione della germinazione prende avvio a ogni evento piovoso in grado di bagnare la lettiera di foglie del vigneto. La simulazione può essere interrotta in ogni fase del processo infettivo, se le condizioni climatiche non sono favorevoli al patogeno, così come può completarsi sino alla

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

4.2 Mezzi agronomici

Le adeguate misure agronomiche sono necessarie per cercare di limitare preventivamente condizioni predisponenti a forti attacchi del patogeno, ma bisogna specificare che la loro adozione non è risolutiva a causa della suscettibilità che la vite presenta nei confronti di *P. viticola*. Sicuramente delle scelte agronomiche corrette contribuiscono al contenimento dei danni e costituiscono una premessa indispensabile per impostare una difesa integrata che sia il più efficace possibile contro il patogeno. Un fattore di centrale importanza è l'eventuale presenza di vigneti abbandonati che avvantaggiano

l'oomicete costituendo una notevole fonte di inoculo per gli impianti vicini. Pertanto, risulta indispensabile l'eliminazione di questi vigneti. Anche nella fase d'impianto bisogna considerare le caratteristiche dei diversi patogeni che colpiscono la vite e in particolare contro il patogeno *P. viticola* si devono evitare le zone di fondovalle e le zone dove in generale tendono a verificarsi frequenti ristagni idrici. Per quanto riguarda invece gli interventi da fare durante la vita produttiva del vigneto, questi riguardano soprattutto la gestione della chioma, perché è importante evitare di creare un microclima umido che favorirebbe il patogeno: ad esempio, gli interventi di potatura invernale o verde potrebbero essere diretti a favorire l'arieggiamento e l'illuminazione della vegetazione, soprattutto in prossimità della fascia produttiva; altri accorgimenti tecnici riguardano il mantenimento di un giusto carico di gemme durante la potatura invernale, effettuare una puntuale potatura verde per eliminare i germogli inutili e cimare quelli portanti i grappoli, effettuare una defogliazione che può essere più intensa nella parete del filare meno esposta alla luce del sole ed evitare ristagni di acqua con opportune lavorazioni del terreno. Altre pratiche agronomiche di importanza rilevante riguardano la corretta gestione dell'interfila, con l'eliminazione di eventuali malerbe troppo competitive e dei residui di potatura che possono fungere da fonte d'inoculo per la stagione successiva.

4.3 Mezzi genetici

Nel corso dell'evoluzione, le piante hanno sviluppato dei meccanismi di difesa dagli agenti di malattia, specifici o ad ampio spettro, che consentano di riconoscere a livello molecolare il patogeno e controllarne lo sviluppo dell'infezione. Nella norma lo sviluppo della malattia è un evento che si verifica allorché la pianta è infettata da un patogeno virulento, che non attiva o reprime le reazioni di resistenza della pianta o, ancora, riesce a eludere le difese attivate, che quindi falliscono nella loro missione. Di conseguenza, lo sviluppo di una particolare patologia dipende dal risultato dell'interazione di tre fattori chiave (triangolo della malattia): suscettibilità del particolare genotipo della pianta ospite, virulenza del particolare genotipo del patogeno, condizioni ambientali. In ultima analisi, il risultato dell'interazione pianta-patogeno (resistenza o suscettibilità) dipende da un bilancio

tra la capacità e la rapidità del patogeno nel sopprimere il “sistema immunitario” della pianta e la rapidità di quest’ultima nel percepire il patogeno e tradurre efficacemente questa percezione nell’attivazione delle risposte di difesa. Le piante posseggono a livello genetico due tipi principali di barriere nei confronti dei patogeni: meccanismi di difesa costitutivi ed indotti. Le resistenze costitutive sono già presenti nelle piante prima del contatto con il patogeno e sono riconducibili a fattori morfo-anatomici della foglia, del grappolo e dell’acino ed alla presenza di composti con attività antifungina preformati, come ad esempio composti fenolici (Gabler *et al.*, 2003). Nel caso di resistenza indotta l’attivazione di meccanismi di difesa può essere determinata dall’attacco del patogeno, quindi l’espressione della reazione di difesa è preceduta dal riconoscimento del patogeno da parte della pianta (Prell *et al.*, 2001).

Vitis vinifera, specie di origine eurasiatica non è coevoluta con *P. viticola* prima della fine del XIX secolo e non possiede basi genetiche di resistenza. All’interno del genere *Vitis* sono state osservate differenti interazioni ospite-patogeno che corrispondono a diverse strade evolutive (Jürges *et al.*, 2009) causate anche dalla coevoluzione di *P. viticola* nelle specie tolleranti nordamericane *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* e *Vitis californica*. In queste, ma anche nella specie di origine asiatica *Vitis amurensis*, l’inibizione dello sviluppo del patogeno è molto rapida e si verifica dopo l’incistamento delle zoospore. Nelle specie asiatiche non siberiane, *Vitis coignetiae*, *Vitis ficifolia*, *Vitis quinquangularis* e *Vitis Jacquemontii*, l’interazione con il patogeno non ha successo, quindi le zoospore non si incistano nei pressi degli stomi, lo sviluppo del micelio è aberrante e si formano solo ife in superficie che però non producono rami sporangiofori funzionali. Al contrario in entrambe le sottospecie di vite europea, *Vitis vinifera sativa* e *Vitis vinifera sylvestris*, la colonizzazione del mesofillo non incontra ostacoli. Queste osservazioni confermano che l’interazione ospite-patogeno è sotto il controllo di specifici segnali legati alla diversificazione dovuta all’evoluzione. Lo studio comparato dell’infezione e dello sviluppo del patogeno nei tessuti fogliari di *Vitis vinifera* e *Vitis rupestris*, ha evidenziato che nella seconda specie, resistente, la penetrazione avviene con gli stessi tempi riscontrati nella specie suscettibile (Unger *et al.*, 2007). Tuttavia, la crescita invasiva del

patogeno è dapprima più lenta, poi cessa prima che gli spazi intercellulari siano riempiti dal micelio, mentre dagli stomi è stata osservata la fuoriuscita di ife non ramificate e sterili che non producono sporangi.

4.3.1 Meccanismi di difesa costitutivi

Le interazioni pianta-patogeno iniziano quando gli organi di propagazione dell'agente causale vengono in contatto con la pianta. In questo caso alcune caratteristiche dei tessuti dell'ospite possono interferire con le modalità di contatto e penetrazione del patogeno. Le difese costitutive sono rappresentate da tutte quelle barriere fisiche o biochimiche presenti nella pianta indipendentemente dall'infezione e capaci di bloccare il processo di patogenesi nei primi stadi. Fondamentali sono le prime fasi del processo infettivo, quando i propaguli del patogeno arrivano sui tessuti della pianta ospite e devono aderire e penetrare superando le barriere fisiche o biochimiche che incontrano. Relativamente alla peronospora, poiché la penetrazione avviene per via stomatica nella pagina inferiore della foglia, molta attenzione è stata rivolta a comprendere il possibile ruolo dei tricomi presenti nel contrastare o meno il movimento delle zoospore che devono raggiungere l'apertura stomatica. In effetti i peli sulla superficie vegetale, specialmente nei tessuti giovani oltre a proteggere la pianta meccanicamente, da un'eccessiva traspirazione e dalla radiazione solare, possono limitare i danni causati dagli erbivori e in particolar modo dagli insetti. In alcuni casi è stato dimostrato che il feltro idrofobico costituito dai peli costituisce anche una strategia difensiva molto importante dagli attacchi fungini poiché l'infezione dipende sostanzialmente dalla bagnatura fogliare. Il feltro che copre la superficie abassiale delle foglie di alcune specie o varietà di vite è costituito da peli lunghi ed intricati che intrappolano facilmente l'aria e riducono la superficie di contatto tra l'acqua e la lamina fogliare. L'angolo di contatto delle gocce di acqua che giungono sulla superficie fogliare inferiore è determinante nel permettere o meno la bagnatura dei tessuti epidermici; nel caso di superfici molto tomentose, generalmente, le piccole gocce che si formano hanno un angolo di contatto maggiore che ostacola la bagnatura e facilita al contrario l'evaporazione dell'acqua, lasciando le spore

maggiormente esposte a disidratazione (Kortekamp e Zyprian, 1999; Kortekamp *et al.*, 1999). Le specie *Vitis doaniana* e *Vitis davidii*, mediamente tomentose, resistenti a *P. viticola*, se trattate con un detergente evidenziano livelli più elevati di infezione, e il patogeno a fine ciclo può normalmente sporulare. In particolare, in queste specie è stata osservata la capacità di peli e tricomi di catturare le gocce di acqua, impedendo la liberazione delle zoospore e causando la germinazione degli zoosporangi che producono direttamente le ife: questo fatto rende il fungo incapace di raggiungere la superficie fogliare a causa della distanza elevata. Il trattamento con sostanze bagnanti favorisce, al contrario, la normale produzione di zoospore da parte degli zoosporangi. In altre specie resistenti, come *Vitis cinerea* e *Vitis labrusca*, quest'ultima molto tomentosa, il blocco della crescita del patogeno è stato messo in relazione a meccanismi riferibili ad una risposta induttiva più che a fattori costitutivi come la elevata tomentosità (Kortekamp *et al.*, 1999). In definitiva quindi il ruolo dei tricomi nel limitare l'infezione non è ancora del tutto chiarito e una loro forte presenza non assicura automaticamente una bassa suscettibilità (Boso *et al.*, 2010). Anche il numero degli stomi presenti sulla superficie abassiale della foglia può giocare un ruolo importante nella fase di infezione, ma i dati ottenuti anche in questo caso non hanno dimostrato una correlazione positiva tra densità stomatica e suscettibilità al patogeno (Boso *et al.*, 2010).

4.3.2 Meccanismi di difesa indotti

Come accennato sopra, le risposte di difesa indotte sono attivate dalle cellule vegetali dopo il contatto con il patogeno. Possono essere classificate in base alla velocità con la quale si manifestano. La risposta di difesa precoce si basa sul riconoscimento da parte della cellula vegetale attaccata da segnali del patogeno: tali segnali attivano la traduzione a livello genico che porta ad una rapida morte cellulare. Tale risposta ipersensibile (Hypersensitive Response, HR), caratteristica anche delle interazioni patogeno-ospite incompatibili, determina un blocco della crescita e diffusione del patogeno che non può colonizzare i tessuti circostanti necrotizzati. La reazione ipersensibile è generalmente associata ad un solo gene dominante, è però razza-specifica e viene chiamata resistenza

verticale (Flor, 1971) che il patogeno può facilmente superare sviluppando geni di avirulenza. Sono state poi descritte reazioni di tipo sistemico (*Systemic Acquired Resistance*, SAR). In questo caso la risposta di difesa si basa su l'attivazione di una risposta genica localizzata e coinvolge cellule adiacenti a quella direttamente attaccata attraverso la produzione attiva di molecole che vanno a rinforzare le barriere strutturali, come la parete cellulare, o che inibiscono direttamente il patogeno. Risposte di difesa sistemica si basano anche sull'attivazione di geni che codificano per la produzione di proteine legate alla patogenesi (*Pathogenesis-Related Protein*, PR) come glucanasi e chitinasi che agiscono direttamente sul patogeno. Tra le risposte indotte dall'infezione del patogeno a livello istologico e biochimico, troviamo la produzione di callosio. Il callosio è un glucano non ramificato formato da β -1,3-D-glucosio presente nei tessuti floematici, nei peli radicali, nelle cellule epidermiche ed anche nei tessuti parenchimatici di diverse specie a seguito di infezioni fungine. Nella vite, in concomitanza di infezioni di *P. viticola*, la deposizione di callosio è stata rilevata solo dopo cinque giorni, quando ormai il patogeno aveva colonizzato i tessuti della pianta ospite e raggiunto la fase di sporulazione. Tale ritardo, anche nelle specie resistenti in cui lo sviluppo dell'oomicete è bloccato a 3-4 giorni dopo l'inoculazione, è spiegabile con altri meccanismi di difesa (Kortekamp *et al.*, 1997). Sempre nella vite, indagini relative alla deposizione di callosio a livello delle aperture stomatiche hanno, invece, dimostrato un ruolo determinante di questo polimero nella resistenza all'infezione fin dalle prime fasi (Gindro *et al.*, 2003). La produzione del glucano da parte degli stomi è in grado di bloccare la penetrazione delle zoospore nella camera sottostomatica: già 7 ore dopo l'infezione depositi di callosio inglobano le zoospore in germinazione e dopo 24 ore gli stomi infettati sono circondati da aree necrotiche, come avviene per la reazione ipersensibile. Gli stomi adiacenti a quelli infettati contengono depositi di callosio, ma non sono circondati da aree necrotiche. I segnali che determinano questa reazione negli stomi vicini per prevenire le infezioni secondarie sono sconosciuti, ma sono riferibili alla resistenza sistemica indotta (SAR). Dal momento che la penetrazione del patogeno è avvenuta, le difese induttive possono riguardare anche la produzione di molecole di difesa. Le piante, quali organismi viventi immobili, hanno sviluppato strategie di difesa

basate sulla produzione di sostanze che possono proteggerle da stress biotici ed abiotici, contrastando la diffusione di molecole estranee o lo sviluppo degli stessi patogeni. Tra queste sostanze di difesa vi sono i flavonoidi; l'accumulo di essi può essere anche indotto e correlato a stress abiotici, come i raggi UV, ma anche ai meccanismi di difesa attivati dall'ingresso dei patogeni. Inoltre, l'induzione di resistenza può essere una conseguenza della somministrazione di preparati di diversa natura (di sintesi o naturali) in grado di stimolare le naturali reazioni di autodifesa della pianta, attraverso due modalità: la SAR e l'ISR (*Induced Systemic Resistance*). La prima viene attivata sia a livello radicale che a livello aereo e sia da stress abiotici che biotici, il mediatore del segnale è l'acido salicilico che determina la produzione di proteine PR. La seconda è invece attivata a livello radicale da elicitori biotici, come ad esempio batteri ed in questo caso fungono da mediatori l'acido jasmonico e l'etilene. In ogni caso, l'effetto finale è comunque dato dall'induzione di resistenza sugli organi epigei, fondamentalmente attraverso la produzione di sostanze che ostacolano l'insediamento dei patogeni (fitoalessine, ecc.).

