

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA IN

SCIENZE E TECNOLOGIE VITICOLE ED ENOLOGICHE

Effetto di estratti vegetali sulla crescita di *Botrytis cinerea in vitro* e su acini d'uva

Effect of plant extracts on the growth of *Botrytis cinerea in vitro* and on grape berries

Relatore

Prof. Francesco Favaron

Correlatore

Dott. Marco Lucchetta

Laureanda

Sara Marcon

Matricola n. 610305

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUZIONE	3
1.1 <i>Botrytis cinerea</i> : muffa grigia	5
1.1.1 Muffa nobile	6
1.1.2 Sintomi	6
1.1.3 Ciclo biologico ed epidemiologia	7
1.1.4 Meccanismo di infezione	8
1.2 <i>Meccanismi di resistenza della pianta ospite (vite)</i>	9
1.3 <i>Elicitori: induttori risposte di difesa</i>	13
1.4 <i>Mezzi chimici di difesa</i>	14
1.4.1 Mezzi chimici in viticoltura	15
1.5 <i>Tecniche agronomiche preventive</i>	16
1.6 <i>Difesa biologica</i>	17
1.7 <i>Estratti naturali</i>	22
1.8 <i>Scopo</i>	32
2. MATERIALI E METODI	33
2.1. Preparazione dell'inoculo di <i>B. cinerea</i>	33
2.2 Oli essenziali e altre molecole naturali	33
2.3 <i>Effetto degli oli essenziali sulla crescita di B. cinerea</i>	33
2.4 <i>Effetto degli oli essenziali e di estratti naturali (GSE, Milsana, chitosano)</i> <i>sulla crescita radiale di B. cinerea</i>	34
2.5 <i>Inoculazione di B. cinerea su foglie di Vitis vinifera trattate con</i> <i>molecole naturali</i>	34
2.6 <i>Inoculazione di B. cinerea su acini di uva trattati con oli essenziali</i>	35
3. RISULTATI	35
3.1 <i>Effetto degli oli essenziali sulla crescita di B. cinerea su terreno liquido</i>	35
3.2 <i>Effetto degli oli essenziali e di estratti naturali (GSE, Milsana,</i> <i>chitosano) sulla crescita radiale di B. cinerea</i>	36
3.3 <i>Effetto di molecole naturali sull'infezione di B. cinerea su foglie di</i> <i>Vitis vinifera</i>	40

3.4 Effetto di oli essenziali su acini di uva Glera inoculati con spore e micelio di <i>B. cinerea</i>	44
3.5 Effetto di oli essenziali su acini di uva Merlot, Cabernet sauvignon, Cabernet franc inoculati con micelio di <i>B. cinerea</i>	46
3.6 Effetto di oli essenziali su acini di uva Raboso inoculati con micelio di <i>B. cinerea</i>	46
4.DISCUSSIONE	50
5.CONCLUSIONI	52
BIBLIOGRAFIA	54
ALLEGATO 1	58
ALLEGATO 2	63

RIASSUNTO

In natura sono presenti composti che potrebbero essere alternativi ai fungicidi sintetici impiegati in viticoltura ed in agricoltura. Derivati di origine vegetale possono essere utilizzati nei trattamenti contro le malattie e possono indurre risposte di difesa nella piante come per esempio il chitosano o la laminarina (*Laminaria digitata*).

Estratti derivati da piante come gli oli essenziali o altre sostanze possono agire direttamente sullo sviluppo del micelio e la germinazione delle spore di *Botrytis cinerea*.

In questo studio sono state effettuate alcuni saggi di attività di estratti vegetali contro *B. cinerea in vitro* e inoculata su foglie ed acini d'uva di diverse varietà di *Vitis vinifera* a bacca bianca e nera.

Gli oli essenziali di garofano (*Syzygium aromaticum*) e menta (*Mentha piperita*) inibiscono completamente *in vitro* lo sviluppo del fungo a tutte le concentrazioni utilizzate (0,1-1%, v/v), mentre l'olio di tea tree (*Melaleuca alternifolia*) manifesta un certo effetto solo alle concentrazioni più alte. Anche l'acido acetico da 10 a 50 mM determina una riduzione della crescita miceliare.

Nel trattamento degli acini solo l'olio di garofano è efficace nel bloccare o ritardare lo sviluppo di *B. cinerea*. L'efficacia nel contenere lo sviluppo del patogeno cambia con la varietà d'uva utilizzata. I trattamenti si sono rivelati più efficaci su Merlot, Cabernet franc e Raboso in confronto a Cabernet sauvignon . Da questi risultati sperimentali ne consegue la necessità di continuare ad approfondire la sperimentazione sulle molecole naturali che possono inibire la crescita di *B. cinerea in vitro* e *in vivo* per una loro possibile applicazione in viticoltura.

ABSTRACT

Several natural compounds can be used in alternative to synthetic fungicides to protect grapevine from diseases in a sustainable viticulture. Effective natural molecules can be obtained from different sources and they could affect also indirectly the plant pathogens such as chitosan or laminarin (*Laminaria digitata*) which can induce plant defences. Plant extracts as essential oils or other substances of plant origin may directly inhibit mycelium growth or spore germination of plant pathogens such as *Botrytis cinerea*.

In this study I performed several inhibition assays of some plant extracts against the growth of *B. cinerea in vitro*. Leaves and grapes of different varieties of *Vitis vinifera* were also treated with selected plant extracts. Clove (*Syzygium aromaticum*) and peppermint (*Mentha piperita*) oils completely inhibited *in vitro* the fungal growth at all concentrations used (0,1-1%, v/v), while the tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) was effective only at the higher concentrations. Inhibition activity was also obtained with 10-50 mM acetic acid.

In grape treatments only clove oil had an effect to partially or completely inhibit the *B. cinerea* development. Grape varieties behaved differently following the treatments. The fungus was better controlled on grape of Merlot, Cabernet franc and Raboso and lesser in Cabernet sauvignon. These experimental results showed the needs to continue the studies of alternative substances that could inhibit the growth of *B. cinerea in vitro* and *in vivo*.

1. INTRODUZIONE

La coltivazione di piante destinate all'alimentazione umana e del bestiame o alla trasformazione in prodotti secondari o derivati, ha avuto bisogno nel corso del tempo di conoscenze tecniche che si sono arricchite portando ad un cambiamento nelle modalità di gestione delle colture nei paesi industrializzati.

La viticoltura risale a tempi molto lontani, infatti, già all'epoca dei romani si era diffusa la coltivazione della vite e il consumo del vino in Italia.

A partire dal 1800 si diffusero le grandi malattie della vite, portate dall'America del Nord in Europa, come l'oidio, la fillossera e la peronospora. Si arrivò a scoprire che la pratica della solfatura poteva sconfiggere l'oidio e che l'innesto di viti di specie europee con quelle americane potevano contrastare gli attacchi di fillossera.

Un tempo le tecniche agronomiche erano essenziali e i prodotti che venivano utilizzati, avevano un'azione molto blanda nel contrastare le malattie dovute a patogeni.

Agli inizi del XX secolo la tecnologia è entrata nel mondo del vino contribuendo nella lotta ai patogeni della vite. Con l'introduzione dei prodotti fitosanitari chimici è iniziata l'era della distruzione totale verso qualsiasi forma di organismo che potesse creare dei danni alle piante coltivate. Questo ha portato ad un aumento smisurato del consumo di prodotti chimici con gravi ripercussioni sulla salute umana e sull'ambiente.

Solo dopo gli anni '70 in Italia si è diffusa una nuova mentalità volta alla difesa delle coltivazioni con un uso più razionale dei prodotti chimici e la consapevolezza che le coltivazioni fanno parte di un agroecosistema in cui convivono diversi organismi vegetali e animali, interagendo tra di loro e con l'ambiente che li circonda. L'uomo è l'elemento chiave di questo sistema in quanto può intervenire nel modificare i rapporti presenti, con conseguenze negative se non tiene conto degli equilibri naturali.

Negli ultimi decenni si è andato constatando che l'impiego ripetuto e quasi esclusivo dei mezzi chimici avrebbe portato a cali di efficacia dovuti all'insorgenza di ceppi resistenti e determinato gravi problemi di residui negli alimenti, di inquinamento ambientale e di rischio sanitario per chi eseguiva i trattamenti. Quindi l'andamento ha portato a controllare le produzioni in termini quantitativi ma soprattutto qualitativi dal punto di vista nutrizionale e sanitario.

Da dati ISTAT del 2010 nel periodo 2000-2010 la quantità di prodotti fitosanitari distribuiti per uso agricolo è diminuita complessivamente di 10,6 mila tonnellate (-6,8%) e considerando il ventennio 1990-2010 si è registrato un calo del 32% nel consumo nazionale di agrofarmaci.

A livello legislativo la Comunità Europea è intervenuta per regolamentare la difesa delle colture. Infatti l'art. 14 della Direttiva 128/2009 del Parlamento Europeo indirizzerà l'agricoltura europea e quindi anche italiana, verso un utilizzo sostenibile dei pesticidi con lo scopo di ridurre i rischi per la salute umana e l'ambiente, promuovendo la difesa integrata e l'uso di metodi alternativi per la riduzione dei danni da patogeni e parassiti. Dal 1° gennaio 2014 diventerà obbligatoria l'adozione dei principi della difesa integrata per tutti gli utilizzatori professionali quali (All. III):

- rotazioni colturali, l'uso di tecniche appropriate (es. potature), fertilizzazioni equilibrate e irrigazione, cultivar resistenti;
- protezione e accrescimento di organismi utili;
- monitoraggio degli organismi nocivi e intervento sopra valori soglia scientificamente attendibili;
- preferenza ai metodi biologici sostenibili, mezzi fisici e altri metodi non chimici se consentono un adeguato controllo degli organismi nocivi.
- pesticidi selettivi rispetto agli organismi da combattere e con minimi effetti sulla salute umana, gli organismi non bersaglio e l'ambiente.

Il mercato mondiale dei prodotti fitosanitari corrisponde a circa 22 miliardi di euro e di questi solamente l'1% è costituito da biopesticidi (220 milioni di euro). Tra questi si includono i principi attivi non di sintesi, come agrofarmaci a base di microrganismi, insetti ed acari predatori, agrofarmaci di origine naturale e feromoni. Tra questi, ad esempio, sono commercializzati prodotti per il controllo di *B. cinerea* su vite a base di *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Ulocladium oudemansii* che compete con *Botrytis* per i tessuti necrotici e *Bacillus subtilis*.

Botrytis cinerea è un fungo molto diffuso in natura che colpisce piante diverse fra loro: erbacee, arbustive, arboree e forestali.

In un vigneto qualsiasi parte della pianta ospite è un potenziale target per la deposizione, crescita e penetrazione dell'inoculo di *Botrytis cinerea*. Questo è un fungo ascomicete che provoca perdite quantitative e qualitative delle produzioni viticole. Da questo ne deriva la necessità di valutare i rischi di infezione e mettere in atto tutti i mezzi a disposizione per conseguire un'efficace protezione delle piante di vite eliminando o riducendo i trattamenti inutili. Ecco come la difesa integrata porge il suo contributo per un'agricoltura sostenibile promuovendo la ricerca di tecniche alternative per il controllo di fitopatogeni come *B. cinerea*. L'introduzione della difesa biologica, che sfrutta la capacità di organismi di ridurre

l'incidenza delle malattie unitamente alle tecniche agronomiche, hanno permesso di sostituire, in parte, i trattamenti chimici.

Attualmente si cerca di ritornare a un'agricoltura più simile a quella di un tempo perché ci si è resi conto che la qualità e la salubrità di un alimento o prodotto non sono rappresentate solo dal suo aspetto esteriore. Inoltre, l'inquinamento globale a livello di acqua-aria e suolo desta le maggiori preoccupazioni in quanto le conseguenze dannose si ripercuotono anche sull'uomo. Per questo la comunità scientifica sta dando il suo contributo per riparare agli errori commessi nel passato e cercando soluzioni alternative valide e sicure.

1.1 *Botrytis cinerea*: muffa grigia

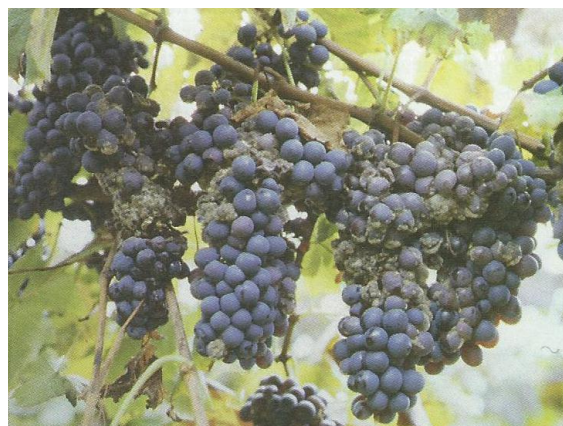
La muffa grigia o Botrite è una delle più importanti malattie della vite ed è causata da un fungo polifago, ubiquitario, necrotrofo e con capacità saprofitaria. Colpisce più di 200 specie vegetali oltre la vite in tutto il mondo. Avendo un comportamento parassitario porta alla morte i tessuti vegetali sui quali continua a svilupparsi o produce delle strutture di sopravvivenza come gli sclerozi. E' inoltre in grado di colpire parti di pianta senescenti o in via di decomposizione.

Botrytis cinerea Pers. è la forma asessuata o anamorfa, mentre *Botryotinia fuckeliana* De Bary quella sessuata o telomorfa che è invece piuttosto rara in natura.

Nella vite il fungo può infettare tutti gli organi erbacei creando i danni maggiori agli acini.



Muffa grigia su grappoli a bacca bianca



Muffa grigia su grappoli a bacca nera

L'attacco di *B. cinerea* causa una diminuzione quantitativa e qualitativa della produzione che portano a compiere una selezione delle uve e a effettuare trattamenti sulle uve colpite come, ad esempio, intense solfitazioni, per ovviare al danno subito. Le uve botritizzate conferiscono al vino finito odori e sapori di terra e muffa (geosmina), riducendone l'acidità totale e

provocando cambiamenti al colore e alla limpidezza. *B. cinerea* produce enzimi ossidasici in particolare la laccasi che ossida numerosi composti fenolici quali polifenoli, antociani e catechine causando l'imbrunimento di vini bianchi dovuto alla polimerizzazione dei chinoni; polisaccaridi come il β - glucano che causa problemi in chiarifica ed eteropolisaccaridi che oltre ad essere colmatanti dei setti filtranti rallentano la fermentazione andando ad inibire il metabolismo di *Saccharomyces cerevisiae*. L'uva colpita presenta una diminuzione degli zuccheri in quanto il fungo assimila glucosio e fruttosio e l'ossidazione diretta del glucosio causa l'accumulo di acido gluconico e glicerolo nel mezzo. Dalla degradazione delle pectine si accumula acido galatturonico che viene poi ossidato ad acido mucico (Wurding, 1976). Aumenta la produzione di resveratrolo e composti che si combinano alla SO₂.

1.1.1 Muffa nobile

In prossimità della vendemmia, in particolari tipi di vitigni, con determinate condizioni ambientali quali l'elevata umidità durante la notte e il mattino ed alte temperature diurne che favoriscono un'intensa traspirazione, può comparire la forma larvata delle infezioni di *B. cinerea*. Inoltre le cultivar devono avere preferibilmente una buccia spessa tale da opporre una maggiore resistenza all'azione degradativa del fungo (Vincenzini *et al.*, 2005). Con le condizioni favorevoli, il fungo infetta gli acini ma non sporifica, evitando così il comune marciume; avviene una forte disidratazione con accumulo degli zuccheri nelle bacche. (Ferrari *et al.*, 2002) Questo tipo di attacco dell'uva viene denominato "muffa nobile" in quanto i vini che ne derivano sono dolci, aromatici ed il loro colore è scuro per l'ossidazione dei polifenoli (tannini) dovuta alla laccasi secreta dal fungo. Parziale ossidazione può avvenire a carico del glucosio e dei monoterpeni volatili, con effetti positivi e/o negativi. Nel mosto compare una sostanza di tipo antibiotico chiamata botriticina che ha un effetto negativo sulla crescita dei lieviti, riducendo la velocità della fermentazione. I vini più conosciuti che derivano da questo tipo di "infezione" sono il Sauternes in Francia e il Tokay in Ungheria (Vincenzini *et al.*, 2005).

1.1.2 Sintomi

La Botrite colpisce soprattutto gli acini mentre sono poco frequenti e dannosi i sintomi sulle foglie che si manifestano con necrosi e comparsa di una massa grigia di conidi. Nei tralci erbacei si possono formare necrosi, imbrunimenti e spesso gli organi di conservazione del

fungo gli sclerozi. Il patogeno può colonizzare le infiorescenze già prima della fioritura causando necrosi e disseccamento, ricoprendole di una muffa grigia. In primavera con andamento climatico umido e piovoso si hanno le infezioni ai germogli con la comparsa di marciume molle che tende a disseccare e spesso compare una muffa di colore grigio. Gli acini sono colpiti dopo l'invasione in quanto la maturazione dell'uva causa un accumulo di zuccheri e gli acini sono più suscettibili alla germinazione e alla penetrazione del fungo. I sintomi evidenti sono un imbrunimento e marciume molle dei tessuti con conseguente fessurazione e comparsa di sporulazione grigia. Se l'andamento climatico evolve verso un periodo secco, i grappoli possono disseccare e necrotizzare.

1.1.3 Ciclo biologico ed epidemiologia

I siti di infezione possono sorgere da conidi, micelio e ascospore (Jarvis, 1977). I conidi derivano dalla fase agamica di *B. cinerea* e sono portati da micelio costituito da ife (filamenti) che portano i rametti conidiofori e i conidi posti a grappolo.



Conidioforo di *B. cinerea* fotografato al microscopio ottico

Il fungo si conserva nell'ambiente, a partire dall'autunno, come sclerozi o micelio all'interno dei tessuti morti dell'ospite quali i residui infetti caduti a terra ed anche nei grappolini tardivi mummificati rimasti sui tralci.

Alla ripresa vegetativa della vite il micelio sverna nella corteccia dei tralci e nelle gemme producendo conidi oppure a partire da sclerozi producendo micelio e/o conidi. In condizioni ambientali sfavorevoli, gli sclerozi possono produrre apotecii (corpi fruttiferi), rari in natura, che portano gli aschi con otto ascospore (Feretra e Antonacci, 1987), dopo aver subito il processo sessuale. Quando le condizioni sono tornate favorevoli allo sviluppo del fungo dagli sclerozi vengono prodotte masse di conidi.

I conidi generati dall'inoculo primario danno avvio al ciclo essendo liberati dai conidiofori, le strutture che li portano, e dispersi dal vento, dalla pioggia e dagli insetti. La produzione e

disseminazione dell'inoculo sono regolate dalla fluttuazione della temperatura e dell'umidità. Una più rapida diminuzione dell'umidità con un aumento della temperatura al mattino presto causano un contorcimento e l'asciugatura dei conidiofori che liberano i conidi nell'aria (Jarvis, 1962). Nei vigneti il 95% di conidi di *B. cinerea* sono depositati all'interno di 1 m dalla sorgente in cui si sono formati (Serby, 2003). I conidi possono rimanere intrappolati nelle ornamentazioni dei segmenti, su cuticola, peli, e aree in rilievo del moscerino dell'aceto (*Drosophila melanogaster*) (Louis *et al.*, 1996), della tignoletta (*Lobesia botrana*) (Fermaud e Le Menn, 1989) e dei tripidi, venendo così distribuiti nella vegetazione. I conidi ingeriti da questi insetti possono rimanere vitali nel loro corpo e costituire una fonte di inoculo.

