



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI

RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea magistrale in scienze e tecnologie agrarie

TESI DI LAUREA:

“Strategie sostenibili per il controllo di *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera*: nuovi agenti microbici di biocontrollo”

Relatore: Prof. Sella Luca

Correlatori: Dott. Nerva Luca

Dott. Chitarra Walter

Laureando: Marzari Marco

Matricola n. 2062949

Anno accademico 2023/2024



## RIASSUNTO

Migliorare la sostenibilità in agricoltura è una delle strategie più importanti che l'Unione Europea sta adottando per contrastare il cambiamento climatico. È stata infatti creata una legislazione specifica per limitare l'uso scorretto degli agrofarmaci e stimolare lo sviluppo di strategie alternative a basso impatto ambientale. Una nuova frontiera verso la sostenibilità è la diffusione degli Agenti di Biocontrollo (BCA), costituiti da microrganismi benefici in grado di contrastare o evitare lo sviluppo di agenti patogeni. Nonostante queste nuove tecniche, non è ancora possibile rimuovere il rame per la gestione della *Plasmopara viticola* e di altri patogeni in viticoltura. Infatti, l'applicazione della strategia di biocontrollo può aiutare nell'obiettivo di ridurre l'uso del rame e di altri composti, con particolare riferimento all'agricoltura biologica e integrata.

Per questi motivi si è valutata la capacità di alcuni *Bacillus spp.* e di un isolato di *Trichoderma harzianum* di tollerare diverse concentrazioni di rame attraverso due tipi di test: su substrato solido e in liquido. Infine, la capacità di biocontrollo nei confronti di *P. viticola* è stata valutata su foglie di vite *in vitro*.

I risultati suggeriscono che *Bacillus spp.* e *T. harzianum* tollerano la presenza del rame e hanno capacità di crescita a concentrazioni variabili. Inoltre, in seguito all'applicazione dei microrganismi sulle foglie è stata osservata un'efficace riduzione della crescita di *P. viticola*.

Ciò apre la prospettiva di utilizzare questi BCA in co-formulazione con il rame per la gestione di *P. viticola*. Tuttavia, è necessario effettuare prove in vivo per valutare l'effetto dell'ambiente sulla persistenza e la capacità di contrastare i patogeni fogliari in condizioni reali.

## ABSTRACT

Improving sustainability in agriculture is one of the key strategies that the European Union is developing to contrast climate change. Indeed, a specific legislation was created to limit the incorrect use of pesticides and insecticides and to stimulate the development of innovative and sustainable strategies. A new frontier towards sustainability is the diffusion of the Biological Control Agents (BCAs), consisting of beneficial microorganisms able to contrast or avoid pathogens development. Despite the availability of these new techniques, it is not possible to completely avoid copper or fungicides application for the management of *Plasmopara viticola*. In fact, the application of copper still remains the main chemical for the management of *P. viticola* in organic viticulture. Applying BCAs can at least act as a complementary strategy to start a reduction in the use of copper and other fungicides. For this reason, more information on these approaches are need and has to be developed.

In this work, we assessed the ability of some *Bacillus spp.* isolates and an isolate of *Trichoderma harzianum* to tolerate different concentrations of copper through in vitro tests on solid and liquid media. Furthermore, their ability to contrast *P. viticola* has been evaluated during *in vitro* trials on grape leaves.

Results suggest that *Bacillus spp.* and *T. harzianum* tolerate and have growth capacity at different concentrations of copper. Moreover, an efficient reduction of *P. viticola* growth was observed production consequence to the application of the microbial formulations.

This allows the perspectives of developing the exploitation of these BCAs and their possible co-formulation with copper for the management of *P. viticola*. Still, in vivo trials must be performed to assess their persistence and their ability to contrast *P. viticola* in real environmental conditions.

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	6
<b>Il cambiamento climatico</b> .....	8
<b>Normative a favore della sostenibilità</b> .....	10
<b>Il rame e il suo largo utilizzo in viticoltura</b> .....	12
<b>La <i>Plasmopara viticola</i></b> .....	14
<b>Gli agenti di biocontrollo</b> .....	20
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	25
<b>Mezzi di coltura</b> .....	25
<b>Test di tolleranza al rame su substrato solido</b> .....	26
<b>Valutazione degli effetti in liquido</b> .....	28
<b>Test su foglie in vitro</b> .....	30
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	34
<b>Test di tolleranza al rame su substrato solido (prima replica)</b> .....	34
<b>Test di tolleranza al rame su substrato solido (seconda replica)</b> .....	38
<b>Valutazione degli effetti in liquido</b> .....	44
<b>Test su foglie in vitro</b> .....	46
<b>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b> .....	50
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	52

## INTRODUZIONE

Oggi, l'Europa sta affrontando una seria sfida per ridurre ed evitare le conseguenze negative date dai cambiamenti climatici, dall'inquinamento ambientale e dall'uso degli agrofarmaci di sintesi. Per questo, la Commissione europea (CE 2024) ha lanciato l'European Green Deal («Il Green Deal europeo - Commissione europea» 2021), il cui obiettivo è di trasformare l'attuale modello economico in un nuovo modello che rispetti l'ambiente. Ciò si può riassumere all'interno del concetto di sostenibilità.

L'ONU, nel 1987, definisce la sostenibilità ambientale come: *“una condizione di uno sviluppo in grado di assicurare il soddisfacimento dei bisogni della generazione presente senza compromettere la possibilità delle generazioni future di realizzare i propri”* (ONU, 2024).

L'European Green Deal affronta diverse linee d'azione, ad esempio la strategia Farm to Fork. Quest'ultima è un'iniziativa che mira a trasformare il sistema agrario europeo in un settore in cui si impiegano dei metodi più sostenibili, con il minor impatto ambientale possibile, aumentando al contempo il livello di qualità degli alimenti. A tal fine, sono stati fissati una serie di obiettivi per il 2030; tra questi ve ne sono due particolarmente ambiziosi: la riduzione del 50% dell'uso e del rischio di prodotti fitosanitari e la riduzione del 50% dell'uso di quelli più pericolosi. Tuttavia, l'esperienza dice che esiste un divario tra gli obiettivi prefissati e i coltivatori (Schäfer et al. 2019; Gil et al. 2019), poiché quest'ultimi non hanno una forte predisposizione ad apportare modifiche alle pratiche agricole, in quanto ciò rappresenta un rischio per il loro sostentamento.

Limitando l'uso dei fitofarmaci da parte degli agricoltori, si rende difficile il controllo delle malattie soprattutto quando non si trovano altre opzioni per sostituirli. È quindi necessario studiare a fondo nuove alternative per mantenere la produttività del settore, come l'uso degli agenti di biocontrollo; già stati studiati con successo contro *Plasmopara viticola* in sostituzione ai prodotti a base di rame (Dagostin et al. 2011).

Rispetto ai fitofarmaci di sintesi, gli agenti di biocontrollo, o BCA, presentano meno rischi nella loro gestione, essendo più rispettosi degli organismi non bersaglio dell'ecosistema e prodotti in tempi più brevi (Seiber et al. 2018); inoltre, riescono ad ottenere più rapidamente l'approvazione normativa (Liu et al. 2021). Considerando questi fattori, la parziale sostituzione dei prodotti agrochimici con i BCA potrebbe essere una buona soluzione per raggiungere gli obiettivi per una migliore sostenibilità. Tuttavia, secondo Samada e Tambunan (2020), i BCA sono limitati rispetto ai

fitofarmaci chimici a causa dei metodi di produzione costosi, della scarsa stabilità di conservazione e dei problemi di efficacia. Pur richiedendo ulteriore ricerca e sviluppo, gli agenti di biocontrollo hanno generalmente un impatto ambientale inferiore, il che li rende una buona opzione come alternativa ai fitofarmaci convenzionali (Kumar et al. 2021).

# Il cambiamento climatico

La Terra sta risentendo sempre di più del graduale cambiamento climatico. Per questo motivo sono state condotte molte ricerche per valutare i potenziali impatti di questi cambiamenti sulla fisiologia delle piante anche in relazione alla virulenza di diversi patogeni.

I ricercatori si stanno adoperando per trovare delle soluzioni più efficaci per contrastare gli effetti che l'innalzamento delle temperature e l'aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> causeranno nel prossimo futuro sulla viticoltura mondiale.

Nell'ultimo secolo la temperatura è aumentata di circa 0,6 °C, si prevede che entro il 2100 l'aumento sarà tra 1 e 4,5 °C (Francesca et al. 2006). Si prevede che i cambiamenti climatici possano influenzare l'epidemiologia dei patogeni delle piante (Francesca et al. 2006) poiché l'insorgenza e il progresso delle malattie dipendono dalle condizioni meteorologiche. In questo caso l'aumento di temperatura può interferire tra l'ospite e il patogeno provocando uno sviluppo precoce dei germogli ma allo stesso tempo anche dei funghi (Francesca et al. 2006).

Grazie a dei modelli previsionali per lo sviluppo di *Plasmopara viticola*, si è osservato che l'impatto dell'aumento delle temperature supererà l'effetto limitante della riduzione delle precipitazioni, provocando un'elevata pressione della malattia (Francesca et al. 2006). Infatti, nell'annata 2023 si è riscontrato un particolare andamento climatico, sia per quanto riguarda le temperature sia per le piovosità anomale registratesi durante l'intero anno, con l'alternarsi di mesi siccitosi e mesi con abbondanti piogge. Gennaio è risultato in linea con le medie avute dal 1961 al 2022. I successivi 3 mesi risultano essere siccitosi con uno scarto della media di circa 150 mm che si sono sommati al deficit dell'anno 2022. Il mese di maggio ha fatto registrare valori di precipitazioni superiori alle medie con 19 giorni in cui ha piovuto e 7 giorni in cui sono caduti almeno 10 mm di pioggia. Questa piovosità elevata ha creato forti disagi agli agricoltori impossibilitati ad effettuare i trattamenti fitosanitari con tempestività e con regolarità, determinando una forte pressione di malattia determinata da *Plasmopara viticola*. I restanti mesi sono rimasti nella media, fatta eccezione per luglio e agosto in cui vi è stata una piovosità leggermente superiore alla media. La conferma che il clima sta cambiando si può vedere nel mese di ottobre in cui si sono registrati valori di piovosità sopra la media, con la concentrazione maggiore di precipitazioni nella seconda parte del mese.

Anche in merito alle temperature si è notata un'alternanza lungo il periodo compreso tra gennaio e ottobre 2023; in generale tutti i mesi hanno oltrepassato di molto le temperature medie del secolo scorso, non superando però la media dell'ultimo decennio nei mesi estivi. Per il mese di settembre



invece le temperature hanno superato notevolmente la media sia del secolo scorso sia dell'ultimo decennio.

L'OIV, ossia l'Organizzazione Mondiale per la Vite e il Vino, ha evidenziato a livello globale un calo del 7% rispetto all'annata precedente nella produzione di vino, convalidando che il 2023 è stato un anno segnato da un forte cambiamento climatico. Gli effetti determinati dal cambiamento climatico hanno creato l'ambiente ideale, caldo e umido, per la crescita di *Plasmopara viticola* favorendone quindi il ciclo di infezione primario e i cicli secondari. In Italia ciò ha segnato il record negativo degli ultimi 60 anni.

A causa delle condizioni favorevoli per lo sviluppo di patogeni dovuto al cambiamento climatico vi è stato un incremento dell'utilizzo di mezzi tecnici per la difesa, andando contro quelle che sono le nuove strategie per un'agricoltura più sostenibile.

## Normative a favore della sostenibilità

La vite è considerata una delle colture che utilizza il maggior numero di trattamenti fitosanitari. Infatti, durante la stagione vegetativa, sono effettuati dai 12 ai 30 trattamenti, per difenderla dagli agenti patogeni (Pertot et al. 2017).

L'incremento dell'utilizzo dei fungicidi in Europa è imputabile principalmente all'alto numero di trattamenti per salvaguardare le rese elevate e gli effetti del cambiamento climatico che favoriscono lo sviluppo dei patogeni. Di conseguenza, negli ultimi anni, si sta lavorando per ridurre l'applicazione di fungicidi per ridurre al minimo l'impatto sull'ambiente e sulla salute umana (Campisano et al. 2014).

Le misure riportate di seguito sono pensate per indirizzare sempre di più i viticoltori ad un approccio più sostenibile. Le due più importanti normative in vigore a livello comunitario sono:

- La Direttiva 2009/128 / CE sul 'quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi'; in particolare obbliga tutti i paesi dell'UE a adottare il Piano di Azione Nazionale (PAN) dove si analizzano gli obiettivi, la riduzione dei rischi derivati dai prodotti fitosanitari e definisce i supporti economici per incoraggiare lo sviluppo della difesa integrata o di tecniche alternative.
- Regolamento Europeo n. 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari. Con il comunicato del Ministero della Salute del 7 marzo 2019, che rettifica ed integra le prescrizioni del comunicato di esecuzione (UE) n.2018/1981 datato 31 gennaio 2019 dove il rame viene ulteriormente vincolato.

La direttiva 2009/128 CE viene attuata mediante la creazione di un Piano d'Azione Nazionale (PAN) che ha la funzione di facilitare gli obiettivi quantitativi, i tempi e le misure e infine gli indicatori per la riduzione dei rischi e degli effetti legati all'impiego dei prodotti fitosanitari. Il PAN ha quindi l'obbligo di vincolare tutti i viticoltori o chiunque utilizzi professionalmente i prodotti fitosanitari.

Inoltre, si sta tracciando una nuova linea verso sistemi di difesa integrata, Integrated Pest Management, riassunti all'interno dell'Articolo 3 del Decreto Legislativo n. 150.

Nel Decreto Legislativo n. 150, più precisamente all'Articolo 19 si stabiliscono gli obblighi, che le aziende devono adempire per la difesa integrata; di seguito riportati:

- L'applicazione di tecniche di prevenzione e monitoraggio delle infezioni e delle infestazioni;
- L'impiego di mezzi biologici di controllo per i parassiti;
- Il ricorso a tecniche di coltivazione appropriate;

- L'uso giustificato e razionale dei fitofarmaci.

L'uso dei prodotti fitosanitari, ove si tratti di uno strumento indispensabile, deve rispettare la Direttiva 128/2009; ciò viene ribadito nell'Articolo 55 del regolamento europeo 1107/2009. È dunque importante assicurarsi il rispetto delle condizioni stabilite sull'etichetta del prodotto poiché un lungo impiego di essi influenza negativamente la sostenibilità ambientale, economica e sociale. Secondo recenti studi ci sono numerosi prodotti alternativi per rispettare le restrizioni europee sull'uso degli agrofarmaci (Direttiva 2009/128/CE) per un'agricoltura più sostenibile e sicura (Taibi et al. 2022).

Gli agricoltori devono implementare la lotta integrata e preferire metodi non chimici se forniscono un controllo soddisfacente delle malattie. Il trattamento della malattia mediante il controllo biologico si realizza attraverso una complessa rete di interazioni tra la pianta, l'agente patogeno, l'agente di biocontrollo e l'ambiente (Handelsman e Stabb 1996).