Studi istochimici comparativi hanno evidenziato le differenti risposte di tre specie del genere *Vitis* (Dai *et al.*, 1995). In *Vitis rotundifolia*, altamente resistente, le infezioni di peronospora sono state bloccate molto velocemente: è stata osservata la formazione di piccoli spot necrotici, assenza di sporulazione e soprattutto sono stati riscontrati alti livelli di flavonoidi nelle cellule stomatiche infette ed in quelle circostanti. Nella specie mediamente tollerante *V. rupestris*, invece sono state osservate necrosi e sporulazione limitata; in più sono stati rilevati sia resveratrolo che attività perossidasi, e successivamente accumulo di flavonoidi. Al contrario nella specie *V. vinifera* non sono state osservate necrosi, la sporulazione è stata abbondante e sono stati rilevati solo flavonoidi. I flavonoidi sembrano dunque avere un ruolo chiave nei meccanismi di resistenza del patogeno, ma la loro produzione è efficace nel bloccare l'infezione solo se molto rapida (Dai *et al.*, 1995).

4.4 Mezzi chimici

Il ricorso a prodotti fitosanitari dotati di attività antiperonosporica è reso necessario, ancora oggi, dalla inefficacia dei mezzi di lotta alternativi e dalla collocazione dei vigneti in zone dalle caratteristiche climatiche favorevoli al verificarsi di gravi epidemie (Belli, 2004). Il principio su cui si basa la difesa chimica è quello della prevenzione, che mira a limitare il più possibile le infezioni scongiurando l'utilizzo di trattamenti curativi. La lotta contro *P. viticola* può essere impostata secondo due criteri differenti: il primo considera il rischio di infezione sempre presente in vigneto e richiede quindi l'esecuzione dei trattamenti in funzione della presenza di tessuti recettivi alle infezioni (copertura continua); il secondo prevede che il processo infettivo si possa instaurare al verificarsi di determinati eventi climatici (lotta guidata). In entrambi i casi i trattamenti devono assicurare la copertura nell'intero periodo di sviluppo del patogeno, pertanto i trattamenti dovranno essere ripetuti ad intervalli che dipendono dalla persistenza del principio attivo utilizzato (Figura 9).

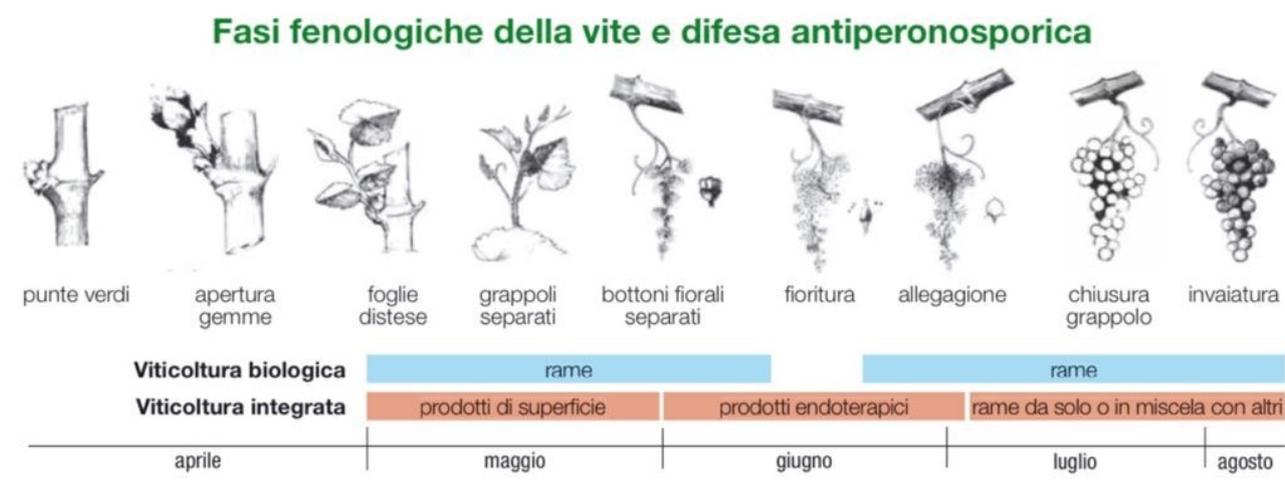


Figura 9 - Schema di una tipica impostazione della protezione antiperonosporica con mezzi chimici in relazione alle fasi fenologiche della vite, sia in agricoltura biologica che in agricoltura integrata (L'Informatore Agrario, 2017).

È di centrale importanza conoscere le caratteristiche degli agrofarmaci che vengono utilizzati, in particolare la classificazione principale che li divide in base allo spettro d'azione: i fungicidi di superficie rimangono all'esterno del vegetale e svolgono un'azione protettiva preventiva; i citotropici e translaminari vengono assorbiti dal vegetale e si ridistribuiscono localmente all'interno dei tessuti fino ad attraversare la lamina fogliare, mentre i sistemici entrano nei tessuti conduttori e possono essere traslocati a distanza notevole dal punto di applicazione raggiungendo i vari organi vegetali; in genere i prodotti penetranti tendono a bloccare le infezioni in atto, svolgendo un'azione curativa, ma sono più soggetti a promuovere fenomeni di resistenza nei patogeni e pertanto vanno impiegati con cautela.

Nella lotta alla peronospora della vite, la molecola più utilizzata nella storia della viticoltura è il rame, che fu introdotto pochi anni dopo la comparsa del patogeno in Europa e che ancora oggi resta un cardine della difesa antiperonosporica della vite sia in agricoltura integrata che in quella biologica (unico trattamento efficace e permesso). Tuttavia, a seguito di emanazioni legislative volte alla riduzione dell'impatto ambientale da parte di questo metallo pesante, il suo impiego in agricoltura nel territorio europeo è stato limitato e addirittura in un prossimo futuro potrebbe essere bandito.

4.4.1 Prodotti a base di rame

Per cercare di limitare i danni causati dalla peronospora, già in passato, si è ricorso all'utilizzo di prodotti chimici, in particolare a base di rame. Questi antiperonosporici hanno un meccanismo d'azione definito "multisito", ovvero sta a significare che agiscono su più funzioni vitali delle cellule non provocando problemi legati a fenomeni di resistenza che invece potrebbero insorgere in caso di prodotti "monosito", ovvero in grado di penetrare nella pianta agendo esclusivamente su un bersaglio specifico del metabolismo cellulare. Questi fungicidi presentano diverse caratteristiche positive, tra cui: basso costo, elevata efficacia nel controllo della malattia, ampio spettro d'azione e bassa tossicità per le piante (Miotto *et al.*, 2014; Speiser *et al.*, 2000). I prodotti a base di rame possono avere anche effetti di contenimento collaterali nei confronti di altri patogeni non bersaglio, sia fungini che batterici

e possono inoltre contribuire a irrobustire la cuticola fogliare o la buccia dei frutti rendendoli così meno suscettibili a ferite e conseguenti attacchi di altri patogeni, come i marciumi dei frutti. L'attività antifungina viene espletata dallo ione Cu^{++} , potente biocida in presenza di anidride carbonica atmosferica e/o emessa dalla pianta (Fontana, 1957). Lo ione si sostituisce ad alcuni cationi essenziali, come idrogeno, calcio e magnesio, formando dei chelati nella parete chitinoso di conidi, spore e micelio e provoca all'interno delle cellule fungine due tipi di azione:

- denaturazione delle proteine di membrana (alterazione della permeabilità);
- alterazione dei processi enzimatici (alterazione della respirazione e dell'attività ossido-riduttiva).

Tutto questo provoca innanzitutto un blocco della germinazione di spore e conidi, poi la morte delle cellule del parassita con un meccanismo conosciuto come "suicida".

L'efficacia di questi prodotti dipende dalla velocità con cui vengono liberati gli ioni rameici; la prontezza di azione varia quindi con il tipo di preparato, la formulazione e le caratteristiche chimico-fisiche. In particolare, risultano di fondamentale importanza le dimensioni e la struttura delle particelle: l'efficacia aumenta al diminuire delle dimensioni e al diminuire del numero di passaggi chimici che il rame subisce prima di rilasciare lo ione.

Esistono diversi preparati contenenti rame, solitamente formulati come sali o come complessi con altre molecole, che liberano il rame come ione Cu^{++} e migliorano l'assorbimento o l'aderenza alla pianta. Tra questi fungicidi contenenti rame si annoverano: solfato di rame, poltiglia bordolese, composti di rame con l'ossigeno, ossicloruro di rame, solfato tribasico di rame, idrossido di rame, cloruro di rame, cloruro rameoso, peptidato di rame, tallato di rame e gluconato di rame; i quali vengono descritti in dettaglio di seguito.

Il solfato di rame è commercializzato con il nome di vetriolo azzurro, è probabilmente il più importante tra i sali di rame e viene utilizzato in agricoltura come pesticida, germicida e come integratore di rame per il terreno. Si presenta sottoforma di cristalli blu; ha un pH acido compreso tra 3,7 e 4,5 ed è solubile in acqua. L'utilizzo del tal quale sulla vegetazione dimostra una scarsa aderenza

ed un rilascio repentino e abbondante di ioni Cu^{++} che causano un'elevata fitotossicità. Attualmente si trova in commercio in soluzioni che presentano una concentrazione dal 3 al 5%.

La poltiglia bordolese è un fungicida storico che in passato veniva solitamente preparato al momento dell'utilizzo a partire da solfato di rame, idrossido di calcio e acqua, mentre oggi viene commercializzato in formulazioni contenenti il 20-25% di rame metallo. Il problema principale è quello di riuscire ad ottenere una soluzione neutra, con l'ausilio delle cartine tornasole; se è troppo acida brucia le foglie e aderisce poco alla vegetazione, se è troppo basica permane a lungo sulla vegetazione, ma non possiede un'efficace azione anticrittogamica contro la peronospora. La poltiglia non dovrebbe essere eccessivamente acida in quanto essa rende solubile il metallo, causando problemi di fitotossicità (Deer e Beard, 2001). Le attuali poltiglie industriali sono chimicamente neutre ed hanno il pregio di persistere maggiormente sulla vegetazione rispetto alle altre formulazioni, ma hanno un rilascio di ioni rame molto lento.

I composti del rame con l'ossigeno: esistono due forme di composto del rame con l'ossigeno, chiamati rispettivamente ossido rameoso (Cu_2O) ed ossido rameico (CuO). Si presentano sotto forma di polvere amorfa e sono caratterizzati da elevato peso molecolare. Sono leggermente fitotossici per la pianta e l'adesività sulla vegetazione trattata è in funzione delle dimensioni delle particelle del prodotto stesso. La sospensione in acqua è fortemente limitata nel tempo a causa dell'elevato peso specifico che tende a far precipitare il prodotto. Per questi motivi in commercio si trovano dei granuli micronizzati che garantiscono maggiore solubilità e maggiore adesività sugli organi verdi. L'ossicloruro di rame si può presentare in due diverse combinazioni idrate di ossido rameico e cloruro. Rispetto al solfato di rame hanno 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 ($3\text{CuO} \cdot \text{CuCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e l'ossicloruro di rame e calcio (triramico) che è un complesso tra l'ossido rameico e il cloruro di calcio ($3\text{CuO} \cdot \text{CaCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Il triramico presenta un'azione più veloce del tetrarameico, ma meno persistente, a causa della molecola poco stabile. Essa possiede una maggiore sicurezza in quanto tende a rilasciare una minor quantità di rame sulla

vegetazione a parità di tempo d'impiego. Al contrario l'ossicloruro tetrarameico risulta essere più persistente e il rilascio di rame è quantitativamente maggiore al triramico ma la prontezza d'azione è più lenta.

Il solfato tribasico di rame è ottenuto neutralizzando il solfato di rame con idrossido di ammonio. La struttura molecolare che ne deriva permette di rendere subito disponibile parte del rame contenuto, mentre la parte residua si solubilizza più lentamente, garantendo una graduale liberazione degli ioni Cu^{++} . In questo modo si riesce a garantire una buona efficacia del prodotto e allo stesso tempo una riduzione della quantità di rame distribuita in linea con gli obiettivi richiesti nei manuali di produzione biologica e integrata.

L'idrossido di rame, rispetto ad altri sali rameici, ha la caratteristica di avere una migliore prontezza d'azione per la piccola dimensione delle sue particelle che assicurano una liberazione massiccia e istantanea di ioni Cu^{++} . È una caratteristica fondamentale che fa preferire questo prodotto in caso di trattamenti fitoterapici tempestivi. Altre caratteristiche da tenere in considerazione sono la fitotossicità e la persistenza, infatti l'idrossido di rame è meno fitotossico, ma allo stesso tempo meno persistente della poltiglia bordolese (Delaiti e Sandri, 2005). La persistenza dell'idrossido di rame risulta essere comunque maggiore rispetto agli altri sali presenti sul mercato. Inoltre, una caratteristica tipica di questo composto è la rimobilizzazione sulla vegetazione in caso di forte umidità ambientale.