Una volta raggiunto l'ospite, i conidi germinano con una temperatura dai 5°C ai 30-32°C ed una prolungata piovosità, con un'umidità di 93% (Williamson *et al.*, 1995) o maggiore. Empiricamente le condizioni favorevoli seguono la "regola dei 15/15" ossia 15°C e 15 ore di bagnatura.

Le infezioni in fioritura generalmente rimangono latenti, quindi *B. cinerea* rimane quiescente e costituiscono la fonte di inoculo per l'infezione degli acini. Sui vitigni precoci si possono avere infezioni importanti anche in post-fioritura, quando l'attacco del fungo si sviluppa nei residui fiorali (ad esempio frutti abortiti e calipstre). Nelle condizioni medie del Veneto le maggiori infezioni si verificano a partire dall'invaiaitura e raggiungono il massimo in prossimità della vendemmia. Infatti, le difese della pianta si indeboliscono in concomitanza con la maturazione mentre il fungo si riattiva e causa il marciume dei frutti e la produzione di conidi che si disperdono dando avvio a più cicli di infezione.

1.1.4 Meccanismo di infezione

Nel processo di infezione gli eventi principali che si susseguono sono l'adesione, la germinazione, la crescita del tubetto germinativo e la penetrazione. A questi fanno seguito la colonizzazione dei tessuti con la quale il fungo può intraprendere il rapporto di parassitismo con l'ospite e l'evasione delle strutture riproduttive per lo più all'esterno degli organi infettati, per consentire l'eventuale disseminazione di propagulo.

I conidi aderiscono meglio alla cuticola degli acini, alle foglie, ai petali o altre superfici della pianta se è presente dell'acqua libera, rispetto a superfici asciutte (Spotts e Holz, 1996). La germinazione porta alla formazione di un tubetto germinativo dal quale si formano gli appressori ossia delle ife che normalmente permettono una migliore adesione del fungo all'ospite favorita dalla sintesi di mucillagini e composti polisaccaridici di natura adesivante,

mentre in questo caso, hanno la capacità di penetrare all'interno della superficie della pianta. Se la penetrazione è attiva l'ingresso avviene per lisi enzimatica della cuticola che ricopre tutte le parti aeree della pianta. La cuticola è composta di cutina, un poliestere di acidi grassi C16 e C18 con gruppi alcolici, ed è ricoperta in molti casi di uno strato ceroso idrofobico. *B. cinerea* produce lipasi, enzimi capaci di idrolizzare le lunghe catene insature di acidi grassi esterificate (Comménil *et al.*, 1995), modificando lo strato ceroso e la cuticola, permettendo l'adesione dei conidi alla superficie della pianta (Comménil *et al.*, 1997, 1998). Il fungo può produrre diversi tipi di enzimi utili alla colonizzazione dei tessuti quali cellulasi, pectinasi, poligalatturonasi, xilanasi, arabinasi e laccasi che permettono al fungo di ricavare l'energia necessaria alla sua sopravvivenza. In conseguenza alla penetrazione nello strato epidermico, il fungo invade i tessuti sub-epidermici inter- e intra-cellulari per instaurare l'infezione. *B. cinerea* uccide le cellule dell'ospite prima che siano invase dalle ife (Clark e Lorbeer, 1976). Il fungo produce delle proteine o dei composti a basso peso molecolare (tossine o acido ossalico) che sono dei fattori di induzione della morte programmata delle cellule, facilitano l'invasione e possono essere essenziali per il successo dell'infezione (Govrin e Levine, 2000). Studi recenti si sono focalizzati sulla produzione di specie attive dell'ossigeno (AOS) in relazione con la patogenicità di *B. cinerea* (Von Tiedemann, 1997; Govrin e Levine, 2000; Patykowski e Urbanek, 2003). La penetrazione passiva può avvenire attraverso aperture naturali quali stomi e lenticelle o ferite grazie alle quali i conidi germinano ed entrano nei tessuti. Quando si formano essudati attorno alla ferita stessa, l'infezione prende avvio ai margini di questa e raramente le ife hanno la capacità di raggiungere la periferia e di entrare nella cavità della ferita (Coertze e Holz, 2002). Le infezioni latenti in fioritura sono situate nel ricettacolo nella zona di inserimento degli organi fiorali sul pedicello, la prima posizione per le infezioni di *B. cinerea* in grappoli di uva (Holz *et al.*, 2003). Le infezioni ai residui fiorali permettono al fungo di rimanere all'interno del grappolo e di svilupparsi nel momento in cui le difese della pianta diminuiscono, ossia in fase di maturazione dell'uva. La fuoriuscita di essudati da ferite o micro ferite forniscono il substrato per la germinazione dei conidi che danno avvio alle infezioni agli acini. Gli insetti possono essere vettori dell'inoculo ma anche responsabili della creazione di ferite sulle quali il fungo si può sviluppare.

1.2 Meccanismi di resistenza della pianta ospite (vite)

La resistenza di piante potenzialmente ospiti avviene mediante il riconoscimento di un patogeno ed l'attivazione dei meccanismi di difesa che bloccano l'infezione, in caso contrario

si parla di piante suscettibili in cui l'attacco da parte del patogeno porta alla comparsa di sintomi e danni.

In seguito alle interazioni che avvengono tra pianta e patogeno nel corso del processo di infezione, la pianta può attivare dei sistemi che innescano una risposta di difesa che costituisce una sorta di “sistema immunitario delle piante”. Tuttavia questi meccanismi avvengono secondariamente alle difese “passive” che possono essere dei costituenti della struttura della pianta o composti chimici che vengono normalmente sintetizzati all'interno delle cellule vegetali e possono avere un'attività antifungina nei confronti di un microrganismo patogeno, come composti fenolici o fenilpropanoidi tra i quali l'acido caffeico, cumarico e altri acidi idrossicinnamici, che si pensa contribuiscano a costituire e indurre la resistenza contro *B. cinerea* (Wurms *et al.*, 2003). Altri composti chimici preformati sono le saponine, i glucosidi cianogenici, i glucosinolati e lattoni insaturi.

Nel caso in cui *B. cinerea* non entri attraverso ferite o aperture naturali, deve penetrare attraverso le superficie della pianta: lo spessore e la composizione chimica delle cere epicuticolari, della cuticola e dell'epidermide, la presenza di strati suberificati o lignina, rappresentano una prima barriera alla sua penetrazione. Tuttavia il fungo possiede degli enzimi litici (pectinasi), che permettono la degradazione degli strati più esterni e l'ingresso del patogeno nei tessuti fino alla parete cellulare dove utilizza un'altra serie di enzimi (cellulasi, emicellulasi, pectinasi e proteasi), che degradano in maniera combinata le diverse componenti della parete.

L'interazione pianta-patogeno, comporta la produzione di AOS sia nella pianta che nel patogeno (Mayer *et al.*, 2001) ed entrambi possiedono un meccanismo antiossidativo per moderare gli effetti dannosi delle specie attive dell'ossigeno. Queste specie attive sono l'anione superossido, il radicale idrossile, l'ossigeno singoletto e l'acqua ossigenata e sono responsabili dell'ossidazione di composti presenti nelle cellule minacciando l'integrità e la funzionalità delle membrane, innescando una serie di reazioni a catena di perossidazione tali da alterare il doppio strato fosfolipidico, con formazione di altre specie chimiche radicaliche. La risposta della pianta all'infezione da parte di un patogeno incompatibile è chiamata “burst ossidativo” e comporta una produzione di AOS rapida e localizzata (Lamb e Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997) ai siti di infezione. Il perossido d'idrogeno è prodotto nelle cellule dell'ospite a livelli di membrana plasmatica e diffuso attraverso la parete nello spazio intercellulare (Prins *et al.*, 2000; Schouten *et al.*, 2002). Comunque, sembra che questo tipo di reazioni di difesa non blocchino le infezioni di *B. cinerea* e che portino alla rottura dei tessuti

della pianta causando marciume (Goodman *et al.*, 2002), il quale non è una reazione patogeno-derivata, ma una manifestazione di un danno fisico all'ospite. E' comprovato (e.g. Edlich *et al.*, 1989; Urbanek *et al.*, 1996; Von Tiedemann, 1997; Govrin e Levine, 2000) che la produzione di AOS supporta la colonizzazione dei tessuti della pianta da parte di organismi necrotrofi, come *B. cinerea*.

Il perossido d'idrogeno accumulato, si comporta da messaggero secondario, assieme ad altri messaggeri come l'acido salicilico, l'acido jasmonico, l'etilene e l'ossido nitrico e trasduce il segnale molecolare di attivazione dei geni di difesa per la sintesi di composti fenolici, lignina e fitoalessine. Ecco che le specie attive dell'ossigeno AOS, funzionano anche come molecole segnale e possono attivare la sintesi di antiossidanti nelle cellule dell'ospite.

Nelle piante sono presenti composti quali i flavonoidi, gli antociani, i carotenoidi, il glutathione, i tocoferoli e gli enzimi perossidasi, superossido dismutasi e catalasi che possono agire come antiossidanti (Sroka e Cisowski, 2003), fondamentali nel prevenire l'ossidazione delle membrane e dei lipidi.

Nelle cellule dell'ospite può avvenire una reazione di ipersensibilità HR (Hypersensitive Reaction) che è di tipo localizzato e comporta la produzione di AOS e altri composti tossici, insieme alla lignificazione delle pareti che creano un ambiente non favorevole allo sviluppo del patogeno.

Dat *et al.*, 2001 propongono che un aumento della quantità di perossido di idrogeno, da solo non è la diretta causa della morte cellulare, dovuto alla perossidazione dei lipidi che porta alla distruzione della membrana cellulare, ma permette la trasduzione del segnale molecolare di attivazione del processo di morte programmata delle cellule con conseguente necrosi dei tessuti. Più rapido è il riconoscimento pianta-patogeno e più veloce è la reazione di ipersensibilità. Questo permette di limitare il numero di cellule coinvolte e quindi limitare le conseguenti lesioni, innescando nel contempo una resistenza locale ristretta al sito di infezione e una resistenza sistemica.

Nella pianta di vite a livello fogliare e negli acini sono concentrati stilbeni, dei metaboliti ad azione antifungina che, come riportano alcuni studi, inibiscono la respirazione cellulare del fungo, probabilmente agendo da disaccoppianti e formando complessi proteina-fenolo (Hart, 1981). Esiste una correlazione positiva tra la loro attività biologica e l'idrofobicità, la loro capacità di formare complessi con le proteine e l'elettron-attrazione dei loro sostituenti (Pont e Pezet, 1990; Pezet e Pont, 1995).

Il resveratrolo è il più solubile e meno tossico stilbene e può essere immagazzinato ad alte concentrazioni nei vacuoli e nelle pareti delle cellule (Morales *et al.*, 2000) solo per essere attivato in seguito al contatto con il microrganismo. L'accumulazione di resveratrolo nelle bucce implica il suo ruolo nella protezione degli acini da agenti esterni quando la buccia è intatta. Per questo la capacità di cultivar di vite di accumulare resveratrolo è correlata positivamente con la loro tolleranza a *B. cinerea* (Douillet-Breuil *et al.*, 1999) e può essere usata come criterio nella selezione di varietà resistenti (Pool *et al.*, 1981; Creasy e Coffee, 1988; Sbaghi *et al.*, 1995).

Uno dei più abbondanti stilbeni è il *trans*-resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) che viene accumulato sottoforma di oligomeri che costituiscono le viniferine, in seguito a stress o infezioni da *B. cinerea*. In particolare la *trans*- ϵ -viniferina deriva dalla dimerizzazione ossidativa del resveratrolo dalla perossidasi delle piante (Langcake e Pryce, 1977; Langcake, 1981; Morales *et al.*, 1997, 2000) o dalla laccasi del fungo (Pezet, 1998; Schouten *et al.*, 2002).

Negli acini la concentrazione di resveratrolo diminuisce durante la maturazione per competizione di enzimi la cui attività è stimolata dalla maturazione per fornire precursori per l'accumulazione di antociani (Jeandet *et al.*, 1995). Tuttavia, gli acini mantengono la loro capacità di accumulare resveratrolo dopo esposizione a radiazioni UV a qualsiasi stadio di maturazione (Adrian *et al.*, 2000) e anche dopo raccolta (Cantos *et al.*, 2001).

Come riportato da Fregoni *et al.*, 2000 e Bavaresco *et al.*, 2001 sussiste una correlazione negativa tra la concentrazione di resveratrolo e la quantità delle fertilizzazioni azotate o applicazioni di fungicidi (Magee *et al.*, 2002), mentre è positiva con un incremento delle fertilizzazioni potassiche.

Un'altra classe di composti accumulati nei tessuti vascolari delle foglie e nei frutti preferibilmente nell'epidermide e nei semi (Porter e Schwartz, 1962; Bachmann e Blauch, 1979; Hills *et al.*, 1981; Jersch *et al.*, 1989; Prieur *et al.*, 1994; Prusky, 1996; Souquet *et al.*, 1996) sono le proantocianidine o tannini condensati che derivano dalla condensazione di uno o più derivati dei flavan-3,4-dioli. Alcuni studi accordano sulla proposta che le proantocianidine delle piante mantengono *B. cinerea* in uno stato quiescente ritardando lo sviluppo dei sintomi. Inoltre agiscono da inibitori competitivi della laccasi del fungo, impedendo in tal modo la detossificazione delle fitoalessine pterostilbeni.

Le proteine da patogenesi (PR proteins) rappresentano un insieme di proteine sintetizzate dalla pianta ospite in risposta a situazioni di stress biotico o abiotico. Per questo le infezioni da *B. cinerea* permettono l'induzione e l'accumulo nelle pareti cellulari e nei vacuoli delle PR

in molte piante (Van Loon, 1985) come risposta locale e sistemica, generalmente associata all'instaurarsi di una resistenza sistemica acquisita SAR (Systemic Acquire Resistance). Nei tessuti dei frutti il loro accumulo avviene in seguito a stimolazione con segnali patogenesi-derivati come l'acido salicilico (Derckel *et al.*, 1998).

Uno studio recente (Favaron *et al.*, 2009) ha evidenziato un meccanismo di detossificazione da parte di *B. cinerea*. In tale studio il patogeno, sia in prove *in vitro* che *in vivo*, utilizza l'azione della laccasi per ossidare i polifenoli e formare specie reattive che reagiscono con le proteine di patogenesi formando dei complessi insolubili.

1.3 Elicitori: induttori delle risposte di difesa

In seguito all'interazione con il fungo, la pianta può produrre degli elicitori che innescano una serie di segnali molecolari nelle cellule in grado di attivare la trascrizione dei geni di difesa. Un altro tipo di elicitori può derivare da segnali molecolari prodotti dal patogeno che sono riconosciuti dalla pianta e stimolano una risposta di difesa.

Vari tipi di molecole possono agire da elicitori, inclusi gli oligosaccaridi, le proteine, le glicoproteine, i lipidi e i glicolipidi (Boller, 1995; Côté, Ham, Hahn e Bergmann, 1998; Varnier *et al.*, 2009).

Il chitosano o suoi frammenti oligomerici, sono costituenti della parete cellulare dei funghi e dell'esoscheletro degli insetti, sono riconosciuti dalle cellule delle foglie di vite dove inducono una risposta di difesa e l'accumulo di fitoalessine, trans- e cis-resveratrolo ed ϵ -viniferina. Diversi studi hanno dimostrato che il chitosano ha un'attività antimicrobica, interferisce con la germinazione delle spore e la crescita del micelio di molti funghi fitopatogeni inclusi *Botrytis* spp. (Ben Shalom *et al.*, 2003; Rabea *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2009). Prove di trattamenti a foglie di vite con chitosano hanno evidenziato l'induzione di lipossigenasi e fenilalanina ammonia-liasi, che conferiscono forte protezione contro *B. cinerea*.

L'acido jasmonico che deriva dalla degradazione dell'acido linolenico ad opera delle lipossigenasi della pianta, è anche naturalmente presente nei semi degli acini (Kondo e Fukunda, 2001) e insieme al metil-jasmonato promuovono l'accumulazione di stilbeni (Krisa *et al.*, 1999) e le naturali difese dei grappoli.

Diversi autori riportano come l'acido salicilico e l'acido β -amminobutirrico inducano i meccanismi di difesa nelle foglie e nei grappoli di viti (Wen *et al.*, 2005). Gli oligosaccaridi stimolano i sistemi di difesa contro stress biotici e abiotici: tra questi si ritrovano gli

oligogalatturonidi (OGA) che derivano dalla parete cellulare delle piante, rilasciati in seguito all'aggressione da parte degli enzimi litici del patogeno e il β -(1,3)-glucano in grado, su vite (Azziz *et al.*, 2003), di indurre diverse reazioni di difesa conferendo resistenza a patogeni virali, batterici e fungini.

Lo studio sugli elicitori ha portato alla scoperta di altri composti di derivazione naturale che possono avere le stesse potenzialità di quelli precedentemente descritti. La laminarina, formata da una catena di β -glucano, derivata dalle alghe brune (*Laminaria digitata*) stimola le difese delle cellule di vite e delle foglie, l'accumulazione di fitoalessine e una serie di geni e proteine PR (da patogenesi). I pre-trattamenti delle foglie di vite con laminarina conferiscono una significativa resistenza contro *B. cinerea*. Inoltre, l'inoculazione fogliare con funghi del genere *Trichoderma* o batteri del suolo *Bacillus* sp. inducono nel primo caso i meccanismi di difesa delle piante (Elad, 2000; Hanson e Howell, 2004) mentre, nel secondo, l'accumulazione di resveratrolo e un aumento della resistenza a *B. cinerea* (Paul *et al.*, 1998). I microrganismi non patogeni stimolano nella pianta una resistenza sistemica indotta ISR (Induced Systemic Resistance) mentre, quelli patogeni una resistenza sistemica acquisita SAR (Systemic Acquire Resistance) (Van Loon, 2007).

E' stato dimostrato che i ramnolipidi, dei glicolipidi composti di acidi 3-idrossibutirrico legati attraverso β -glicosidi uniti a mono e di-ramnosi (Soberon-Chavez, Lépine e Déziel, 2005), a basse concentrazioni agiscono come tipici elicitori e potenziano le difese della pianta di vite stimolando un grande numero di geni in piante *in vitro* e le proteggono contro *B. cinerea*. I ramnolipidi da *Burkholderia plantarii* e *Pseudomonas aeruginosa* sono riconosciuti dalle cellule di pianta di vite pertanto si possono considerare come una categoria di (MAMPs Micorbe-Associated Molecular Patterns) (Mackey e McFall, 2006), cioè degli elicitori coinvolti nell'immunità non-specifica e la resistenza associata ha effetto contro un'ampia gamma di patogeni (Jones e Dangl, 2006; Bent e Mackey, 2007)

1.4 Mezzi chimici di difesa

La necessità di difendere le colture dai danni provocati dagli agenti di malattia e dai fitofagi ha portato alla nascita dei prodotti fitosanitari che hanno avuto un ruolo determinante nell'evoluzione dell'agricoltura. La prima esigenza era quella di distruggere ogni forma di malattia/danno attraverso l'impiego di prodotti chiamati di "prima generazione" a largo spettro d'azione ed elevata tossicità. Da questo ne sono derivati l'accumulo di composti tossici, come l'arseniato e il piombo, nell'ambiente e ripercussioni negative sia per la salute

umana che per la biocenosi presente all'interno degli agroecosistemi, rompendo gli equilibri presenti provocando:

- una sterilizzazione degli ambienti, selezionando ceppi di fitofagi/fitopatogeni più resistenti;
- la generale alterazione degli ambienti portando un impoverimento della fauna utile, meno resistente alle variazioni ambientali, con conseguente maggiore incidenza delle fitopatie.