## Il rame e il suo largo utilizzo in viticoltura

Come accennato nell'introduzione, il Green Deal europeo ha tra gli obiettivi principali quello di promuovere la conversione all'agricoltura biologica, oltre a ridurre del 50% l'uso degli agrofarmaci entro il 2030. Nell'agricoltura biologica è presente un'elevata dipendenza dall'uso del rame come fungicida (Kuehne et al. 2017). Una possibile soluzione per i viticoltori biologici potrebbe essere quella di diminuire la quantità di rame applicato aumentando il livello di tecnologia di applicazione (Campos et al. 2019; Nackley et al. 2021) e l'utilizzo di nuovi prodotti contenenti microrganismi.

I preparati a base di rame sono utilizzati da oltre cento anni per il controllo preventivo della peronospora. Il loro uso ebbe uno sviluppo mondiale dopo l'accidentale scoperta della miscela bordolese nel 1880, quando i viticoltori usarono una miscela di solfato di rame e calce per evitare che le uve potessero essere rubate. A causa di questa pratica, uno scienziato francese di nome Millardet notò che questi grappoli coperti non presentavano danni da peronospora. Nel 1885, Millardet completò degli esperimenti che confermarono la capacità di questa sostanza di controllare la malattia a un costo relativamente basso. Pertanto, la poltiglia bordolese divenne il primo fungicida ad essere utilizzato su larga scala, a livello mondiale (De La Fuente et al. 2022).

Questo micronutriente, oltre ai vantaggi derivanti dal contenimento della peronospora, ne offre altri come, la scarsa capacità degli organismi bersaglio di sviluppare resistenza. Questo è dovuto alla capacità di esercitare un'azione multisito contro i funghi grazie all'induzione dell'aumento di permeabilità della membrana cellulare e all'inibizione dei processi di respirazione (Matta et al. 2017).

Inoltre, il rame si pone da antagonista nei confronti di altri elementi come il calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), il magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) o l'idrogeno ( $\text{H}^+$ ), che compongono la parete chitinosa dei funghi traducendosi in un blocco germinativo delle spore e dei conidi.

Nonostante il rame risulti ancora il principale alleato dei viticoltori biologici e non, oggi viene inserito tra le sostanze attive candidate alla sostituzione entro il 2025 in conformità del regolamento CE 1107/2009. Questo significa che la sostanza attiva in questione ha un tempo limitato di autorizzazione dato che causa problemi ambientali legati all'accumulo nei suoli e alla potenziale contaminazione dell'ambiente acquatico. Così, dal 2007 l'uso del rame è stato limitato dalla normativa europea (De La Fuente et al. 2022). Infatti, al giorno d'oggi, l'uso di rame nel vigneto è limitato a un massimo di 28 kg/ha in 7 anni (De La Fuente et al. 2022) qualsiasi sia la forma. Delle forme disponibili le più utilizzate sono il rame idrossido che rilascia lo ione rame molto velocemente,

ma con scarsa persistenza, il solfato tribasico di rame, il quale rilascia una parte di rame rapidamente, mentre un'altra si solubilizza più lentamente. Il limite è applicato all'agricoltura biologica e a quella convenzionale che predisponendo però di prodotti fitosanitari alternativi non presenta il rischio di superare il limite imposto (De La Fuente et al. 2022).

Date le limitazioni è stato esortato il mondo della ricerca e delle industrie produttrici di fitofarmaci a trovare rapidamente delle alternative con un profilo eco-tossicologico a minore impatto. La costituzione di nuovi formulati di rame potrebbe rappresentare un'altra tecnica per ridurre la quantità di questo metallo. In questo senso, i nuovi prodotti micro incapsulati possono migliorare la deposizione del rame, pertanto gli agricoltori sarebbero in grado di ridurre la quantità di prodotto necessaria per il controllo della malattia (Weitbrecht et al. 2021).

Un'altra tecnica che porterebbe alla riduzione del rame è l'utilizzo degli agenti di biocontrollo; infatti, risultano essere un'alternativa interessante per l'unione europea, poiché contribuirebbero a rispettare la strategia di riduzione. Questi prodotti, possono essere utilizzati come sostitutivi, almeno parziali, sia nella produzione biologica che convenzionale, dei fungicidi rameici e diminuendo l'impatto ambientale (Dagostin et al. 2010; Mulholland et al. 2017; Cohen et al. 2006). Purtroppo, però le alternative al rame non sono ancora sufficientemente diffuse tra gli agricoltori, a causa della mancanza di fiducia nella loro efficacia.

## ***La Plasmopara viticola***

La Peronospora cioè *Plasmopara viticola*, è un oomicete eterotallico endemico del Nord America su vite selvatica e coltivata, che presenta diversi livelli di specializzazione della pianta ospite, che varia da una lieve a una completa dipendenza dall'ospite. Tutte le principali cultivar di *Vitis vinifera* sono altamente sensibili alla peronospora, infatti, in assenza di un'efficace protezione quest'ultima risulta essere una delle più gravi patologie della vite (Yin et al. 2017; Ilaria Pertot 2007). Fu segnalata e introdotta nel sud-ovest della Francia per la prima volta nel 1878, dove probabilmente fu importata dall'America attraverso il materiale di propagazione resistente alla fillossera (Ilaria Pertot 2007; Gessler, Pertot, e Perazzolli 2011). Entro 5 anni dalla sua individuazione da parte di Jules Emile Planchon, *Plasmopara viticola* si diffuse in tutti i vigneti francesi, italiani, tedeschi e svizzeri (Planchon 1887).

La peronospora è principalmente una patologia fogliare causata da un agente strettamente biotrofo cioè, può crescere solo in associazione con le cellule vive dell'ospite e non *in vitro*, rendendone difficile lo studio. Questo, causa notevoli perdite economiche sulla coltura poiché infetta i tessuti giovani e teneri delle foglie verdi, dei rametti e dei frutti in breve tempo. Inoltre, può provocare difetti organolettici, riduzione della produttività e perdite di resa fino al 75% (Koledenkova et al. 2022; Darriet et al. 2002; Jermini, Blaise, e Gessler 2010; Gessler, Pertot, e Perazzolli 2011; Stummer et al. 2005). Queste infezioni possono distruggere tra il 40 e il 90 % delle piante in campo in condizioni di umidità e temperatura ottimali (Toffolatti et al. 2018). Questo patogeno della vite fu fuori controllo fino a quando Pierre-Marie Alexis Millardet scoprì le proprietà antimicotiche del solfato di rame nel 1882 e inventò la miscela bordolese nel 1885 (Millardet e Gayon 1885; Gessler, Pertot, e Perazzolli 2011).

*Plasmopara viticola*, appartenente all'ordine delle *Peronosporales* e alla famiglia delle *Peronosporaceae*, è stata identificata per la prima volta dal botanico e micologo americano Lewis David de Schweinitz nel 1834 e fu classificata come *Botrytis cana* (Schweinitz 1834). Nei successivi anni, viene riclassificata dal microbiologo tedesco Anton De Bary che ne descrisse nel 1863 i due cicli riproduttivi e la inserì in un nuovo genere *Peronospora* come *Peronospora viticola*. In seguito, nel 1886, Schröder trovò delle differenze tra diversi membri di *Peronospora* e introdusse un nuovo genere di *Plasmopara*. Nel 1888 Berlese e de Toni, utilizzando il sistema di classificazione di Schröder, diedero a questo patogeno il nome attuale di *Plasmopara viticola*.

Negli ultimi 50 anni, pur avendo causato in passato epidemie catastrofiche, la peronospora ha suscitato maggior interesse grazie alla scoperta e all'utilizzo dei fungicidi sistemici che hanno migliorato la capacità di controllare le malattie.

Dopo l'introduzione dal Nord America, questa malattia ha rappresentato un enorme problema per la viticoltura europea, causando epidemie in anni in cui si è osservata un'elevata umidità e copiose precipitazioni annuali (Emmett, Wicks, e Magarey 1992; Ilaria Pertot et al. 2017) e in assenza di un controllo sufficiente, come verificatosi nel 2023.

La temperatura ottimale per la crescita della *Plasmopara viticola* è di 25 °C; tuttavia la pioggia è il principale fattore responsabile delle epidemie. Più precisamente, le migliori temperature per lo sviluppo di questo patogeno vanno da una temperatura minima di crescita e di germinazione di circa 8-9 °C, fino ad una temperatura massima di 34 °C, che nel momento in cui viene superata va ad inibire la sua crescita (Francesca et al. 2006). Quest'ultima è limitata nelle regioni con scarse precipitazioni in primavera ed estate, dove non si raggiungono temperature sufficientemente elevate.

Pur infettando tutte le parti verdi che presentano stomi nella vite, le foglie sono il principale sito di infezione grazie alle dimensioni della loro superficie, il volume delle cellule per la crescita degli austori, la quantità e la struttura degli stomi e la mancanza di adeguata protezione contro l'invasione del patogeno.

La malattia è caratterizzata da un primo sintomo, ovvero delle macchie (definite come macchie d'olio) di forma regolare sulla faccia superiore delle foglie che sviluppano un colore verde opaco che vira verso un giallastro traslucido, mentre la faccia inferiore presenta una crescita cotonosa bianca. L'infezione di *Plasmopara viticola* provoca la decolorazione delle foglie, la necrosi e la defogliazione anticipata nella malattia grave, che insieme riducono la composizione delle sostanze nutritive, l'accumulo di zuccheri nelle bacche, la capacità di svernamento delle gemme e la quantità di raccolto (Underdown et al. 2008). Quando infette, le bacche giovani, dalla seconda e dalla terza settimana dall'allegagione, diventano marroni e sono coperte da polvere bianca ossia la sporulazione; mentre, con la maturazione, gli acini diventano meno suscettibili all'infezione ma il rachide può essere infettato oltre le tre settimane, diffondendosi agli acini più vecchi (Gessler et al. 2011) causando marciume con conseguente mummificazione.

La peronospora della vite, come molti oomiceti, possiede un corpo vegetativo filamentoso chiamato micelio, formato da ife dicotomicamente ramificate il cui diametro varia da 1 a 60 µm a seconda dello stadio di sviluppo del patogeno. Le ife crescono nello spazio intercellulare della foglia in modo

cenocitico, ovvero contengono diversi nuclei senza la formazione di pareti trasversali che dividono ogni ifa in cellule settate. Le pareti cellulari degli oomiceti sono costituite da cellulosa, glucani, piccole quantità di chitina e idrossiprolina, differendo dai funghi veri e propri (Bartnicki-Garcia 1968; Bakshi, Szejnberg, e Yarden 2001; Werner et al. 2002). La ramificazione delle ife è perpendicolare e monopodiale, ciò significa che la crescita del ramo principale dello sporangioforo continua mentre quello laterale rimane fisso, fino a formare 4 o 6 rami con 2 o 3 rami secondari. I rami finali, chiamati sterigmi, sono per lo più tricotomi nel genere *Plasmopara* e presentano distinti anuli alle loro estremità.

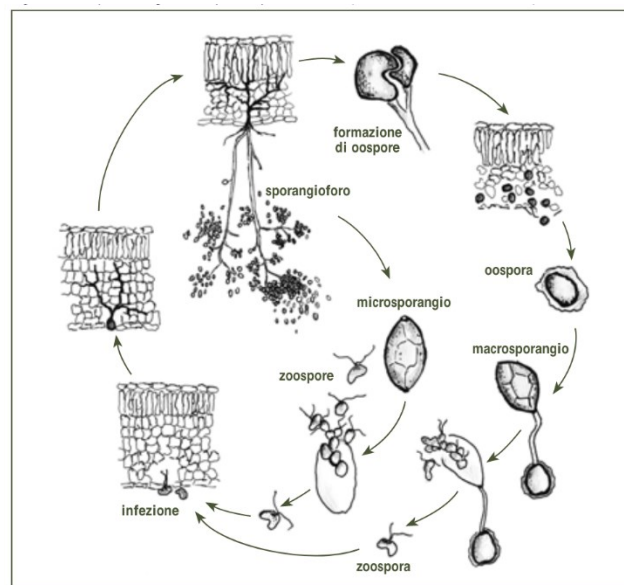


Figura 1: Adattato da Goidanich, 1964. Ciclo epidemiologico della peronospora della vite.

Gli sporangi sono sacche che rilasciano zoospore ellissoidi a parete sottile con un diametro di 15-30  $\mu\text{m}$  e hanno due flagelli eteroconti. Il flagello anteriore è più lungo e possiede due file simmetriche di peli tubolari, tripartiti chiamati mastigonemi, mentre quello posteriore è più corto e liscio (a frusta). Gli oomiceti producono anche grandi sferule di 25-50  $\mu\text{m}$  di diametro, con pareti spesse e sferiche, chiamate oospore utili a svernare queste derivanti dalla fase sessuata e sono presenti sia nell'ambiente sia nei residui fogliari e sui tralci.

Come molti oomiceti, *Plasmopara viticola* la si può trovare sia nella fase sessuata sia in quella asessuata.

Nella riproduzione asessuata esistono due fasi: la sporangiogenesi, in cui vi è la formazione di sporangi multinucleati, e la zoosporogenesi, ossia la formazione di zoospore biflagellate che infettano l'ospite attraverso gli stomi (Emmett et al. 1992). Durante la crescita del patogeno, i miceli



intercellulari raggiungono la cavità substomatica e formano un cuscino da cui si originano sporangiofori sulla parte inferiore delle zone infette, in condizioni di oscurità e di alta umidità, più precisamente la bagnatura.

Le spore sono definite sporangi se germinano indirettamente attraverso la produzione interna di zoospore biflagellate mobili che vengono rilasciate nell'ambiente, si incistano e poi germinano tramite un tubo germinativo oppure si definiscono conidi se germinano direttamente mediante la formazione di un tubo germinativo. Le spore sono generalmente rilasciate da un movimento di torsione dello sporangioforo in condizioni calde e umide. Gli sporangi scaricano le zoospore attraverso la rottura della papilla apicale callosa. Le spore rimangono attive da poche ore a giorni, a seconda delle condizioni ambientali e non sono in grado di sopravvivere in assenza di acqua, poiché non hanno pareti cellulari. Pertanto, il micelio della peronospora è programmato per non sporulare fino alla comparsa di condizioni ottimali. Le sue oospore possono atterrare nel terreno, dove restano inattive fino a quando non si verificano le condizioni favorevoli. In seguito, si trasferiscono in maniera passiva su una pianta ospite ed inizia così la fase di crescita (Agrios 2005). In alcuni casi, svernano come micelio in tralci infetti ma non morti. Le zoospore germinate colonizzano intercellularmente il parenchima fogliare con un micelio tubolare diploide non segmentato assorbendo i nutrienti dalle cellule ospitali usando l'haustoria intracellulare (Allègre et al. 2009).

Dopo 7-10 giorni compaiono i sintomi tipici dell'infezione primaria sulle foglie.

In condizioni di umidità e di una temperatura calda, superiore ai 25 °C, le masse di sporangi emergono tra gli stomi (Fröbel e Zyprian 2019). Quest'ultimi formano l'aspetto "bianco lanuginoso" che progredisce verso il grigio con il passare del tempo. Gli sporangi producono zoospore che vengono rilasciate attraverso il vento o le gocce di pioggia, dando inizio a infezioni secondarie, le quali causano lo sviluppo esponenziale della malattia (Park et al. 1997).

Il progredire della malattia nei germogli provoca l'ingrossamento delle cellule infette e del volume del micelio nelle aree intercellulari dando origine alla distorsione e all'ipertrofia, che porta alla morte e al collasso, generando germogli marroni e infossati.