Il cloruro di rame (CuCl_2) si presenta come una polvere giallo-marrone se anidro, e verde se diidrato. È solubile in acqua e in cloruro di ammonio.

Il cloruro rameoso (CuCl o Cu_2Cl_2) si presenta invece in cristalli tetraedrici di colore verde ed è insolubile in acqua. Viene utilizzato come fungicida e come agente trattante e preservante del legno.

Il peptidato di rame è un composto molto importante, perché si tratta di un prodotto complessato con aminoacidi ottenuti per idrolisi enzimatica. Questo processo permette di ottenere un agrofarmaco che risponde alle attuali necessità di riduzione delle percentuali di rame utilizzabile sulle piante e nel terreno (quantità pari al 5%). Ciò è possibile in quanto i peptidi sono molecole organiche che possono essere facilmente assorbiti e trasportati all'interno degli organi verdi sfruttando diversi

meccanismi di trasporto enzimatico e canali di natura proteica. In questo modo c'è un accumulo di rame a livello intercellulare che può portare problemi legati alla fitotossicità.

Il tallato di rame è un prodotto ottenuto dalla combinazione di resine e acidi grassi derivanti dal legno di pino, con l'idrossido di rame. Il risultato che si ottiene è l'aumento dell'adesività e della persistenza del fitofarmaco sulla vegetazione che permette di limitare l'apporto del metallo pesante sul vigneto e il numero di interventi durante la stagione vegetativa. Il meccanismo d'azione non è ancora del tutto chiarito, così come i reali rischi di fitotossicità che, però, sembrano meno evidenti rispetto al peptidato, se non in caso di sovradosaggio (Pertot *et al.*, 2005).

Il gluconato di rame è un nuovo formulato a bassa concentrazione di rame, ancora in fase di sperimentazione (8% Cu²⁺), registrato attualmente soltanto come fertilizzante fogliare. La sua azione nei confronti della peronospora si esplica a dosaggi di rame molto bassi. I risultati ottenuti con questo tipo di prodotto sono del tutto paragonabili a quelli del classico idrossido di rame, ma differenza di quest'ultimo consente di rispettare il limite legale di rame consentito dal regolamento europeo. Non ha evidenziato danni di fitotossicità né su foglia né su grappolo.

4.4.2 Prodotti organici di sintesi

Negli ultimi decenni la chimica ha messo a disposizione dei viticoltori prodotti organici di sintesi raggruppabili in due grandi gruppi: gli azoto-solforganici (ad esempio ditiocarbammati e chinoni) e gli azotorganici, suddivisi a loro volta in azotorganici aromatici-alifatici (ad esempio acetammidi, ammino-acido-ammino-carbammati e fenilammidi) ed azotorganici eterociclici (ad esempio benzimidazoli, fenilimmidi cicliche, fenilpirroli). Ad essi si aggiungono gli analoghi delle strobiruline ed i fosforganici. Un altro sistema di classificazione dei fungicidi di sintesi può essere la distinzione tra tradizionali di copertura e moderni (o di seconda generazione): i primi non sono in grado di penetrare i tessuti vegetali, quindi vengono impiegati preventivamente come una barriera velenosa per il patogeno ed hanno generalmente un ampio spettro d'azione; mentre i secondi, introdotti a partire dagli anni '60/'70, sono per la maggior parte in grado di penetrare i tessuti vegetali e possono

quindi bloccare le infezioni in atto, svolgendo un'azione curativa (generalmente colpiscono processi specifici del biochimismo cellulare e pertanto presentano rischi di insorgenza di resistenze più o meno elevate).

Per quanto riguarda i meccanismi d'azione, più nel dettaglio, soltanto i composti appartenenti agli azoto-solforganici svolgono attività multisito, mentre tutti gli altri sono dotati di attività uni od oligosito (Belli, 2013). Alcune di queste molecole di sintesi sono efficaci anche nel combattere lo sviluppo del patogeno dopo la sua penetrazione nei tessuti della pianta poiché translaminari o sistemiche, ma l'elevata specificità di molti principi attivi può causare l'insorgenza di resistenze nel patogeno. Tra i fungicidi a base di prodotti organici di sintesi più utilizzati contro la peronospora della vite sono: ditiocarbammati, fenilammidi, etilfosfiti, acetammidi, ammidi di acidi carbossilici e le strobilurine.

I ditiocarbammati sono agrofarmaci di superficie con meccanismo di azione multisito e presentano elevati livelli di protezione nei confronti degli oomiceti (tra cui *P. viticola*) e dei generi *Fusarium*, *Phomopsis*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Verticillium* e molti altri (Belli, 2013). La diffusione di questi prodotti però, è stata possibile proprio per l'azione che esso compie contro l'agente della peronospora. Inoltre, i ditiocarbammati presentano un vantaggio fondamentale rispetto al rame (tradizionalmente utilizzato come fungicida) in quanto non hanno dimostrato nessun effetto fitotossico in caso di applicazione su piante in crescita. Questo ha reso possibile estendere la difesa anche in quei periodi fenologici considerati delicati (fioritura e allegagione) senza avere nessun tipo di ripercussione negativa. Presentano però anche degli svantaggi, ovvero il soffocamento della chioma, l'assottigliamento della buccia dei frutti che diventano più sensibili, la produzione di prodotti di degradazione potenzialmente pericolosi e l'azione tossica nei confronti degli acari predatori favorendo dunque i fitofagi.

Le fenilammidi sono fungicidi unisito che hanno la capacità di penetrare subito all'interno della pianta evitando problemi di dilavamento. Essi si muovono in senso acropeto e la loro azione si manifesta nell'inibizione della sintesi proteica. Questo meccanismo d'azione permette lo sviluppo di

P. viticola fino alla formazione dei primi austori in quanto nelle zoospore sono presenti i ribosomi sufficienti per garantire movimento, germinazione e penetrazione. Tuttavia, dopo una prima fase di inefficacia, la mancanza di strutture proteiche per lo sviluppo del patogeno stesso risulta limitante e il processo si blocca.

Gli etilfosfiti sono composti specifici contro gli oomiceti, ma vengono utilizzati soprattutto contro quelli parassiti degli organi ipogei, in quanto possono essere traslocati dalla pianta alle radici ed oltre a svolgere un'azione tossica diretta, stimolano l'attivazione di meccanismi di difesa della pianta.

Tra le acetammidi, quella più diffusa è sicuramente Cymoxanil che è un fungicida citotropico e translaminare facilmente assorbibile dalla pianta. La sua azione interferisce negativamente sulla sintesi di proteine, di acidi nucleici e sulla respirazione. Questo prodotto è in grado di inibire la germinazione di zoospore e sporangi ed evitare lo sviluppo del micelio stesso.

Le ammidi degli acidi carbossilici sono fungicidi monosito che agiscono sulla cellulosa sintasi A, determinando la formazione di un poro sulla parete cellulare degli *Oomicota*. A questo gruppo appartengono diversi principi attivi che tuttavia si somigliano per l'azione tossica causata su parassiti fungini. Infatti, questi prodotti determinano l'impossibilità da parte dei patogeni di sintetizzare la parete.

Le strobiruline sono fungicidi monosito che inibiscono l'azione enzimatica di un citocromo collocato sulla catena respiratoria. Quello che ne consegue è un'inibizione della respirazione e della produzione di ATP. Hanno uno spettro d'azione molto ampio e sono gli unici fungicidi attivi contemporaneamente contro oidi, peronosspore e ruggini (Belli, 2013).

5 INNOVAZIONI NELLA PROTEZIONE DELLA VITE DALLA PERONOSPORA

A causa delle numerose problematiche che insorgono a seguito dell'utilizzo ripetuto del rame per il controllo antiperonosporico, negli ultimi anni sono emerse delle limitazioni legislative che mirano alla riduzione delle quantità distribuite di questo metallo pesante nell'ambiente agrario. Queste limitazioni hanno disorientato soprattutto le aziende viticole a conduzione biologica, in cui i prodotti a base di rame continuano ad essere i soli capaci di garantire una efficace protezione contro gli attacchi di *P. viticola*, agente eziologico della peronospora della vite e, nel contempo, ha stimolato sperimentazioni pluriennali di campo volte all'ottimizzazione degli apporti cuprici e alla ricerca di alternative nei principali areali della penisola vocati alla viticoltura (Bortolotti *et al.*, 2006; Egger e D'Arcangelo, 2006; Sancassani *et al.*, 2006; Dongiovanni *et al.*, 2008; Romanazzi *et al.*, 2014, 2016; Mancini *et al.*, 2018). La ricerca sta dunque mettendo a disposizione della comunità nuove conoscenze e sta promuovendo innovazioni nel campo della difesa fitosanitaria. Nel caso della peronospora della vite, le innovazioni fitoiatriche più promettenti al momento sembrano essere: l'impiego di prodotti naturali ad azione biocida ed elicitante, l'impiego di varietà resistenti o tolleranti e l'utilizzo di aptameri peptidici.

5.1 Prodotti naturali alternativi

I prodotti naturali alternativi, se efficaci contro *P. viticola*, possono aiutare a ridurre il quantitativo di rame utilizzato e quindi immesso nell'ambiente, ma molti di loro sono stati valutati solo sperimentalmente e non sono ancora facilmente reperibili in commercio. Questi composti, in genere, non hanno un'azione paragonabile a quella del rame e di altri fungicidi di sintesi, ma hanno mostrato interessanti qualità in termini di controllo nei confronti di *P. viticola*. Queste sostanze di origine naturale possono essere applicate da sole e/o in combinazione con formulati rameici e promuovono generalmente un rafforzamento fisico dei tessuti vegetali accompagnato anche in alcuni casi dalla stimolazione delle difese endogene delle piante che aumentano così la resistenza nei confronti dei parassiti. I principali composti naturali dove è stata riscontrata una certa attività fungicida o

fungistatica sono: il silicato di sodio, i fosfiti e fosfonati, l'acido salicilico, bicarbonato di sodio e potassio, microrganismi, estratto di semi di pompelmo, estratti microbici, humus di lombrico, le farine di roccia (algamonite), propoli, olio di Neem, estratto di equisetto, perossido d'idrogeno o acqua ossigenata, oli e laminarina.

Il silicato di sodio: i silicati si ottengono dalla fusione di SiO_2 (sabbia) e carbonato di sodio Na_2CO_3 . Il meccanismo d'azione del silicato di sodio sembrerebbe avere un duplice effetto, sia a livello fogliare, formando una pellicola inorganica dura in grado di ostacolare l'attività dei parassiti e limitando però la traspirazione, sia a livello fisiologico, tramite un meccanismo di traslocazione, interferendo con i normali processi vitali della pianta. I silicati sono compatibili con l'agricoltura biologica, in quanto il silicio viene continuamente rimosso dal terreno attraverso l'assorbimento da parte della pianta, e tramite la lisciviazione, nota come processo di desilicizzazione. Le condizioni per l'uso devono prevedere un'utilizzazione massima pari al 2 % in volume, diluito in acqua, di prodotto commerciale con una concentrazione del 30% di principio attivo. L'efficacia nei confronti della peronospora però è del tutto insoddisfacente.

Per quanto riguarda i fosfiti e fosfonati, il fosfonato monopotassico (KN_2PO_3) e il fosfito di potassio (K_2HPO_3) sono dei sali rispettivamente dell'acido fosforico (H_3PO_4) e dell'acido fosforoso (H_3PO_3). Sono entrambi solubili in acqua. Tali sali si presentano sotto forma di polvere bianca con un pH compreso tra 6,4 e 6,7. Se sottoposti ad ossidazione originano fosfato instabile. I fosfiti sono molto attivi nelle piante. Tali molecole essendo completamente solubili possono essere assorbite dalla pianta sia per via fogliare che radicale. Sembra che il meccanismo d'azione dei prodotti a base di questi sali sia diretto sul metabolismo amminoacidico, sulla composizione proteica, sulla riduzione del pool nucleotidico, e indiretto con lo stimolo alla produzione di sostanze di difesa nella pianta ospite (DuPont, 2000). Inoltre, tali principi attivi agiscono direttamente sul patogeno, inibendo la crescita del micelio, riducendo la sporulazione, modificando la struttura del micelio tramite alterazione del contenuto di acidi grassi liberi e degli aminoacidi delle cellule di parete. Oltre ad un'azione diretta, i fosfiti possiedono un'azione stimolante sulla vegetazione, in quanto sono

responsabili di fenomeni di resistenza sistemica indotta. Infatti, tali prodotti stimolano le autodifese della pianta, andando a potenziare il sistema immunitario endogeno attraverso la sintesi e traslocazione delle fitoalessine. Tali molecole, comprendenti principalmente terpeni e fenoli aromatici sono responsabili di fenomeni di rottura delle membrane cellulari del patogeno. I fosfonati e fosfiti sono stati registrati solo negli ultimi anni come agrofarmaci, e la forma attiva dell'acido fosforoso non differisce da quella del fungicida sistemico Phosetyl-Al, disponibile in commercio da decenni. Essendo dotati di azione translaminare, quindi garantendo un rapido assorbimento e un'ottima attività inibitoria sono considerati ottimi fungicidi. Sono facilmente degradabili, infatti si ionizzano in idrogeno e fosforo, quindi non si accumulano nel terreno o nell'acqua. Manifestano generalmente una bassa tossicità.