Agli inizi del 1900 è stato introdotto il concetto di selettività per cui sono nati i prodotti di “seconda generazione” ma solo negli anni '70 si è iniziato ad analizzare le conseguenze di una ventennale politica fitoiatrica disastrosa per i problemi che aveva creato di natura tossicologica e ambientale. Si sono così diffusi i prodotti fitosanitari di “terza generazione” ed è stata sostituita la “lotta a calendario” in cui si trattava con calendari prefissati indipendentemente dall'infestazione, con la “lotta guidata” in cui al concetto di selettività è stato introdotto quello del controllo. L'azione del prodotto fitosanitario era mirata al fitofago/fitopatogeno e il trattamento era effettuato seguendo il concetto di “soglia economica di intervento” cioè quando il danno era inferiore al costo del trattamento e quindi intervenendo nel momento in cui il danno del patogeno diventava economicamente significativo. Si sono introdotte metodologie di campionamento e monitoraggio, come l'uso trappole sessuali o cromotropiche e di parametri climatici, per intervenire nel momento opportuno. Con questo tipo di approccio si è potuto permettere la sopravvivenza degli organismi utili e dei nemici naturali, oltre che il contenimento della quantità di prodotti fitosanitari utilizzati.

Una successiva evoluzione delle tecniche fitoiatriche hanno portato allo sviluppo della lotta integrata che mantiene saldi i criteri di soglie di intervento e introduce il concetto di priorità dei fattori naturali di limitazione. Si è cercato quindi di limitare l'uso di mezzi chimici a favore di tecniche alternative quali interventi agronomici (sistemazioni del terreno, diserbo, sistema di allevamento, potatura, concimazioni, irrigazioni, ecc.), mezzi fisici e meccanici, biologici e biotecnologici.

1.4.1 Mezzi chimici in viticoltura

Nel programma di difesa contro *B. cinerea* i criteri di lotta integrata hanno ridimensionato i trattamenti che vengono eseguiti solo quando le condizioni climatiche sono favorevoli al patogeno quindi in base alle condizioni di umidità e bagnatura. La regola dei 15/15 cioè 15°C e 15 ore di bagnatura è empirica ma permette insieme a modelli previsionali di stabilire se l'intervento deve essere effettuato o meno. Sono 4 gli stadi fenologici nei quali possono essere

eseguiti i trattamenti con fungicidi che corrispondono alle fasi di maggior suscettibilità al patogeno:

- A effettuato a fine fioritura per impedire la colonizzazione ai residui fiorali
- B in pre-chiusura grappolo per proteggere le parti interne del grappolo che non sono raggiunte dai successivi trattamenti
- C ad invaiatura
- D 3-4 settimane prima della raccolta.

I trattamenti A e C si effettuano solo quando c'è il rischio di avvio di infezioni latenti; si cerca quindi di far coincidere il trattamento A con il B eventualmente anticipando questo e il trattamento C posticipato alla prima precipitazione consistente. Il trattamento D è di solito indispensabile.

I prodotti antibotritici che è possibile utilizzare in vigneto sono numerosi e questo permette di alternarli per evitare la comparsa di resistenza ad uno specifico principio attivo da parte di *B. cinerea*. I principali gruppi comprendono le anilinopirimidine che consentono di proteggere in modo efficace il grappolo, tra questi il cyprodinil è molto persistente. Le dicarbossimidi hanno buona efficacia ma provocano la selezione di ceppi resistenti; le idrossianilidi come il fenhexamid. Questi prodotti sono dotati di azione preventiva, bloccante sul micelio ed eradicante sulle spore, ed inoltre non hanno nessuna azione antifermentativa. Le anilidi tra cui il boscadil e altri prodotti come il folpet hanno azione antifermentativa e vanno utilizzati, dopo invaiatura, con cautela. I sali di rame o altri rameici usati nella lotta antiperonosporica favoriscono l'irrobustimento dei tessuti.

1.5 Tecniche agronomiche preventive

La riduzione dei trattamenti chimici può avvenire sfruttando tecniche agronomiche che riducono i fattori di rischio d'infezione da parte di *B. cinerea*. Nell'impianto del vigneto si deve tenere in considerazione l'esposizione e il tipo di terreno. Un appezzamento in collina ben esposto e soleggiato risulta meno soggetto all'infezione rispetto ad un terreno in pianura o nel fondovalle e poco soleggiato in cui si verificano le condizioni di elevata umidità. Inoltre, la presenza di terreni che non permettono un buon ristagno idrico in seguito ad eventi piovosi, necessitano di impianti di drenaggio che permettano lo scolo delle acque. La scelta della varietà e del portinnesto sono importanti al fine di contenere la vigoria, la compattezza del grappolo e la densità della chioma. In questo contribuisce il sistema di allevamento che deve

garantire una buona aerazione dei grappoli evitando di creare microclimi umidi. Pratiche come il diradamento, la potatura estiva e la sfogliatura favoriscono l'arieggiamento.

Eccessive concimazioni azotate contribuiscono ad aumentare il rigoglio vegetativo, il numero di acini, la compattezza del grappolo e la formazione di pareti cellulari più sottili che rendono la pianta più vulnerabile all'attacco del patogeno. Per contro il calcio ha un ruolo fondamentale e aumenta la resistenza alle malattie. La maggiore o minore suscettibilità è legata allo spessore della cuticola e alla presenza di cere, alla forma degli acini o del grappolo e alla sua composizione chimica (antociani e composti fenolici) piuttosto che alle difese costitutive dell'ospite.

Una buona prevenzione si ottiene anche evitando la formazione di ferite o lesioni di diverso tipo (danni da grandine, spaccature da oidio, tignoletta o altri entomopatogeni, ecc.) che possono costituire la via d'ingresso per *B. cinerea*.

1.6 Difesa biologica

La necessità di ridurre l'impiego di tecnologie ad elevato impatto ambientale, che possono incidere negativamente sull'ambiente e sulla salute degli individui, ha contribuito alla diffusione di tecniche di difesa delle colture di tipo biologico. La lotta biologica prevede la totale abolizione dei prodotti di sintesi. Possono essere impiegati, oltre agli antagonisti, i prodotti fitosanitari di origine naturale regolarmente registrati in Italia dal Ministero della Salute. Come riportato dal Regolamento CE 834/2007 la produzione biologica è un sistema globale di gestione dell'azienda agricola e di produzione agroalimentare basato sull'interazione tra le migliori pratiche ambientali, un alto livello di biodiversità e la salvaguardia delle risorse naturali, al fine di ottenere prodotti con sostanze e procedimenti naturali. L'attenzione si è spinta alla salvaguardia, conservazione ed al potenziamento degli antagonisti naturali dei fitopatogeni presenti in un ambiente, in quanto il loro numero è andato riducendosi in seguito all'uso scorretto dei trattamenti chimici e alcune pratiche agricole. Vengono anche prodotti e immessi negli ambienti nemici naturali che sono andati "perduti" agevolando, così il ripopolamento.

Il controllo biologico indotto da microrganismi contro patogeni consiste in meccanismi di parassitismo (Wisniewski *et al.*, 1991; Elad, 1995; Howell, 2003), competizione (Blakeman, 1993; Elad *et al.*, 1994; Elad, 1996), induzione della resistenza delle piante (Korolev *et al.* 2008), produzione di composti inibitori (Nelson e Powelson, 1988; Edwards e Seddon, 1992) o modificazioni dell'ambiente (Edwards e Seddon, 1992).

L'uso di antagonisti produttori di antibiotici desta qualche preoccupazione per quanto concerne la sicurezza alimentare in caso di applicazioni sulle parti eduli. Pertanto la ricerca è indirizzata verso specie che competono attivamente con i patogeni per le risorse alimentari, ne degradano la parete e ne colonizzano le strutture vegetative e riproduttive con azione parassitaria, indicata come iperparassitismo.

Sulla superficie della pianta, i conidi o il tubetto germinativo di *B. cinerea* sono sensibili agli effetti di antibiotici ed enzimi litici prodotti dai microorganismi che possono inibire la germinazione e lisare il tubetto germinativo. La soppressione della malattia può essere basata sulla riduzione delle capacità saprofitiche del patogeno, la disseminazione delle spore, la virulenza o l'induzione di resistenza nella pianta ospite (Elad e Freeman, 2002).

L'attività competitiva degli agenti di biocontrollo BCA è spesso associata ad un antagonismo nei confronti del patogeno. *B. cinerea* è estremamente suscettibile alla competizione da parte di batteri, lieviti e funghi filamentosi perché necessita di risorse di nutrienti esogene come azoto, carbonio, macro e micro-elementi per la germinazione, crescita del tubetto germinativo e infezione. Per esempio, specie di *Pseudomonas* utilizzano più velocemente gli amminoacidi rispetto ai conidi di *B. cinerea* (Brodie e Blakeman, 1975).

Molti funghi comuni (*Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *E. nigrum*) e lieviti basidiomiceti (*Aureobasidium pullulans*) sono stati isolati da tessuti sui grappoli (Dugan *et al.*, 2002) e sono antagonisti di *B. cinerea* provocando la riduzione della germinazione dei conidi per competizione dei nutrienti.

Diversi tipi di lieviti (*Rhodotorula glutinis*, *Candida* spp., *Pichia membranifaciens*, *Kloeckerea apiculata*, *Saccharomyces* spp.) e yeast-like species (*A. pullulans* e *T. pullulans*) hanno dimostrato la loro efficacia contro *B. cinerea*. In particolare *Rhodotorula glutinis* (LS-11) e *Cryptococcus laurentii* (LS-28) sono antagonisti di *B. cinerea* in vigneti. L'azione dei lieviti è dovuta all'attività di glucanasi che ledono le ife del patogeno provocandone la devitalizzazione.

L'attività di batteri contro *B. cinerea* in tessuti dell'uva include *Bacillus* spp. (Ferreira, 1990; Krol, 1998; Paul *et al.*, 1998) tra cui *Bacillus circulans* (Paul *et al.*, 1997), *Brevibacillus brevis* (precedentemente *Bacillus brevis*; Seddon *et al.*, 2000), *Bacillus subtilis* (Esterio *et al.*, 2000), *Pseudomonas fluorescens* (Krol, 1998), e *Serratia liquefaciens* (Whiteman e Stewart, 1998).

L'inoculazione fogliare per 2 mesi in Chardonnay di batteri del suolo *Bacillus* sp. induce l'accumulazione di resveratrolo e aumenta la resistenza in seguito all'inoculazione con *Botrytis* sp. (Paul *et al.*, 1998). Tra i batteri, *Bacillus subtilis* può produrre più di 24 sostanze

antifungine con sostanziale varietà di strutture (Stein, 2005). 14 composti volatili sono stati identificati. Per questo *B. subtilis* ha un'importante ruolo nel biocontrollo delle malattie fungine dopo-raccolta (Toure' *et al.*, 2004). In vitro la germinazione delle spore e l'elongazione del tubetto germinativo di *B. cinerea* sono inibiti dai composti volatili prodotti da *Bacillus subtilis* JA. La natura antifungina di alcuni dei composti volatili prodotti da *Bacillus subtilis* JA come 2-etil-esanolo, 2,4-bis(2-metilpropil)-fenolo, 4-idrossibenzaldeide e 2-nonanone, è già stata dimostrata in alcuni patogeni (Fernando *et al.*, 2005; Gershon *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2005; Almenar *et al.*, 2007).

2-Ethyl-hexanol	9-Methyl-nonadecane
2-Nonanone	2,6,11,15-Tetramethyl-hexadecane
2,4-bis(2-Methylpropyl)-phenol	10-Methyl-nonadecane
4-Hydroxybenzaldehyde	10-Methyl-eicosane
Ammonium acetate	2,6,10-Trimethyl-tetradecane
Tetramethyl-pyrazine	2,6,10,15-Tetramethyl-heptadecane
1,2,4,5-Tetramethyl-benzene	8-Hexyl-pentadecane
The 14 compounds were identified by comparison of mass spectral data with those in NIST/EPA/NIH library	

Tabella 1. Composti volatili identificati generati da *Bacillus subtilis* JA da (Hua Chen *et al.*, 2007).

Lipopeptidi LP prodotti dal genere *Bacillus* sono “antagonisti” e “soppressori” inibendo la crescita dei patogeni, ma anche “diffusori” facilitando la colonizzazione e come “immuno-stimolatori” rinforzando la potenziale resistenza dell'ospite.

L'eterogeneità dei LP di *Bacillus* è dovuta al tipo e sequenza dei residui amminioacidici, la natura della ciclizzazione dei peptidi e la natura, lunghezza e ramificazione delle catene di acidi grassi.

I lipopeptidi sono divisi in 3 famiglie:

- surfactin ha attività emolitiche, antivirali, antimicoplasmici e antibatteriche ma interessante non dà segno di fungo-tossicità.
- iturin sono fortemente emolitici e *in vitro* hanno dimostrato una forte attività antifungina contro una grande varietà di lieviti e funghi ma solo limitate attività antibatteriche e non antivirali. La fungo-tossicità dipende quasi certamente dalle loro proprietà di permeabilizzazione delle membrane. Comunque il meccanismo si basa sulla perturbazione

osmotica a causa della formazione di pori ione-conduttori e non sulla distruzione e solubilizzazione delle membrane che è causata da surfactin.

- fengycin ha una minore attività emolitica di surfacin e iturin, ma ha una forte azione fungo-tossica specialmente contro i funghi filamentosi. Il meccanismo di azione è meno conosciuto rispetto alle altre due famiglie di lipopeptidi, ma interagiscono anche prontamente con lo strato lipidico e alcuni ritengono e alcuni mantengono un alto potenziale per alterare la struttura della membrana delle cellule e la permeabilità in maniera dose-dipendente.

Una diretta evidenza del ruolo di fengycin nella riduzione di malattie, deriva da esperimenti dimostrano la capacità del ceppo S499 di proteggere le mele ferite contro la malattia botrite causata da *Botrytis cinerea*. Il ruolo è stato dimostrato dall'efficace controllo della malattia purché i trattamenti sui frutti con estratti di lipopeptidi-aricchiti e dalla scoperta *in situ* delle quantità inibenti di fengycin.

I lipopeptidi fengycin e surfactin possono interagire con le cellule delle piante come una determinante via laterale batterica per una risposta immunitaria attraverso la stimolazione all'induzione del fenomeno della resistenza sistemica (ISR).

Applicazioni in campo di *Ulocladium* spp. hanno ridotto il marciume causato da *Botrytis* nei grappoli fino al 67% in diverse regioni viticole in Germania (Lennartz *et al.*, 1998; Schoene e Kohl, 1999; Schoene *et al.*, 2000) e simili livelli di controllo dei marciumi nei grappoli è stato riportato da studi con U385 in vigneti francesi (Roudet e Dubos, 2001).

L'efficacia di *U. oudemansii* è dovuta ad un'aggressiva colonizzazione dei tessuti fiorali della vite prima della chiusura dei grappoli (Elmer *et al.*, 2003) per questo la sua applicazione in tale fase ha ridotto l'incidenza dell'attacco di *B. cinerea* riducendone il marciume (Reglinski e Kingston, 2001; Elmer *et al.*, 2003). Studi condotti sulla varietà Chardonnay hanno dimostrato come *U. oudemansii* sopprime la crescita e lo sviluppo di *B. cinerea* in tessuti necrotici, anche quando il patogeno ha un vantaggio di 8 h. Il prodotto commerciale a base di *U. oudemansii* è il Botry-Zen.

Azioni della specie *Trichoderma* sono antibiosi (Cutler *et al.*, 1996; Cooney *et al.*, 1997; Rey *et al.*, 2001), competizione (Elad *et al.*, 1999), micoparassitismo (Dubos *et al.*, 1982; Papavizas, 1985) e induzione dei meccanismi di difesa delle piante (Elad, 2000; Hanson & Howell, 2004).

Trichodex è il prodotto che è composto da *T. harzianum* T39 ed è formulato specificatamente per il controllo di *B. cinerea* su vite (Elad, 2001) e diverse colture in serra. Come riportato da prove in vigneti il prodotto è stato usato alla fine della fioritura, chiusura grappolo, invaiatura,

2-3 settimane dopo invaiatura in quantità di 4 kg ha⁻¹. L'efficacia diminuiva nell'intervallo tra l'ultima applicazione prima della raccolta e la vendemmia. *T. harzianum* ha la capacità di colonizzare i residui fiorali e i tessuti verdi delle bacche essendo dei potenziali siti di latenza dell'infezione di *B. cinerea* (Holz *et al.*, 1997, 2003).

Utilizzando T-22 nell'uva era equivalente dell'utilizzare programmi di antibotritici standard (Harman *et al.*, 1996; Wilson, 1997). Da prove effettuate con isolati di *Trichoderma harzianum* (codice S10B e P1) nell'uva da tavola cv. Thompson Seedless in Cile, ne è derivato che l'isolato P1 è efficiente contro *B. cinerea* come il fungicida dicarboximide, vincolzin. (Latorre *et al.*, 1997).

Sentinel è un nuovo biofungicida che utilizza *Trichoderma atroviride* (LC52) per il controllo di *B. cinerea* nell'uva ed è autorizzato in Nuova Zelanda. Paragonato a Trichodex e Dicarboximide riesce a bloccare la comparsa di marciume nei grappoli. Con *T. viride* è prodotto Trichopulvin 25 PU che è stato valutato in campo in grappoli in crescita in Romania (Sesan *et al.*, 1999).

Produzioni cellulari di *Trichoderma viride* inducono l'accumulazione di resveratrolo in colture di cellule di acini (Calderon *et al.*, 1993) e l'accumulazione di isozima perossidasi nelle foglie e fusti di vite (Barcelo *et al.*, 1996), che stimolano le risposte di difesa delle piante, inducendo una resistenza sistemica ISR.

Cañamás *et al.* (2011) hanno effettuato uno studio in cui è stato utilizzato l'agente di biocontrollo *Candida sake* CPA-1 ed è stata dimostrata la sua capacità di ridurre le infezioni di *B. cinerea*. Quando combinato con Fungicover un coadiuvante che aiuta a migliorare la persistenza delle cellule di *C. sake* all'ospite, l'efficacia è comparabile ai trattamenti con fungicidi tradizionali.

I biofungicidi consistono prevalentemente in trattamenti preventivi e generalmente non sono efficaci dopo l'infezione (Whipps e Lumsden, 2001) così, devono essere applicati quando le condizioni climatiche favoriscono la colonizzazione della vite da parte dei BCA (agenti di biocontrollo), prima di periodi di elevata vulnerabilità della pianta, come la fioritura o dopo l'invaiatura (Whipps e Lumsden, 2001).