A seconda della temperatura, dell'umidità e della suscettibilità varietale, il ciclo completo della malattia dura da 5 a 18 giorni (Agrios 2005).

Le zoospore iniziano a muoversi alla ricerca di un nuovo ospite, rilevando dei gradienti chimici ed elettrici della pianta da infettare. Una volta che le zoospore raggiungono un potenziale ospite utilizzano il flagello anteriore, il quale si piega e propaga un'onda sinusoidale dalla base alla punta, per spingere la zoospora in avanti, mentre, usano quello posteriore, a frusta, per farla virare. Dopo

essere arrivate al complesso stomatico si incistano. Durante l'incistamento delle zoospore staccano entrambi i flagelli, secernono materiali della matrice extracellulare e trasformano le cellule ovoidali in cisti sferiche. Entro 30 minuti dall'incistamento, le zoospore germinano utilizzando un tubo germinale che forma un appressorio attraverso lo stoma (Allègre et al. 2007). L'appressorio sfrutta meccanismi chimici e fisici per penetrare la superficie.

La riproduzione sessuata fornisce un meccanismo di variazione genetica e forma spore che possono sopravvivere per molti anni in condizioni difficili. Infatti, le oospore sono prodotte in condizioni secche e in grandi quantità; maturano durante l'inverno e germinano con la presenza di tre fattori: tralci più lunghi di 10 cm, precipitazioni superiori agli 8-10 mm nelle 24 ore precedenti e temperature maggiori ai 10 °C (Rosa et al. 1993; 1995). Altri fattori che favoriscono la germinazione sono la luce, gli estratti vegetali e i metaboliti microbici.

Per prevenire l'infezione da parte di patogeni biotrofi, tra cui la peronospora, le piante hanno evoluto due sistemi di segnalazione complessi che percepiscono gli agenti patogeni. Normalmente i meccanismi di difesa si attivano dopo l'attacco del patogeno, portando a una resistenza indotta.

Oltre alla risposta di difesa inducibile, le piante utilizzano una resistenza preformata che include fattori strutturali e biochimici. Gli aspetti strutturali, come le proprietà della superficie fogliare o delle pareti cellulari resistenti sono la prima barriera che i patogeni devono superare prima di invadere la pianta. Se il microrganismo supera questa linea di resistenza aspecifica e colonizza la pianta, questa diventa il suo ospite e i meccanismi di resistenza indotta vengono attivati (Mysore e Ryu 2004; Slusarenko, Fraser, e Loon 2012).

La percezione di un patogeno oomicete da parte della pianta innesca una serie di vie fisiologiche e metaboliche nelle cellule, regolando i geni legati alla resistenza e avviando le corrispondenti risposte immunitarie, tra cui l'HR (Halim et al. 2009; Koornneef e Pieterse 2008). *Plasmopara viticola* è nota per innescare diverse risposte di difesa nei tessuti fogliari, comprese quelle fisiche come la lignina: deposizione di callosio e chimiche, ad esempio la sintesi di chitinasi, glucanasi, perossidasi, stilbeni; in aggiunta vengono prodotti fattori coinvolti nei processi di lignificazione e necrosi che possono portare allo sviluppo di resistenza (Dai et al. 1995). I meccanismi strutturali, volti a produrre barriere fisiche contro l'infezione, includono la deposizione di cutina, cere cuticolari, lignina e callosio per rinforzare la parete cellulare nei siti di infezione (O'Connell e Panstruga 2006; Miotto-Vilanova et al. 2016; Paris et al. 2016).

Metaboliti secondari antimicrobici come fitoanticipine (principalmente saponine) e fitoalessine formano una resistenza biochimica. Le principali fitoalessine ad azione antimicrobica della vite sono gli stilbeni, ed in particolare il resveratrolo e i suoi derivati.

In aggiunta alle risposte molecolari e biochimiche intrinseche, le piante possono trarre vantaggio dal richiamo di microrganismi benefici che, colonizzando i tessuti della pianta vanno a formare il cosiddetto olobionte, ossia un superorganismo composto dalla pianta e da tutti i microrganismi ad essa associati. Alcuni microrganismi benefici sono poi in grado non solo di inibire direttamente la crescita dei patogeni tramite iperparassitismo o attività metaboliche e rifornire le piante di nutrienti o ormoni, ma hanno anche la capacità di stimolare i meccanismi di difesa della pianta (Van Loon, Bakker, e Pieterse 1998; Pieterse et al. 1996).

## Gli agenti di biocontrollo

Gli agenti di biocontrollo, detti anche BCA, sono dei microrganismi antagonisti che si presentano come funghi, batteri o lieviti, i quali vengono impiegati, attraverso vari meccanismi, nei trattamenti contro le malattie, ad esempio quelle funginee (Fedele et al. 2020).

Gli agenti patogeni sono la causa del 20-30 % delle perdite globali di resa (Savary et al. 2019). Per garantire una resa sufficiente e costante della vite spesso dipendiamo dall'utilizzo di prodotti fitosanitari di sintesi. Poiché quest'ultimi rappresentano una minaccia per la salute dell'uomo e dell'ambiente, vi è la necessità urgente di scoprire dei fungicidi sicuri per il controllo dei patogeni (Legein et al. 2020). Sebbene la gestione della malattia dipenda da delle classi di fungicidi chimici e da miscele contenenti rame, c'è il rischio di sviluppo di resistenza ai fungicidi (Sawant 2023). Quest'ultima è una delle principali sfide nella gestione del patogeno *Plasmopara viticola*; infatti, questa specie è riconosciuta dalla FRAC, *Fungicide Resistance Action Committee*, come ad alto rischio di sviluppo di resistenze ai fungicidi («FRAC | Home», s.d.). Per tali motivi e per la crescente voglia di cambiamento verso un'agricoltura più sostenibile è aumentata la richiesta di ridurre l'uso delle sostanze di sintesi.

Un'alternativa promettente per proteggere le colture è la lotta biologica con l'utilizzo di prodotti a base microbica classificati con il nome di agenti di biocontrollo, che hanno dimostrato di avere un'efficacia quasi paragonabile alla difesa convenzionale. Oltre ai BCA si sta provando l'impiego di estratti di piante o di organismi.

Negli ultimi anni le nuove normative europee e italiane hanno stimolato sempre di più lo sviluppo di metodi di lotta alternativi a quelli fondati sull'impiego dei prodotti di sintesi. Con questa prospettiva, la lotta biologica ha assunto un ruolo importante, ovvero l'impiego di qualsiasi entità biologica vivente oppure di molecole derivate da organismi viventi per controllare la crescita di organismi patogeni.

Molto spesso la lotta biologica viene effettuata nei regimi di agricoltura biologica: un settore dell'agricoltura in rapida crescita, grazie anche alle nuove direttive europee. Si tratta di utilizzare sostanze e processi naturali che tendono ad avere un impatto ambientale limitato, escludendo quindi l'uso di prodotti di sintesi.

Inoltre, la lotta biologica viene impiegata nell'agricoltura integrata, un sistema agricolo di produzione a basso impatto ambientale, che prevede l'uso razionale di tutti i fattori della produzione con lo scopo di ridurre al minimo il ricorso a mezzi tecnici e l'utilizzo del rame.

I BCA possono agire come eradicanti, riducendo l'inoculo oppure come protettivi, agendo sui patogeni presenti sulla vegetazione. Rispetto ai prodotti chimici classici gli agenti di biocontrollo hanno un profilo ecotossicologico e ambientale migliore, venendo anche affiancati in maniera sinergica agli agrofarmaci tradizionali (Tosi 2019) e ai prodotti contenenti rame. L'uso di quest'ultimi è consigliato soprattutto a basse e medie pressioni di malattia.

<p style="text-align: center;"><b>PUNTI DI FORZA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• No intervallo di sicurezza</li> <li>• Strategie anti-resistenza</li> <li>• Biodegradabilità</li> <li>• Selettività</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>PUNTI DI DEBOLEZZA</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficacia variabile</li> <li>• Stabilità del formulato</li> <li>• Bassa prontezza d'azione</li> <li>• Compatibilità con prodotti chimici</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>OPPORTUNITA'</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecnologia della formulazione</li> <li>• Trattamenti al seme</li> <li>• Potenziale crescita della tecnologia</li> </ul>	<p style="text-align: center;"><b>CRITICITA'</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Processi regolatori di autorizzazione</li> <li>• Obiezione dei produttori</li> </ul>

*Tabella 1: Punti di forza e debolezza, criticità ed opportunità per lo sviluppo e l'utilizzo degli agenti di biocontrollo nelle strategie di difesa delle colture.*

Gli agenti di controllo biologico implicano una sconcertante serie di meccanismi per il controllo delle malattie. Tuttavia, le prove conclusive del coinvolgimento di un particolare fattore nel controllo biologico sono determinate dalla stretta correlazione tra la comparsa del fattore e il controllo biologico (Junaid et al. 2013).

I vari meccanismi impiegati dagli agenti di biocontrollo sono ampiamente classificati in:

- Antagonismi diretti
- Antagonismi indiretti

L'antagonismo diretto avviene attraverso il contatto fisico tra BCA e l'agente patogeno, caratterizzato da un elevato grado di selettività per gli agenti patogeni. L'antagonismo diretto include:

- Iperparassitismo
- Competizione
- Antibiosi
- Secrezione di enzimi

L'iperparassitismo è la forma di antagonismo più considerata e più diretta (Pal e McSpadden Gardener 2006), che comporta la crescita tropica dell'agente di biocontrollo verso l'organismo bersaglio.

La competizione, per le superfici delle piante viventi, sono spesso ambienti limitati di nutrienti. Per colonizzare la pianta o parte di essa quindi il BCA deve competere efficacemente per i nutrienti disponibili (Pal e McSpadden Gardener 2006) per stabilirsi nell'ambiente. Questo processo di competizione è considerato un'interazione diretta tra il patogeno e l'agente di biocontrollo per cui i patogeni vengono esclusi dal consumo di nutrienti e dall'occupazione fisica del sito (Lorito et al. 1994).

Nella competizione per i nutrienti, i BCA competono per avere i micronutrienti rari ma essenziali, come il ferro e il manganese; poiché hanno un sistema di assorbimento delle sostanze più efficiente rispetto ai patogeni (Nelson 1991). Mentre nell'occupazione fisica del sito riducono o ritardano la colonizzazione della pianta da parte dell'agente patogeno.

L'antibiosi invece si riferisce alla produzione di composti a basso peso molecolare o di un antibiotico da parte di microrganismi che hanno un effetto diretto sulla crescita dei patogeni vegetali (Weller, 1988). Un efficace agente di biocontrollo è colui che produce una quantità sufficiente di antibiotici in prossimità del patogeno vegetale (Gour e Purohit 2004).

Infine, diversi microrganismi secernono enzimi che possono interferire con la crescita e/o le attività dei patogeni. Molti di questi producono e rilasciano enzimi litici che idrolizzano un'ampia varietà di composti polimerici, tra cui chitina, proteine, cellulosa e DNA. Talvolta la secrezione degli enzimi può provocare la soppressione diretta delle attività dei patogeni vegetali, della dissoluzione della parete cellulare o della membrana dei patogeni bersaglio.

Nell'antagonismo indiretto si induce la difesa immunitaria delle piante mediante la stimolazione dipendente dagli agenti di controllo biologico. In questo meccanismo si include:

- Promozione della crescita
- Resistenza sistemica indotta

Per promozione della crescita si intende il processo con cui i BCA possono ridurre l'incidenza delle malattie della vite aumentandone la crescita durante le fasi critiche dove il patogeno è in diretto contatto coi tessuti. I BCA promuovono la crescita delle piante attraverso l'aumento della disponibilità del nutriente ed un maggior assorbimento per il suo successivo impiego all'interno dei metaboliti (El-Sharkawy, Abo-El-Wafa, e Ibrahim 2018).

La resistenza sistemica indotta è la forma più indiretta di; in questo caso vengono indotti dei meccanismi di difesa della pianta nei quali si rafforzano le pareti cellulari migliorandone le risposte biochimiche e fisiologiche (Abdalla et al. 2011; Roatti et al. 2013; Xu e Kim 2016; Nandini et al. 2017). I BCA inducono la pianta a produrre acido jasmonico ed etilene che circolano all'interno della pianta stessa, così risultando disponibili per la difesa.

I BCA sono microrganismi delicati in quanto non sempre esiste una piena compatibilità con alcuni prodotti chimici o inorganici; quindi, quando si vuole impiegare una strategia di difesa integrata risulta opportuno fare degli studi preventivi, come effettuato nella medesima tesi mediante prove in solido e in liquido con prodotti contenenti rame. Oltre a questo, le condizioni ambientali sono uno dei fattori più importanti che influenzano l'efficacia degli agenti di biocontrollo (Fedele et al., 2020) poiché hanno un'ampia adattabilità ambientale tanto da poter crescere in un ambiente diverso da quello di isolamento (Sawant 2023). In particolare, la temperatura e l'umidità influenzano le dinamiche di crescita dei microrganismi (Elad e Freeman 2002) come anche la possibilità di crescita del patogeno.

Sono segnalati diversi batteri, lieviti e funghi iperparassiti, produttori di metaboliti antifungini, enzimi litici, o induttori di resistenza contro la peronospora (Koledenkova et al. 2022).

In conclusione, l'applicazione dei BCA può superare il problema degli effetti negativi della peronospora come alternative ai fungicidi chimici, rappresentando un metodo applicabile, sicuro per il controllo della peronospora della vite. Inoltre, potrebbero anche avere un buon impatto sui parametri di crescita e di produttività. È necessario comprendere i meccanismi di controllo biologico

delle malattie delle piante per consentire la manipolazione dell'ambiente per creare così condizioni favorevoli ad un biocontrollo di successo.



## MATERIALI E METODI

L'esperimento è cominciato con una prova di contaminazione di un prodotto fitosanitario sperimentale contenente del rame (rame metallo 5%), fornito dal centro di ricerca (CREA). Il tutto è iniziato con la preparazione di un terreno solido di coltivazione, chiamato CYA agar ovvero Czapek Yeast Autolysate Agar, un terreno di crescita per la coltura in vitro. La Yeast Autolysate sta ad indicare la presenza di lievito nel terreno; in questo caso i lieviti sono senza vitalità e quindi sono impossibilitati alla riproduzione.

### Mezzi di coltura

Il terreno di coltura utilizzato per le sperimentazioni di questa tesi è il Czapek Yeast Autolysate (CYA).

Di seguito sono esplicitate le dosi per la produzione di 1 L di CYA solido:

- 1 L di acqua Milli-Q
- 30 g di saccarosio
- 3 g di  $\text{NaNO}_3$
- 5 g di estratto di lievito
- 1 ml di  $\text{CuSO}_4$  a concentrazione [1000]
- 1 ml di  $\text{ZnSO}_4$  a concentrazione [1000]
- 1 ml di  $\text{FeSO}_4$  a concentrazione [1000]
- 4 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a concentrazione [250]
- 4 ml di KCl a concentrazione [250]
- 4 ml di  $\text{MgSO}_4$  a concentrazione [250]
- 15 g di bactoagar

Il solfato di ferro viene aggiunto solo alla fine poiché c'è il rischio di precipitazione durante la preparazione.