L'acido salicilico viene prodotto dalle piante in piccole quantità. La pianta si difende dalle infezioni dei parassiti grazie ad un meccanismo noto con il nome di Resistenza Sistemica Acquisita (SAR). Si attiva infatti un processo interno ai tessuti vegetali mediante la formazione di acido salicilico, che fungendo da elicitore, porta alla sintesi di proteine attive nel processo di riconoscimento del patogeno e con un conseguente potenziamento delle autodifese della pianta. Gli elicitori sono agenti biotici o abiotici in grado di indurre nella pianta la biosintesi di metaboliti secondari implicati nella risposta all'attacco patogeno. L'acido salicilico ($C_7H_6O_3$) è ritenuto essere un'alternativa al rame per combattere la peronospora e si può usare prima e durante la fioritura. L'efficacia però risulta soddisfacente solo in condizioni di bassa pressione della malattia ed inoltre si registrano residui indesiderati nel vino (Kast, 2000). Un analogo fotostabile dell'acido salicilico è il benzothiadiazolo (BTH), o acibenzolar-S-metile, disponibile in commercio come induttore di resistenza, non registrato su vite, mentre è risultato efficace su tabacco per la protezione antiperonosporica e su vite per il controllo del Legno nero (Romanazzi *et al.*, 2013).

Il bicarbonato di sodio e di potassio: il bicarbonato di sodio (Na_2CO_3) è una sostanza presente in natura, atossica, dotata di attività antimicrobica, invece il bicarbonato di potassio è ottenuto artificialmente a partire dall'idrossido di potassio (KOH). Sono utilizzati per il controllo biologico di

molti funghi patogeni delle piante. In ambito di agricoltura biologica, il loro utilizzo come fungicida è autorizzato dal regolamento CEE 889/2008. Il bicarbonato di sodio è stato inserito fra le sostanze di base ai fini del Reg. 1107/2009, con il Reg. 2069 del 2015. Tale composto è un prodotto commerciale, poco costoso e poco tossico, ma deve essere applicato alla pianta con l'aggiunta di un surfattante o di un detergente in modo da spargerlo uniformemente. L'azione del bicarbonato di potassio sembra dovuta al danneggiamento della membrana delle cellule delle spore e allo spostamento del pH della linfa a un valore di circa 6,4 incompatibile con la vita dei funghi. Questo innalzamento del pH è dovuto alla liberazione di ioni bicarbonato in soluzione. Ciò comporta un aumento della pressione osmotica della superficie fogliare che determina condizioni avverse allo sviluppo dei funghi. Inoltre, l'aumento del pH disattiva gli enzimi responsabili dell'espansione della parete e membrana cellulare delle spore fungine. Ha un meccanismo preventivo in grado di diminuire l'incidenza della malattia e anche dopo la sua comparsa, sembra avere una certa efficacia contro la peronospora. Il periodo e la dose di utilizzo sono molto importanti in quanto un alto livello di bicarbonato di sodio può provocare ustioni sulle foglie. Il suo utilizzo deve essere basato sul fatto che la concentrazione non deve superare lo 0,5 %, altrimenti si rischiano gravi fenomeni di tossicità. Un uso non corretto del prodotto porta al danneggiamento delle foglie e al suo accumulo nel terreno con conseguente alterazione del pH e rallentamento della crescita delle piante (Quarles, 2004).

I microrganismi, come alcuni funghi o batteri non dannosi per la pianta, possono venire usati per proteggerla dai patogeni che la infestano. Tali microrganismi permettono un biocontrollo del patogeno. L'antagonismo microbico si basa in generale su diversi meccanismi d'azione, che possono avvenire singolarmente o in contemporanea, quali: predazione, iperparassitismo antibiosi e competizione. La competizione si manifesta quando due organismi per il loro accrescimento concorrono allo sfruttamento di uno stesso substrato, sia che si parli di sostanze nutritive che di spazio o altre risorse. L'iperparassitismo è una forma di antagonismo nella quale un organismo vive a carico di un altro parassita, sfruttandone il ciclo biologico. Nell'antibiosi si ha la produzione di una o più sostanze tossiche (es. *Trichoderma* che produce sostanze quali la triclorodermina) che inibiscono o

provocano la morte di altri microrganismi. Nella predazione sono gli individui predatori che attaccano le prede, nutrendosi di esse. Inoltre, l'azione di alcuni agenti di biocontrollo si esplica direttamente sulla pianta, tramite l'induzione di uno stress che la porta ad un aumento delle difese. La possibilità di utilizzare funghi endofiti come antagonisti nei confronti dei patogeni della vite, e in particolare della peronospora, è confortata da recenti risultati, ottenuti in laboratorio, sulle interazioni tra l'agente patogeno, *P. viticola*, ed un endofita della vite, *Alternaria alternata* (Musetti *et al.*, 2006). Il fungo endofita si è rivelato un efficace antagonista contro il patogeno, in quanto ne provoca gravi alterazioni morfologiche e strutturali, compromettendone così la capacità di sporulazione. Dal brodo di coltura di *A. alternata* sono stati successivamente isolati e caratterizzati metaboliti secondari appartenenti alla famiglia delle dichetopiperazine, anch'essi in grado di inibire la sporulazione di *P. viticola* (Musetti *et al.*, 2007). Vi sono inoltre nuovi preparati che mettono insieme funghi micorrizici arbuscolari del genere *Glomus*, batteri della rizosfera come *Bacillus subtilis* e *Streptomyces* e funghi saprofiti come *Pichia pastoris*. Questa biocenosi, ossia un insieme di popolazioni di specie diverse che vivono in uno stesso ambiente naturale si caratterizza per la formazione di rapporti di interrelazione e interdipendenza, tra i quali simbiosi di tipo mutualistico. Questa forma di simbiosi garantisce a funghi, batteri, e radici vegetali di portare avanti il loro ciclo biologico, traendo benefici reciproci, dovuti alle strette relazioni che si sono formate. Infatti, batteri e funghi saprofiti svolgono un importante ruolo nel migliorare la filiera assimilativa e nel potenziare le difese naturali delle piante.

L'estratto di semi di pompelmo è a base di oli vegetali di pompelmo, che apportano il 2 % di vitamina C e bioflavonoidi, stimolando la crescita delle piante e la loro autodifesa. Le proprietà antimicrobiche e antiossidanti che caratterizzano l'estratto di semi di pompelmo lo rendono efficace contro batteri, virus e funghi fitopatogeni (*Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Verticillium* spp., *Botrytis* spp., *Bremia* spp., peronospora, ruggine, mal secco, ecc.). Può essere impiegato su ortaggi, fruttiferi (actinidia, agrumi, albicocco, pesco, susino, ciliegio, melo), vite, olivo, colture ornamentali, giardini, bulbi e radici, uova, carne, pesce, gamberi ecc. Quando applicato ripetutamente su vite, ha prodotto segni di fitotossicità (Mancini *et al.*, 2018).

Gli estratti microbici sono ottenuti a partire da microrganismi. Ci sono dei preparati come il K&A OOMISINE che combina l'azione degli elicitori biologici dell'estratto di *Saccharomyces* spp. con le carbosilamine, segnalatrici di difesa che, dopo essere state riconosciute dalle proteine presenti sulla membrana cellulare della pianta, attivano i meccanismi di difesa locali e sistemici. Gli estratti delle pareti dei saccaromiceti fungono da elicitori, infatti sono riconosciute dalle proteine recettrici della membrana cellulare della pianta, imitando il fenomeno di riconoscimento del patogeno da parte della pianta. Infatti, è noto come il patogeno dia inizio all'infezione a causa del suo mancato riconoscimento. Questi elicitori biologici permettono alla pianta di mettere in azione tutto il suo sistema di difesa, caratterizzato dalla produzione dei ROS (Radical Oxygen Species), cioè le specie reattive dell'ossigeno, come H₂O₂ e O₂, che sono tossiche per il fungo e allo stesso tempo attivano strutture di resistenza nelle pareti cellulari, e la produzione di fitoalessine. La combinazione di estratti di *Saccharomyces* spp. con laminarina ha fornito una buona protezione antiperonosporica (Romanazzi *et al.*, 2016; Mancini *et al.*, 2018; Romanazzi *et al.*, 2021) e non hanno influenzato la proporzione e la concentrazione di aminoacidi liberi nel mosto (Garde-Cerdán *et al.*, 2017), risultati fortemente ridotti dai trattamenti cuprici.

L'humus di lombrico è un prodotto di derivazione naturale conosciuto principalmente per la sua notevole attività fitostimolante e fitoregolatrice nei confronti del terreno e della flora microbica selezionata, agisce accentuando l'attività enzimatica nei terreni stanchi. Fra tutte le specie di lombrico esistenti al mondo, solo poche sono allevabili in cattività. Tra queste, la più gestibile è quella dei "Red worms of California". Hanno piccola taglia, sono di colore rosso, e hanno una vita di durata media superiore a 4 volte al lombrico comune. Il lombrico rosso di California si distingue dalle altre razze principalmente per la sua grande versatilità e duttilità. Il lombrico dovrà essere alimentato settimanalmente con gli scarti dell'orto, del giardino e della cucina lasciati precedentemente decomporre con il letame, possibilmente equino o avicolo. Questi rifiuti dovrebbero essere ridotti in poltiglia e mescolati in acqua. Questo processo è necessario in quanto la decomposizione degli scarti vegetali sprigiona dei gas di fermentazione che possono nuocere ai lombrichi. Gli scarti meno indicati

per alimentare i lombrichi sono le erbe di sfalcio, i grassi animali, i prodotti caseari, le spezie, la frutta acida, le varietà della specie *Allium* spp. e i lievitati. La prima raccolta di humus avviene dopo sei mesi dalla realizzazione della lettiera, spostando da un lato la parte superiore della lettiera, che contiene la maggior parte dei lombrichi, e togliendo la parte sottostante, rappresentante l'humus vero e proprio. Successivamente si provvede ad una sorta di stoccaggio, che consente una notevole diminuzione dell'umidità, seguita da un setacciamento con il quale si garantisce l'eliminazione di eventuali residui non decomposti. Il preparato di humus può essere arricchito dall'aggiunta di sostanze provenienti da essenze vegetali (equiseto, ortica, assenzio) attraverso la macerazione in acqua o impiegando estratti alcolici (tinture madri) diluiti in acqua a vari dosaggi secondo le necessità. L'impiego di humus di lombrico è ancora limitato, dovuto soprattutto alla sua scarsa reperibilità condizionata dal difficile e non ancora abbastanza diffuso sistema di produzione. Nonostante il suo scarso utilizzo è un prodotto ad altissimo valore biologico, i cui effetti benefici al terreno sono ampiamente comprovati. Applicato nella protezione antiperonosporica su vite, ha prodotto riduzioni della malattia non significative (Mancini *et al.*, 2018; Romanazzi *et al.*, 2021).

La farina di roccia: le caratteristiche di tali composti variano in funzione della composizione della roccia madre. I minerali più utilizzati sono: basalto, granito, bentonite, algamatolite del Brasile e dolomia. Il principale componente della farina di roccia è l'acido silicico, che arriva fino al 75 % nel basalto. In queste polveri si trovano sia macroelementi come calcio e magnesio che microelementi come ferro, rame e molibdeno. Si usa come protettivo, sia in campo, sia in serra. L'attività protettiva è dovuta ad un effetto fisico indiretto, legata alla riduzione del numero di ore di bagnatura della vegetazione. Inoltre, i minerali trattenuti dalla superficie fogliare creano una barriera sfavorevole all'aggressione dei fitofagi ed allo sviluppo delle larve e delle crittogame. Associato a silicato e zolfo costituisce un preparato di base dell'agricoltura biodinamica ed è particolarmente indicato nei trattamenti invernali (pasta per tronchi) e primaverili. Assieme a zolfo e solfato di rame rappresenta il mezzo più efficace nella prevenzione di crittogame e fitofagi: permette infatti lo sviluppo di un "ambiente acido" ma evita le bruciature dell'apparato fogliare anche in presenza di sovra-dosaggi dei

sali rameici e solfurei. Applicata assieme alla propoli, la polvere di roccia ha fornito una protezione antiperonosporica significativa, ma nettamente più bassa rispetto ai formulati cuprici, anche quando impiegati al 40% della dose di etichetta (Romanazzi *et al.*, 2008).

La propoli è un derivato dell'elaborazione, da parte delle api, di sostanze di natura resinosa, gommosa e cerosa presenti nei tessuti di una grande varietà di piante arboree tra cui il castagno, salice, ippocastano, pioppo, abete, quercia e frassino. Non si tratta di un mezzo di lotta efficace, infatti, presenta un'azione fitostimolante che favorisce l'attivazione delle difese endogene del vegetale attraverso composti di natura fenolica (flavoni, flavonoidi e flavononi) ma non ha alcun effetto diretto verso il parassita di natura fungina. L'impiego del propoli da solo è sconsigliato a causa della sua inefficacia, ma può essere interessante la distribuzione di una miscela contenente zolfo o sali di rame di cui potenzia l'azione e ne permette un uso in concentrazioni limitate (Donnaruma *et al.*, 1999). L'olio di Neem è un agrofarmaco botanico estratto dalla specie arborea *Azadirachta indica* che è una pianta di origine asiatica, appartenente alla famiglia delle *Meliaceae*. Ha effetti insetticidi e fungicidi in particolare verso specie crittogame come *P. viticola* e *Botrytis cinerea*. Ciò è possibile grazie ai limonoidi, molecole particolarmente attive dal punto di vista antimicrobico, e ai derivati dello zolfo presenti all'interno dell'olio stesso. Non si è dimostrato dannoso verso gli insetti utili. Per quanto riguarda l'equiseto, la pianta da cui viene estratto (*Equisetum arvense*) è una delle poche piante che necessitano di quantità molto elevate di silicio per la sopravvivenza. Questo fa sì che i suoi estratti siano ricchi in questo minerale (15-40 %). La sua azione fungicida è dovuta principalmente al silicio e può essere utilizzato come tale oppure in miscela con fungicidi a base di rame, zolfo o con prodotti a base di ortica.