Variazioni delle condizioni climatiche portano alla diminuzione dell'efficacia nella colonizzazione dei BCA (Elad e Stewart, 2004). Molti biofungicidi, in contrasto con i fungicidi sintetici, richiedono il contatto con il patogeno. L'efficacia del controllo della malattia è in genere ridotto dopo la chiusura del grappolo, quando la penetrazione del biofungicida diventa inefficiente. Dopo questo momento, è improbabile che i BCA persistano

all'interno del grappolo fino alla raccolta (Holz e Volkmann, 2002), nel momento in cui i grappoli sono più suscettibili all'infezione (Nicholas *et al.*, 1994).

Dopo la chiusura del grappolo, gli agenti di biocontrollo possono indurre le risposte di difesa della pianta attraverso meccanismi sistemici che portano alla soppressione del patogeno senza il diretto contatto con questo.

1.7 Estratti naturali

La ricerca è indirizzata alla scoperta di composti di derivazione naturale che possono inibire lo sviluppo di *Botrytis cinerea* *in vitro* ed *in vivo*, su piante e frutti. Questo è un passo importante nell'ottenimento di prodotti alternativi ai fungicidi sintetici, a basso impatto ambientale e sicuri per la salute umana.

Recenti studi (Hassani *et al.*, 2012) hanno confermato i risultati di altri ricercatori riportando come diversi oli essenziali abbiano attività antifungine (Wilson *et al.*, 1997; Montes e Carvajal, 1998; Reddy *et al.*, 1998; Ranasinghe *et al.*, 2002; Ziedan e Farrag, 2008; Tzortzakis, 2009; Abdolahi *et al.*, 2010b; Xing *et al.*, 2010). Inoltre, nella chimica industriale si sta ponendo l'attenzione per il loro uso viste le proprietà antibatteriche, antiossidanti e bioregolatrici (Burt e Reinders, 2003; Holley e Patel, 2005).

Alcuni ricercatori credono che le proprietà antifungine degli oli essenziali di pianta, dipendono dal tipo e quantità dei composti fenolici presenti (Dean *et al.*, 1995; Dorman e Deans, 2000). I composti fenolici, come le frazioni idrofobiche degli oli essenziali, dissolvono la parte idrofobica delle membrane citoplasmatiche, disintegrano la membrana esterna e aumentano la permeabilità delle membrane citoplasmatiche all'adenosin trifosfato ATP di cellule del patogeno e, alla fine, le portano alla morte (Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 1999).

Rasooli e Owlia (2005) hanno dimostrato che l'elevata attività antifungina dei composti fenolici causa seri danni alle pareti cellulari, membrane e agli organelli cellulari come i mitocondri dei funghi.

Da prove condotte su albicocca i frutti spruzzati con olio essenziale di *Thymus vulgaris*, *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Carum copticum* presentano una riduzione dell'incidenza e della gravità della malattia. In particolare con *T. vulgaris* è risultata ridotta la gravità e con *E. caryophyllata* l'incidenza della malattia. I maggiori composti chimici presenti trovati come costituenti di questi oli essenziali sono il timolo, l'eugenolo e la cinnamaldeide.

Essential oil	Component	Percentage (%)
<i>T. vulgaris</i>	Thymol	37.55
	γ -Terpinene	15.08
	Carvacrol	10.8
	p-Cymene	10.56
<i>E. caryophyllata</i>	Eugenol	48.76
	Eugenyl acetate	27.84
	Trans-caryophyllene	16.83
	α -Humulene	2.38
<i>C. zeylanicum</i>	Cinnamaldehyde	90.33
	p-Methoxy cinnamic aldehyde	2.34
	α -Copaene	1.18
<i>C. copticum</i>	Thymol	50.88
	γ -Terpinene	16.04
	p-Cymene	15.35
	Carvacrol	7.97

Tabella 2. Composti chimici presenti in oli essenziali da (Abbas Hassani *et al.*, 2012).

Una serie di oli estratti da diversi tipi di piante inibiscono *in vitro* la crescita di micelio di *B. cinerea* (vedi anche tabella 3):

olio di timo (*Thymus capitatus*) (Arras *et al.* 1995) e (*Thymus vulgaris*), salvia (*Silva officinalis*) (Carta *et al.*, 1996), maggiorna (*Oreganum syriacum*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), citronella (*Cymbopogon citratus*) (Shimoni *et al.*, 1993), tea tree (*Melaleuca alternifolia*), melissa (*Melissa officinalis*), menta piperita (*Mentha piperita*), menta poggio (*Mentha pulegium*), gelsomino (*Jasminum grandiflorum*), legno di rosa (*Rosa* spp.), arancio amaro (*Citrus aurantium* sub. *aurantum*), (*Gaultheria procumbens*), issopo (*Hyssopus officinalis*) (Cutler *et al.*, 1996), rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), (*Tagetes minuta*), manuka (*Leptospermium scoparium*), (*Prostanthera rotundifolia*), garofano (*Eugenia caryophyllata* o *Syzygium aromaticum*), oliva e sesamo.

Species	Common name†	Level of control obtained	Medium‡	Target of inhibition§	Reference¶,††
<i>Aegle marmelos</i> L.	Bael	High	GM	M	8
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Billygoat-weed, chick weed, goatweed, whiteweed	Moderate	GM	M	8
<i>Amomum subulatum</i> Roxb.	Big cardamom	Moderate	GM	M	8
<i>Anethum graveolens</i> L.	Dill	High	GM	M, G	3, 6
<i>Azadirachta indica</i> A.	Neem tree	Moderate	GM	M	8
<i>Caesulia axillaries</i> Roxb.	NA	Very high	GM	M	8
<i>Callistemon lanceolatus</i> DC.	Bottlebrush, red bottlebrush bush	Low	GM	M	8
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Epazote, wormseed, Jesuit's tea, Mexican tea	Very high	GM	M	8
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> L.	Cinnamon	Very high	V	G	11
<i>Citrus medica</i> L.	Citron	Low	GM	M	8
<i>Citrus reticulata</i> L.	Mandarin, satsuma	Low	GM	M	8
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Coriander	High	V	M	6

Continua

Species	Common name†	Level of control obtained	Medium‡	Target of inhibition§	Reference¶,††
<i>Cryptocarya massoia</i> L.	Massoi	Very high	Pg	S	1, 10
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cumin	High	GM	M	3
<i>Cymbopogon citrates</i> DC.	Citronella grass, lemongrass	Very high	GM, V	M, S, G	6, 8, 9
<i>Cymbopogon martini</i> Stapf	Palmarosa	Very high	V	G	11
<i>Elettaria cardamomum</i> Maton.	Cardamomum green	High	GM	M	8
<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.	Lemon-scented gum, spotted gum, lemon eucalyptus	Very high	GM	M	8
<i>Eupatorium cannabinum</i> L.	Hemp-agrimony, hemp agrimony	Very high	GM	M	8
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Fennel	Very high	V, GM	M, G	5, 7
<i>Heteranthemis viscidiflora</i> Schott.	Sticky oxeye	Very high	GM	M	3
<i>Hyptis suaveolens</i> L.	Pignut	Low	GM	M	8
<i>Jasminum grandiflorum</i> L.	Catalonian jasmine, Spanish jasmine, royal jasmine	Moderate	GM	M, G	1
<i>Laurus nobilis</i> L.	Bay laurel, bay leaf, true laurel, laurel, sweet bay	High	GM	M	3
<i>Lavandula angustifolia</i> L.	Common lavender, English lavender, true lavender	Moderate	GM	M	1, 4
<i>Lawsonia inermis</i> L.	Henna, hina	Very high	GM	M	8
<i>Lepiospermium scoparium</i> Forst	Manuka, tea tree	Moderate	GM	M, G	1
<i>Lippia alba</i> Mill N. B.	Bushy lippia, verbena white, white lippia	Low	GM	M	8
<i>Melaleuca alternifolia</i> L.	Narrow-leaved paperbark, narrow-leaved tea-tree, narrow-leaf ti-tree, snow-in-summer	Moderate	GM, V	M, G	1
<i>Melaleuca leucodendron</i> L.	Cajaput	Low	GM	M	8
<i>Mentha cardiaca</i> L.	Spearmint, scotch spearmint	Very high	GM	M, G	6
<i>Mentha piperita</i> L.	Peppermint	High	V	G	11
<i>Mentha pulegium</i> L.	Pennyroyal	Moderate	GM	M	2, 4
<i>Mentha</i> spp.	Mint	Very high	V	G	7
<i>Murraya koenigii</i> L.	Curry Tree, curry-leaf tree, kadipatta, karivepallai	High	GM	M	8
<i>Nepeta hindostana</i> Roth Haines	Cal mint	Moderate	GM	M	8
<i>Ocimum basilicum</i> L. (cv.)	Cinnamon basil	High	GM	M, G	6
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Basil, basilico, bush basil, common basil, sweet basil, wild basil.	High	GM, V	M, G	6, 7, 8
<i>Ocimum canum</i> Sims	Hairy basil	Very high	GM	M	8
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	African basil	Very high	GM	M	8
<i>Ocimum sanctum</i> L.	Holy basil	Very high	GM, Pg	M, G	8
<i>Origanum dictamnus</i> L.	Dictamnus	Very high	GM	M	4
<i>Origanum majorana</i> L.	Marjoram	High	GM	M	4
<i>Origanum vulgare</i> L.	Oregano	Very high	GM, V, Pt	M, G	2, 4, 6, 11
<i>Pelargonium roseum</i> Willd.	Rose geranium	Very high	V	G	7
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Aniseed, anise	Very high	V	G	7
<i>Prostanthera rotundifolia</i> R. Br.	Australian mint, native mint, roundleaf mint bush	High	GM	M, G	1
<i>Prunus persica</i> L.	peach	Very high	GM, Pg	M, G	8
<i>Rosa</i> spp.	Bois de rose	Moderate	GM	M, G	1
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Rosemary	Low	GM	M	1, 4, 6
<i>Salvia fruticosa</i> L.	Greek sage	Moderate	GM	M	4, 5
<i>Lavandula angustifolia</i> L.	Common lavender, English lavender, true lavender	Moderate	GM	M	1, 4

Continua

Species	Common name†	Level of control obtained	Medium‡	Target of inhibition§	Reference¶,††
<i>Lawsonia inermis</i> L.	Henna, hina	Very high	GM	M	8
<i>Leptospermium scoparium</i> Forst	Manuka, tea tree	Moderate	GM	M, G	1
<i>Lippia alba</i> Mill N. B.	Bushy lippia, verbena white, white lippia	Low	GM	M	8
<i>Melaleuca alternifolia</i> L.	Narrow-leaved paperbark, narrow-leaved tea-tree, narrow-leaf ti-tree, snow-in-summer	Moderate	GM, V	M, G	1
<i>Melaleuca leucodendron</i> L.	Cajaput	Low	GM	M	8
<i>Mentha cardiaca</i> L.	Spearmint, scotch spearmint	Very high	GM	M, G	6
<i>Mentha piperita</i> L.	Peppermint	High	V	G	11
<i>Mentha pulegium</i> L.	Pennyroyal	Moderate	GM	M	2, 4
<i>Mentha</i> spp.	Mint	Very high	V	G	7
<i>Murraya koenigii</i> L.	Curry Tree, curry-leaf tree, kadipatta, karivepallai	High	GM	M	8
<i>Nepeta hindostana</i> Roth Haines	Cal mint	Moderate	GM	M	8
<i>Ocimum basilicum</i> L. (cv.)	Cinnamon basil	High	GM	M, G	6
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Basil, basilico, bush basil, common basil, sweet basil, wild basil.	High	GM, V	M, G	6, 7, 8
<i>Ocimum canum</i> Sims	Hairy basil	Very high	GM	M	8
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	African basil	Very high	GM	M	8
<i>Ocimum sanctum</i> L.	Holy basil	Very high	GM, Pg	M, G	8
<i>Origanum dictamnus</i> L.	Dictamnus	Very high	GM	M	4
<i>Origanum majorana</i> L.	Marjoram	High	GM	M	4
<i>Origanum vulgare</i> L.	Oregano	Very high	GM, V, Pt	M, G	2, 4, 6, 11
<i>Pelargonium roseum</i> Willd.	Rose geranium	Very high	V	G	7
<i>Pimpinella anisum</i> L.	Aniseed, anise	Very high	V	G	7
<i>Prostanthera rotundifolia</i> R. Br.	Australian mint, native mint, roundleaf mint bush	High	GM	M, G	1
<i>Prunus persica</i> L.	peach	Very high	GM, Pg	M, G	8
<i>Rosa</i> spp.	Bois de rose	Moderate	GM	M, G	1
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Rosemary	Low	GM	M	1, 4, 6
<i>Salvia fruticosa</i> L.	Greek sage	Moderate	GM	M	4, 5
<i>Salvia officinalis</i> L.	Broadleaf sage, common sage, culinary sage, Dalmatian sage, garden sage, kitchen sage, purple sage, red sage	Moderate	GM	M, G	6
<i>Syzygium aromaticum</i> L.	Clove	High	GM, V	M, G	1, 11
<i>Thymbra spicata</i> L.	Black thyme	High	GM	M	3
<i>Thymus capitatus</i> L.	Thyme	Very high	GM, V, Pg, Pt	M, G	1, 4, 6, 10
<i>Thymus glandulosus</i> Lag.	NA	Very high	GM	M	2
<i>Thymus zygis</i> Loebl.	NA	Very high	V	G	11
<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.	Ginger cassumunar, zingiber	Very high	GM	M	8
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Garden giner, ginger	Very high	GM, Pg	M, G	8

†NA, not applicable.

‡GM, growth medium (Potato Dextrose Agar [PDA]); V, volatile/vapour in lab on growth medium; Pg, suppressed disease in grape; Pt, suppressed disease in tomato.

§M, mycelium; G, germination; S, sporulation.

¶1, Antonov et al. (1997); 2, Bouchra et al. (2003); 3, Chebli et al. (2004); 4, Daferera et al. (2003); 5, Ozcan (2003); 6, Plotto et al. (2003); 7, Tanović et al. (2005); 8, Tripathi et al. (2008); 9, Tzortzakos and Economakis (2007); 10, Walter et al. (2001); 11, Wilson et al. (1997).

††Studies by Plotto et al. (2003) and Tripathi et al. (2008) examined post-harvest disease.

Tabella 3. Lista di alcuni oli essenziali testati contro *Botrytis cinerea*, il livello di controllo ottenuto (molto alto, alto, moderato e basso), il terreno in cui è stato testato e il target di inibizione (M, micelio; G, germinazione e S sporulazione) da (Jacometti *et al.*, 2010).

L'olio di timo e massoialactone, un derivato dalla corteccia di un albero *Cryptocarya massoia*, hanno inibito l'infezione di *B. cinerea* nei grappoli e nelle foglie *in planta* (Walter *et al.*, 2001).

In altri studi l'olio di timo ha inibito completamente la germinazione dei conidi e la crescita del tubetto germinativo alla più bassa concentrazione testata di 0.1%. Alla stessa concentrazione *Eugenia caryophyllata* ha ridotto la germinazione e la crescita tubetto germinativo, mentre l'olio derivato da *Prostanthera* in misura inferiore. Con 1% e 10% di concentrazione la riduzione della germinazione è aumentata. Alla concentrazione di 0,25% si è riscontrato un effetto fungostatico contro *B. cinerea* da parte dell'olio di timo, chiodi di garofano e *Prostanthera rotundifolia*.

Prove in campo, trattando i grappoli una settimana prima della raccolta, hanno dimostrato come l'olio di *Eugenia caryophyllata* sia efficace contro lo sviluppo di *B. cinerea*.

Gli oli essenziali possono essere usati per ritardare il deterioramento degli acini dopo la raccolta in seguito alla presenza di *B. cinerea*. Usando trattamento con oli essenziali di basilico (*Ocimum sanctum*), *Prunus persica* o zenzero (*Zingiber officinale*) la comparsa del deterioramento risulta dopo 8, 9 e 10 giorni, rispettivamente, mentre nel controllo dopo 4 giorni (Tripathi *et al.*, 2008). In seguito a trattamenti su uva da tavola con gli oli essenziali di eugenolo o timolo si è riscontrata la riduzione del numero degli acini marcescenti dopo 56 giorni di conservazione a 1°C e 3 giorni di durata (del prodotto) da 50% nel controllo a 10-22% (Valero *et al.*, 2006). Grappoli di uva da tavola con inoculo di *B. cinerea*, che sono stati spruzzati con oli naturali di timo (*Thymus vulgaris*) e santoreggia estiva (*Satureja hortensis*), risultano avere una riduzione della gravità della malattia dopo 60 giorni di conservazione a 0°C (Abdolani *et al.*, 2010). Questi oli essenziali dimostrano un diverso grado di inibizione nella crescita *in vitro* di *B. cinerea*. Vapori di carvacolo un componente dell'olio essenziale di origano (*Origanum vulgare*) inibiscono completamente la crescita di *B. cinerea* su terreno PDA e diminuiscono il deterioramento dei singoli acini da tavola mantenuta a 25°C per 4 giorni da 93% nel controllo a 6% quando esposti alle più alte concentrazioni (Martínez-Romero *et al.*, 2007).

Concentrazioni alte sopra l'1% possono avere un'applicazione non economica per le colture in campo, inoltre alcuni estratti sono disponibili in piccole quantità. Possono comparire problemi di citotossicità quando questi estratti sono applicati su tessuti di piante viventi. Ulteriori studi *in vivo* sui diversi tipi e differenti concentrazioni di oli essenziali sono necessari per trovare gli oli essenziali efficaci e le giuste concentrazioni sicure, a minor tossicità e senza residui per l'uomo e l'ambiente.

Un estratto di foglia derivato da *Reynoutria sachalinensis* registrata come Milsana (Biofa AG, Germania) è stata utilizzata in vigneti in Germania tra il 1999 e il 2001 trattando ogni 7-10 giorni ha ridotto l'incidenza di *B. cinerea* dello stesso grado o migliore che con zolfo o agenti contenenti rame FW 450 (Dow Agro, USA; Schmitt *et al.*, 2002).

In USA 4 applicazioni di Milsana applicato tra pre-chiusura grappolo e la raccolta, ha ridotto il marciume agli acini del 50 % (Schilder *et al.*, 2002). E' stato riscontrato che l'uso di questo estratto può alterare il contenuto di resveratrolo negli acini (Jeandet *et al.*, 1996, Jeandet *et al.*, 2000) e ridurre le popolazioni di alcuni predatori di entomoparassiti.

Croplife (Croplife, Canberra, Australia) un estratto di agrume e noce di cocco, quando applicato con GNS Plantfood (GNS, Milan, OH, USA), un fertilizzante fogliare, ha causato una moderata soppressione di *B. cinerea* in vigneti prova in MI, USA (Schilder *et al.* 2002).

Estratto di semi di pompelmo GSE è un prodotto commerciale derivato dai semi e dalla polpa del pompelmo (*Citrus paradisi* Macf. Rutaceae). E' un estratto naturale a largo spettro d'azione e battericida (Coombe, 1989; Reagor *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005), fungicida (Heggors *et al.*, 2002), antivirale e antiparassitario (Ionescu *et al.*, 1990; Tirillini, 2000). E' sicuro per l'ambiente senza tossicità per l'uomo o gli animali alle concentrazioni efficaci (Ionescu *et al.*, 1990). Sono state effettuate delle prove su *Vitis vinifera* cv. Redglobe dalle quali si è visto che la germinazione di spore di *B. cinerea* è inibita nel modo migliore dopo un'esposizione di 60 s a 25°C a 0,5% GSE, riducendo l'andamento della germinazione a 14%. La combinazione di GSE con chitosano ha permesso una riduzione della germinazione delle spore di *B. cinerea* e una riduzione della crescita radiale del micelio su piastre di agar, indicando un effetto antifungino combinato. Tuttavia il chitosano da solo non è così efficace come la formulazione contenete GSE. La minima concentrazione inibente (MIC) di chitosano riportata per *B.cinerea* era 10 ppm (Rabea *et al.*, 2003). Il GSE è stato utilizzato anche su grappoli raccolti con lo scopo di controllarne il deterioramento in fase di conservazione ed è risultato che il numero di acini deteriorati è ridotto di circa 1/3 rispetto al controllo (Xu *et al.*, 2007). Lo stesso risultato è stato ottenuto quando gli acini erano infettati artificialmente con *B. cinerea* (18 acini infetti nella prova con il trattamento GSE e 65 nel non trattato) (Xu *et al.*, 2007).