Dopo aver aggiunto gli ingredienti è necessario regolare il pH, il cui valore deve essere di 6.2, mediante l'acidificazione che avviene con l'aggiunta di HCl 1M. Una volta prodotto il CYA agar viene messo in autoclave per essere sterilizzato ed evitare così contaminazioni ed errori durante la sperimentazione. Al termine del ciclo di autoclave, evitando la solidificazione di CYA agar e mantenendo la sterilità sotto cappa aspirante, vengono mescolati in una beuta posta sopra un agitatore magnetico riscaldante 10 g di prodotto fitosanitario in 90 ml di CYA. All'interno di 2 piastre

da 60 mm si pipettano 10 ml del composto formato precedentemente; dopo la sua solidificazione verranno serrate con del parafilm e incubate ad una temperatura di 28°C per 72 ore.

#### Test di tolleranza al rame su substrato solido

Accertata la sterilità del campione di prodotto fitosanitario, si procede all'inizio dell'esperimento.

Prima di iniziare sono state scelte sette concentrazioni diverse del prodotto sperimentale, che partono da un valore del 10% (peso/volume), poi via via dimezzato fino ad arrivare alla concentrazione più bassa, ossia del 0,156%. (Tab.2)

Diluizione	Percentuale di concentrazione del prodotto	Percentuale di concentrazione del rame
DIL.1	10 %	0,5%
DIL.2	5 %	0,25%
DIL.3	2.5 %	0,125%
DIL.4	1.25 %	0,0625%
DIL.5	0.625 %	0,0313%
DIL.6	0.312 %	0,0156%
DIL.7	0.156 %	0,0078%

*Tabella 2: Presentazione delle sette diluizioni con le corrispondenti concentrazioni.*

Durante l'esperimento sono stati presi in esame sei tipi di batteri e un fungo. Mentre le piastre di Petri usate sono da 60 mm per i batteri e da 90 mm per il fungo. Per tutti i batteri e il fungo studiati sono state fatte due repliche per ogni concentrazione.

Per avere le diluizioni seriali ed evitare di pesare ripetutamente il prodotto fitosanitario, il quale nelle concentrazioni minori risulta essere un peso non misurabile in modo accurato, si sceglie quindi di preparare 340 ml di CYA, aggiungendo il 10% di prodotto fitosanitario. Dal totale si prendono 170 ml, che vengono poi divisi per ogni piastra di Petri da 60 mm, nella quale si aggiungono 10 ml del composto CYA agar e prodotto fitosanitario, precedentemente ottenuto; mentre per la piastra da 90 mm si aggiungono 20 ml del composto. Questo passaggio viene effettuato per due repliche a cui si associano 10 ml per l'eventuale possibilità di errore di riempimento delle piastre. Una volta inserite nelle piastre, ai restanti 170 ml si aggiungono altri 170 ml di CYA agar affinché la diluizione

diventi 1:2. Questa tecnica viene eseguita fino alla concentrazione di 0,15625%, ossia per sette volte. Il procedimento avviene in totale sterilità, mediante cappa aspirante.

La crescita deve essere monitorata per cinque giorni, in uno dei quali è necessario rinfrescare i batteri, in modo che siano vitali per il nuovo esperimento.

Per rinfresco batterico si intende il rinnovamento dei batteri presi in esame, attraverso il recupero di alcuni di essi da una coltivazione più datata e l'inserimento di questi in nuove piastre di CYA agar in modo da avere dei batteri sempre vitali per l'esperimento. La sequenza deve essere eseguita totalmente sotto cappa aspirante per evitare la contaminazione da *Aspergillus niger*, un fungo che può falsare il risultato finale. Infine, sono sigillate con del parafilm e conservate in camera di crescita a 28°C fino al prossimo utilizzo.

Una volta preparate le piastre vengono fatte raffreddare fino alla solidificazione del CYA agar; nel frattempo si preparano i batteri per essere poi inoculati sulle piastre. Quest'ultime sono nominate in base ai sei batteri utilizzati ed il fungo. Gli isolati usati sono i seguenti (Tab. 3):

Nome dell'Isolato	Nome scientifico
G-ML WS B6	<i>Bacillus velezensis</i>
G-ML-WS B12	<i>Bacillus altitudinis</i>
G-C WS B5	<i>Bacillus paralicheniformis</i>
WOOD B1	<i>Bacillus pumilus</i>
ROOT B7	<i>Bacillus spp.</i>
INQ INT	<i>Bacillus velezensis/amyloliquefaciens</i>
19VE211	<i>Trichoderma harzianum</i>

Tabella 3: Presentazione degli isolati presi in esame.

Per poter inoculare sulle piastre è necessario preparare un liquido apposito con batteri rinfrescati da un massimo di quattro giorni. Le piastre con i batteri cresciuti, previa pulizia con alcool, devono essere aperte sotto cappa; poi, mediante un'ansa monouso da 10 µL si raccolgono i batteri che vengono messi all'interno di un'ependorf contenente un 1 ml di acqua Milli-Q, il tutto poi viene messo in sospensione utilizzando una pipetta da 1 ml. Una volta omogenizzata la sospensione di acqua e batteri, con una pipetta si effettuano due spot, ognuno costituito da 2 µL, per piastra ripetuto per le sette diluizione, per la replica A e la replica B.

Durante l'inoculo dello spot si deve prestare attenzione a non creare delle bolle, in quanto il loro scoppio potrebbe causare una disseminazione di batteri, quindi la creazione di nuove colonie che andrebbero a falsare le misurazioni. Inoltre, per evitare contaminazioni tra gli isolati è fondamentale chiudere le piastre e pulire la postazione di lavoro con l'alcol. Per il fungo si procede allo stesso modo con la differenza che deve essere fatto per ultimo in quanto è molto facile la contaminazione con le piastre dei batteri.

Una volta completata la procedura le piastre vengono inserite ad una temperatura di 28°C. Ogni 24 ore si prende la misura della crescita, ossia si misura il diametro dello spot; questo deve essere effettuato per i primi quattro giorni, mentre la quinta misurazione viene effettuata a 48 ore dall'ultima.

La seconda replica dell'esperimento è stata effettuata con solo quattro diluizioni più una di controllo, contenente solo CYA agar, poiché si è osservato che ad alcune concentrazioni alcuni batteri non crescevano; perciò, diventa superfluo provare con altre diluizioni meno elevate, limitando così la crescita di uno o più componenti del consorzio batterico preso in considerazione.

Le diluizioni esaminate sono:

- 0,1%
- 0,05%
- 0,01%
- 0,005%

Le procedure per l'inoculo e la misurazione della crescita sono le stesse della prima prova.

### **Valutazione degli effetti in liquido**

La sperimentazione del prodotto fitosanitario è stata effettuata, oltre che nelle piastre, anche in CYA liquido in cui sono state utilizzate unicamente due diluizioni, 0,05% e 0,005%; inoltre, è stato effettuato un controllo senza prodotto fitosanitario replicato tre volte per ognuno: A, B e C. In aggiunta vengono lasciati tre bianchi, ovvero senza inoculo, cioè, sono delle falcon contenenti rispettivamente CYA per il controllo e CYA con prodotto fitosanitario nelle due diluizioni, necessarie a prendere lo zero di assorbanza.

La prova in liquido è iniziata dalla preparazione del CYA, come preparato già pronto, con l'aggiunta di acqua Milli-Q per arrivare al volume desiderato, successivamente autoclavato. Questa determinata prova è stata effettuata in delle falcon da 15 ml che sono state mantenute con la massima sterilità dalla scrittura all'inoculo. Successivamente, sotto cappa aspirante sono inseriti 4 ml di composto CYA più prodotto fitosanitario, ancora caldo da autoclave, in delle falcon. Nel frattempo che si raffredda quest'ultima miscela, si prepara per ogni batterio una eppendorf da 1,5 ml contenente 1 ml di acqua Milli-Q, alla quale è stata inserita una ansa di batteri poi rimessi in sospensione attraverso il carico e scarico della pipetta. Dopo aver omogenizzato la sospensione si prelevano 70 µL dalla eppendorf e si inseriscono in ogni falcon relativa allo stesso batterio. Una volta inoculate tutte le falcon vengono incubate a 28°C in un agitatore a 210 giri. Ogni 24 ore, in sterilità, si prelevano 100 µL, i quali si inseriscono all'interno di piastre con pozzetti; poi si effettua la misurazione dell'assorbanza rispetto a un pozzetto in cui è stato caricato il composto non inoculato, cioè il bianco, ripetuto per tre giorni.

La seconda e la terza replica della prova in liquido si basa sulle diluizioni usate nella prima replica, l'unica differenza è che vengono inoculati 50 microlitri ad una concentrazione di  $1 \cdot 10^{-5}$  cellule/ml. Per avere una così precisa concentrazione, le cellule batteriche sono state contate attraverso la camera di Burker.

La camera di Burker è uno strumento che serve a determinare una concentrazione standard di cellule. La madre, ossia il composto formato da CYA e crescita batterica di 24-48 ore contenuto nella beuta, ha una concentrazione cellulare troppo elevata per effettuare la conta; perciò, per favorire quest'ultima si diluisce 1:100 il campione. Dopo questo passaggio, si prendono 20 µL e si posizionano all'interno della piastra, quindi si procede al conteggio delle cellule distribuite in N quadrati. I quadrati in questione hanno una dimensione di 1 mm x 1 mm, una profondità di 0,1 mm e sono composti a loro volta da 16 settori. Di questi 16 se ne contano circa sei, annotandone la conta e successivamente facendone la media, la quale va poi moltiplicata per tutti i settori. Il risultato ottenuto viene moltiplicato per un fattore di conversione, ossia  $10^4$ , che va da 0,1 µl a 1 ml. Allo stesso tempo, però, si può ottenere la concentrazione effettiva della madre, moltiplicando il risultato per  $10^n$  dove n è il numero delle diluizioni effettuate. Mentre si procede alla conta è necessario prestare attenzione alle cellule nei bordi del settore, le quali devono essere contate solo su due dei quattro lati del settore stesso, per non rischiare la sovrastima o la sottostima.

## Test su foglie in vitro

Con lo stesso consorzio microbico, paragonato ad altri formulati sperimentati, è stata eseguita una prova su foglie, in cui si valuta la capacità di controllo o di limitare la crescita di *Plasmopara viticola*.

Il paragone, mantenendo la giusta umidità dell'ambiente, è stato effettuato tra:

- Piastre di controllo positivo mediante inoculazione di *Plasmopara viticola*
- Piastre di controllo negativo, dove non si effettua nessun inoculo
- Piastre con *Bacillus spp.*, cioè solo consorzio batterico e successivamente inoculati con *Plasmopara viticola*
- Piastre con *Bacillus spp.* più *Trichoderma harzianum*, ossia un fungo e successivamente inoculati con *Plasmopara viticola*
- Piastre con prodotto sperimentale siglato della Lallemand
- Mock test in cui al consorzio batterico si sostituiscono 600 µL di acqua Milli-Q

Per effettuare le prove in vitro è stato scelto lo *Sauvignon Blanc* come varietà di media/alta sensibilità (Cesco et al. 2020), prelevato da una coltivazione protetta e non trattata. In questo saggio, le piastre utilizzate sono da 90 mm contenenti 10 ml di acqua Milli-Q e agar 1%, non necessariamente autoclavati. È sconsigliato usare carta bagnata o cotone al posto di acqua e agar poiché tendono a mandare più facilmente in necrosi i tessuti fogliari e a rilasciare troppo velocemente, in modo aggressivo la propria umidità così falsando l'esperimento.

La foglia intera, con la pagina inferiore rivolta verso l'alto, va totalmente adagiata sull'agar, cercando di evitare la presenza di pieghe eccessive della lamina; conviene infatti ritagliare la foglia in maniera perfetta evitando le pieghe. Bisogna asportare parte del picciolo lasciandolo almeno lungo 5 mm per permettere una chiusura ottimale della piastra ed evitare la perdita di umidità all'interno.

L'inoculo batterico avviene tramite spray: 100 µL per ogni isolato, per un totale di 600 µL per foglia e di 700 per la tesi con *Trichoderma harzianum*; il liquido si trova ad una concentrazione cellulare di  $1 \times 10^9$ /ml, mentre in foglia avremo una quantità di  $1 \times 10^8$  cellule per ogni isolato batterico.

I batteri utilizzati per entrambi gli esperimenti sia in liquido sia per la prova contro *Plasmopara viticola*, sono stati coltivati all'interno di beute che ne favoriscono la crescita in tempi più rapidi. Le beute utilizzate sono da 250 ml all'interno delle quali vi sono 50 ml di CYA; è fortemente consigliato non superare 1/4 del volume totale, poiché la crescita risulta essere migliore per il giusto rapporto

aria/liquido. Il CYA usato è stato precedentemente autoclavato all'interno delle beute ed in seguito raffreddato sotto cappa, per limitare la possibilità di contaminazioni. Per ogni beuta avviene un inoculo con un ceppo batterico diverso. Questi batteri vengono prelevati dalle piastre rinfrescate alcuni giorni prima con un'ansa da 1 µL e inseriti nel liquido. Una volta inoculati tutti i batteri, vengono sigillati e messi a crescere a 28 °C a 210 giri.

Una volta spruzzato l'inoculo batterico su tutta la foglia, in modo omogeneo, si lascia asciugare circa 12 ore prima di inoculare la *Plasmopara viticola*. Per inoculare *Plasmopara viticola* alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  si deve prestare attenzione durante la conta in camera di Burker eliminando da essa gli zoosporangi danneggiati o vuoti; non superare la concentrazione indicata perché oltre risulta essere meno efficace l'inoculo. Per l'inoculazione è possibile usare sia la sporulazione raccolta fresca, per questa tecnica è consigliato raccogliere foglie in campo con macchie d'olio fresche e farle sporulare in armadio climatico, cioè in maniera controllata, piuttosto che raccogliere sporulazioni già presenti in campo; sia sporulazione raccolta precedentemente e conservata in congelatore a -20 °C, ciò è più utile per eludere la stagionalità. Se si utilizza quest'ultima tecnica è essenziale impiegare mezza eppendorf da 1,5 ml che va risospesa in 15 ml di acqua Milli-Q per inoculare circa 25 piastre a foglia intera.

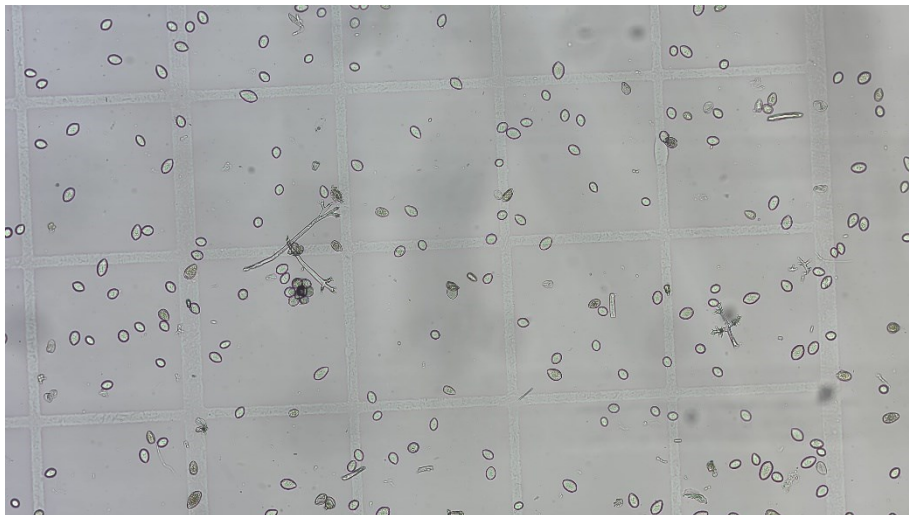


Figura 2: Conta di spore di *Plasmopara viticola*.