Il perossido di idrogeno o acqua ossigenata (H_2O_2) viene menzionato come agente preventivo contro la peronospora. Esso possiede un'elevata biodegradabilità, poca fitotossicità ed è in grado di uccidere le spore dei funghi con un meccanismo di contatto, ma presenta una persistenza molto limitata. Per quanto riguarda gli oli, diverse sono le tipologie usate in agricoltura per il controllo degli insetti e funghi. Tra queste le più importanti sono: oli minerali, oli essenziali, vegetali e acidi grassi.

Gli oli probabilmente proteggono dagli attacchi fungini tramite un'azione idrorepellente che rende difficile l'apporto d'acqua al fungo e di conseguenza la sua crescita (Quarles, 2004). Uno dei prodotti formulati da questi oli è lo *Stylect-oil* (olio minerale) che può essere considerato un insetticida e un fungicida. La sua azione principale è quella di agente di protezione, mentre la sua azione fungicida è legata alla capacità di prevenire l'inoculazione e bloccare l'infezione inibendo la germinazione delle spore. Affinché si abbia un'efficacia tale prodotto deve essere adeguatamente distribuito sull'intera copertura fogliare, in modo da facilitare la sua azione di barriera fisica. Per questo viene applicato tramite l'uso di un ugello in grado di fornire una micronizzazione uniforme. Una spinta micronizzazione porta dei vantaggi legati all'uniformità di distribuzione rispetto a gocce di maggiori dimensioni e ad una maggiore efficacia, ma allo stesso tempo determina maggiori fenomeni di deriva. Questo può comportare, soprattutto in condizioni di elevata ventosità, importanti dispersioni di principio attivo che non raggiungono il target. La formazione di particelle piccolissime riduce la sua fitotossicità. La fitotossicità di questo prodotto si ha se esso viene usato ad una temperatura inferiore ai 10 °C o sopra i 32 °C, su piante in condizioni di stress. Uno dei problemi che quest'olio può dare è la rimozione della cera dagli acini. Questo sembra non modificare la qualità del vino, ma cambia l'estetica del grappolo (Ellis, 2003). Di recente è stato messo in commercio un prodotto a base di olio essenziale di arancio dolce, registrato per il controllo di peronospora e oidio della vite.

La laminarina, più esattamente denominata β -1,3-glucon 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). 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% quando somministrato prima dell'inoculazione e del 75% se applicato successivamente.

5.1.1 Chitosano

Il chitosano è un polimero policationico formato da D-glucosamina e N-acetil-D glucosammina che sono tenute insieme da legami glucosidici β 1-4. È una molecola naturale ottenuta dall'esoscheletro dei crostacei tramite processi di deacetilazione della chitina ed utilizzata in svariati ambiti: in farmacologia come medicinale (agente coagulante e nella fabbricazione dei cerotti), nel trattamento delle acque, in biotecnologia, nella produzione di alimenti e mangimi, in cosmetologia (prodotti per l'igiene dentale, per la cura dei capelli, prodotti per la cura della pelle) e in agricoltura (Ding *et al.*, 2013; Lei *et al.*, 2014).

Il chitosano è stato il primo composto naturale ad essere registrato nella lista delle sostanze di base approvate dall'Unione Europea per fini fitosanitari ai sensi del Regolamento Reg. UE 2014/563, sia per l'agricoltura biologica che per la lotta integrata. Grazie alla sua bassa tossicità, il chitosano è stato approvato come sostanza GRAS (*Generally Recognized As Safe*) negli Stati Uniti dalla USFDA (Hu *et al.*, 2019) e la sua applicazione è ritenuta dunque sicura per il consumatore e l'ambiente.

A testimonianza dell'interesse intorno al chitosano e della sua efficacia antimicrobica contro i funghi fitopatogeni, svariati autori hanno studiato sue applicazioni, con risultati positivi, nel post raccolta per la protezione di derrate alimentari facilmente deperibili, come ad esempio: su uva da tavola (Meng *et al.*, 2008), fragole (Romanazzi *et al.*, 2013), melograno (Varasteh *et al.*, 2012), ciliege (Petriccione *et al.*, 2015), papaya (Ali *et al.*, 2011), kiwi (Kaya *et al.*, 2016) e guava (Krishna e Rao, 2014).

Recentemente è stata pubblicata una rassegna completa sui dati disponibili in letteratura circa l'efficacia del chitosano, i suoi meccanismi d'azione, i suoi possibili impieghi nella conservazione di frutta e verdura sia da solo che in combinazione con altri trattamenti (Romanazzi *et al.*, 2017; Rajestary *et al.*, 2021). Il rivestimento di prodotti alimentari facilmente deperibili, come ad esempio frutta e verdura, con chitosano può essere una strada percorribile per contrastare le perdite post raccolta dovute all'attacco di organismi fungini fitopatogeni, in quanto è in grado, oltre a contrastare attivamente lo sviluppo di questi organismi, di formare una pellicola semipermeabile sulla superficie

di frutta e verdura, ritardando così la frequenza respiratoria, diminuendo la perdita di peso, mantenendo la qualità complessiva e prolungando la durata di conservazione. Inoltre, il rivestimento può fornire un substrato per l'incorporazione di altri additivi alimentari funzionali, come minerali, vitamine o altri farmaci o composti nutraceutici che possono essere utilizzati per migliorare le proprietà benefiche di prodotti freschi o, in alcuni casi, l'attività antimicrobica del chitosano. Tuttavia, le conoscenze intorno a questo biopolimero crescono sempre di più ed i rapidi progressi nella ricerca di base e applicativa in questo campo, richiedono aggiornamenti costanti, mirati e basati su sperimentazioni pluriennali (Romanazzi *et al.*, 2017; Rajestary *et al.*, 2021).

Il chitosano è inoltre uno degli elicitori più studiati per il controllo di *P. viticola* e altri funghi patogeni della vite come *B. cinerea* ed *Erysiphe necator* (Romanazzi *et al.*, 2002). Esso è noto da tempo per le sue proprietà quali biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività; ed è considerato una molecola con grandi potenzialità fitoiatriche perché, una volta applicato sulle superfici vegetali, è in grado di svolgere una triplice attività: filmogena, antimicrobica ed elicitante (Romanazzi *et al.*, 2018). L'azione filmogena consiste nella formazione di un film semipermeabile attorno ai tessuti vegetali che blocca l'infezione e lo sviluppo dei parassiti, ma che al contempo, a concentrazioni troppo elevate, può rappresentare un problema per la riduzione dell'evapotraspirazione a cui le cellule vegetali devono far fronte dopo un intervento di distribuzione del chitosano; l'azione antimicrobica diretta nei confronti dei patogeni è invece resa possibile dalle cariche elettriche positive del composto in questione che vanno ad interferire con la carica elettrica negativa tipica della superficie delle membrane cellulari di batteri e funghi, depolarizzandole e alterando la loro permeabilità cellulare; infine, il biopolimero è considerato un elicitore in quanto la sua struttura è chimicamente simile a quella delle pareti fungine in degradazione quindi, quando viene applicato su tessuti vegetali, simula la presenza del patogeno, stimolando l'attivazione dei meccanismi di difesa endogeni della pianta, come: l'induzione della sintesi di fitoalessine nelle cellule vegetali, la formazione di lignina, la produzione di inibitori della proteasi, variazioni del flusso ionico, l'acidificazione del citoplasma, la depolarizzazione della membrana, fosforilazione proteica, l'attivazione della chitinasi e della

glucanasi, la generazione di specie reattive dell'ossigeno, la formazione del callosio, la biosintesi dell'acido jasmonico e l'espressione di geni legati alla difesa (Amborabé *et al.*, 2008); nei tessuti vegetali viene stimolata anche la produzione di un'ampia gamma di sostanze (resveratrolo, piceatannolo, viniferine, ecc.), le quali svolgono naturalmente una funzione di difesa della pianta contro i microrganismi patogeni, in particolare fungini. Il chitosano può aumentare le difese delle piante e indurre la resistenza dell'ospite sia nei monocotiledoni che nei dicotiledoni. La capacità del chitosano di stimolare le difese dell'ospite viene studiata sin dagli anni novanta, a partire dal monitoraggio delle attività degli enzimi legati ai meccanismi di difesa (es. chitinasi) in diversi frutti (El Ghaouth *et al.*, 1992); ad oggi, importanti informazioni sull'espressione di un singolo gene o sull'espressione dell'intero genoma possono essere ottenute grazie alla maggiore conoscenza molecolare e strumenti come qRT-PCR e RNA-Seq (RNA-Sequencing) (Xoca-Orozco *et al.*, 2017), infatti l'indagine molecolare permette una buona comprensione delle molteplici azioni delle applicazioni di chitosano e del modo in cui influenzano i cambiamenti fisiologici nella frutta: ad esempio, l'applicazione del chitosano su fragole in momenti diversi prima della raccolta può influenzare il livello di espressione di migliaia di geni (Landi *et al.*, 2017). Inoltre, il chitosano può interferire con gli acidi nucleici microbici, inibendo la sintesi di mRNA e proteine (Devlieghere *et al.*, 2004).

Questo biopolimero, dopo essersi mostrato efficace nei confronti di organismi fungini *in vitro* e in prove di laboratorio post-raccolta (Romanazzi *et al.*, 2002; 2006; 2009; Rajestary *et al.*, 2021), è stato sperimentato in campo contro la peronospora della vite (Romanazzi *et al.*, 2014, 2016, 2021) ed infine più recentemente, grazie alla partecipazione al progetto *PSR Marche* “Vitinnova”, in contesti aziendali (Romanazzi *et al.*, 2021) in modo da valutarne con certezza la sua efficacia *in vivo* nelle condizioni ambientali e applicative dei vigneti commerciali. Nella sperimentazione, sono state testate diverse formulazioni a base di chitosano e altri composti naturali, applicati singolarmente (trattamenti individuali), alternati a prodotti convenzionali (generalmente con idrossido di rame) o combinati. Le prove sono state svolte in più vigneti commerciali naturalmente infettati, con varie cultivar di vite e

differenti condizioni ambientali ed è stato dimostrato che tra i composti naturali applicati come trattamenti individuali, una formulazione di chitosano allo 0,5% - 0,8% ha fornito la migliore protezione contro *P. viticola*, mentre gli altri composti naturali e le concentrazioni più basse sono risultate meno efficaci. Quando è stato affiancato al chitosano l'uso del rame, l'incidenza e la gravità della malattia sono state in genere ridotte, in particolare con l'applicazione di idrossido di rame in combinazione con una formulazione di chitosano allo 0,5% - 0,8%, piuttosto che con una miscela di laminarina e *Saccharomyces* spp. (Romanazzi *et al.*, 2016, 2021).

Come è emerso nelle varie sperimentazioni di campo, è necessario tenere sotto controllo alcuni parametri, quali la concentrazioni e i volumi di irrorazione, per permettere al biopolimero di esplicare al meglio la sua efficacia fitoiatrica: i prodotti a base di chitosano infatti hanno dato risultati soddisfacenti solo se applicati con volumi d'acqua sufficientemente alti e a concentrazioni più elevate, ad esempio con formulazioni superiori o uguali allo 0,5%, mentre spesso con concentrazioni inferiori allo 0,5%, esso non riesce a garantire una protezione efficiente.

Altri effetti determinati dal chitosano sulle piante possono riguardare la fisiologia vegetale: maggior potere germinativo ed emergenza precoce, riduzione dello stress idrico, aumento della biomassa prodotta in rapporto all'acqua consumata, miglior sviluppo delle radici, stabilizzazione della vita biologica delle piante, miglior vitalità e resa della pianta, quindi aumento del raccolto, aroma più intenso dei frutti, maggiore crescita vegetale e formazione di micorrize, aumenta infine la “*shelf life*” di prodotti ortofrutticoli freschi. Si può concludere che il chitosano è una molecola sicura e biodegradabile, rispettosa perciò dell'ambiente circostante, non presenta tossicità né verso l'uomo né verso le specie vegetali e, tra i vari prodotti naturali, attualmente rappresenta il candidato principale per affiancare e in qualche caso sostituire i prodotti rameici nelle strategie di protezione della vite dalla peronospora in agricoltura biologica ed integrata. Infine, va considerato il fatto che a differenza del rame, il chitosano non ha conseguenze negative sulle caratteristiche organolettiche del vino, come dimostrato da un panel di esperti a seguito di microvinificazioni condotte sulle uve provenienti dalle parcelle sperimentali del progetto Vitinnova e sembra non creare problemi in fase di vinificazione.

5.2 Varietà resistenti

Come afferma Sartori: “Un vitigno resistente è un vitigno ottenuto attraverso ibridazione. Si incrocia una varietà di *vinifera*, come può essere il Sangiovese o il Cabernet, con un vitigno che è nato a sua volta da ibridazione e che ha nel suo Dna dei geni che sono interessanti per l'agricoltore”. (Agronotizie, 2016 link: <https://agronotizie.imagelinenetwork.com/vivaismo-e-sementi/2016/05/04/vitigni-resistenti-peronospera-e-oidio-addio/48634>).

Il ricorso a ibridi rappresenta un passaggio obbligato, poiché *V. vinifera*, oltre ad essere suscettibile ad un elevato numero di patogeni, è una specie di origine eurasiatica che non è coevoluta con *P. viticola* prima della fine del XIX secolo e non possiede perciò basi genetiche di resistenza e richiede una frequente applicazione di antimicrobici chimici per evitare importanti perdite di resa e di qualità.