Studi in campo hanno permesso di affermare che applicazioni pre-raccolta di chitosano 1%, 21 e/o 5 giorni prima della raccolta, riducono la gravità del marciume agli acini del 55% su uva da tavola (cv. Italia) comparati con i controlli non trattati (Romanazzi *et al.*, 2002).

Chitosano in questo studio ha direttamente inibito la crescita di *B. cinerea* in colture liquide e ridotto le lesioni causate da *B. cinerea* quando applicato su foglie di Chardonnay prima

dell'inoculazione del patogeno. In queste prove è risultato che c'è un'inibizione della germinazione e della crescita di *B. cinerea* dose-dipendente, in media con una concentrazione di chitosano di circa 0,016 g L⁻¹, che completa la soppressione del fungo a concentrazioni di 0,125 g L⁻¹.

Il trattamento in isolati di foglie di vite ed acini di uva con estratti da compost derivati da concime animale o vegetale, hanno ridotto l'incidenza di *B. cinerea* (Ketterer *et al.*, 1992; Elad e Shtienberg, 1994). La loro efficacia era aumentata quando gli estratti venivano aggiunti con caseina e olio di pino e l'eliminazione della malattia era quasi uguale a quella ottenuta con fungicidi convenzionali (Ketterer *et al.*, 1992).

Composti naturali isolati da piante con proprietà antifungine includono terpenoidi, composti aromatici, alifatici e contenenti azoto, lecitine e polipeptidi (Grayer e Harbone, 1994; Cowan, 1999). Alcuni di questi hanno attività contro *B. cinerea*. Per esempio, la germinazione dei conidi di *B. cinerea* è inibita da sakuranetin, un flavonoide isolato dalla superficie di *Ribes nigrum* (Grayer e Harbone, 1994).

Anche resveratrolo, uno stilbene prodotto da *Vitis* spp., inibisce l'espansione dell'infezione di *B. cinerea* (Langcake e McCarthy, 1979), mentre il naturale diterpenoide acido 3 β -hydroxy-kaurenoic, ottenuto dagli essudati resinosi di *Pseudognaphalium vira vira*, presenta un'attività fungo tossica contro *B. cinerea* (Cotoras *et al.*, 2004).

Un'importante classe di composti antifungini sono le saponine che sono spesso presenti in alte concentrazioni in piante sane e sono implicate nel determinare la resistenza delle piante agli attacchi da parte di funghi (Morrissey e Osbourn, 1999).

Saponine presenti nella parte esterna del pseudo-cereale quinoa, *Chenopodium quinoa* Willd., presente in Perù, Bolivia ed Ecuador, sono state studiate per valutare le loro proprietà contro la germinazione di micelio e conidi di *B. cinerea*. Il trattamento alcalino di queste saponine risultava formare derivati di saponine più idrofobici che potevano avere una più alta affinità con gli steroli presenti nelle membrane cellulari del fungo. Nelle prove che contenevano saponine trattate con alcali si è evidenziato un effetto inibitorio sulla germinazione dei conidi rispetto alle saponine di quinoa non trattate, che avevano poco effetto nell'inibire la crescita del micelio di *B. cinerea* e nessun azione nel bloccare la germinazione dei conidi. Solo in presenza di saponine trattate con alcali la membrana plasmatica di *B. cinerea* risultava permeabile probabilmente a causa delle interazione tra le prime e gli steroli delle membrane del fungo, causando la perdita dell'integrità delle membrane e la formazione di pori trans-membranali.

I flavonoidi e la classe dei polifenoli, inducono la protezione delle piante contro le infezioni microbiche (Harbone e Williams, 2000) da prove condotte *in vitro*.

Fenoli e catechine isolate da estratti crudi di acini della varietà di Pinot nero sono risultati essere attivi contro *B. cinerea* inibendo la laccasi e la germinazione dei conidi mantenendo il fungo quiescente. Inoltre sembrano impedire lo sviluppo di malattie attraverso diversi meccanismi che causano l'inibizione di enzimi fungini extracellulari (cellulasi, pectinasi, laccasi, xilanasi, ecc.), l'inibizione di fosforilazioni ossidative fungine, di nutrienti (complessazione di metalli, insolubilizzazione di proteine) e attività antiossidanti in tessuti delle piante.

Proprietà lipofile e la presenza di gruppi idrossilici in fenoli sembrano avere un ruolo predominante nella loro attività antifungina, permettendo rispettivamente la penetrazione di membrane biologiche e il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa.

Alcuni composti fenolici attivi *in vitro* contro *B. cinerea* sono:

- oli essenziali (Arras e Usai, 2001) (Arras *et al.*, 1995; Reddy *et al.*, 1998);
- derivati cinnamici: acidi cinnamici; acido 4-cumarico; acido 3-cumarico; acido diidrocaffeoico; acido ferulico; acido sinapico (Lattanzio *et al.*, 2001);
- derivati benzoici: acido gallico; acido siringtonico; acido 4-idrossibenzoico; acido 2,3-3,4- e 2,5-diidrossibenzoico; acido 2,3- 2,4- e 2,5-dimetossibenzoico (Tonini e Caccioni, 1990; Wilson *et al.*, 1987).

Derivati benzoici come gli acidi 2,5-diidrossibenzoico e 2,5-dimetossibenzoico, sono efficaci nell'inibire la germinazione delle spore e la crescita del micelio di diversi funghi patogeni, incluso *B. cinerea* *in vitro* e controllano lo sviluppo della malattia *in vivo*.

La combinazione degli acidi p-cumarico, ferulico, caffeico e p-idrossibenzoico alla concentrazione di 500 ppm inibisce la crescita del micelio *B. cinerea*, dove i primi due composti hanno il maggior potere antifungino (San Francisco e Cooper-Driver, 1984). Prove condotte in *Arabidopsis* hanno rivelato come l'acido sinapico possa contribuire ad aumentare la resistenza a *B. cinerea*.

Gli estratti completi di *Ephedra breana* e *Nolana sedifolia* non hanno dato alcun effettivo controllo sulla crescita di *B. cinerea*. Si è invece riscontrato un'attività antifungina dei loro estratti etanoliche in condizioni *in vitro* risultando interessanti alternative per contrastare il fungo. E' anche interessante la presenza dell'acido 3,4-dimetossicinnamico nelle due frazioni che dimostrano di controllare la crescita del micelio e l'acido 3,4-dimetossibenzoico come composto biocontrollore (Narasimhan *et al.*, 2009).

Nella frazione etanolica di *Ephedra breana* sono presenti gli acidi 3,4-diidrossibenzoico, *p*-idrossibenzoico, caffeico e 3,4-dimetossibenzoico. La frazione etanolica di *Nolana sedifolia* non contiene l'acido 3,4-dimetossibenzoico ma gli acidi ferulico, *p*-coumarico e 3,4-dimetossicinnamico. L'estratto etanolico di *Fabiana imbricata* non ha dimostrato effetti inibitori sulla crescita di *B. cinerea in vitro*.

Il modo di azione dei composti fenolici citati non è completamente chiarito ma è stato proposto che agiscono sulla membrana citoplasmatica producendo cambiamenti sulla sua permeabilità, causando la liberazione dei contenuti della cellula (Veldhuizen *et al.*, 2006; Feng e Zheng, 2007). Inoltre, interferiscono nel trasporto degli elettroni, nell'assorbimento dei nutrienti, nella sintesi degli acidi grassi, sull'attività dell'adenosin trifosfato ATP ed altri processi metabolici della cellula, probabilmente interagendo con gli enzimi responsabili di questi processi (Feng e Zheng, 2007).

L'uso di fumigazioni di acido acetico per il controllo dei funghi dopo la raccolta dell'uva si è dimostrato un trattamento effettivo anche contro *B. cinerea* (Tripathi e Dubey, 2004).

Camili *et al.* (2010) affermano che l'acido acetico potrebbe stimolare le naturali difese nei grappoli da prove effettuate in Italia. Il miglior controllo contro *Botrytis* era ottenuto quando gli acini erano trattati con vapori di acido acetico 48 ore prima dell'inoculazione con le spore del fungo. Per l'acido indole-acetico non sono stati eseguiti test di applicazioni in vigneto per verificare il suo effetto di controllo sugli acini.

Diversi acidi sono stati testati per dissolvere il chitosano: la migliore efficacia di chitosano per ridurre *B. cinerea* nell'uva da tavola è stata osservata dissolvendolo in acido acetico (Romanazzi *et al.*, 2009) e induce l'attivazione della fenilalanina ammonia-liasi (PAL) in acini trattati (Romanazzi *et al.*, 2002). Vapori di acido acetico a concentrazioni tra 0,25 e 4 ml per 100 l di spazio (volume della camera), riducono la crescita radiale di *B. cinerea* dopo 4 giorni di incubazione a 22°C da 8 cm nel controllo a meno di 1 cm, senza differenza tra le diverse concentrazioni (Camili *et al.*, 2010). Prove *in vivo* su acini inoculati artificialmente trattati con vapori di 0,25 e 1 ml per 100 l⁻¹ di acido acetico, dopo conservazione a 22°C per 2-6 giorni (Camili *et al.*, 2010) riducono efficacemente il deterioramento causato dal fungo. Il trattamento degli acini di uva da tavola con 5 ml 100 ml⁻¹ di acido acetico diminuisce la presenza di *B. cinerea* dopo-raccolta su uva "Regina" e "Taloppo", dopo 8 settimane di conservazione a 5°C (Venditti *et al.*, 2008).

Altre sostanze naturali possono essere utilizzate in pre- e post-raccolta per ridurre i danni o le infezioni di *B. cinerea*.

L'acetaldeide è battericida e fungicida e viene applicata sottoforma di vapore dopo la raccolta di uva (Pesis, 2005). Come affermato da Tripathi e Dubey (2004), le aldeidi esanale ed esenale sono composti naturali, prodotti di ossidazione dei lipidi che hanno proprietà antifungine contro *Botrytis* sp. Studi di Kishimoto *et al.* (2008) inducono a pensare che spruzzare queste aldeidi su viti potrebbe ridurre lo sviluppo di vari funghi, comunque deve essere considerato il costo ed il rischio di manipolare queste molecole.

Ethephon o acido 2-cloroetilfosfonico induce una riduzione della crescita dei funghi quando spruzzato sulle viti come affermato nel libro J.M. Merillon's, attraverso l'induzione di difese naturali (Belhadj *et al.*, 2008).

L'acido sorbico usato dopo raccolta può ridurre l'incidenza di *Botrytis cinerea* in fase di conservazione nell'uva da tavola "Thompson Seedless".

L'etanolo è un additivo comune per cibi con attività antimicrobica (Larson e Morton, 1991) che può essere utilizzato in pre-raccolta. Karabulut *et al.* (2003) ha scoperto che spruzzando 1 litro per 5 viti di una soluzione con 50 % di etanolo 24 ore prima della raccolta aveva l'effetto di ridurre il marciume nel periodo dopo la raccolta. La quantità della soluzione precedente è stata ridotta a 150 litri ha⁻¹ all'inizio dell'invaiaitura (inizio agosto), seconda metà di agosto, metà settembre e inizio ottobre. Alla concentrazione di 2% etanolo inibisce la crescita del fungo ma 16% in pre-raccolta è la dose ritenuta ottimale per ridurre la crescita di *B. cinerea*. Lichter *et al.* (2003) afferma che almeno il 30% di etanolo è necessario per prevenire la germinazione delle spore di *Botrytis cinerea*. Così la dose di etanolo 2% induce le difese della pianta attraverso segnali acetaldeide (Pesis, 2005) o direttamente attraverso l'etanolo come primo segnale (Tomsett *et al.*, 2005). Nigro *et al.* (2006) affermano come la soluzione con 16% etanolo e 1% cloruro di calcio ha dimostrato avere miglior effetto nel limitare lo sviluppo del fungo nell'uva da tavola, tra le prove effettuate con la cv. "Chasselas". La combinazione di etanolo e cloruro di calcio spruzzata in campo fornisce il miglior controllo di *B. cinerea* in raccolta e dopo immagazzinamento (Chervin *et al.*, 2009). L'etanolo liquido o vapore è usato nel controllo di malattie dopo-raccolta di uve da tavola (Larson e Morton, 1991; Feliciano *et al.*, 1992; Smilanick *et al.*, 1995; Mlikota Gabler e Smilanick, 2001; Karabulut *et al.*, 2003), specialmente, quando riscaldato (Smilanick *et al.*, 1995; Margosan *et al.*, 1997; Karabulut *et al.*, 2004; Mlikota Gabler *et al.*, 2005), incrementa la sua tossicità alle spore di *B. cinerea*.

B. cinerea in post-raccolta in uva da tavola (*Vitis vinifera* L.) è controllata con fumigazioni di anidride solforosa e i grappoli sono poi conservati (Harvey e Uota, 1978; Luvisi *et al.*, 1992). L'SO₂ è efficace nel controllare il deterioramento causato da *B. cinerea*, ma il suo uso causa

problemi associati ai solfiti residui, alle emissioni di SO₂ e al suo negativo impatto sulla qualità degli acini (Lichter *et al.*, 2006). Combinazione di ridotte dosi di etanolo con sorbato di potassio riducono *B. cinerea* in uve da tavola agli stessi livelli dell'SO₂ e sinergiche interazioni nella riduzione del deterioramento comparata a singoli trattamenti (Karabulut *et al.*, 2005).

Nigro *et al.* 2006 hanno dimostrato che il cloruro di calcio, il bicarbonato di calcio e il carbonato di calcio sono i sali più efficaci alla concentrazione di 1% (p/v), testati in campo, contro il marciume degli acini causato da *B. cinerea*. L'applicazione di boro ha dato i migliori risultati con tetraborato di potassio 1% riducendo il deterioramento dei singoli acini inoculati con il patogeno da 40% a 2-3% (Qin *et al.*, 2010).

L'ozono (O₃) è una sostanza naturale nell'atmosfera e uno dei più potenti contro un'ampia gamma di microrganismi (Khadre *et al.*, 2001). Il prodotto della degradazione dell'ozono è l'ossigeno perciò non ci sono residui nei prodotti trattati. Un altro aspetto positivo è la depurazione da micotossine (Karaca e Velioglu, 2007) e da residui di pesticidi (Ikehata e El-Din, 2005). Inoltre, incrementa il contenuto di stilbeni negli acini (Sarig *et al.*, 1996; Artes-Hernandez *et al.*, 2004; Gonzalez-Barrio *et al.*, 2006). L'ozono è fungostatico, efficace nel controllare il deterioramento, sebbene sia dose-dipendente e alte concentrazioni possono essere fitotossiche (circa 5000 ppm h⁻¹). Trattamenti con ozono 5000 ppm h⁻¹ in acini di uva da tavola "Autumn Seedless" e "Black Seedless" hanno ridotto l'incidenza dell'inoculo naturale di *B. cinerea* (Mlikota Gabler *et al.*, 2010).

1.8 Scopo

La ricerca scientifica ha reso disponibili numerosi prodotti chimici di sintesi capaci di contrastare e bloccare lo sviluppo di patogeni della vite come di altre specie coltivate. Da diversi anni va crescendo l'interesse verso metodi di contenimento delle malattie più eco-sostenibili con minori conseguenze negative sull'ambiente. Numerose molecole naturali di origine vegetale hanno la potenzialità di inibire lo sviluppo di patogeni come *B. cinerea*.

In questo lavoro di tesi sono riportati i risultati di alcuni trattamenti con estratti vegetali contro *B. cinerea* cresciuta *in vitro* e inoculata su foglie ed acini di uva di varietà a bacca bianca e nera. Dopo un primo screening *in vitro* alcune molecole sono state utilizzate per il trattamento di foglie e acini di diverse varietà di *Vitis vinifera* ed è stata valutata la capacità di contrastare lo sviluppo di *B. cinerea*.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Preparazione dell'inoculo di *B. cinerea*

Le spore di *B. cinerea* ceppo PM10 sono state ottenute da colonie in crescita al 15° giorno di sviluppo in piastre Petri su PDA (Potato Dextrose Agar, Difco). Le piastre sono state lavate con 5 ml di acqua demineralizzata sterile. Dopo leggera raschiatura con ansa sterile la sospensione è stata filtrata con carta da filtro. Le spore sono state contate con camera di Thoma. Le spore potevano essere utilizzate immediatamente o dopo conservazione a -80°C con il 10% (v/v) di glicerolo.

Il micelio per gli inoculi veniva prelevato dal margine esterno di colonie cresciute su PDA per 3 giorni a 25°C.

2.2 Oli essenziali e altre molecole naturali

Sono stati utilizzati oli essenziali acquistati da Erba Vita Italia (Montegrimano Terme,) di timo bianco (*Thymus vulgaris*) con 40% di timolo e 20% di para-cimene; garofano (*Syzygium aromaticum*) con 85% di eugenolo e 5% di eugenil-acetato; fiore di lavanda (*Lavandula officinalis*) con il 35% di linalil-acetato e 15% di linalolo; rizoma di zenzero (*Zingiber officinalis*) con 25% di zingiberene; foglie di citronella (*Cymbopogon nardus*) con 25% di citronellale e 20% di geraniolo; infiorescenze di menta (*Mentha piperita*) con 45% di mentolo e 4% di isomentone. Il tea tree da foglie di *Melaleuca alternifolia* con 38% di terpeni totali è stato ottenuto da ESI s.p.a. (Albissola Marina, Savona).

Altre molecole naturali utilizzate sono il GSE pompelmo *Citrus glandis* (Prodeco Pharma s.r.l., Castelfranco V.to, Italia); Milsana un estratto di foglia derivato da *Reynoutria sachalinensis* (Biofa AG, Germania); chitosano semi-polvere preparato da chitina (Biochemica Fluka) a basso peso molecolare $M_r \sim 70000$; tampone sodio-acetato 10mM (finale) pH 4,5. Per far aderire il prodotto alla superficie degli acini è stato utilizzato l'adesivante Nu-Film-P (pinolene 96% pari a 892,8 g/l).

2.3 Effetto degli oli essenziali sulla crescita di *B. cinerea* in terreno liquido

La prova è stata effettuata su piastra per test E.L.I.S.A. sotto cappa microbiologica in 200 µl di coltura liquida Czapek (Rif.) portato a pH 3,5 con acido tartarico 1M contenente oli essenziali alle concentrazioni di 0,1%, 0,25% e 1% (v/v) e spore di *B. cinerea* (10^5 conidi/ml). Per arrivare al volume desiderato è stata aggiunta acqua demineralizzata sterile. Ciascuna

prova è stata effettuata in doppio. Il testimone non conteneva oli essenziali. La piastra è stata posta in termostato a 25°C.