Per la produzione delle spore usate per il test, si prediligono foglie intere piene di macchie d'olio da riporre interamente nella piastra ma si possono anche ritagliare diversi spot di macchie d'olio da foglie diverse e comporre un puzzle all'interno della piastra di Petri. Dopo l'overnight, ovvero un periodo di buio, si aprono le piastre e vengono lasciate ad asciugare per circa 15 – 20 minuti, per poi procedere con l'aspirazione delle spore con pompa e puntale con filtro. Una volta terminata la

raccolta si trasferiscono le spore dal filtro del puntale alla eppendorf per essere subito utilizzate oppure riposte in congelatore a -20 °C.

Se le spore raccolte si utilizzano subito è preferibile non conservarle in soluzione per troppo tempo prima del loro utilizzo per non perdere di vitalità.

Per la raccolta delle spore fresche sono stati testati due metodi: il primo con uno spazzolino e acqua Milli-Q, mentre il secondo con falcon contenenti foglie sporulate e acqua Milli-Q con uno o due gocce di Triton. Quest'ultimo è un tensioattivo non ionico, usato per detergere le spore dalla foglia. Dopo varie prove di sporulazione, il metodo più efficace per ottenere delle spore pienamente fresche e vitali di *Plasmopara viticola* si è dimostrato essere la raccolta in campo di foglie con macchie d'olio fresche non ancora sporulate, ma fatte sporulare in modo controllato in laboratorio così da assicurare la raccolta di sole spore totalmente vitali.

Per il protocollo che si serve del metodo con lo spray sono necessarie per foglia circa sei o sette spruzzate della sospensione di acqua Milli-Q e *Plasmopara viticola*. L'inoculo deve essere perfettamente risospeso con una pipetta da 5000 µL e trasferito nello spray che deve nebulizzare bene e in maniera omogenea. È importante che il canalino dello spray sia carico della sospensione per poter procedere all'inoculazione delle foglie. Dopo aver inoculato la *Plasmopara viticola* si deve riporla velocemente in uno spazio al buio; infatti, si consiglia di procedere con questa operazione verso fine giornata così che faccia un overnight pur evitando un periodo superiore alle 15 ore di buio.

Una volta inoculate, bisogna chiudere le piastre e posizionarle in un portaoggetti oppure nell'armadio climatico, ricordandosi di metterle all'interno di un sacchetto perché la ventola dell'armadio potrebbe asciugare troppo. Dopo l'overnight le piastre vengono rimosse e fatte asciugare da tutta l'acqua libera. La temperatura della stanza o dell'armadio deve essere tra 22 e 23 °C. Una volta che le piastre sono asciutte, è utile bagnare il coperchio con circa tre spruzzate di acqua Milli-Q evitando però che ce ne sia in eccesso e comunque mantenendo un'umidità superiore al 90%. Quindi riporre le piastre nell'armadio o nel portaoggetti conservando il ciclo circadiano.

Il protocollo di inoculo di *Plasmopara viticola* mediante goccia avviene in modo identico al protocollo precedente fino al momento di inoculo di *Plasmopara viticola*.

In questo caso *Plasmopara viticola*, viene inoculata su di una foglia intera tramite 18 gocce da 20 µL; bisogna prestare attenzione a porre la goccia sulla lamina senza che questa si rompa. In seguito al posizionamento di tutte le gocce sulla foglia, si spruzza acqua Milli-Q sul coperchio e si richiude la



piastra, quindi si pone in overnight. Il giorno seguente si tolgono le piastre poste al buio e, usando una pipetta, si asportano tutte le gocce cercando di non toccare il tessuto fogliare per non lesionarlo; quindi, si lascia la piastra aperta per circa 5-10 minuti per l'asciugatura delle 18 gocce. Successivamente, si crea un ambiente con umidità vicina al 90 % mediante due o tre spruzzate di acqua Milli-Q sul coperchio e infine si ripone nell'armadio climatico o nel portaoggetti. Per garantire un'umidità elevata all'interno della piastra, si deve controllare tutti i giorni la bagnatura del coperchio. Si è osservato che la sporulazione comincia a comparire dopo cinque o sei giorni dall'overnight. Il protocollo che è adottabile con dischi fogliari di vite prevede l'uso di due o tre gocce da 10  $\mu$ L o di una sola goccia da 30  $\mu$ L. Per ogni dischetto fogliare non si deve scendere sotto 1,5 cm di diametro del dischetto stesso poiché tenderebbe a sfavorire la sporulazione di *Plasmopara viticola*; in qualsiasi caso non è necessario sterilizzare i dischetti o le foglie dato che la peronospora non si sviluppa correttamente.

L'indagine sull'indice di malattia è stata condotta a sette giorni dopo l'inoculazione. La gravità è stata valutata utilizzando la seguente scala da 0 a 9:

- 0: nessuno sviluppo visibile di peronospora,
- 1: area fogliare che manifesta sporulazione da 0% a 5%
- 3: area fogliare che manifesta sporulazione da 6% a 25%
- 5: area fogliare che manifesta sporulazione da 26% a 50%
- 7: area fogliare che manifesta sporulazione da 51% a 75%
- 9: area fogliare che manifesta sporulazione superiore a 76%

La percentuale determina l'area infettata della lamina fogliare (Reuveni 1998).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Test di tolleranza al rame su substrato solido (prima replica)

Il seguente test ha lo scopo di trovare quale sia la diluizione che più si avvicina al fattore limitante per la crescita di uno dei batteri che compone il pool da testare per un possibile controllo di *Plasmopara viticola*. Oltre a testare un pool di batteri viene testato anche un fungo, cioè il *Trichoderma harzianum*.

Il diametro delle colonie degli isolati presi in considerazione per questo test è stato misurato in millimetri.

In seguito, vengono riportate le tabelle riassuntive con i dati delle medie e delle deviazioni standard delle quattro colonie per ogni singolo isolato.

Isolato INQ INT										
	Giorno 1		Giorno 2		Giorno 3		Giorno 4		Giorno 6	
	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV
DIL 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 4	/	/	/	/	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00
DIL 5	/	/	2,50	0,58	2,50	0,58	2,50	0,58	2,50	0,58
DIL 6	3,00	0,00	4,88	0,25	7,25	0,50	8,75	0,96	10,00	0,82
DIL 7	5,75	0,50	7,13	0,25	9,00	0,00	10,25	0,50	13,75	0,50
<b>CONTROLLO</b>	9,75	0,50	14,25	0,96	16,38	0,48	17,75	0,96	20,00	0,00

Tabella 4: Medie e deviazioni standard dell'isolato INQ INT

Inizialmente si è osservato che l'isolato INQ INT non cresce a tutte le diverse diluizioni del substrato, ma con il passare dei giorni inizia la sua crescita in alcune piastre in cui non si era sviluppato precedentemente. In particolar modo nelle diluizioni 1, 2 e 3, in cui la concentrazione di rame è maggiore, la crescita dell'isolato viene totalmente limitata fino al giorno 6. (Tab. 4)

Isolato WOOD B1										
	Giorno 1		Giorno 2		Giorno 3		Giorno 4		Giorno 6	
	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV
DIL 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 5	2,00	0,00	2,75	0,50	2,88	0,25	2,88	0,25	3,50	0,58
DIL 6	3,00	0,00	3,38	0,25	3,63	0,48	4,00	0,71	5,00	0,00
DIL 7	2,50	0,58	3,38	0,48	3,50	0,58	3,63	0,48	4,75	0,50
<b>CONTROLLO</b>	4,50	0,58	4,50	0,58	5,00	0,41	5,25	0,29	12,00	0,00

Tabella 5: Medie e deviazioni standard dell'isolato WOOD B1

Nel caso dell'isolato WOOD B1 il limite di crescita si trova alla diluizione 4, mentre alla diluizione 5 la crescita comincia sin dal primo giorno. Più precisamente nella diluizione 6 si osserva il maggior sviluppo per tutti i giorni rispetto alle diluizioni restanti. Le deviazioni standard di tutti i giorni osservati restano pressoché invariate, ciò vuol dire che le singole colonie si sviluppano in maniera eguale. (Tab. 5)

<b>Isolato G-ML WS B12</b>										
	<b>Giorno 1</b>		<b>Giorno 2</b>		<b>Giorno 3</b>		<b>Giorno 4</b>		<b>Giorno 6</b>	
	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>
DIL 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 6	3,00	0,00	4,13	0,25	6,13	0,25	8,00	1,41	8,50	1,29
DIL 7	3,00	0,00	4,00	0,00	5,25	0,50	6,38	0,75	12,25	3,30
<b>CONTROLLO</b>	4,25	0,50	6,00	0,00	7,13	0,63	8,13	0,25	10,00	0,00

Tabella 6: Medie e deviazioni standard dell'isolato G-ML WS B12

Per G-ML WS B12 la crescita è osservabile fin dal primo giorno nelle diluizioni 6 e 7 e nel controllo. Si osserva però che le colonie batteriche alla diluizione 6 hanno una crescita maggiore solo fino al giorno 4, mentre la media dei diametri delle colonie nella diluizione 7 subisce una notevole crescita al giorno 6. (Tab. 6)

<b>Isolato ROOT B7</b>										
	<b>Giorno 1</b>		<b>Giorno 2</b>		<b>Giorno 3</b>		<b>Giorno 4</b>		<b>Giorno 6</b>	
	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DEV</b>
DIL 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 5	2,13	0,25	2,88	0,25	3,00	0,00	3,00	0,00	4,00	0,00
DIL 6	2,75	0,29	3,00	0,00	3,00	0,00	3,25	0,29	5,00	0,00
DIL 7	3,00	0,00	3,00	0,00	3,50	0,00	3,75	0,29	5,00	0,00
<b>CONTROLLO</b>	4,38	0,48	4,75	0,29	4,88	0,25	5,00	0,00	7,00	0,00

Tabella 7: Medie e deviazioni standard dell'isolato ROOT B7

Si è osservato che l'isolato ROOT B7 è il più stabile rispetto agli altri isolati, poiché all'aumentare della concentrazione di rame la crescita viene inibita. Infatti, le deviazioni standard con valori vicini allo 0 definiscono una crescita regolare tra i diversi spot. Il limite di crescita è dato dalla diluizione 4. (Tab. 7)

Isolato G-C WS B5										
	Giorno 1		Giorno 2		Giorno 3		Giorno 4		Giorno 6	
	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV
DIL 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 7	2,13	0,25	2,63	0,25	3,00	0,00	3,00	0,00	5,75	0,50
<b>CONTROLLO</b>	3,50	0,58	8,00	0,00	10,25	0,50	10,50	0,58	14,50	1,73

Tabella 8: Medie e deviazioni standard dell'isolato G-C WS B5

Questo isolato, ossia G-C WS B5, ha il limite di crescita più basso di tutti; infatti, si può notare il suo sviluppo solo nelle piastre a diluizione 7 e nel controllo. (Tab. 8)

Isolato G-ML WS B6										
	Giorno 1		Giorno 2		Giorno 3		Giorno 4		Giorno 6	
	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV
DIL 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 5	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 6	2,63	0,25	3,63	0,48	5,13	0,25	7,25	0,50	10	0,00
DIL 7	4,13	0,25	6,38	0,48	8,25	0,50	14,25	0,50	24,75	0,50
<b>CONTROLLO</b>	7,25	0,50	11,75	0,48	16,25	0,96	17,50	0,58	24,75	1,89

Tabella 9: Medie e deviazioni standard dell'isolato G-ML WS B6

Nella tabella 9, riguardante G-ML WS B6, è la diluizione 5 a limitare la crescita dell'isolato. Si osserva che il diametro delle colonie alla diluizione 7 presentano crescita maggiore rispetto alle colonie della diluizione 6, mantenendo un'uguale crescita del controllo al giorno 6. Mentre, le deviazioni standard rimangono pressoché invariate tra loro.

Isolato 19 VE 211										
	Giorno 1		Giorno 2		Giorno 3		Giorno 4		Giorno 6	
	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV	MEDIA	DEV
DIL 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
DIL 2	/	/	/	/	/	/	/	/	10	0,00
DIL 3	/	/	14,25	2,99	31,5	1,29	40	0,00	FULL	0,00
DIL 4	/	/	23,25	2,75	35,5	1,00	FULL	0,00	FULL	0,00
DIL 5	/	/	24,75	3,30	FULL	0,00	FULL	0,00	FULL	0,00
DIL 6	/	/	45,75	5,56	FULL	0,00	FULL	0,00	FULL	0,00
DIL 7	/	/	40	4,08	FULL	0,00	FULL	0,00	FULL	0,00
<b>CONTROLLO</b>	/	/	35	3,56	FULL	0,00	FULL	0,00	FULL	0,00

Tabella 10: Medie e deviazioni standard dell'isolato 19 VE 211

Nella tabella 10, ossia quella dell'isolato 19 VE 211, che identifica il fungo *Trichoderma harzianum* si identifica con il termine "FULL" l'assenza di misurazione poiché la piastra risulta essere completamente colonizzata dal fungo, con gradi diversi di sporulazione.

Rispetto ai batteri, *Trichoderma harzianum* ha un comportamento completamente diverso in quanto al giorno 1, in tutte le diluizioni, non vi è stata alcuna crescita misurabile. Dal secondo giorno la colonizzazione era visibile e già abbondante; inoltre, dai dati si nota una deviazione standard molto elevata provocata da una variabilità nella circonferenza delle colonie. Dalla tabella 10 si può osservare che il fungo sembra crescere maggiormente nelle piastre delle diluizioni 6 e 7, contenenti minor concentrazione di rame, rispetto alle piastre di controllo.

In questo caso, solo la diluizione 1 risulta contenere una percentuale troppo elevata di rame tanto da inibire la crescita del fungo anche al giorno 6.

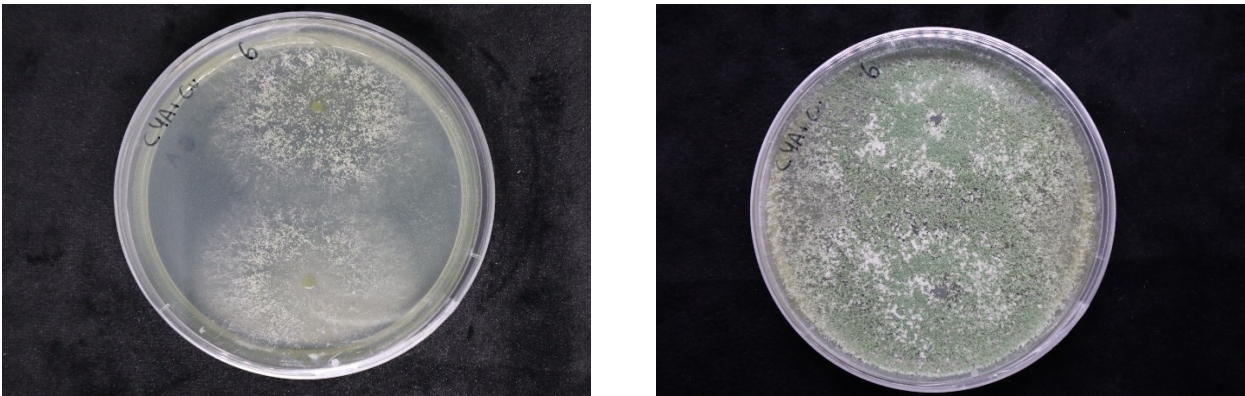


Figura 3: Confronto della medesima piastra (DIL. 6) per *Trichoderma harzianum* al giorno 2 e al giorno 3.