Nel lungo periodo il miglioramento genetico tradizionale per vitigni resistenti e tolleranti potrebbe portare risorse nuove per la riduzione dell'uso del rame grazie ad una minore sensibilità della pianta nei confronti del patogeno. I programmi di miglioramento genetico della vite per le resistenze sono processi lunghi che possono richiedere anche 20 anni. Oggi, la possibilità di assistere questo processo con analisi molecolari (MAS, *Marked Assisted Selection*) consente di velocizzare la selezione per la resistenza o qualità, utilizzando analisi molecolari precoci che accorciano sensibilmente i lunghi tempi necessari per la produzione/valutazione di vitigni commercialmente validi e portatori di geni di resistenza.

Le tecniche con cui effettuare questo tipo di trasferimento sono essenzialmente tre: l'incrocio tradizionale, la transgenesi (che vede l'inserimento nella pianta di un gene proveniente dal genoma di un'altra specie) e la cisgenesi (con la quale viene inserito un gene di un organismo della stessa specie). Strettamente legata a quest'ultima è poi il *genome editing*, tecnica che consente di effettuare interventi molto precisi con cui si sono ottenute alcune varietà resistenti a peronospora e oidio.

La creazione di vitigni resistenti avviene convenzionalmente seguendo vari step: innanzitutto si effettua un incrocio tra un individuo suscettibile (*V. vinifera*) e uno che presenta geni di resistenza

(ad esempio *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. californica*); da questo incrocio si ottengono numerose piante alcune delle quali sono resistenti. Successivamente, va effettuato un lavoro di screening per capire quali viti sono portatrici di geni resistenti e quali no, ma vanno anche selezionare quelle piante che diano dei risultati positivi anche dal punto di vista agronomico ed enologico. Il vitigno resistente deve avere un legame dal punto di vista enologico con il parentale, ovvero si devono tenere in considerazione quegli incroci che siano resistenti, ma che rispettino anche le caratteristiche tecniche, agronomiche, commerciali ed organolettiche della varietà di *V. vinifera* di partenza (Agronotizie, 2016). Una volta individuata la combinazione migliore, si effettuano una serie di reincroci (tecnica appunto nota con il nome di reincrocio) con il parentale di *V. vinifera* originario, in modo da “purificare” il più possibile il genoma dell’ibrido dai geni non desiderati del parentale resistente, cercando quindi di inserire solo le caratteristiche di resistenza in un genotipo già buono per altre caratteristiche. Come già accennato questo è un procedimento lungo e laborioso, ma l’ausilio delle tecniche di indagine molecolare permette di ridurre i tempi e di essere più precisi nella scelta degli individui da portare avanti; inoltre, in futuro, anche l’ingegneria genetica potrebbe giocare un ruolo chiave nella produzione di vitigni resistenti.

Con la formazione e l’immissione in commercio di queste varietà resistenti si andrà verso una riduzione dell’utilizzo di antimicrobici chimici, ma allo stesso tempo richiederà, per lo meno in Italia, la revisione della normativa sulla vinificazione, perché il ricorso ad incroci tra varietà resistenti e suscettibili porta alla produzione di vino da uve ibride e quindi non più aventi il genotipo puro del vitigno di partenza. Le limitazioni legislative, infatti, prevedono il divieto di coltivazione di ibridi resistenti che presentino meno del 95% di genoma della vite tradizionale, oltre al fatto che le uve derivanti da queste piante possono essere destinate solamente alla produzione di vini generici o IGT (dal 2014), secondo il corrente EU Reg. 1308/2013. Inoltre, nella Direttiva 2001/18/CE che regola l’immissione degli OGM nell’ambiente, viene definito OGM un organismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l’incrocio e/o la ricombinazione genica naturale.

L'ASSAM, dal 2015, nell'ambito di un progetto di ricerca relativo ai vitigni resistenti, sta valutando 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. La resistenza al momento è limitata alle due principali crittogame (peronospora e oidio) ed in un contesto monocolturale si rende necessario monitorare anche eventuali altre avversità fungine oltre a fitofagi e virosi: il grado di resistenza alle malattie è molto variabile e sono consigliati comunque interventi fitosanitari, seppur in numero sensibilmente minore; inoltre gli agenti di malattia, sottoposti a pressione di selezione, potrebbero sviluppare mutazioni in grado di superare la resistenza e diventare nuovamente dannose anche per queste varietà. In ogni caso con l'utilizzo di varietà di vite resistenti alle principali crittogame i viticoltori hanno l'opportunità di giocare d'anticipo sulla natura anziché rincorrere il problema e allo stesso tempo l'impiego di queste varietà resistenti va considerato come mezzo complementare e non sostitutivo dei mezzi di lotta antiparassitaria agronomici, chimici e biologici.

L'utilizzo delle varietà di vite resistenti potrebbero apportare nell'immediato i seguenti benefici alla sostenibilità ambientale, economica e sociale: significativa diminuzione delle applicazioni di prodotti fitosanitari, riduzione delle quantità di prodotti rameici in agricoltura biologica, minore compattazione del suolo, diversificazione delle produzioni e potenziale valore aggiunto sul mercato, minore consumo di combustibile fossile, coltivazione della vite in zone "sensibili" (abitazioni, scuole ecc.), coltivazione in condizioni difficili (es. terreni inaccessibili ai mezzi agricoli), maggiore sicurezza per l'operatore e per la salubrità delle produzioni, migliore preservazione del territorio e della sua immagine.

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.

In Italia i vitigni resistenti, iscritti al registro nazionale delle varietà di vite sono: il Bronner coltivabile in Veneto, Lombardia, Trento e Bolzano; il Cabernet Carbon coltivabile in Veneto e

Lombardia; il Cabernet Cortis coltivabile in Veneto, Lombardia e Bolzano; l'Helios coltivabile in Veneto, Lombardia e Trento; il Muscaris coltivabile in Veneto, Lombardia Trento e Bolzano; lo Johanniter coltivabile in Veneto, Lombardia, Trento, Bolzano ed Emilia Romagna; il Prior coltivabile in Veneto e Lombardia; il Regent coltivabile in Veneto e Bolzano; e il Solaris coltivabile in Veneto, Lombardia, Trento, Bolzano ed Emilia Romagna. Queste varietà sono ammesse alla vinificazione ma non sono tuttora utilizzabili per la produzione di vini a denominazione di origine.

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.

5.3 Aptameri

Gli aptameri sono molecole oligonucleotidiche o peptidiche che si legano a una specifica molecola bersaglio (Figura 10); vengono solitamente creati selezionandoli da un ampio pool di sequenze casuali.

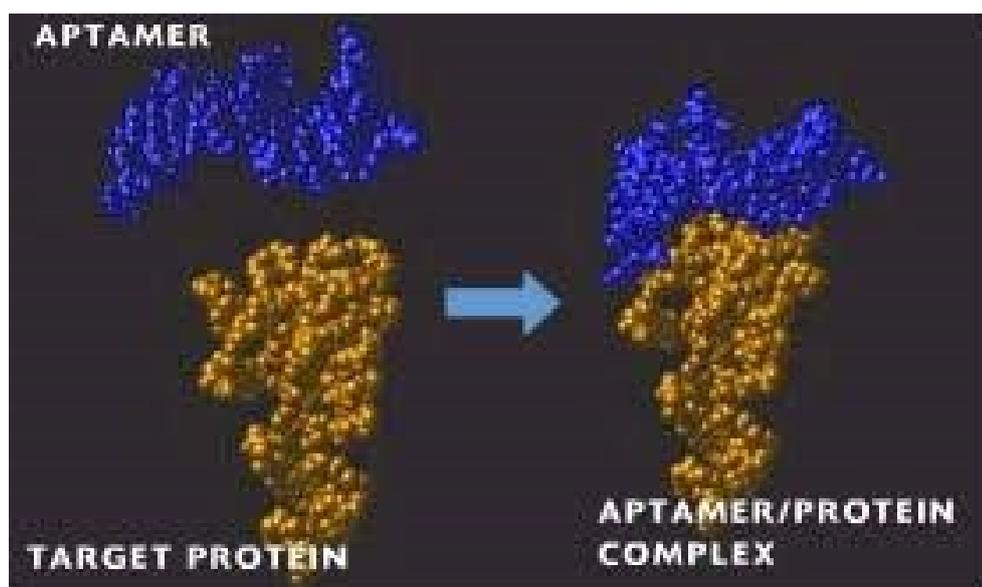


Figura 10 - Formazione del legame tra l'aptamero e la molecola bersaglio, che come si denota dalla figura è altamente specifica. (Bernardi, 2011 link: <http://m.docente.unife.it/francesco.bernardi/basi->

molecolari-di-malattia-materiale-didattico/2011/copy_of_basi-molecolari-di-malattia-materiale-didattico/Aptamers010.pdf).

Gli aptameri possono essere utilizzati sia per la ricerca di base che per scopi clinici come farmaci macromolecolari e possono essere combinati con i ribozimi, ed in grado di separarsi in presenza della loro molecola bersaglio. Queste molecole composte hanno diverse applicazioni di ricerca, come ad esempio industriali e cliniche.

Gli aptameri possono essere classificati come: aptameri di DNA o RNA o XNA, i quali sono costituiti da fili (solitamente corti) di oligonucleotidi; aptameri peptidici, costituiti da uno (o più) brevi domini peptidici variabili, attaccati ad entrambe le estremità a uno scaffold proteico.

Un approccio innovativo sia della medicina umana che della fitoiatria, consentito dallo sviluppo delle biotecnologie e della chimica verde, si indirizza verso una progettazione mirata dei principi attivi desiderati, i quali devono essere sempre più selettivi e specifici.

Negli ultimi anni, gli aptameri peptidici sono emersi come nuovi strumenti molecolari che hanno attirato l'attenzione di numerosi ricercatori interessati allo sviluppo di nuovi composti antimicrobici (Colombo, 2015; Xu, 2019), che presentino un minor impatto ambientale a differenza dei pesticidi convenzionali. Questi non sono altro che peptidi di piccole dimensioni (8-20 amminoacidi) in grado di legare, tracciare e inibire in modo specifico una determinata molecola bersaglio con elevata affinità, anche molecole con scarsa immunogenicità o elevata tossicità, e rappresentano una notevole alternativa agli anticorpi in svariati campi applicativi. Il loro utilizzo è in aumento, trainato principalmente dal settore medico e farmaceutico, seguito poi dal settore agricolo dove sono ancora in via di sperimentazione. Gli aptameri peptidici sono molecole estremamente semplici selezionate per legarsi in modo specifico a una data proteina bersaglio, in condizioni intracellulari (Nord *et al.*, 1995); possono quindi essere individuati e testati sulla base della loro affinità e specificità nei confronti delle proteine vitali per il patogeno. L'utilizzo di questa tecnologia consente perciò lo sviluppo di principi attivi che abbiano un alto livello di specificità e ridotti rischi

di insuccesso, dotati di una buona precisione nel colpire solo il bersaglio designato, e che minimizzano i possibili effetti indesiderati su organismi non target; inoltre, essa permette di selezionare aptameri peptidici che interagiscano con domini fondamentali per il funzionamento della proteina bersaglio, quali domini catalitici fortemente conservati presenti nei patogeni delle piante, in maniera tale da ritardare l'insorgenza di fenomeni di resistenza.

Nell'ambito del progetto di ricerca "GrAptaResistance", si è identificato un aptamero peptidico, chiamato *NoPv1* (No *P. viticola* 1), in grado di inibire la crescita di *P. viticola* su vite e dotato di ottime proprietà di attività, specificità e tossicità. *NoPv1* ha infatti dimostrato di essere altamente efficace a dosi molto basse, non essere citotossico per le cellule umane, non essere tossico per le foglie di vite ed essere innocuo su organismi non target, quali batteri del suolo (*Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus amyloliquefaciens*) (Colombo *et al.*, 2020). Questo risultato è stato ottenuto dalla selezione di una libreria di peptidi di 8 amminoacidi combinatori con l'obiettivo di identificare peptidi interagenti (Reverdatto, 2013), potenzialmente in grado di inibire l'enzima PvCesa2 (cellulosa sintasi 2 di *P. viticola*). In questo modo l'aptamero peptidico *NoPv1* previene la formazione del tubo germinale di *P. viticola* e l'infezione delle foglie di vite senza influire sulla crescita di organismi non bersaglio e senza essere tossico per le cellule umane. Inoltre, *NoPv1* è anche in grado di contrastare la crescita di *Phytophthora infestans*, l'agente eziologico della peronospora nella patata e nel pomodoro (Agrios, 2005), forse come conseguenza dell'elevata somiglianza della sequenza amminoacidica tra gli enzimi cellulosa sintasi di *P. viticola* e *P. infestans*.

La tecnologia degli aptameri peptidici è estremamente innovativa ed è in grado, in determinate condizioni, di offrire performance paragonabili ai fitofarmaci attualmente in commercio in termini di riduzione della malattia; inoltre, presentano però diversi aspetti positivi per quanto riguarda: l'ottima efficienza a dosi molto basse, l'assenza di fitotossicità nei confronti delle foglie di vite e la non pericolosità nei confronti dell'uomo, dell'ambiente e degli organismi non bersaglio (essendo estremamente specifico nei confronti degli oomiceti). Tuttavia, questa tecnologia ha dei costi di produzione più elevati rispetto i fitofarmaci attualmente in commercio, richiede ancora una convalida

sperimentale in condizioni di pieno campo e sarà necessario mettere a punto un sistema comodo ed efficace per la diffusione su larga scala commerciale. Visti i vantaggi in termini di sostenibilità (basso rischio) ed efficacia, se ne può valutare l'utilizzo, almeno in un primo momento, in sinergia con i fitofarmaci tradizionali, in alternanza al rame o ad agrofarmaci di sintesi durante la stagione vegetativa, oppure come prodotto unico nelle fasi prossime alla raccolta.