Ogni giorno è stata valutata la crescita di micelio nei pozzetti.

2.4 Effetto degli oli essenziali e di estratti naturali (GSE, Milsana, chitosano) sulla crescita radiale di *B. cinerea*

Ciascun composto è stato miscelato insieme al terreno liquido PDA (12 ml per piastra) in provette da 50 ml sterili e mescolato prima di essere aliquotato nelle piastre (3 per prova) sotto cappa microbiologica. Le molecole naturali utilizzate sono state il GSE alle concentrazioni di 0,02%, 0,1% e 0,5% (v/v); Milsana filtrato a 0,45µm alle concentrazioni di 0,06%, 0,2%, 1% e 5% (v/v); gli oli essenziali di menta, garofano e tea tree alle concentrazioni di 0,1%, 0,25% e 1% (v/v); il chitosano alle concentrazioni di 0,0125%, 0,025% e 0,05% (v/v). Lo stock di chitosano era all'1% in tampone sodio-acetato 50mM e 25mM a pH 4,5. Il chitosano è stato sciolto nel solvente a bagnomaria. Una tesi conteneva tampone sodio-acetato 10 mM a pH 4,5. L'inoculo era costituito da un tondello (diametro 3 mm) di PDA contenente il micelio di *B. cinerea*. Le piastre erano poste in termostato a 25°C. Il controllo era rappresentato da PDA inoculato con il micelio di *B. cinerea*. Il controllo per le tesi con chitosano consisteva in PDA con il solvente in cui è stato sciolto il chitosano.

La crescita radiale del fungo è stata rilevata giornalmente nelle piastre Petri.

2.5 Inoculazione di *B. cinerea* su foglie di *Vitis vinifera* trattate con molecole naturali

Le varietà di *Vitis vinifera* Cabernet sauvignon e Manzoni bianco 6.0.13 sono state recise mantenendo il picciolo dalla pianta e lavate con acqua e detergente per piatti per 2 minuti circa. Le foglie sono state sciacquate con acqua demineralizzata e asciugate sotto cappa microbiologica con carta assorbente sterile. Sono state prelevate 4 foglie di ogni varietà per ciascun trattamento, incluso il controllo.

I preparati per il trattamento delle foglie contenevano GSE 0,5%, Milsana 5%, tea tree 1% e menta 1% ciascuno. Le foglie sono state trattate con 1 ml di preparato o con acqua demineralizzata sterile per il controllo. Questo volume era distribuito uniformemente su tutta la superficie con una spatola. Dopo asciugatura le foglie erano poste in un contenitore sopra carta da filtro con acqua demineralizzata sterile. Tre tondelli di micelio di *B. cinerea* sono

stati disposti sulla superficie fogliare. Il contenitore è stato coperto con pellicola trasparente posto in termostato a 25°C.

2.6 Inoculazione di *B. cinerea* su acini di uva trattati con oli essenziali

Venti acini per trattamento di uva delle varietà Glera, sono stati tagliati con il picciolo dal grappolo, lavati con acqua e asciugati. Sono stati immersi in 50 ml di preparato contenente la sostanza antifungina o acqua demineralizzata nel caso del controllo per 1 minuto. Dopo il trattamento gli acini venivano depositi su carta da filtro umidificata e lasciati asciugare sotto cappa microbiologica. Ciascun acino è stato inoculato con 20 µl di una sospensione di spore di *B. cinerea* (10^6 cellule/ml) contenente PDB (Potato Dextrose Broth, Difco) e la vaschetta è stata coperta con pellicola trasparente umidificata con acqua demineralizzata sterile e posta in termostato a 25°C.

Nelle varietà Merlot, Cabernet sauvignon, Cabernet franc e Raboso, gli acini sono stati trattati come sopra ma sono stati inoculati con tondelli di 3 mm di diametro di PDA colonizzato con micelio di *B. cinerea*. Gli acini sono stati umidificati con acqua sterile con nebulizzatore e la vaschetta è stata coperta con pellicola trasparente umidificata con acqua sterile e posta in termostato a 25°C.

I trattamenti consistevano in diluizioni in sodio-acetato 10 mM pH 4,5 di 0,1% o 0,2% di oli di menta, garofano e timo bianco somministrati separatamente o in combinazione tra loro. La soluzione conteneva anche l'adesivante Nu-Film-P (0,4 ml/l). Un trattamento è stato eseguito anche con 1,25 g/l di $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Il controllo era eseguito utilizzando l'adesivante Nu-Film-P (0,4 ml/l) disciolto in acqua.

3. RISULTATI

3.1 Effetto degli oli essenziali sulla crescita di *B. cinerea* su terreno liquido

Per valutare l'efficacia di diversi oli essenziali nei confronti dello sviluppo di *B. cinerea*, spore del fungo sono state inoculate in 200 µl di terreno liquido. Le concentrazioni utilizzate erano comprese tra 0,1 e 1% (Tab.1). Lo sviluppo del micelio è stato valutato allo stereo microscopio dopo 3 giorni dall'inoculo secondo una scala visiva. Gli oli di garofano, menta e tea tree presentavano la maggior inibizione della crescita soprattutto alla concentrazione più

elevata (Tab.1). L'olio essenziale di lavanda favoriva la crescita del fungo che si sviluppava in misura maggiore del controllo.

Conc.	Timo bianco	Garofano	Lavanda	Zenzero	Citronella	Menta	Tea Tree	Controllo
0,1%	3	4	4	3	3	3	3	3
0,1%	2	2	4	3	2	3	3	3
0,25%	3	2	4	3	2	2	2	
0,25%	3	1	4	3	2	1	2	
1%	3	1	3	4	2	1	1	
1%	2	1	3	4	2	2	1	

Tabella 1. Effetto degli oli essenziali sulla crescita di *B. cinerea* a 3 giorni dall'inoculo eseguito con 1×10^5 /ml di spore su 200 µl di mezzo Czapek. La valutazione è stata effettuata visivamente con lo stereo microscopio secondo una scala numerica da 1 (sviluppo assente o estremamente ridotto) a 4 (massimo sviluppo del micelio).

3.2 Effetto degli oli essenziali e di estratti naturali (GSE, Milsana, chitosano) sulla crescita radiale di *B. cinerea*

In seguito alle osservazioni riportate nel precedente paragrafo, l'effetto sulla crescita miceliare degli oli essenziali di garofano, menta e tea tree alle concentrazioni di 0,1%, 0,25% e 1% è stata confrontata su PDA con quella dei preparati di GSE, Milsana e chitosano.

Dalle prove è risultato che gli oli essenziali di garofano, menta e tea tree si sono rivelati molto efficaci nell'inibire la crescita del micelio di *B. cinerea* a tutte le concentrazioni saggate (0,1%, 0,25% e 1%) ad eccezione dell'olio tea tree 0,1% che consentiva la crescita del fungo seppure con valori inferiori al controllo (Tab. 2, Fig. 1). Il GSE a 0,02%, 0,1% e 0,5% ha avuto un'azione stimolante sulla crescita del micelio del fungo all'aumentare della concentrazione utilizzata, rispetto al controllo. Milsana solo alla concentrazione dell'1% riduceva lo sviluppo di *B. cinerea* mentre alla concentrazione del 5% l'inibizione della crescita era notevole (Tab. 2).

In una separata prova è stato valutato l'effetto sulla crescita di *B. cinerea* del tampone sodio acetato 10 mM pH 4,5. La crescita del fungo è risultata ridotta rispetto al controllo contenente solo PDA (Tab. 2).

Il chitosano sciolto in tampone sodio acetato pH 4,5 50 mM il micelio comincia a crescere dal 2° giorno mentre nel controllo con solo tampone sodio-acetato la crescita era evidente dal 3° giorno (Tab. 3). Con tutte le concentrazioni di chitosano usate 0,0125%, 0,025% e 0,05%, la

crescita è risultata leggermente superiore rispetto al controllo e lo sviluppo del fungo non era ridotto all'aumentare della concentrazione di chitosano usata.

Da queste prove si evince come l'acido acetico ritardi lo sviluppo del micelio di *B. cinerea*. Alla concentrazione 50mM è massima la sua efficacia ma persiste anche con la soluzione di tampone sodio-acetato 10mM a pH 4,5.

Una rappresentazione grafica degli effetti dei trattamenti più significativi è riportata in Fig. 2.

TRATTAMENTI	Media 1° gg	Media 2° gg	Media 3° gg	Media 4° gg
<u>1° esperimento</u>				
Controllo	2,29 ± 0,12	4,87 ± 0,42	6,81 ± 1,14	
GSE 0,02%	2,53 ± 0,23	5,23 ± 0,25	8,08 ± 0,20	8,60 ± 0,00
GSE 0,1%	2,55 ± 0,18	5,12 ± 0,38	7,44 ± 0,85	8,28 ± 0,45
GSE 0,5%	2,75 ± 0,13	4,08 ± 0,22	7,33 ± 1,29	7,60 ± 1,42
Milsana 0,06%	2,51 ± 0,22	4,70 ± 0,50	6,94 ± 0,98	8,13 ± 0,66
Milsana 0,2%	2,47 ± 0,19	4,07 ± 0,47	6,59 ± 1,09	7,91 ± 0,98
Milsana 1%	2,08 ± 0,07	3,51 ± 0,34	5,95 ± 0,14	8,02 ± 0,16
Milsana 5%	n.s.	0,50 ± 0,36	0,80 ± 0,57	1,53 ± 0,52
<u>2° esperimento</u>				
Controllo	2,56 ± 0,06	5,55 ± 0,06	8,28 ± 0,13	8,60 ± 0,00
Garofano 0,1%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Garofano 0,25%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Garofano 1%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Menta 0,1%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Menta 0,25%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Menta 1%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tea tree 0,1%	0,88 ± 0,44	2,13 ± 0,64	3,16 ± 1,27	6,31 ± 1,19
Tea tree 0,25%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tea tree 1%	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<u>3° esperimento</u>				
Controllo	2,45 ± 0,24	4,78 ± 1,15	6,62 ± 2,23	7,02 ± 2,25
Tampone Na-acetato 10 mM pH 4,5	1,83 ± 0,08	3,49 ± 0,59	4,78 ± 0,94	5,77 ± 1,37

Tabella 2. Crescita radiale del micelio di *B. cinerea in vitro* su PDA contenente GSE, Milsana, oli essenziali di garofano, menta e tea tree e tampone sodio-acetato 10 mM. I valori sono la media di 3 repliche ± SD. n.s. nessun sviluppo.

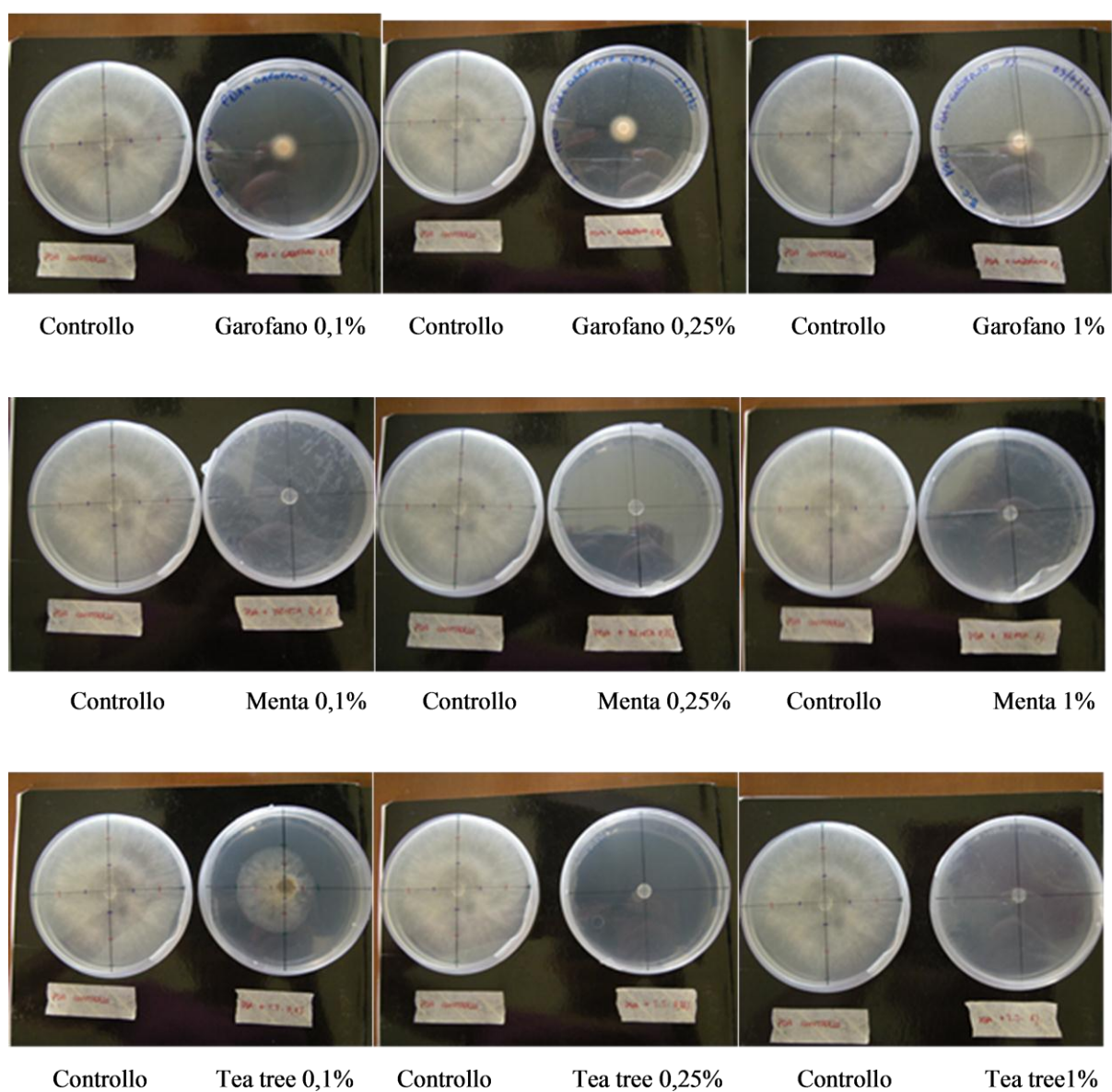


Figura 1. Crescita del micelio di *B. cinerea* su PDA a diverse concentrazioni di oli essenziali.

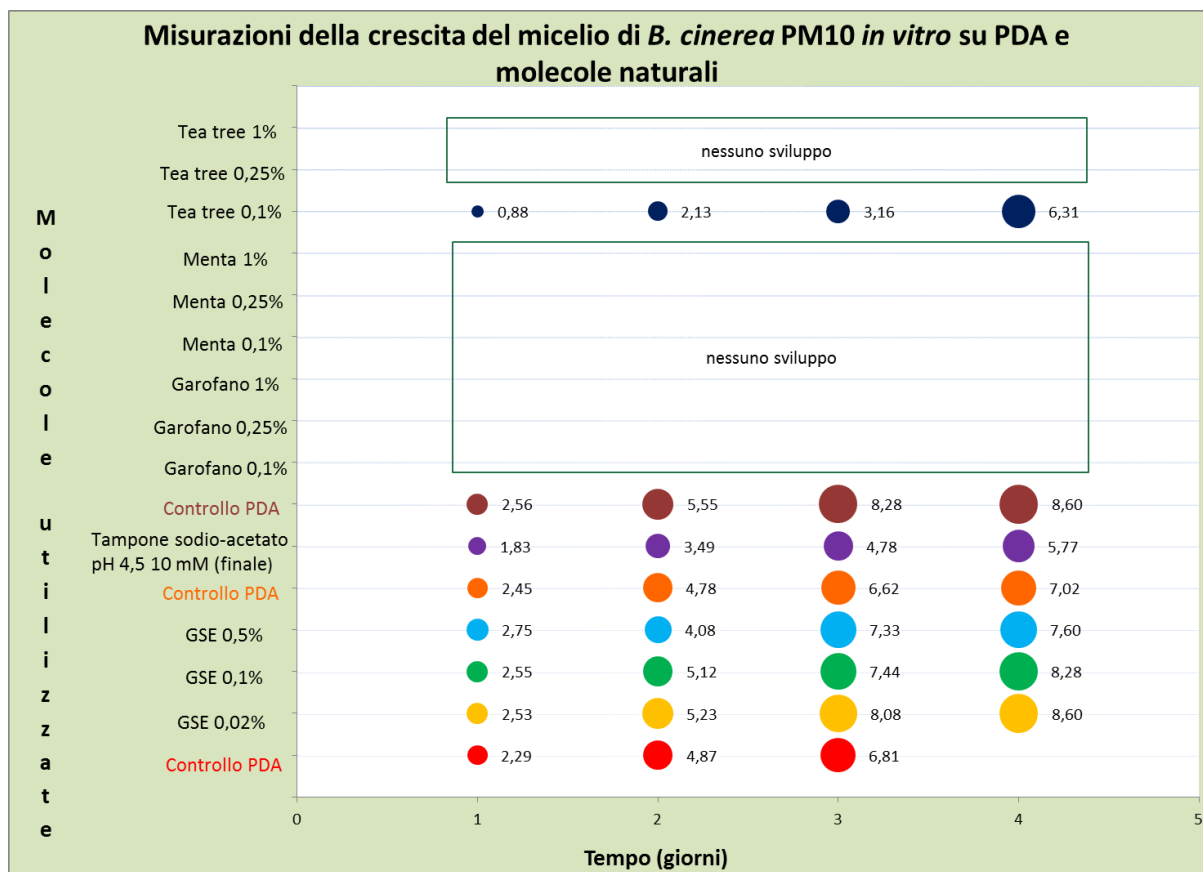


Figura 2. Rappresentazione grafica dei valori di crescita del micelio di *B. cinerea* PM10 su PDA contenente diversi preparati di molecole naturali.

		M 1° gg	M 2° gg	M 3° gg	M 6° gg	M 7° gg	M 8° gg
CONTROLLO PDA + tampone Na-acetato 50 mM pH 4,5		n.s.	n.s.	0,37 ± 0,43	3,53 ± 0,90	4,68 ± 1,00	5,71 ± 1,14
PDA + CHITOSANO in tampone Na-acetato 50 mM pH 4,5	CHITOSANO 0,0125%	n.s.	0,86 ± 0,81	1,71 ± 1,02	5,21 ± 1,01	6,41 ± 0,94	7,75 ± 0,85
	CHITOSANO 0,025%	n.s.	0,92 ± 0,31	2,01 ± 0,29	5,68 ± 0,28	7,02 ± 0,40	8,22 ± 0,20
	CHITOSANO 0,05%	n.s.	0,93 ± 0,33	1,92 ± 0,57	5,28 ± 0,49	6,33 ± 0,56	7,28 ± 0,63

Tabella 3. Crescita radiale del micelio di *B. cinerea* su PDA e chitosano in tampone Na-acetato 50 mM pH 4,5. I valori sono la media di 3 repliche ± SD.

Negli allegati 1 e 2 sono presenti tutte le misure della crescita radiale del micelio di *B. cinerea* per ciascuna piastra.