## Test di tolleranza al rame su substrato solido (seconda replica)

La seconda replica su substrato solido è stata effettuata solamente con quattro diluizioni in quanto l'isolato G-C WS B5 risulta essere limitato a concentrazioni di prodotto che superano 0,156 %, corrisponde alla diluizione 7 della prima replica del test di tolleranza al rame su substrato solido.

Inoltre, in tale replica si è scelto di non esaminare il *Trichoderma harzianum* dato che la sua crescita nei tre giorni è massima per le concentrazioni prese in esame. Sono state scelte invece altre diluizioni, ad esempio 0,005 % ossia quella che si utilizzerebbe in campo.

Di seguito vengono introdotti dei grafici rappresentanti le crescite delle colonie e la corrispettiva analisi statistica dei dati mediante un ANOVA test supportato da un test di HSD di Tukey, con una probabilità di errore del 5%. Questo test viene utilizzato per determinare le differenze significative tra le due tesi. Per sintesi, nella rappresentazione, si intenderà la significatività con il simbolo \*, mentre la non significatività con il simbolo /.

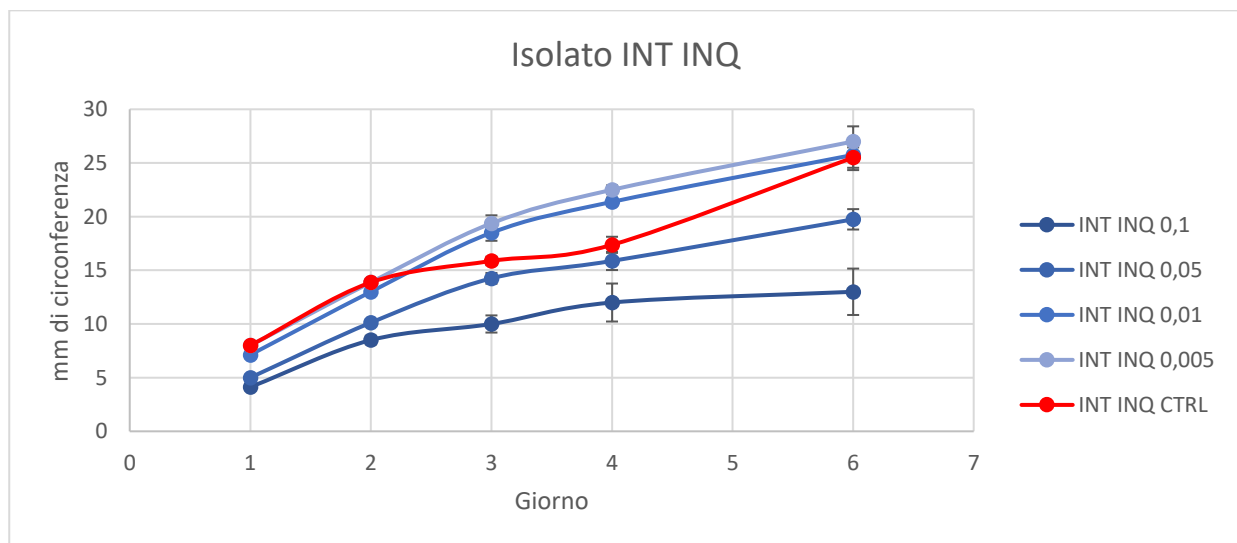


Grafico 1: Rappresentazione della crescita batterica di INT INQ alle diverse diluizioni.

	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 6
CTRL vs C_0,005	/	/	*	*	/
CTRL vs C_0,01	*	*	*	*	/
CTRL vs C_0,05	*	*	*	/	*
CTRL vs C_0,1	*	*	*	*	*

Tabella 11: Analisi statistica per l'isolato INT INQ. (ANOVA Tukey test)

Per i primi due giorni il controllo e la concentrazione 0,005 % sono equiparabili tra loro; le restanti concentrazioni sono caratterizzate da una differenza significativa nella circonferenza della colonia.

Al terzo giorno il controllo ha un rallentamento della crescita, la quale si manifesta con l'abbassamento della curva, causando una differenza significativa rispetto alle diverse concentrazioni. Al giorno 6, ovvero la conclusione del rilievo dei dati, la circonferenza delle colonie del controllo non è significativamente diversa rispetto a quella misurate alle concentrazioni 0,005% e 0,01%, mentre presenta una differenza significativa rispetto alle concentrazioni con più rame cioè la 0,05% e 0,1%.

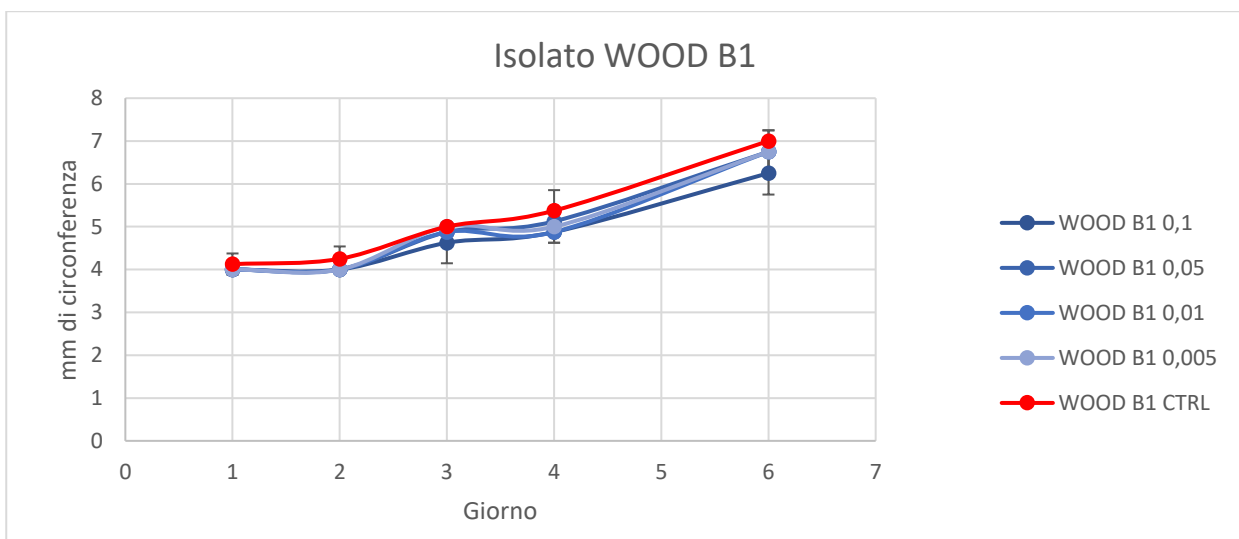


Grafico 2: Rappresentazione della crescita batterica di WOOD B1 alle diverse diluizioni.

	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 6
CTRL vs C_0,005	/	/	/	/	/
CTRL vs C_0,01	/	/	/	/	/
CTRL vs C_0,05	/	/	/	/	/
CTRL vs C_0,1	/	/	/	/	/

Tabella 12: Analisi statistica per l'isolato WOOD B1. (ANOVA Tukey test)

Per l'isolato, WOOD B1 si osserva una linea di crescita costante a tutte le concentrazioni. Si può quindi constatare che per l'intero esperimento non c'è nessuna differenza significativa tra le concentrazioni ed il controllo. Si può quindi concludere che la presenza di rame nel substrato non crea limitazione nella crescita della colonia.

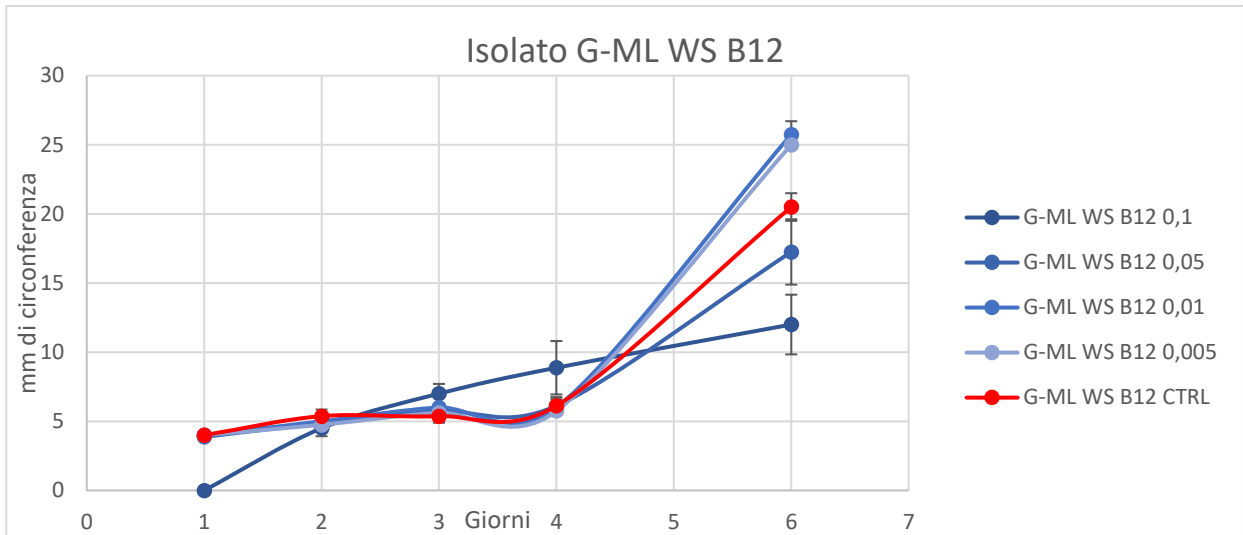


Grafico 3: Rappresentazione della crescita batterica di G-ML WS B12 alle diverse diluizioni.

	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 6
CTRL vs C_0,005	/	/	/	/	*
CTRL vs C_0,01	/	/	/	/	*
CTRL vs C_0,05	/	/	/	/	/
CTRL vs C_0,1	*	*	*	*	*

Tabella 13: Analisi statistica per l'isolato G-ML WS B12. (ANOVA Tukey test)

Dal grafico di G-ML WS B12 si osserva che al giorno 1, non vi è crescita alla concentrazione 0,1 %, tuttavia nei giorni 3 e 4 la circonferenza è maggiore rispetto a quella osservata alle altre concentrazioni e nel controllo. Ciò è possibile poiché alcuni isolati di questo *Bacillus altitudinis* riescono a detossificare il rame. (Harsonowati et al. 2023)

Inoltre, alla conclusione della rilevazione le concentrazioni 0,005% e 0,01% sono significativamente diverse rispetto al controllo, in quanto mostrano una crescita maggiore.



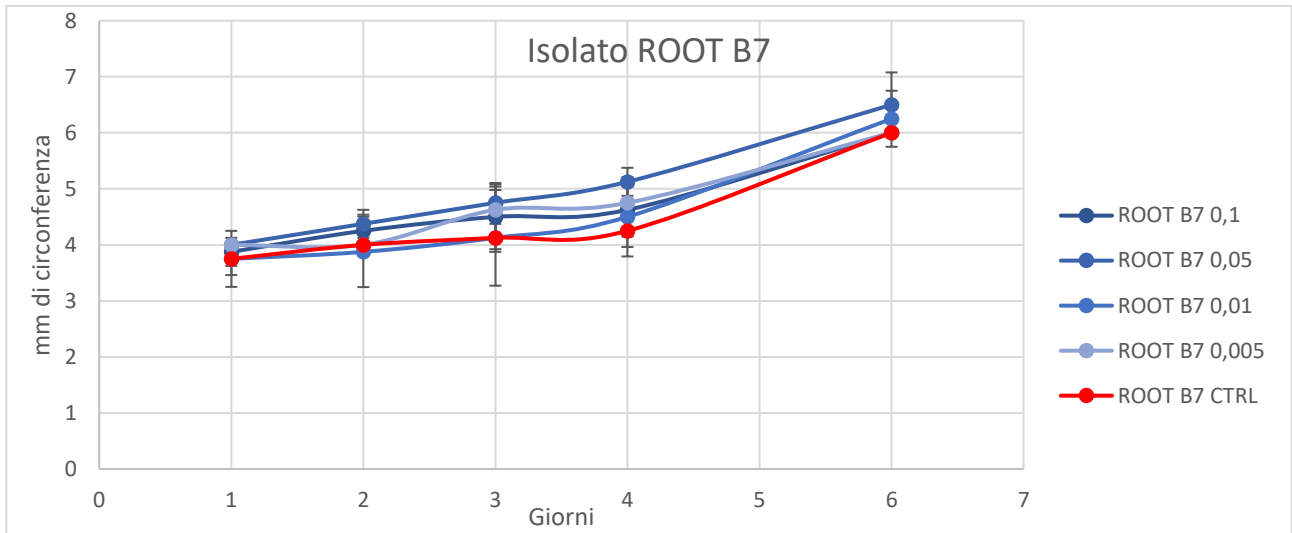


Grafico 4: Rappresentazione della crescita batterica di ROOT B7 alle diverse diluizioni.

	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 6
CTRL vs C_0,005	/	/	/	/	/
CTRL vs C_0,01	/	/	/	/	/
CTRL vs C_0,05	/	/	/	/	/
CTRL vs C_0,1	/	/	/	/	/

Tabella 14: Analisi statistica per l'isolato ROOT B7. (ANOVA Tukey test)

Per ROOT B7 la crescita è simile a tutte le concentrazioni, la crescita minore si osserva nel controllo anche se non è significativamente diversa rispetto ai substrati contenenti rame.

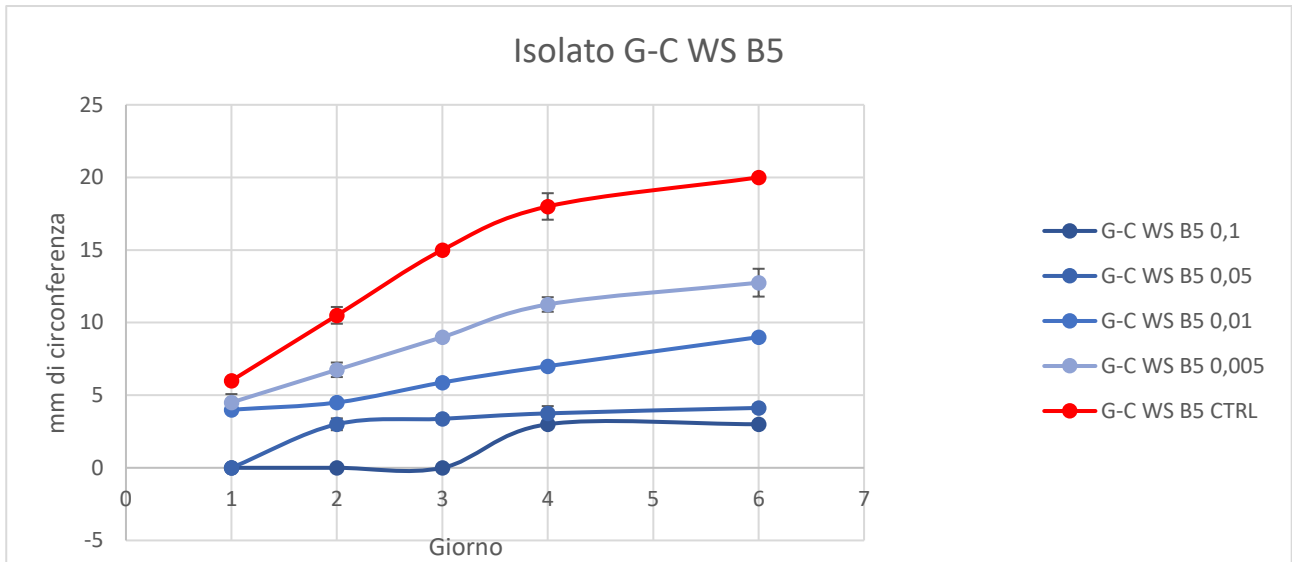


Grafico 5: Rappresentazione della crescita batterica di G-C WS B5 alle diverse diluizioni.