6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La vite è una coltura di grande importanza economica a livello mondiale che investe una superficie di circa 7.534,00 Mha (migliaia di ettari) (Buonassisi, 2017). Tuttavia, l'industria vitivinicola fa affidamento prevalentemente sulla specie *V. vinifera*, la quale è suscettibile ad un ampio spettro di agenti patogeni fungini e quindi richiede frequenti interventi fitoiatrici durante la stagione vegetativa con antimicrobici di natura chimica (Armijo, 2016).

Una delle principali malattie, è la peronospora della vite, causata dall'oomicete parassita obbligato *P. viticola* (Gessler, 2011), il quale in presenza di determinate condizioni favorevoli e in assenza di interventi volti a contenerne lo sviluppo può arrecare gravi danni alla produzione dell'anno e compromettere quella degli anni successivi.

La redditività dei vigneti è garantita, ancora oggi, dall'utilizzo massiccio di prodotti fitosanitari di natura chimica in grado di contrastare le infezioni da *P. viticola*, sia in regime di agricoltura biologica che in agricoltura integrata. La sostanza attiva principalmente utilizzata per contenere le infezioni di peronospora è il rame, pilastro della difesa fitosanitaria della vite da quando nel 1882 Pierre Millardet, un professore di botanica dell'Università di Bordeaux, si accorse che nel Médoc (regione della Francia sud-occidentale, nel dipartimento della Gironda), lungo le strade, le viti che erano state imbrattate con un miscuglio di rame e calce per scoraggiare i ladruncoli di bacche, 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. Dal 1° aprile del 1885 la poltiglia bordolese, cioè il solfato di rame neutralizzato con la calce, fece il suo ingresso ufficiale nella fitoiatria internazionale. Nel 1887 una Commissione istituita dal nostro governo stabilì che la poltiglia bordolese, e di conseguenza il rame, era un ottimo rimedio per prevenire alcune malattie causate da funghi. Oggi, dopo circa 130 anni le proprietà fitoiatriche del rame e dei suoi derivati non sono ancora state messe in discussione ed è tuttora considerato un cardine della difesa antiperonosporica sia in agricoltura biologica che in agricoltura integrata. I prodotti a base di rame svolgono un'azione preventiva non curativa e non sono in grado di penetrare i tessuti vegetali, pertanto l'approccio alla protezione della vite dalla peronospora è di tipo preventivo-cautelativo e prevede un elevato numero di interventi durante l'anno, proprio per garantire una copertura efficace durante le fasi di maggiore suscettibilità al patogeno.

Il rame è un metallo pesante, quindi un suo utilizzo ripetuto e massiccio, oltre ad essere pericoloso per la salute umana e a danneggiare la qualità dei vini (si lega agli amminoacidi ed è un catalizzatore di ossidazioni) (García-Esparza *et al.*, 2006; Provenzano *et al.*, 2010; Miotto *et al.*, 2014), porta ad un accumulo del minerale negli strati più superficiali del terreno e di conseguenza nelle catene trofiche, con una serie di risvolti ambientali negativi come ad esempio: la diminuzione delle popolazioni di carabidi e lombrichi (Bayley *et al.*, 1995; Paoletti *et al.*, 1998; Wightwick *et al.*, 2008), alterazioni microbiologiche ed enzimatiche, abbassamento del pH del suolo e fenomeni di fitotossicità a carico della vite stessa (Pontiroli *et al.*, 2001). Appare chiaro dunque che il rame, pur essendo un principio attivo ammesso in agricoltura biologica, desta qualche preoccupazione e la sua utilizzazione non è più compatibile con i principi dell'agricoltura moderna e non è più in linea con gli obiettivi dell'Europa, che punta ad un'agricoltura sempre meno impattante e sempre meno dipendente da input chimici esterni. A questo proposito, dal 2014 la lotta integrata è stata resa obbligatoria dalla Comunità Europea, che con la Direttiva CE 128 del 2009, stabilisce l'adozione di tutte le misure necessarie per ridurre l'utilizzo di agrofarmaci nelle strategie di difesa fitosanitaria. La fitoiatria moderna pone alla base di una efficace e razionale difesa l'impiego di tutti i mezzi e le pratiche disponibili al fine di prevenire il più possibile l'insorgenza delle malattie, in modo da

ricorrere al trattamento chimico solo in ultima istanza, al superamento di determinate soglie di intervento, alternando le diverse molecole disponibili, ovvero cercando di evitare l'insorgenza di fenomeni di resistenza fra i parassiti delle piante. Nei programmi di difesa integrata, tra le tante altre cose, è necessario condurre il vigneto rispettando tutte le norme delle buone pratiche agricole, gestendo in modo razionale l'intervento fitosanitario al pari di altre pratiche agronomiche. Ciò significa porre attenzione ai dati vegetativi e climatici del vigneto in relazione al ciclo biologico del patogeno. Non meno importanti sono inoltre le dosi di impiego, la cadenza da adottare (cercando di evitare un approccio di tipo calendarizzato), l'effetto sinergico tra le varie molecole ed il rispetto del tempo di carenza. Per un'ottima difesa occorre quindi valutare il reale rischio fitosanitario in modo da sfruttare a pieno le potenzialità di ciascun prodotto. Inoltre, più di recente, è stato approvato il *Green Deal* europeo che prevede un piano d'azione volto a: promuovere l'uso efficiente delle risorse passando a un'economia pulita e circolare; ripristinare la biodiversità e ridurre l'inquinamento. A tale scopo, tra diverse strategie, entra in gioco anche la strategia "*Farm to Fork*", la quale ha tra gli obiettivi quello di eliminare i prodotti fitosanitari pericolosi (nei quali rientra ovviamente anche il rame).

Attraverso alcuni provvedimenti legislativi, l'Europa ha già limitato l'utilizzo del rame in agricoltura: con l'introduzione prima del Regolamento CE n. 473/2002, con cui si è disposto il vincolo di non oltrepassare l'apporto di 6 kg/ha all'anno di rame metallo e, più recentemente, con il regolamento. 2018/1981, che sancisce a 28 kg/ha in 7 anni (media di 4 kg/ha all'anno) il limite di legge per la quantità di rame impiegabile in agricoltura. Come se non bastasse, dato che il rame soddisfa i criteri di tossicità e di bioaccumulo, è stato inserito nella lista dei prodotti candidati alla sostituzione, ovvero la lista dei prodotti che destano preoccupazioni per le loro caratteristiche intrinseche. Inoltre, in diversi paesi del vecchio continente, l'utilizzo del rame in agricoltura è stato già azzerato (Romanazzi et al., 2021).

Alla luce di queste considerazioni, le aziende a conduzione biologica sono in grossa difficoltà e potrebbero trovarsi nel prossimo futuro senza la possibilità di ricorrere al rame per contenere le

infezioni di peronospora e mentre in agricoltura integrata c'è comunque la possibilità di ricorrere ad altri mezzi chimici, in regime biologico ad oggi non ci sono alternative altrettanto valide ed efficienti (Dagostin e Pertot, 2007). Da qui la necessità di sviluppare nuove tecniche di protezione della vite altrettanto efficaci, ma sempre più sostenibili da un punto di vista economico, sociale ed ambientale. Questo lavoro di tesi rappresenta la fotografia dello stato dell'arte nella ricerca di innovazioni nel campo della difesa antiperonosporica e focalizza l'attenzione su tre punti cruciali: l'impiego di prodotti di origine naturale (soprattutto chitosano) ad azione antimicrobica ed elicitante; l'utilizzo di vitigni con geni di resistenza alla peronospora ed altre patologie di origine fungina; l'impiego di aptameri peptidici altamente specifici per gli oomiceti come *P. viticola*.

Il chitosano è una molecola naturale ottenuta dall'esoscheletro dei crostacei, utilizzata in svariati ambiti dalla medicina all'industria alimentare e, sotto forma di chitosano cloridrato, è stata la prima sostanza di base approvata dall'Unione Europea per la protezione dei vegetali di interesse agrario ai sensi del Reg. UE 2014/563; negli Stati Uniti possiede il riconoscimento GRAS (*Generally Recognized As Safe*) (Hu *et al.*, 2019). Questo biopolimero è noto per le sue proprietà quali biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività; ed è considerato una molecola unica nel panorama fitopatologico perché una volta applicato sulle superfici vegetali, il chitosano svolge una triplice attività: filmogena, antimicrobica ed elicitante (Romanazzi *et al.*, 2018). È importante però considerare che i prodotti naturali come il chitosano, non rappresentano una mera sostituzione del prodotto convenzionale (in questo caso il rame) perché è necessario conoscere le caratteristiche del nuovo prodotto ed adeguare quindi le strategie di difesa. Mentre i prodotti a base di rame sono in commercio da moltissimi anni e sono ben conosciuti dagli operatori agricoli, il chitosano si sta affacciando ora al mondo agricolo e per esprimere al massimo la sua comprovata efficacia, è necessario che vengano considerati alcuni parametri importanti, come ad esempio la concentrazione (0,5% - 0,8%), i volumi di irrorazioni (servono volumi piuttosto alti per coprire bene la vegetazione) e le modalità di preparazione che variano in funzione delle formulazioni. Tra le molecole di origine naturali, il chitosano sembra essere il candidato principale ad entrare a far parte dei futuri programmi

di protezione dalla peronospora della vite, da solo o posto in strategia con il rame (ad esempio alternato o combinato) in funzione di vari parametri, come ad esempio la pressione della malattia.

Le varietà resistenti sono nuovi vitigni ottenuti attraverso un processo di ibridazione tra varietà suscettibili di *V. vinifera* e varietà che presentano geni di resistenza ai più importanti patogeni fungini, fra i quali *P. viticola*; si opera attraverso un preliminare lavoro di screening per capire quali viti sono portatrici dei geni resistenti e quali no, ma allo stesso tempo vengono selezionate quelle piante che diano dei risultati positivi dal punto di vista agronomico ed enologico. Questo miglioramento genetico viene utilizzato per prevenire la malattia anziché rincorrere il problema e allo stesso tempo l'impiego di queste varietà resistenti va considerato come mezzo complementare e non sostitutivo degli altri mezzi di lotta antiparassitaria. Con i tradizionali programmi di miglioramento genetico, ad esempio il reincrocio, questo lavoro richiede tempi molto lunghi ed ha scarsa precisione. Negli ultimi anni queste metodologie sono state affiancate da tecniche molecolari, ma nuove tecniche di ingegneria genetica potrebbero prossimamente aprire nuove frontiere e rendere l'intero procedimento meno dispendioso in termini economici e di tempo.

Negli ultimi anni, gli aptameri peptidici, brevi peptidi sintetici in grado di legare e inibire specificamente un target proteico, sono emersi come nuovi strumenti molecolari che hanno attirato l'attenzione di diversi gruppi di ricerca interessati allo sviluppo di composti antimicrobici (Colombo, 2015; Xu, 2019), presumibilmente con un migliore impatto ambientale, minori effetti off-target e rappresentano un'alternativa a basso rischio ai prodotti fitosanitari convenzionali, sebbene il loro impiego richieda una convalida sperimentale e presenti dei costi elevati. Sarà inoltre necessario mettere a punto delle formulazioni stabili e pronte all'uso per una diffusione su scala commerciale. Nel caso di *P. viticola* il target specifico individuato è dato dall'enzima PvCesa2 (cellulosa sintasi), coinvolto nella sintesi dei tubetti germinativi responsabili delle infezioni (Colombo *et al.*, 2020).

7 BIBLIOGRAFIA

- Agrios G., (2005). Plant pathology. Fifth edition.
- Ali A., Tengku M., Muhammad M., Sijam K., Siddiqui Y., (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica Papaya L.*) fruit during cold storage. Food Chemistry 124, 620–626.
- Amborabé B-E., Bonmort J., Fleurat-lessard P., Roblin G., (2008). Early events induced by chitosan on plant cells. Journal of Experimental Botany 59, 2317–2324.
- Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Muñoz D., Nuñez C., Arce-Johnson P., (2016). Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. Frontiers in Plant Science 7, 382.
- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert, Joubert J. M., Pugin A., (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Phytopathology 12, 1118–1128.
- Aziz A., Aziz T. 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 11, 1188-1194.
- Bayley M., Baatrup E., Heimbach U., Bjerregaard P., (1995). Elevated copper levels during larval development cause altered locomotor behavior in the adult carabid beetle *Pterostichus cupreus L.* (Coleoptera: Carabidae). Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 166–170.
- Belli G., (2011). Elementi di patologia vegetale. Piccin editore.
- Boller E. F., Avilla J., Joerg E., Malavolta C., Wijnands F. G., Esbjerg P., (2004). Integrated production: principles and technical guidelines. Bulletin OILB srop, 27.
- Bortolotti P. R., Nannini P., Scannavini M., Antoniaci L., Bugiani R., (2006). Valutazione di diversi composti rameici a basso dosaggio nella difesa antiperonosporica della vite. Atti Giornate Fitopatologiche 2, 173-178.
- Buonassisi D., Colombo M., Migliaro D., Dolzani C., Peressotti E., Mizzotti C., Velasco R., Masiero

- S., Perazzolli M., Vezzulli S., (2017). Breeding for grapevine downy mildew resistance: a review of “omics” approaches. *Euphytica* 213, 1–21.
- Burruano, (2000). The life cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist* 14, 179-182.
- Cinquemani T., (2016). Vitigni resistenti, peronospora e oidio addio. *Agronotizie*.
- Colombo M., Mizzotti C., Masiero S., Kater M. M., Pesaresi P., (2015). Peptide aptamers: the versatile role of specific protein function inhibitors in plant biotechnology. *Journal of Integrative Plant Biology* 57, 892–901.
- Colombo M., Masiero S., Rosa S., Caporali E., Toffolatti S. L., Mizzotti C., Tadini L., Rossi F., Pellegrino S., Musetti R., Velasco R., Perazzolli M., Vezzulli S., Pesaresi P., (2020). *NoPvI*: a synthetic antimicrobial peptide aptamer targeting the causal agents of grapevine downy. *Scientific reports* 10, 17574.
- Dagostin S., Scharer H. J., Pertot I., Tamm L., (2011). Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection* 30, 776–788.
- Devlieghere F., Vermeulen A., Debevere J., (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21, 703–14.
- Dongiovanni C., Giampaolo C., Di Carolo M., Gasparre A., Masiello N., Santomauro A., Faretra F., (2008). Attività antiperonosporica di dosi ridotte di rame e di sostanze alternative in vigneti dell’Italia meridionale. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 315-320.
- Dongiovanni C., Di Carolo M., Giampaolo C., Santomauro A., Natale P., Perrelli D., Faretra F., (2010). Osservazioni sull’efficacia antiperonosporica su vite di dosi ridotte di rame e di sostanze alternative e resistenza al dilavamento di composti rameici. *Petria* 20, 13-16.
- DuPont, (2000). Lavori presentati alle Giornate Fitopatologiche 2000.
- Egger E., D’Arcangelo M. E. M., (2006). Valutazione dell’efficacia di antiperonosporici a basso apporto di rame nella difesa della vite in Toscana. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 179-186.