3.3 Effetto di molecole naturali sull'infezione di *B. cinerea* su foglie di *Vitis vinifera*

In un primo esperimento è stata confrontata la capacità di GSE, Milsana e tea tree di contenere lo sviluppo dell'infezione di *B. cinerea* su foglie di Cabernet sauvignon e Manzoni bianco 6.0.13. Si è evidenziata una certa variabilità dei sintomi tra le foglie trattate con la stessa sostanza. Questo può essere dovuto alle differenti caratteristiche (es. età e posizione sul tralcio) delle foglie utilizzate nell'esperimento. Tuttavia i sintomi in Cabernet sauvignon erano un po' meno evidenti, soprattutto nel controllo, rispetto a quelli manifestati dal Manzoni bianco 6.0.13.

In un successivo esperimento oltre ai trattamenti descritti è stato aggiunto un trattamento con la menta.

Valutando l'efficacia delle diverse sostanze utilizzate in entrambe le varietà, Milsana ha fornito i migliori risultati. Infatti il micelio si è sviluppato con difficoltà e il numero di lesioni è stato ridotto rispetto al controllo (Tab. 4 e 5, Fig. 3 e 4)

Con il GSE il micelio non era cotonoso come il controllo ma le necrosi molto estese. Gli oli essenziali di tea tree e menta hanno leggermente contenuto lo sviluppo del micelio di *B. cinerea* ma le necrosi prodotte sui tessuti delle foglie sono ben espanse come si può notare in Fig. 3 e 4.

TRATTAMENTI	n° di lesioni necrotiche						
1° esperimento	1° gg	2° gg	3° gg	4° gg	5° gg	6° gg	7° gg
CONTROLLO			0/12	0/12	0/12	4/12	11/12
GSE			11/12	12/12	12/12	12/12	12/12
MILSANA			0/12	5/12	3/12	6/12	7/12
TEA TREE			11/12	10/12	12/12	12/12	11/12
2° esperimento	1° gg	2° gg	3° gg	4° gg	5° gg	6° gg	7° gg
CONTROLLO	0/12	0/12	7/12			10/12	
GSE	0/12	9/12	11/12			11/12	
MILSANA	0/12	0/12	3/12			5/12	
TEA TREE	0/12	3/12	12/12			12/12	
MENTA	0/12	6/12	12/12			12/12	

Tabella 4. Numero di lesioni necrotiche di *B. cinerea* sulle foglie di Cabernet sauvignon dopo trattamento con molecole naturali. Per ciascun trattamento venivano utilizzate 4 foglie ciascuna inoculata con 3 tondelli di PDA colonizzato dal fungo.

TRATTAMENTI	n° di lesioni necrotiche						
<u>1° esperimento</u>	1° gg	2° gg	3° gg	4° gg	5° gg	6° gg	7° gg
CONTROLLO			12/12	8/12	11/12	12/12	12/12
GSE			10/12	12/12	12/12	12/12	12/12
MILSANA			6/12	0/12	7/12	3/12	7/12
TEA TREE			11/12	11/12	11/12	12/12	12/12
<u>2° esperimento</u>							
CONTROLLO	0/12	0/12	8/12			12/12	
GSE	0/12	0/12	12/12			12/12	
MILSANA	0/12	0/12	0/12			2/12	
TEA TREE	0/12	0/12	10/12			10/12	
MENTA	0/12	0/12	9/12			12/12	

Tabella 5. Numero di lesioni necrotiche di *B. cinerea* sulle foglie di Incrocio Manzoni 6.013 dopo trattamento con molecole naturali. Per ciascun trattamento venivano utilizzate 4 foglie ciascuna inoculata con 3 tondelli di PDA colonizzato dal fungo.

Controllo



GSE



MILSANA



TEA TREE



MENTA



Figura 3. Foglie di Cabernet sauvignon dopo 6 giorni dal trattamento con GSE, Milsana, tea tree e menta. Su ogni foglia erano eseguiti 3 inoculi con tondelli di PDA colonizzato da *B. cinerea*.

Controllo



GSE



MILSANA



TEA TREE



MENTA



Figura 4. Foglie di Manzoni bianco 6.0.13 dopo 6 giorni dal trattamento con GSE, Milsana, tea tree e menta. Su ogni foglia erano eseguiti 3 inoculi con tondelli di PDA colonizzato da *B. cinerea*.

3.4 Effetto di oli essenziali su acini di uva *Glera* inoculati con spore e micelio di *B. cinerea*

L'inoculo degli acini di *Glera* con spore di *B. cinerea* non ha permesso di valutare in modo chiaro l'efficacia dei trattamenti con oli essenziali in quanto lo sviluppo del micelio era lento e molti acini si spaccavano causando la comparsa di marciumi non riconducibili direttamente a *B. cinerea*. La prova che prevedeva il trattamento con il rame non ha avuto risultati positivi nel contenimento dello sviluppo di *B. cinerea* e osservavano tacche brune in alcuni casi.

Per questo si è ritenuto necessario effettuare l'inoculo degli acini con micelio di *B. cinerea*.

Anche in questa prova tuttavia molti acini si sono spaccati e questo ha portato allo sviluppo di marciumi. Le osservazioni condotte sugli acini che rimanevano integri hanno evidenziato come i trattamenti con gli oli essenziali di menta e garofano allo 0,1% non risultassero efficaci in quanto il fungo si sviluppava come nel controllo. La combinazione di menta e garofano ciascuno allo 0,1% è risultata abbastanza efficace, mentre il trattamento che conteneva in modo migliore lo sviluppo dell'infezione è stato quello con l'olio di garofano allo 0,2% (Fig. 5).

Controllo



Garofano 0,1%



Garofano 0,2%



Menta 0,1%



Menta 0,1% e garofano 0,1%



Figura 5. Sviluppo del micelio di *B. cinerea* dopo 3 giorni dall'inoculo su acini di Glera dopo trattamento con oli essenziali di garofano e menta.

3.5 Effetto di oli essenziali su acini di uva Merlot, Cabernet sauvignon, Cabernet franc inoculati con micelio di *B. cinerea*

Inizialmente è stato confrontato l'effetto protettivo degli oli essenziali di menta 0,1% e garofano 0,1% distribuiti separatamente o in combinazione tra loro su acini di uva Merlot e Cabernet sauvignon inoculati con micelio di *B. cinerea*. A queste concentrazioni lo sviluppo diametrico del micelio sulla superficie dell'uva era comparabile a quello del controllo. Pertanto, in una successiva prova, la concentrazione dell'olio essenziale di garofano è stata raddoppiata. Con questa dose sugli acini di Merlot lo sviluppo del fungo era bloccato o molto limitato mentre, tale comportamento non era osservato su Cabernet Sauvignon dove lo sviluppo miceliare era comparabile al controllo (Fig. 6).

L'esperimento con l'olio di garofano 0,2% è stato ripetuto 3 volte su entrambe le cultivar con risultati simili.

Il trattamento con l'olio essenziale di garofano 0,2% è stato effettuato anche su Cabernet franc. Questa varietà ha dato lo stesso tipo di risultati ottenuti con la varietà Merlot, cioè il micelio di *B. cinerea* non si sviluppava o cresceva in modo molto contenuto (Fig. 7).

In tutte le prove condotte nel caso in cui gli acini si fossero spaccati con la fuoriuscita di liquido, il micelio del fungo si sviluppava abbondantemente.

3.6 Effetto di oli essenziali su acini di uva Raboso inoculati con micelio di *B. cinerea*

Anche su questa cultivar i trattamenti singoli con l'olio essenziale di menta 0,1% e garofano 0,1% non hanno bloccato lo sviluppo di *B. cinerea* (dati non mostrati). L'olio essenziale di garofano 0,2% aveva un effetto protettivo comparabile a quello osservato con Merlot e Cabernet franc mentre, il trattamento con menta allo 0,2% aveva un effetto protettivo molto limitato. Il trattamento combinato di menta 0,2% e garofano 0,2% aveva un effetto di riduzione dello sviluppo miceliare inferiore a quello con garofano da solo. I trattamenti effettuati con l'olio di timo allo 0,2% in combinazione o meno con l'olio di garofano avevano un effetto comparabile a quanto descritto con la menta (Fig. 8).

Merlot

Cabernet sauvignon

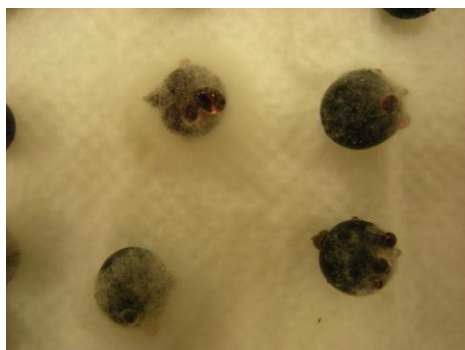
Controllo



Garofano 0,1%



Menta 0,1%



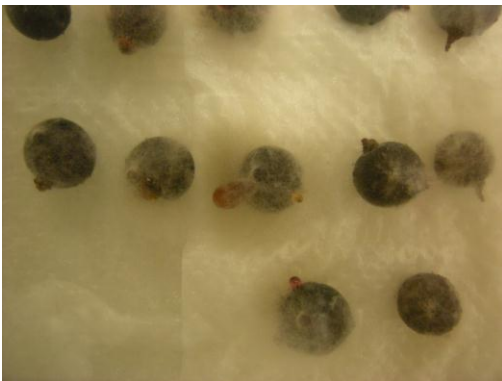
Menta 0,1% e garofano 0,1%



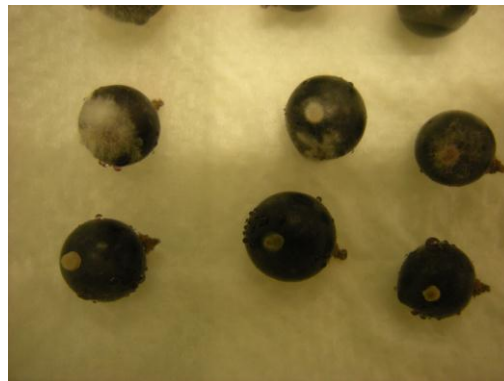
Figura 6. Acini di uva Merlot e Cabernet sauvignon trattati con oli essenziali di menta 0,1% o garofano 0,1%, dopo 5 giorni dall'inoculo con micelio di *B. cinerea*.

Merlot

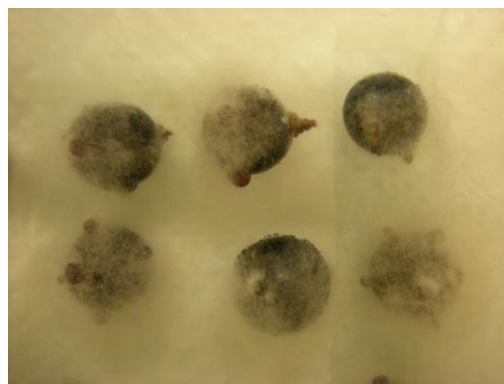
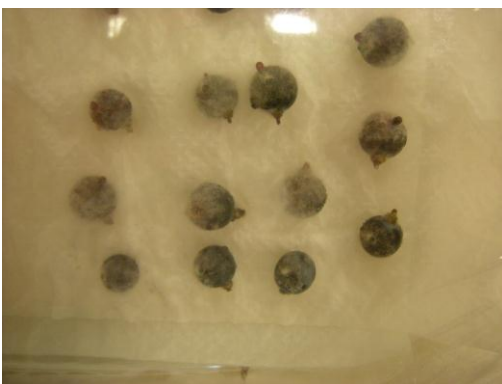
Controllo



Garofano 0,2%



Cabernet sauvignon



Cabernet franc



Figura 7. Acini di uva Merlot, Cabernet sauvignon e Cabernet franc trattati con olio essenziale di garofano 0,2%, dopo 5 giorni dall'inoculo con micelio di *B. cinerea*.

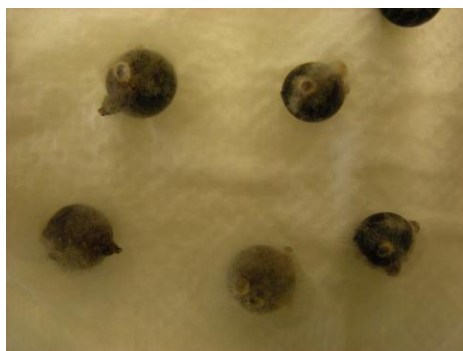
Controllo



Garofano 0,2%



Timo 0,2%



Menta 0,2%



Timo 0,2% e garofano 0,2%



Menta 0,2% e garofano 0,2%

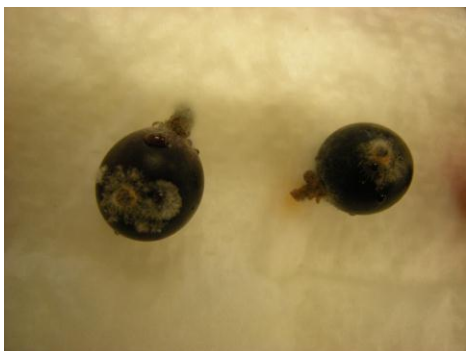


Figura 8. Acini di uva Raboso trattati con oli essenziali di garofano 0,2%, menta 0,2% o timo 0,2% dopo 5 giorni dall'inoculo con micelio di *B. cinerea*.

4. DISCUSSIONE

La ricerca di sostanze naturali, come alternativa ai comuni antibotritici sintetici utilizzati in viticoltura, è dettata dall'esigenza di contenere l'uso di prodotti chimici che, nel tempo, hanno portato alla selezione di ceppi resistenti. Inoltre, l'inquinamento ambientale può danneggiare gli equilibri naturali e costituire un serio pericolo per la salute di molte specie viventi, compreso l'uomo.

La legislazione con la Direttiva CE 128/2009 sta ponendo le basi per indirizzare le pratiche di difesa contro gli agenti di malattia verso una lotta integrata. Gli agricoltori dovranno pertanto cercare di prevenire l'attacco dei patogeni della vite con tutti i mezzi che hanno a disposizione: tecniche agronomiche adeguate, scelte varietali razionali, impiego della lotta biologica e biotecnologica, ecc. Solo nel caso in cui questi interventi non siano sufficienti a prevenire e contenere i danni del patogeno, si potrà ricorrere ai prodotti chimici di sintesi.

Botrytis cinerea è un fungo necrotrofo polifago che su vite danneggia soprattutto i grappoli determinando marciume e forti alterazioni delle caratteristiche organolettiche dei mosti e dei vini. La necessità di ridurre l'impiego dei prodotti fitosanitari tradizionali apre la porta alla sperimentazione di sostanze di origine naturale, soprattutto di origine vegetale, che possiedono attività antifungine intrinseche e che agiscono direttamente contro il fungo o, in maniera indiretta, che siano capaci di stimolare le risposte di difesa della pianta.

Diverse categorie di composti hanno dimostrato *in vitro* buona efficacia nel contrastare lo sviluppo del micelio o la germinazione delle spore di *B. cinerea*. Prove in campo hanno contribuito a chiarire le loro potenzialità applicative. E' il caso di Milsana (Schmitt *et al.*, 2002) utilizzato in Germania come preparato antibotritico con azione preventiva. L'azione di chitosano è stata verificata in campo (Romanazzi *et al.*, 2002) e *in vitro* (Reglinski *et al.*, 2010; Trotel-Azziz *et al.*, 2006) evidenziando la sua attività antifungina diretta e inducendo le naturali difese della pianta. L'estratto di semi di pompelmo GSE ha permesso di ottenere una riduzione della crescita del micelio di *B. cinerea* su piastra (Xu *et al.*, 2007). Alcuni autori riportano l'efficacia dell'acido acetico sottoforma di vapore nel ridurre la crescita di *B. cinerea* su acini di uva. Gli oli essenziali sono stati molto studiati e la loro efficacia nei confronti di *B. cinerea* è ancora in fase di studio. Tuttavia diversi ricercatori hanno confermato l'attività antifungina di diversi oli essenziali (Wilson *et al.*, 1997; Montes e Carvajal, 1998; Reddy *et al.*, 1998; Ranasinghe *et al.*, 2002; Ziedan e Farrag, 2008; Tzortzakis, 2009; Abdolahi *et al.*, 2010; Xing *et al.*, 2010; Hassani *et al.*, 2012). Tra questi, quelli per i quali si possono trovare maggiori riscontri in letteratura sono gli oli essenziali di

timo (*Thymus vulgaris*), garofano (*Eugenia caryophyllata*), *Prostanthera rotundifolia*, tea tree (*Melaleuca alternifolia*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), citronella (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*), rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), origano (*Origanum vulgare*) e zenzero (*Zingiber officinale*).

In questo studio le prove condotte *in vitro* hanno in alcuni casi confermato l'efficacia della riduzione della crescita radiale del micelio di *B. cinerea* su terreno semisolido (PDA) già descritta in letteratura. Milsana già alla concentrazione dell'1% riduce lo sviluppo del micelio rispetto al controllo ma la sua azione aumenta di molto con la concentrazione del 5%. La validità degli oli essenziali di garofano, menta e tea tree si è dimostrata dall'assenza di crescita già alla minima concentrazione usata dello 0,1% per i primi due e a partire dallo 0,25% per tea tree. Il GSE non ha bloccato lo sviluppo del micelio di *B. cinerea*; in comparazione con il controllo la crescita è stata simile o superiore rispetto a questo. Nella prova con il chitosano questo ha permesso lo sviluppo del micelio in maniera superiore rispetto al controllo e in modo indipendente dalla sua concentrazione. Il ruolo dell'acido acetico nell'inibire lo sviluppo del fungo è stato confermato dalle prove che dimostrano un'assenza della crescita con l'acido acetico 50 mM dovuto probabilmente anche al pH acido. L'azione inibitoria dell'acido acetico persiste utilizzando il tampone sodio-acetato a pH 4,5 10 mM.

Nelle prove condotte inoculando *B. cinerea* sulle foglie di varietà di *Vitis vinifera*, la difficoltà di valutazione e di quantificazione delle infezioni insieme alla differenza osservata tra foglia e foglia non ha permesso di ottenere risultati uniformi e ripetibili tra le diverse prove. Sussiste una diversità risposta tra le varietà utilizzate in quanto il Cabernet sauvignon mostra sintomatologia meno evidente rispetto alla varietà Manzoni bianco 6.0.13. Tuttavia in entrambe le varietà, Milsana 5% ha permesso di ridurre i sintomi dell'infezione fungina riducendo lo sviluppo del micelio e la necrosi, rispetto al controllo e alle prove con gli oli essenziali. Gli oli essenziali di tea tree e menta hanno ridotto in modo meno evidente lo sviluppo del micelio ed era chiara la presenza di necrosi espanse sulle foglie.

Le tesi con gli acini di diverse varietà a bacca bianca e nera di *Vitis vinifera*, trattati con oli essenziali in tampone sodio-acetato a pH 4,5 10 mM, hanno evidenziato come non sempre quello che succede *in vitro* si conferma anche *in vivo*, in quanto la complessità dell'ambiente acino gioca un ruolo fondamentale per l'adesione, crescita e penetrazione del patogeno nei tessuti. Nella varietà Glera la sintomatologia del controllo con l'inoculo di *B. cinerea* messo nelle condizioni di umidità e temperatura idonee è risultata inferiore rispetto alle varietà a bacca nera usate nella prova (Merlot, Cabernet sauvignon e franc, Raboso). Evidentemente

questa è una varietà meno suscettibile all'attacco di questo patogeno. Inoltre molti acini nelle diverse prove si sono spaccati, fenomeno che non si è manifestato nelle varietà a bacca nera. L'azione antifungina del rame non si è evidenziata con le prove su Glera. In tutte le prove con le diverse varietà dove l'acino era lesionato anche non a causa del fungo, questo si è sviluppato normalmente confermando che l'azione delle molecole utilizzate si manifesta prevalentemente in copertura e la presenza di ferite può annullare l'efficacia protettiva.