	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 6
CTRL vs C_0,005	*	*	*	*	*
CTRL vs C_0,01	*	*	*	*	*
CTRL vs C_0,05	*	*	*	*	*
CTRL vs C_0,1	*	*	*	*	*

Tabella 15: Analisi statistica per l'isolato G-C WS B5. (ANOVA Tukey test)

Nei primi tre giorni alla diluizione 0,1 % per l'isolato G-C WS B5 non si osserva crescita della colonia, così come alla diluizione 0,05 % al giorno 1; dal giorno 2, la sua crescita rimane pressoché invariata fino alla fine del giorno 6.

Dall'analisi dei dati si riscontra che, per questo isolato, qualsiasi sia la concentrazione di rame nel substrato causa sempre una differenza significativa rispetto al controllo.

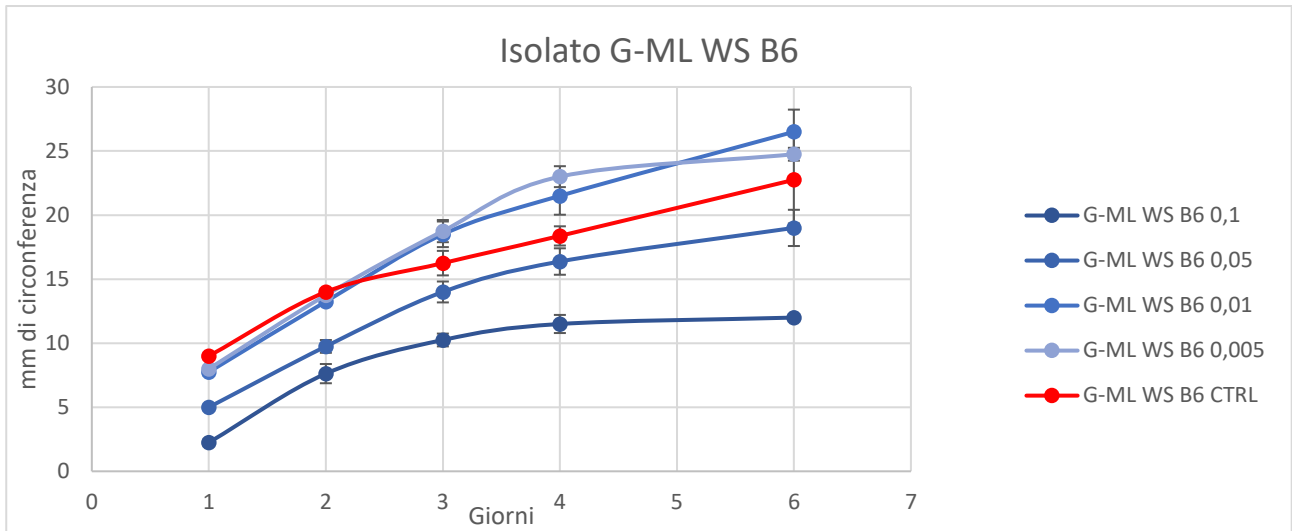


Grafico 6: Rappresentazione della crescita batterica di G-ML WS B6 alle diverse diluizioni.

	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3	Giorno 4	Giorno 6
CTRL vs C_0,005	*	/	*	*	/
CTRL vs C_0,01	*	/	*	*	/
CTRL vs C_0,05	*	*	*	/	/
CTRL vs C_0,1	*	*	*	*	*

Tabella 16: Analisi statistica per l'isolato G-ML WS B6. (ANOVA Tukey test)

Per l'isolato G-ML WS B6, al giorno 1 vi è differenza significativa di crescita delle colonie in tutti i substrati contenenti rame rispetto al controllo. Per i substrati con concentrazione più elevata la crescita della colonia è inferiore a quella del controllo, seppur l'unica differenza significativa è osservabile alla concentrazione 0,1 %. Nei giorni 3, 4 e 6 le colonie nei substrati con concentrazione 0,005% e 0,01%, hanno una circonferenza maggiore rispetto al controllo, sebbene la differenza sia significativa solo nei giorni 3 e 4.

## Valutazione degli effetti in liquido

Nel test in liquido si è tenuto conto solo della concentrazione 0,005 % del prodotto sul liquido di crescita, questa è la concentrazione che si utilizza in campo. La concentrazione 0,05 % presenta in tutti i trial effettuati delle misurazioni non utilizzabili, in quanto sembrerebbe che l'assorbanza utilizzata per valutare la crescita batterica venga disturbata dalla presenza del prodotto fitosanitario, che quindi altera i risultati. Perciò, sono stati scartati tutti i risultati ottenuti da quella concentrazione.

La prova in liquido è stata necessaria in quanto in quella in solido potrebbe esserci la possibilità di detossificazione del rame, essendo i batteri a contatto puntuale con il terreno. Invece nella prova in liquido, i batteri sono immersi nella soluzione e quindi sempre a contatto con il rame.

Per ottenere i dati riportati in tabella 17 sono state misurate le differenze tra la densità ottica del bianco e la densità ottica delle provette contenenti i batteri. Questo è stato eseguito per le tre repliche di ogni batterio; inoltre, è stato calcolato il rapporto tra la crescita media allo 0,005 % e quella del controllo. Il tutto è stato replicato per tre giorni consecutivi.

	CTRL		0,005%		0,005/CTRL
	Mean	St. Dev	Mean	St. Dev	
<b>GIORNO 1</b>					
INT INQ	0,4040	0,0314	0,4207	0,0215	1,041
WOOD B1	0,3243	0,0206	0,3323	0,0368	1,025
G-ML WS B12	0,0043	0,0006	0,0283	0,0015	6,538
ROOT B7	0,2657	0,0301	0,2883	0,0595	1,085
G-C WS B5	0,0080	0,0149	0,0117	0,0080	1,4583
G-ML WS B6	0,3823	0,0120	0,4527	0,0137	1,184
<b>GIORNO 2</b>					
INT INQ	0,5543	0,0644	0,2893	0,0435	0,522
WOOD B1	0,3247	0,0229	0,3150	0,0314	0,970
G-ML WS B12	0,0023	0,0012	0,1330	0,1482	57,000
ROOT B7	0,3007	0,0165	0,2680	0,0503	0,891
G-C WS B5	0,2437	0,0154	0,1913	0,0325	0,785
G-ML WS B6	0,5843	0,0508	0,3197	0,0290	0,547
<b>GIORNO 3</b>					
INT INQ	0,5250	0,0740	0,4733	0,1189	0,902
WOOD B1	0,3290	0,0242	0,2623	0,0453	0,797
G-ML WS B12	0,2250	0,1980	0,2997	0,0068	1,331
ROOT B7	0,2433	0,0179	0,2307	0,0351	0,948
G-C WS B5	0,2647	0,0078	0,2657	0,0591	1,004
G-ML WS B6	0,4647	0,0777	0,2143	0,0812	0,461

Tabella 17: Risultati delle densità ottiche dell'esperimento in liquido.

Dalla tabella si possono osservare dei dati contrastanti per l'isolato G-ML WS B12 nel giorno 1 e nel giorno 2 poiché i risultati ottenuti dalla media della densità ottica del controllo si rivelano essere

molto bassi, dati da una possibile mancanza di sviluppo batterico. Ciò è probabilmente causato da un errore durante la fase di inoculo delle provette del controllo.

Fatta eccezione per gli isolati G-C WS B5 e G-ML WS B12, tutti gli isolati sia al giorno 2 che al giorno 3 presentano un rapporto di densità ottica 0,005/CTRL inferiore a 1, che definisce una crescita batterica superiore nella prova non contenente rame. Possiamo però osservare che gli isolati ROOT B7 e INT INQ hanno valori molto vicini ad 1, mentre G-ML WS B6 e WOOD B1 sono nettamente al di sotto di 1 ciò comporta che la crescita in assenza di rame è superiore rispetto agli altri isolati presi in considerazione.

## Test su foglie in vitro

Per questo tipo di esperimento sono state effettuate due repliche. Nel test è stata valutata l'efficacia contro infezioni da *Plasmopara viticola* di trattamenti con *Bacillus spp.*, ovvero la miscela degli isolati valutati precedentemente, e di *Bacillus spp.* addizionati con *T. harzianum* e un prodotto sperimentale siglato, utilizzato come confronto.

Le tabelle riportate di seguito rappresentano la frequenza con cui si manifestano le classi di danno al settimo giorno dall'inoculo con *Plasmopara viticola*. In tabella 18 e 19 è stato riportato, inoltre, il test del chi-quadrato per stabilire l'ipotesi che i dati ottenuti corrispondano a quelli attesi.

### REPLICA 1

TESI	CLASSI DI DANNO						X <sup>2</sup>
	0	1	3	5	7	9	
CTRL -	5	0	0	0	0	0	X
CTRL +	0	0	3	2	0	0	0,00290
Mock	0	0	3	1	1	0	0,00044
<i>Bacillus spp.</i>	2	3	0	0	0	0	n.s.
<i>Bacillus spp.</i> + <i>T. harzianum</i>	1	4	0	0	0	0	n.s.
Prodotto sperimentale siglato	0	1	2	2	0	0	0,00113

Tabella 18: Frequenze delle classi di danno della prima replica su foglie.

Si può osservare che al settimo giorno tutte cinque le piastre di CTRL - hanno classe di danno 0; ciò significa che le foglie, raccolte da una coltivazione protetta e non trattata e non inoculate in vitro, non sono contaminate da spore di *P. viticola*. Si osserva inoltre che il consorzio batterico rispetto al *Bacillus spp.* più *T. harzianum* fornisce un miglior controllo in quanto presenta più piastre con classe di danno 1, anche se la differenza è di una sola piastra.

Il test Mock, ossia quello con solo acqua Milli-Q, favorisce di più le classi di danno maggiore rispetto al controllo positivo, ciò è dovuto alla maggiore concentrazione di umidità e acqua libera sulla foglia, che favoriscono la penetrazione di *Plasmopara viticola*.

Invece, il prodotto sperimentale siglato è caratterizzato da piastre aventi classe di danno superiori a quelle dei consorzi *Bacillus spp.* e *Bacillus spp.* più *T. harzianum*, indicando quindi una minor capacità di controllo da parte del prodotto sperimentale siglato. Dai risultati si evince che il fungo

*Trichoderma harzianum* in presenza dei batteri non controlla in maniera maggiore la crescita di *Plasmopara viticola*; infatti, si è osservata una maggiore sporulazione.

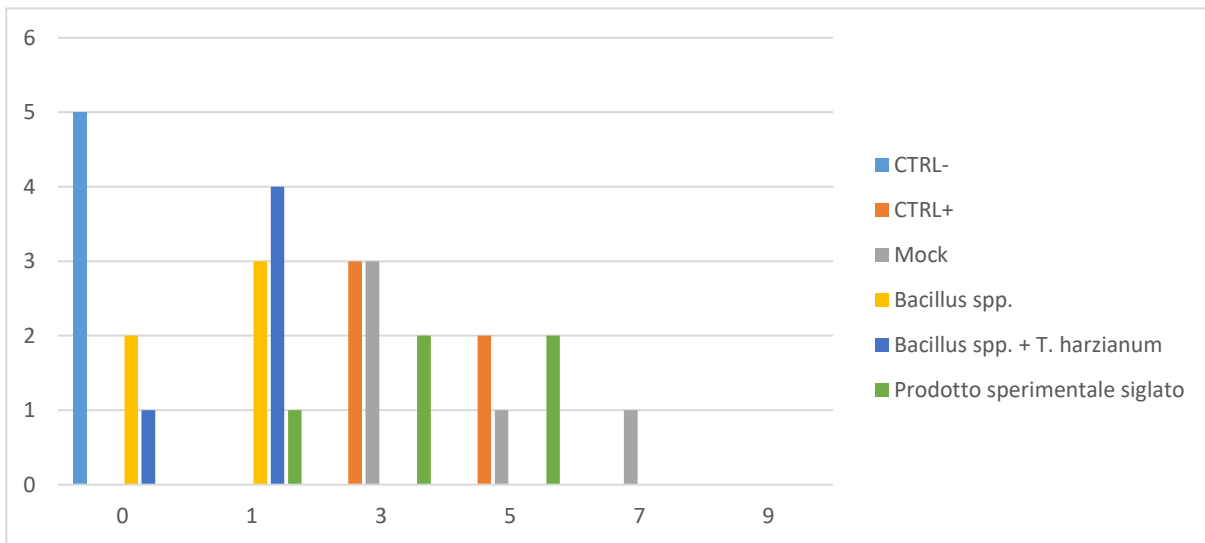


Grafico 7: Rappresentazione grafica delle frequenze delle classi di danno.



*Figura 4: Porzione di foglia con classe di danno 0 (CTRL -)*

*Figura 5: Porzione di foglia con classe di danno 5 (Prodotto sperimentale siglato).*



*Figura 6: Porzione di foglia con classe di danno 9 (CTRL +)*



## REPLICA 2

TESI	CLASSI DI DANNO						X <sup>2</sup>
	0	1	3	5	7	9	
CTRL -	5	0	0	0	0	0	X
CTRL +	0	0	0	0	3	2	5,23 E <sup>-7</sup>
Mock	0	0	0	1	2	2	5,23 E <sup>-7</sup>
Bacillus spp.	0	5	0	0	0	0	0,26146
Bacillus spp. + T. harzianum	0	1	2	1	1	0	0,00044
Prodotto sperimentale siglato	0	0	0	2	1	2	9,54 E <sup>-6</sup>

Tabella 19: Frequenze delle classi di danno della seconda replica su foglie.

Grazie alla precedente replica si è potuto agire in modo migliore per la seconda replica mediante un controllo migliore dell'umidità. Le foglie utilizzate di CTRL- non presentano sporulazione di *Plasmopara viticola* e quindi infezione.

Il consorzio di *Bacillus spp.* dimostra una forte capacità di contrastare lo sviluppo di *Plasmopara viticola* rispetto al consorzio *Bacillus spp. + Trichoderma harzianum* poiché tutte le cinque piastre hanno una classe di danno pari a 1. Nuovamente, il prodotto sperimentale siglato è caratterizzato da piastre aventi classe di danno superiori agli altri trattamenti.

Si conferma di nuovo che il Mock test con acqua Milli-Q favorisce la germinazione con successiva penetrazione, il tutto si conclude con la sporulazione di *Plasmopara viticola*.