- Fontana P., (1957). Contributo alla conoscenza del meccanismo d'azione degli agenti anticrittogamici a base di rame. *Notiziario sulle Malattie delle Piante* 42, 77-82.
- Garde-Cerdán T., Mancini V., Carrasco-Quiroz M., Servili A., Gutiérrez-Gamboa G., Foglia R., Pérez-Alvarez E. P., Romanazzi G., (2017). Chitosan and laminarin as alternatives to copper for *Plasmopara viticola* control: effect on grape amino acid. *Journal Agric and Food Chemistry* 65, 7379–7386.
- Gehmann K., (1987). Untersuchungen zur epidemiologie des falschen mehltaus an weinreben *Plasmopara viticola*, Berk. & Curt, ex de Bary, Berl. & de Toni. PhD Thesis, Universitat Stuttgart Hohenheim.
- Gessler C., Pertot I., Perazzolli M., (2011). *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathology Mediterranea* 50, 3-44.
- Gindro K., Pezet R., Viret O., (2003). Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 846-853.
- Hao Z., Gong P., He C., Lin J., (2018). Peptide aptamers to inhibit protein function in lants. *Trends in Plant Science* 23, 281–284.
- 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.
- Juang K.-W., Lee Y.-I., Lai H.-Y., Wang C.-H., Chen B.-C., (2012). Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1315–1322.
- Kaya M., Cesonien L., Daubaras R., Leskauskaitė D., Zabulionė D., (2016). Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. *International Journal of Biological Macromolecules* 85, 355–360.

- Krishna K. R., Rao D. V. S., (2014). Effect of chitosan coating on the physiochemical characteristics of guava (*Psidium Guajava* L.) fruits during storage at room temperature. *Indian Journal of Science and Technology* 7, 554–58.
- Kortekamp A., Zyrian E., (1999). Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *Journal of phytopathology* 147, 453-459.
- Kortekamp A., Wind R., Zyrian E., (1999). The role of hairs on the wettability of grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Vitis* 38, 101-105.
- Landi L., Angelini RMDM., Pollastro S., Feliziani E., (2017). Global transcriptome analysis and identification of differentially expressed genes in strawberry after preharvest application of benzothiadiazole and chitosan. *Frontiers in Plant Science* 8, 1–22.
- 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.
- Laviola C., Burruano S., Strazzeri S., (1986). Influenza della temperatura sulla germinazione delle oospore di *Plasmopara viticola* (Berk, et Curt.) Berl. et De Toni. *Phytopathology Mediterranea* 25, 80-84.
- Mancini V., Foglia R., Gregori M., Marcolini D., Coppa D., Nardi S., Romanazzi G., (2018). Trattamenti a basso impatto ambientale per la protezione antiperonosporica e antioidica della vite in agricoltura biologica. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 523-530.
- Martelli R., (1984). Meccanismo d'azione degli antiparassitari a base di rame. *VigneVini* 11, 51-53.
- Meng X., Li B., Liu J., Tian S., (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry* 106, 501–508.
- Paoletti M. G., Somaggio D., Favretto M. R., Petruzzelli G., Pezzarossa B., Barbafieri M., (1998). Earthworms as useful bioindicators of agroecosystem sustainability in orchards and vineyards with different inputs. *Applied Soil Ecology* 10, 137-150.
- Pertot I., Gobbin D., Dagostin S., Ferrari A., Gessler C., (2005). La peronospora della vite. *Safe Crop*

64.

- Petriccione M., Sanctis F. De., Pasquariello M. S., Mastrobuoni F., Rega P., Scortichini M., Mencarelli F., (2015). The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. *Food Bioprocess Technology* 8, 394–408.
- Pontiroli R., Rizzotti R., Zerbetto F., (2001). Prove di difesa antiperonosporica in viticoltura biologica. *Informatore fitopatologico* 51, 62-66.
- Rajestary R., Landi L., Romanazzi G., (2021). Chitosan and postharvest decay of fresh fruit: meta-analysis of disease control and antimicrobial and eliciting activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 563-582.
- Reverdatto S., Rai V., Xue J., Burz D. S., Schmidt A. M., Shekhtman A., (2013). Combinatorial library of improved peptide aptamers, CLIPs to inhibit RAGE signal transduction in mammalian cells. *Plos One* 8, e65180.
- Reverdatto S., Burz D. S., Shekhtman A., (2015). Peptide aptamers: development and applications. *15*, 1082–1101.
- Romanazzi G., Nigro E., Ippolito A., Di Venere D., Salerno M., (2002). Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grape. *Journal of Food Science* 67, 1862-1867.
- Romanazzi G., Mlikota Gabler F., Smilanick J. L., (2006). Preharvest chitosan and postharvest UV irradiation treatments suppress gray mold of table grapes. *Plant Disease* 90, 445-450.
- Romanazzi G., Mlikota Gabler F., Margosan D., Mackey B. E., Smilanick J. L., (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology* 99, 1028-1036.
- Romanazzi G., 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., Murolo S., Feliziani E., (2013). A new approach to manage phytoplasma diseases: field treatments with resistance inducers to contain grapevine Bois noir. *Phytopathology* 103, 785-791.
- Romanazzi G., Mancini V., Feliziani E., Servili A., Nardi S., Flamini L., (2014). Effectiveness of alternative compounds in the control of grapevine downy mildew. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 247-254.
- 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 Reviews 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* (in stampa).

- Romanazzi G., Mancini V., Feliziani E., Bastianelli M., Servili A., Nardi S., Flamini L., (2021). Efficacia di prodotti alternativi nella difesa antiperonosporica della vite. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 247-254.
- Rossi V., Caffi T., Giosuè S., Girometta B., Bugiani R., Spanna F., Dellavalle D., Brunelli A., Collina M., (2005). Elaboration and validation of a dynamic model for primary infections of *Plasmopara viticola*. *Rivista Italiana di Agrometeorologia* 10, 7-13.
- Rossi V., Caffi T., (2007). Effect of water on germination of *Plasmopara viticola* oospores. *An International Journal edited by the British Society for Plant Pathology* 56, 957-966.
- Sancassani G. P., Buccini M., Fremiot P., Rho G., Toffolatti S. L., Vercesi A., (2006). Prove di efficacia antiperonosporica di rame a basso dosaggio. *Atti Giornate Fitopatologiche* 2, 167-172.
- Schut S., Zauner S., Hampel G., König H., Claus H., (2011). Biosorption of copper by wine-relevant lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology* 145, 126–131.
- Stoian, M., Caprita, D., (2019). Organic agriculture: opportunities and trends. *Agri-food economics and sustainable development in contemporary society*. IGI Global 275–293.
- Yin L., Zhang Y., Hao Y., Lu J., (2014). Genetic diversity and population structure of *Plasmopara viticola* in China. *European Journal of Plant Pathology* 140, 365–376.
- Varasteh F., Arzani K., Barzegar M., Zamani Z., (2012). Changes in anthocyanins in arils of chitosan-coated pomegranate (*Punica Granatum* L . Cv . Rabbab-e-Neyriz) fruit during cold storage. *Food Chemistry* 130, 267–272.
- Wightwick A. M., Mollah M. R., Partington D. L., Allison G., (2008). Copper fungicide residues in Australian vineyard soils. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 56, 2457-2464.
- Xoca-Orozco L., Cuellar-torres E. A., González-Morales S., Gutiérrez-Martínez P., López-García U., Herrera-Estrella L., Vega-Arreguín J., Chacón-López A., (2017). Transcriptomic analysis of avocado hass (*Persea Americana* Mill) in the interaction system fruit-chitosan-*Colletotrichum*. *Frontiers in Plant Science* 8, 1–13.
- Xu Q., Yan X., Zhang Y., Wu J., (2019). Current understanding of transport and bioavailability of

bioactive peptides derived from dairy proteins: A review. International Journal of Food Science Technology 54, 1930–1941.

8 SITOGRAFIA

<https://www.peronosporavite.it/sintomi-e-danni-della-peronospora/>

<https://www.coltivazionebiologica.it/peronospora-della-vite/>

<http://www.viten.net/files/927/92760ce2ce1e1df73c203ec71d393921.pdf>

<https://www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/GUIDA%20PRODOTTI%20FITOSANITARI%20ED.2015/Cap5-Scheda5-2.pdf>

<https://www.rivistadiagraria.org/articoli/anno-2008/lotta-biologica-alla-peronospora-della-vite/>

<http://www.viten.net/files/db6/db65624a58b98455fcf2915ec341be57.pdf>

[https://www.agro.basf.it/it/Servizi/Avversit%C3%A0/Funghi-patogeni/Patogeni-di-frutti-punti-di-accrescimento-\(gemme\)-foglie-e-steli/Peronospora-della-Vite/](https://www.agro.basf.it/it/Servizi/Avversit%C3%A0/Funghi-patogeni/Patogeni-di-frutti-punti-di-accrescimento-(gemme)-foglie-e-steli/Peronospora-della-Vite/)

<https://www.istitutoagrariosartor.edu.it/wp-content/uploads/2016/10/Difesa-peronospora-vite.pdf>

<https://agronotizie.imagelinenetwork.com/difesa-e-diserbo/2008/05/09/strategia-di-lotta-contro-la-peronospora-della-vite-da-vino/5366>

<http://www.vitevino.informatoreagrario.it/punto-vite/miscela-efficaci-contro-la-peronospora-della-vite>

http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:4QY_aEOG6IEJ:www.giornatefitopatologiche.it/it/download/23%3FidMat%3D97273+&cd=1&hl=it&ct=clnk&gl=it

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.008>

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00235>

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.012>

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.085>

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.031>

<http://www.angelomorittu.com/ Giornate%20fitopatologiche>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026121941100086X>.

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:bgiQF3rlKUIJ:www.giornatefitopatologiche.it/it/download/23%3FidMat%3D33258+&cd=5&hl=it&ct=clnk&gl=it>

<file:///C:/Users/Marco/Downloads/Peronospora%20della%20vite.pdf>

<http://www.georgofili.it/Media?c=b570baf3-7dda-4f6f-ad23-3acabf7edb72>

https://www.researchgate.net/profile/Gianfranco_Romanazzi/publication/341000758_Webinar_AIP

https://www.researchgate.net/profile/Gianfranco_Romanazzi/publication/341000758_Webinar_AIP/P_30_aprile_ore_1130_Esperienze_sulla_coltivazione_di_vitigni_resistenti_alle_malattie_Dott.

https://www.researchgate.net/profile/Gianfranco_Romanazzi/publication/341000758_Webinar_AIP/Giuseppe_Camilli_Enologo_Sperimentatore_ASSAM_Regione_Marche/links/5eb29336299bf152d

https://www.researchgate.net/profile/Gianfranco_Romanazzi/publication/341000758_Webinar_AIP/69dcc77/Webinar-AIPP-30-aprile-ore-1130-Esperienze-sulla-coltivazione-di-vitigni-resistenti-alle

[malattie-Dott-Giuseppe-Camilli-Enologo-Sperimentatore-ASSAM-Regione-Marche.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Gianfranco_Romanazzi/publication/341000758_Webinar_AIP/malattie-Dott-Giuseppe-Camilli-Enologo-Sperimentatore-ASSAM-Regione-Marche.pdf)

file:///C:/Users/Marco/Downloads/Vinitaly_9_aprile_2019_Bavaresco.pdf

9 RINGRAZIAMENTI

Il mio percorso di studio in Scienze e Tecnologie Agrarie di laurea triennale è stato intenso e soddisfacente ed è giunto al termine. I ringraziamenti più generali vanno a tutto l'ambiente universitario che mi ha permesso di conoscere professori preparati e disponibili e di trovare anche dei compagni con i quali ho condiviso il corso di studio. Particolari ringraziamenti invece vanno a coloro i quali mi hanno affiancato durante la stesura della tesi stessa. In particolare, ringrazio il Professor. Gianfranco Romanazzi per avermi permesso di affrontare al meglio questo argomento e un sentito ringraziamento va anche al correlatore Dottor. Simone Piancatelli per avermi affiancato durante la stesura della tesi e per essere stato sempre puntuale e disponibile in caso di dubbi. Inoltre, ringrazio la mia famiglia che mi ha sostenuto durante tutto questo percorso spronandomi sempre a fare il massimo ed i miei amici con cui ho trascorso il tempo libero.