Nelle varietà Glera, Merlot, Cabernet franc e Raboso l'olio essenziale di garofano allo 0,2% è risultato efficace nell'inibire completamente lo sviluppo del micelio di *B. cinerea* in circa la metà degli acini e ha permesso una crescita molto contenuta rispetto al controllo nell'altra metà degli acini. Questi risultati confermano quanto riportato in letteratura circa l'efficacia dell'olio di garofano il cui costituente principale è l'eugenolo. Tuttavia esiste una diversa risposta delle varietà di vite al trattamento. Infatti, l'uva della varietà Cabernet sauvignon rispetto a Merlot, Cabernet franc e Raboso non contrastava in modo evidente lo sviluppo del micelio di *B. cinerea*. Sulle cause di queste differenze varietali è possibile avanzare alcune ipotesi. Per esempio l'olio potrebbe indurre nella buccia di alcune varietà l'accumulo di metaboliti secondari con azione antifungina. Oppure è possibile che il tipo o la quantità di cere e le caratteristiche della cuticola possano interagire con i componenti attivi dell'olio modificandone le proprietà e i suoi effetti contro il fungo. Meccanismi simili potrebbero spiegare anche l'interazione negativa osservata tra l'olio di garofano e quello di menta.

5. CONCLUSIONI

In conclusione si può affermare che molecole naturali o estratti vegetali possono contenere o bloccare lo sviluppo di patogeni della vite, come *B. cinerea*, agendo direttamente sul fungo. E' importante tenere in considerazione il fatto che alcuni composti naturali possono contribuire a rafforzare i sistemi di difesa delle piante predisponendole ad una minore suscettibilità alle infezioni da *B. cinerea* e da altri patogeni. Buona efficacia nel ridurre i sintomi e la comparsa di micelio del fungo *in vitro* e su foglie è stata riscontrata con l'estratto Milsana e con l'uso dell'acido acetico, cosa che non è avvenuta con GSE e chitosano. Gli oli essenziali di garofano, menta e tea tree hanno bloccato la crescita del micelio di *B. cinerea in vitro* mentre non sempre è stata buona la loro efficacia su foglie e acini. L'olio essenziale di garofano 0,2% ha buona mostrato la migliore capacità di bloccare o ridurre lo sviluppo del micelio del fungo. L'efficacia dell'olio essenziale risulta essere proporzionale all'aumento della sua concentrazione nel trattamento. Considerando una possibile applicazione in vigneto

degli oli essenziali si devono tenere in considerazione alcuni aspetti quali la loro efficacia in copertura e quindi il loro utilizzo preventivo; sotto l'aspetto tossicologico vanno esaminati gli eventuali effetti fitotossici e i problemi relativi alla sicurezza della salute e la possibilità di alterazione del gusto e dell'aroma del vino (Gold *et al.*, 1992). La loro azione non è certamente paragonabile a un antibiotico sintetico, ma non per questo si deve escludere l'efficacia di alcuni oli essenziali, come l'olio di garofano, contro *B. cinerea*.

In natura si può trovare quello che la chimica ha voluto inventare. Per questo, gli studi futuri si devono spingere alla ricerca di estratti vegetali e molecole naturali per soddisfare l'esigenza di utilizzare composti alternativi ai prodotti fitosanitari, da impiegare anche in combinazione con agenti di biocontrollo o altre sostanze. Risulta quindi necessario trovare quali sono i principi attivi effettivamente responsabili dell'inibizione del patogeno, le minime concentrazioni inibitrici efficaci, economicamente sostenibili per il loro uso in campo, sicure per la salute umana, gli organismi utili e per l'ambiente.

BIBLIOGRAFIA

1. Ait Barka E., Eullaffroy P., Clément C., Vernet G. (2004), Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*, *Plant Cell Rep. Physiology and Biochemistry* 22: 608–614.
2. Antonov A., Stewart A. e Walter M. (1997), Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products, *Plant Protection Conf.* 1997: 159-164.
3. Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhuicq L., Jeandet P., Couderchet M. e Vernet G. (2006), Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew, *Phytopathology* 96: 1188-1194.
4. Belli G. (2011), Elementi di patologia vegetale, *seconda ed. Piccin*.
5. Caillot S., Rat S., Tavernier M. L., Michaud P., Kovensky J., Wadouachi A., Clément C., Baillieul F. e Petit E. (2012), Native and sulfated oligoglucuronans as elicitors of defence-related responses inducing protection against *Botrytis cinerea* of *Vitis vinifera*, *Carbohydrate Polymers* 87: 1728– 1736.
6. Cañamás T. P., Viñas I., Torres R., Usall J., Solsona C. e Teixidó N. (2011), Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes, *Biological Control* 56: 150–158.
7. Chervin C., Alternatives to synthetic fungicides using small molecules of natural origin (2012), *Plant Defence: Biological Control. Springer* 55-66.
8. Chervin C., Lavigne D. e Westercamp P. (2009), Reduction of gray mold development in table grapes by preharvest sprays with ethanol and calcium chloride, *Postharvest Biology and Technology*, vol. 54 (n° 2) 115-117.
9. Demkura P. V. e Ballaré C. L. (2012), UVR8 mediates UV-B-induced *Arabidopsis* defense responses against *Botrytis cinerea* by controlling sinapate accumulation, *Molecular Plant* vol. 5, N. 3 642-652.
10. Dhinagra, Sinclair (1995), *Basic Plant Pathology Methods*.
11. Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. e Delen N. (2007), *Botrytis: Biology, Pathology and Control, Springer*.
12. Elmer P. A. G. e Reglinski T. (2006), REVIEW Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes, *Plant Pathology* 55: 155–177.

13. Favaron F., Lucchetta M., Odorizzi S., Pais da Cunha A. T., Sella L. (2009), The role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against *Botrytis cinerea* and of fungal laccase on the solubility of putative grape PR proteins, *Journal of Plant Pathology*, vol. 91, N. 3 579-588.
14. Ferrari M., Marcon E. e Menta A. (2003), Fitopatologia, entomologia agraria e biologia applicata, *Calderini edagricole*.
15. Gazzetta ufficiale dell' Unione Europea (2007), Regolamento CE n. 834/2007 del Consiglio.
16. Gazzetta ufficiale dell' Unione Europea (2009), Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio.
17. Goetz G., Fkyerat A., Métais N., Kunz M., Tabacchi R., Pezet R. e Pont V. (1999), Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase, *Phytochemistry* 52: 759-767.
18. Hassani A., Fathi Z., Ghosta Y., Abdollahi A., Meshkatsadat M. H. e Marandi R. J. (2012), Evaluation of plant essential oils for control of postharvest Brown and Gray Mold rots on apricot, *Journal of Food Safety* 32: 94–101.
19. Hua Chen, Xiang Xiao, Jun Wang, Lijun Wu, Zhiming Zheng e Zengliang Yu (2008), Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*, *Biotechnol Lett* 30: 919–923.
20. Iriti M., Rossoni M., Borgo M. e Faoro F. (2004), Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*, *J. Agric. Food Chem.* 52: 4406-4413.
21. Jacometti M. A., Wratten S. D. e Walter M. (2010), Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 154–172.
22. Karabulut O. A., Mlikota Gabler F., Mansour M. e Smilanick J. L. (2004), Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold, *Postharvest Biology and Technology* 34: 169–177.
23. Marenghi M. (2005), Manuale di viticoltura impianto gestione e difesa del vigneto, *Edagricole*.
24. Mlikota Gabler F., Smilanick J. L., Mansour M. F. e Karaca H. (2010), Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes, *Postharvest Biology and Technology* 55: 85–90.

25. Muñoz Z. e Moret A. (2010), Sensitivity of *Botrytis cinerea* to chitosan and acibenzolar S-methyl, *Pest Manag Sci* 66: 974–979.
26. Ongena M. e Jacques P. 2008, *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol, *Trends in microbiology* vol.16 n.3, 115-125.
27. Reglinski T., Elmer P. A. G., Taylor J. T., Wood P. N. e Hoyte S. M. (2010), Inhibition of *Botrytis cinerea* growth and suppression of Botrytis bunch rot in grapes using chitosan, *Plant Pathology* 59: 882–890.
28. Reglinski T., Elmer P.A.G., Taylor J. T., Parry F. J., Marsden R. e Wood P. N. (2005), Suppression of Botrytis bunch rot in Chardonnay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism, *Australasian Plant Pathology* 34: 481–488.
29. Romanazzi G., Karabulut O. A. e Smilanick J. L. (2007), Combination of chitosan and ethanol to control postharvest gray mold of table grapes, *Postharvest Biology and Technology* 45: 134–140.
30. Romanazzi G., Lichter A., Mlikota Gabler F. e Smilanick J. L. (2012), Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes, *Postharvest Biology and Technology* 63: 141–147.
31. Rossi M. (2012), Agrofarmaci convenzionali e biologici, binomio strategico nella Difesa Integrata: la posizione di Agrofarma, *Agrofarma*.
32. Stuardo M., San Martín R. (2008), Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*, *Industrial crops and products* 27: 296–302.
33. Trotel-Aziz P., Couderchet M., Vernet G. e Aziz A. (2006), Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*, *European Journal of Plant Pathology* 114: 405–413.
34. Varnier A.L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J.H., Kauffmann S., Pugin A., Clement C., Baillieul F. e Dorey S. (2009), Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine, *Plant, Cell and Environment* 32: 178–193.
35. Vincenzini M., Romano P. e Farris G.A. (2005), Microbiologia del vino, *Casa Editrice Ambrosiana*.
36. Vio-Michaelis S., Apablaza-Hidalgo G., Gómez M., Peña-Vera R. e Montenegro G. (2012), Antifungal activity of three chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*, *Botanical sciences* 90 (2): 179-183.

37. Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. e Van Kan Ltd G. A. L. (2007), *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease, *Molecular Plant Pathology* 8 (5): 561–580.
38. Xu W.T., Huang K.L., Guo F., Qu W., Yang J.J., Liang Z., Luo Y.B. (2007), Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*, *Postharvest Biology and Technology* 46: 86–94.

Siti internet:

39. agronotizie.imagelinenetwork.com/difesa-e...trattamenti/13381
40. biofarm.it/difesa-piante/adesivanti-antitraspiranti.html
41. www.noresidue.it/.../Vite-Vino-strategie-per-la-difesa-integrata-avanzata

ALLEGATO 1

Misurazioni della crescita radiale di *B. cinerea in vitro* su PDA con molecole naturali

PDA CONTROLLO

Piastra	1°gg	2°gg	3°gg
1	2,1	4,7	6,3
	2,1	4,55	6,5
2	2,3	4,45	5,5
	2,3	4,2	4,8
3	2,35	5,3	7,85
	2,35	5,45	7,9
4	2,4	5,15	7,85
	2,45	5,15	7,8
Media	2,29	4,87	6,81
D. S.	0,121	0,423	1,143

PDA + GSE

GSE 0,02%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	2,35	5,05	8,1	8,6
		2,1	4,8	8,05	8,6
	2	2,7	5,6	8,05	8,6
		2,8	5,4	7,7	8,6
	3	2,6	5,3	8,35	8,6
		2,6	5,2	8,25	8,6
	Media	2,53	5,23	8,08	8,60
	D.S.	0,234	0,255	0,203	0,000

GSE 0,1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	2,45	4,6	6,2	8,6
		2,45	4,65	6,3	8,6
	2	2,8	5,6	8,2	8,6
		2,8	5,5	8,1	8,6
	3	2,4	5,1	7,8	7,6
		2,4	5,25	8,05	7,7
	Media	2,55	5,12	7,44	8,28
	D.S.	0,178	0,384	0,852	0,449

GSE 0,5%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	2,85	4,15	8,25	8,6
		2,75	4,3	8,2	8,6
	2	2,7	4,1	5,8	8,6
		2,5	3,6	5,25	8,6
	3	2,9	4,1	8,4	5,9
		2,8	4,2	8,1	5,3
	Media	2,75	4,08	7,33	7,60
	D.S.	0,13	0,223	1,292	1,425

PDA + MILSANA

PDA + MILSANA 0,06%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	2,4	4,8	5,35	8,6
		2,2	4,7	5,85	8,6
	2	2,8	5,25	7,95	8,6
		2,8	5,3	7,8	8,6
	3	2,35	3,9	7,4	7,3
		2,5	4,25	7,3	7,1
	Media	2,51	4,70	6,94	8,13
	D.S.	0,224	0,502	0,985	0,662

PDA + MILSANA 0,2%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	2,7	3,75	5,4	8,6
		2,7	3,95	4,75	8,6
	2	2,3	3,95	7,3	8,6
		2,2	3,4	7,2	8,6
	3	2,4	4,8	7,4	6,65
		2,5	4,55	7,5	6,4
	Media	2,47	4,07	6,59	7,91
	D.S.	0,189	0,473	1,093	0,981

PDA + MILSANA 1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	2,1	3,2	6	8,3
		2,2	3,2	6,2	8,15
	2	2	3,4	6	7,9
		2,1	3,3	5,8	8
	3	2,1	4	5,9	7,95
		2	3,95	5,8	7,8
	Media	2,08	3,51	5,95	8,02
	D.S.	0,069	0,337	0,138	0,165

PDA + MILSANA 5%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0,7	1,2	0,8
		0	0,8	1,2	0,8
	2	0	0,7	1,2	1,8
		0	0,8	1,2	1,8
	3	0	0	0	2
		0	0	0	2
	Media	0,00	0,50	0,80	1,53
	D.S.	0	0,356	0,566	0,525

PDA CONTROLLO

Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
1	2,75	5,6	8,35	8,6
	2,8	5,5	8,4	8,6
2	2,4	3,05	3,55	4,2
	2,25	3,25	3,4	3,5
3	2,25	5,65	8	8,6
	2,25	5,6	8	8,6
Media	2,45	4,78	6,62	7,02
D.S.	0,236	1,151	2,227	2,248

PDA + TAMPONE SODIO ACETATO 10mM (finale) pH 4,5

Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
1	1,9	3,9	3,8	3,35
	1,85	3,9	3,15	4,4
2	1,85	3,9	5,45	6,65
	1,9	3,9	5,4	6,75
3	1,75	2,85	5,45	6,8
	1,7	2,5	5,45	6,65
Media	1,83	3,49	4,78	5,77
D.S.	0,075	0,586	0,944	1,373

PDA CONTROLLO

Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
1	2,5	5,65	8,15	8,6
	2,6	5,55	8,5	8,6
2	2,5	5,6	8,35	8,6
	2,65	5,5	8,3	8,6
3	2,5	5,55	8,3	8,6
	2,6	5,45	8,1	8,6
Media	2,56	5,55	8,28	8,60
D.S.	0,061	0,065	0,131	0

PDA + GAROFANO 0,1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

PDA + GAROFANO 0,25%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

PDA + GAROFANO 1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

PDA + MENTA 0,1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

PDA + MENTA 0,25%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

PDA + MENTA 1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

PDA + TEA TREE 0,1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	1,15	2,55	2,15	6,85
		1,2	2,4	2,35	7,3
	2	0,6	1,4	5	7,1
		0	1,1	4,9	7,3
	3	1,2	2,65	2,35	4,8
		1,1	2,7	2,2	4,5
	Media	0,88	2,13	3,16	6,31
	D.S.	0,443	0,637	1,269	1,185

PDA + TRA TREE 0,25%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

PDA + TRA TREE 1%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	0	0	0	0
		0	0	0	0
	2	0	0	0	0
		0	0	0	0
	3	0	0	0	0
		0	0	0	0
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.S.	0	0	0	0

ALLEGATO 2

Misurazioni della crescita radiale del micelio di *B. cinerea in vitro* su PDA e chitosano

CONTROLLO PDA + TAMPONE SODIO ACETATO 50mM (finale) pH 4,5

Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	6°gg	7°gg	8°gg
1	0	0	1,2	2,2	3,4	7,15
	0	0	0,5	2,45	3,35	6,9
2	0	0	0,5	3,85	4,9	5,8
	0	0	0	3,75	4,8	5,9
3	0	0	0	4,6	5,9	4,25
	0	0	0	4,35	5,7	4,25
Media	0,00	0,00	0,37	3,53	4,68	5,71
D.S.	0	0	0,435	0,904	1	1,14

PDA + CHITOSANO in tampone sodio acetato 50mM (finale) pH 4,5

CHITOSANO 0,0125%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	6°gg	7°gg	8°gg
	1	0	1,2	0,6	6,05	7,15	6,4
		0	1,3	0	6,1	7,1	6,7
	2	0	1,3	2,5	5,7	7,1	8,3
		0	1,35	2,65	5,8	6,95	8,4
	3	0	0	2,2	3,85	5,1	8,3
		0	0	2,3	3,75	5,05	8,4
Media		0,00	0,86	1,71	5,21	6,41	7,75
D.S.		0	0,609	1,021	1,006	0,945	0,854

CHITOSANO 0,025%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	6°gg	7°gg	8°gg
	1	0	0,5	1,65	5,6	6,8	8
		0	0,5	1,6	5,6	6,75	7,95
	2	0	1,2	2,3	6,05	7,55	8,4
		0	1,3	2,35	6,05	7,6	8,5
	3	0	1	2,1	5,35	6,7	8,15
		0	1	2,05	5,4	6,7	8,3
Media		0,00	0,92	2,01	5,68	7,02	8,22
D.S.		0	0,313	0,291	0,281	0,397	0,201

CHITOSANO 0,05%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	6°gg	7°gg	8°gg
	1	0	1	1,95	4,8	5,85	6,6
		0	1	2	4,7	5,9	6,6
	2	0	1,3	2,6	5,95	7,1	8,1
		0	1,3	2,5	5,9	7,15	8,15
	3	0	0,5	1,5	5,2	5,95	7,1
		0	0,5	0,95	5,15	6,05	7,1
Media		0,00	0,93	1,92	5,28	6,33	7,28
D.S.		0	0,33	0,566	0,487	0,563	0,635

PDA + **CHITOSANO** in tampone sodio acetato 25mM (finale) pH 4,5

CHITOSANO 0,0125%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	1,2	1,75	4,1	5,8
		1,35	1,95	4,1	5,65
	2	1,25	2,6	4,25	5,4
		1,2	2,5	4,15	5,55
	3	1,2	2,6	2,15	2,05
		1,2	2,6	2	2,2
	Media	1,23	2,33	3,46	4,44
	D.S.	0,055	0,348	0,98	1,643

CHITOSANO 0,025%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	1,2	2,25	4,2	5,5
		1,25	2,2	4,2	5,45
	2	1,2	2,25	4,35	5,6
		1,2	2,3	4,4	5,5
	3	1,1	2,15	3,95	5,45
		1,1	2,55	3,85	5,5
	Media	1,18	2,28	4,16	5,50
	D.S.	0,056	0,128	0,199	0,05

CHITOSANO 0,05%	Piastra	1°gg	2°gg	3°gg	4°gg
	1	1,35	2	4,35	3,05
		1,4	2,05	4,35	3,4
	2	1,4	2,9	4,65	6,1
		1,4	2,95	4,5	5,9
	3	1,2	2,7	2,3	5,6
		1,3	2,65	2,3	5,55
	Media	1,34	2,54	3,74	4,93
	D.S.	0,073	0,38	1,024	1,226