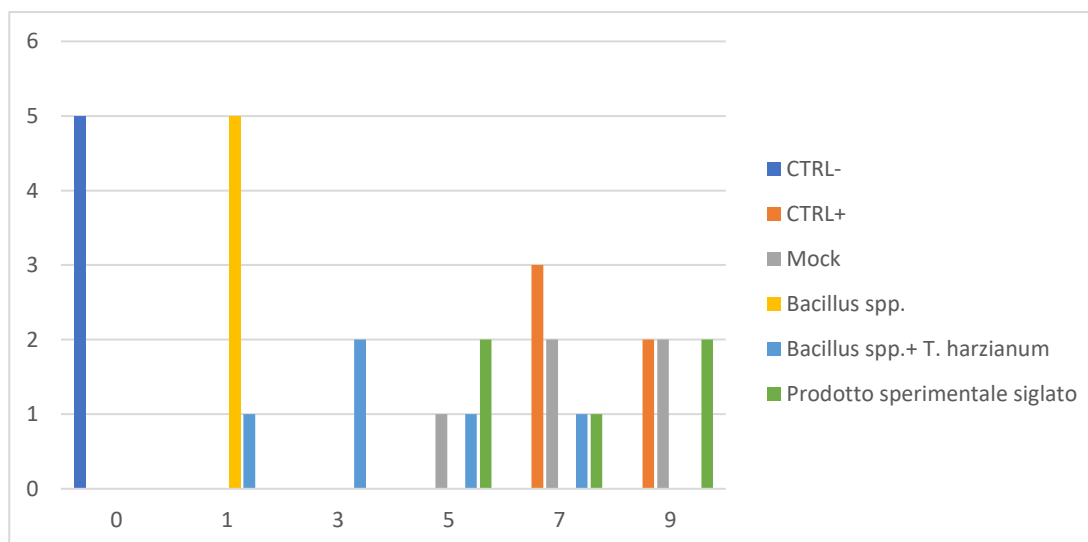


Grafico 8: Rappresentazione grafica delle frequenze delle classi di danno.

## CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La capacità di tolleranza al rame degli isolati di *Bacillus spp.* e del fungo *T. harzianum* è stata confermata dalle prove effettuate. È stato confermato, inoltre, che il consorzio batterico preso in esame è in grado di controllare abbastanza efficacemente *Plasmopara viticola*, fornendo una protezione superiore a quella fornita dal consorzio batterico addizionato con *T. harzianum*.

*T. harzianum*, invece, ha una forte capacità di sviluppo a concentrazioni elevate di rame nel substrato. Questo fattore potrebbe condizionare positivamente eventuali test in campo poiché le piante si potrebbero irrorare con soluzioni contenenti più rame rispetto a quello che si utilizzerebbe nel caso di trattamento con batteri, mantenendo così una difesa dalla malattia più elevata. Il possibile aumento del rame comunque dovrebbe rispettare il limite massimo consentito di 4 kg/ha per anno.

Alcuni isolati tra quelli studiati, come G-C WS B5, non risultano avere un'elevata capacità di tolleranza al rame, però ad oggi risultano essere gli unici utilizzabili per prove sperimentali; si auspica che nei prossimi anni questi isolati batterici vengano testati ulteriormente sia singolarmente che come consorzio per trovare quale sia il migliore pool batterico da far registrare e convalidare per l'utilizzo in campo aperto. Infatti, per poter convalidare l'efficacia degli isolati di *Bacillus spp.* identificati, è necessario effettuare dei test direttamente in campo, poiché le condizioni pedoclimatiche possono influenzare fortemente l'efficacia dei microrganismi.

In agricoltura biologica, il rame è la molecola più importante per la difesa da *Plasmopara viticola*. Dato che questa è una delle sostanze candidate alla sostituzione, è necessario quindi continuare la ricerca di singoli batteri o funghi o consorzi microbici alternativi al rame, in quanto gli agricoltori biologici non hanno altri prodotti per il controllo della malattia. Ad oggi, infatti, non esistono in commercio prodotti a base di agenti di biocontrollo registrati per *Plasmopara viticola*. Per chi effettua agricoltura biologica, oltre al rame sono disponibili alcune sostanze che inducono resistenza, come la laminarina, che tuttavia non ha un'efficacia comparabile con quella del rame; soprattutto in questi anni in cui la pressione di malattia è molto elevata.

In futuro si spera quindi che il rame non venga ulteriormente limitato dando così tempo per costituire altre miscele contenenti agenti di biocontrollo con effetti positivi per le piante.

Una prospettiva futura è che l'utilizzo degli agrofarmaci venga rimpiazzato dall'uso di agenti di biocontrollo sempre più specializzati e capaci di limitare malattie anche nei momenti di forte pressione infettiva.

L'obiettivo comune per gli studi futuri dovrebbe essere la produzione di una sostanza che abbia minor costo e maggior efficacia in modo da convincere tutti gli agricoltori, non solo quelli che applicano il biologico, a preferirla in modo da avere un'agricoltura sempre più sostenibile.

## BIBLIOGRAFIA

- Abdalla, Muna Ali, Hnin Yu Win, Md Tofazzal Islam, Andreas von Tiedemann, Anja Schüffler, e Hartmut Laatsch. 2011. «Khatmiamycin, a Motility Inhibitor and Zoosporicide against the Grapevine Downy Mildew Pathogen *Plasmopara Viticola* from *Streptomyces* Sp. ANK313». *The Journal of Antibiotics* 64 (10): 655–59. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.68>.
- Agrios, George N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier.
- Allègre, Mathilde, Xavier Daire, Marie-Claire Héloir, Sophie Trouvelot, Laurence Mercier, Marielle Adrian, e Alain Pugin. 2007. «Stomatal Deregulation in *Plasmopara Viticola* -infected Grapevine Leaves». *New Phytologist* 173 (4): 832–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01959.x>.
- Allègre, Mathilde, Marie-Claire Héloir, Sophie Trouvelot, Xavier Daire, Alain Pugin, D. Wendehenne, e Marielle Adrian. 2009. «Are Grapevine Stomata Involved in the Elicitor-Induced Protection Against Downy Mildew?» *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 22 (8): 977–86. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0977>.
- Bakshi, Shlomo, Abraham Szejnberg, e Oded Yarden. 2001. «Isolation and Characterization of a Cold-Tolerant Strain of *Fusarium Proliferatum*, a Biocontrol Agent of Grape Downy Mildew». *Phytopathology*® 91 (11): 1062–68. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.11.1062>.
- Bartnicki-Garcia, S. 1968. «Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi». *Annual Review of Microbiology* 22 (1): 87–108. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.000511>.
- Campisano, Andrea, Livio Antonielli, Michael Pancher, Sohail Yousaf, Massimo Pindo, e Ilaria Pertot. 2014. «Bacterial Endophytic Communities in the Grapevine Depend on Pest Management». *PLOS ONE* 9 (11): e112763.
- Campos, Javier, Jordi Llop, Montserrat Gallart, Francisco García-Ruiz, Anna Gras, Ramón Salcedo, e Emilio Gil. 2019. «Development of Canopy Vigour Maps Using UAV for Site-Specific Management during Vineyard Spraying Process». *Precision Agriculture* 20 (6): 1136–56. <https://doi.org/10.1007/s11119-019-09643-z>.
- Cesco, Stefano, Anna Tolotti, Stefano Nadalini, Stefano Rizzi, Fabio Valentinuzzi, Tanja Mimmo, Carlo Porfido, et al. 2020. «*Plasmopara viticola* infection affects mineral elements allocation and distribution in *Vitis vinifera* leaves». *Scientific Reports* 10 (ottobre): 18759. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75990-x>.
- Cohen, Yigal, Wenqiao Wang, Bat-Hen Ben-Daniel, e Yigal Ben-Daniel. 2006. «Extracts of *Inula Viscosa* Control Downy Mildew of Grapes Caused by *Plasmopara Viticola*». *Phytopathology*® 96 (4): 417–24. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0417>.
- «Commissione europea, sito web ufficiale - Commissione europea». 2024. 19 gennaio 2024. [https://commission.europa.eu/index\\_it](https://commission.europa.eu/index_it).
- Dagostin, Silvia, Tiziano Formolo, Oscar Giovannini, Ilaria Pertot, e Annegret Schmitt. 2010. «*Salvia Officinalis* Extract Can Protect Grapevine Against *Plasmopara Viticola*». *Plant Disease* 94 (5): 575–80. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0575>.
- Dagostin, Silvia, Hans-Jakob Schärer, Ilaria Pertot, e Lucius Tamm. 2011. «Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture?» *Crop Protection* 30 (7): 776–88.
- Dai, G. H., C. Andary, L. Mondolot-Cosson, e D. Boubals. 1995. «Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46 (3): 177–88. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1995.1014>.
- Darriet, Philippe, Monique Pons, Robert Henry, Olivier Dumont, Vincent Findeling, Philippe Cartolaro, Agnès Calonnec, e Denis Dubourdieu. 2002. «Impact Odorants Contributing to the Fungus Type Aroma from Grape Berries Contaminated by Powdery Mildew (*Uncinula Necator*); Incidence of Enzymatic Activities of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (11): 3277–82. <https://doi.org/10.1021/jf011527d>.

- De La Fuente, Mario, David Fernández-Calviño, Bartosz Tylkowski, Josep M. Montornes, Magdalena Olkiewicz, Ruth Pereira, Anabela Cachada, Tito Caffi, Giorgia Fedele, e Felicidad De Herralde. 2022. «Alternatives to CU Applications in Viticulture: How R&D Projects Can Provide Applied Solutions, Helping to Establish Legislation Limits». In *Grapes and Wine*, a cura di Antonio Morata, Iris Loira, e Carmen González. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100500>.
- Elad, Yigal, e Stanley Freeman. 2002. «Biological Control of Fungal Plant Pathogens». In *Agricultural Applications*, a cura di Frank Kempken, 93–109. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2_6).
- El-Sharkawy, Hany Hassan Ahmed, Thoraya Saber Ali Abo-El-Wafa, e Seham Abdel-Aal Ibrahim. 2018. «Biological Control Agents Improve the Productivity and Induce the Resistance against Downy Mildew of Grapevine». *Journal of Plant Pathology* 100 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0007-0>.
- Emmett, R. W., T. J. Wicks, e P. A. Magarey. 1992. «Downy mildew of grapes. In 'Diseases of fruit crops, Vol. 3: Plant diseases of international importance'.(Eds J Kumar, HS Chaube, US Singh, AN Mukhopadhyay) pp. 90–128». Prentice Hall: Englewood Cliffs, NJ.
- Fedele, Giorgia, Chiara Brischetto, Elisa González-Domínguez, e Vittorio Rossi. 2020. «The Colonization of Grape Bunch Trash by Microorganisms for the Biocontrol of Botrytis Cinerea as Influenced by Temperature and Humidity». *Agronomy* 10 (11): 1829. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111829>.
- «FRAC | Home». s.d. Consultato 19 gennaio 2024. <https://www.frac.info/>.
- Francesca, Salinari, Giosuè Simona, Tubiello Francesco Nicola, Rettori Andrea, Rossi Vittorio, Spanna Federico, Rosenzweig Cynthia, e Gullino Maria Lodovica. 2006. «Downy Mildew ( *Plasmopara Viticola* ) Epidemics on Grapevine under Climate Change». *Global Change Biology* 12 (7): 1299–1307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01175.x>.
- Fröbel, Sarah, e Eva Zyprian. 2019. «Colonization of Different Grapevine Tissues by *Plasmopara viticola*—A Histological Study». *Frontiers in Plant Science* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00951>.
- Gessler, Cesare, Iliana Pertot, e Michele Perazzolli. 2011. «*Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management». *Phytopathologia Mediterranea* 50 (1): 3–44.
- Gil, Emilio, Javier Campos, Paula Ortega, Jordi Llop, Anna Gras, Enric Armengol, Ramón Salcedo, e Montserrat Gallart. 2019. «DOSAVIÑA: Tool to calculate the optimal volume rate and pesticide amount in vineyard spray applications based on a modified leaf wall area method». *Computers and Electronics in Agriculture* 160: 117–30.
- Gour, H. N., e S. D. Purohit. 2004. *Annual Review of Plant Pathology (Vol. 2)*. Scientific Publishers.
- Halim, Vincentius A., Simone Altmann, Dorothea Ellinger, Lennart Eschen-Lippold, Otto Miersch, Dierk Scheel, e Sabine Rosahl. 2009. «PAMP-induced Defense Responses in Potato Require Both Salicylic Acid and Jasmonic Acid». *The Plant Journal* 57 (2): 230–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03688.x>.
- Handelsman, Jo, e Eric V. Stabb. 1996. «Biocontrol of soilborne plant pathogens». *Plant Cell* 8 (10): 1855–69. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1855>.
- Harsonowati, Wiwiek, Sri Rahayuningsih, Erny Yuniarti, Dwi Ningsih Susilowati, Dyah Manohara, Sipriyadi, Sri Widyaningsih, Alina Akhdiya, Yadi Suryadi, e Titi Tentrem. 2023. «Bacterial Metal-Scavengers Newly Isolated from Indonesian Gold Mine-Impacted Area: *Bacillus Altitudinis* MIM12 as Novel Tools for Bio-Transformation of Mercury». *Microbial Ecology* 86 (3): 1646–60. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02203-z>.
- «HomePage». 2024. ONU Italia. 19 gennaio 2024. <https://unric.org/it/>.
- «Il Green Deal europeo - Commissione europea». 2021. 14 luglio 2021. [https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal\\_it](https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_it).
- Jermine, Mauro, Philippe Blaise, e Cesare Gessler. 2010. «Quantification of the influence of the downy mildew (*Plasmopara viticola*) epidemics on the compensatory capacities of *Vitis vinifera* “Merlot” to limit the qualitative yield damage». *Vitis* 49 (4): 153–60.

- Junaid, Jan, N.A. Dar, Tauseef Bhat, Arif Bhat, e Mohammad Bhat. 2013. «Commercial Biocontrol Agents and Their Mechanism of Action in the Management of Plant Pathogens». *Int J Modern Plant&Anim Sci.* 1 (gennaio): 39–57.
- Koledenkova, Kseniia, Qassim Esmaeel, Cédric Jacquard, Jerzy Nowak, Christophe Clément, e Essaid Ait Barka. 2022. «Plasmopara viticola the Causal Agent of Downy Mildew of Grapevine: From Its Taxonomy to Disease Management». *Frontiers in Microbiology* 13: 889472.
- Koornneef, Annemart, e Corné M.J. Pieterse. 2008. «Cross Talk in Defense Signaling». *Plant Physiology* 146 (3): 839–44. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112029>.
- Kuehne, Stefan, Dietmar Roßberg, Peter Röhrig, Friedhelm Von Mehring, Florian Weihrauch, Sonja Kanthak, Jutta Kienzle, Wolfgang Patzwahl, Eckhardt Reiners, e Julia Gitzel. 2017. «The use of copper pesticides in Germany and the search for minimization and replacement strategies». *Organic Farming* 3 (1): 66–75.
- Kumar, Jitendra, Ayyagari Ramlal, Dharmendra Mallick, e Vachaspati Mishra. 2021. «An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance». *Plants* 10 (6): 1185.
- Legein, Marie, Wenke Smets, Dieter Vandenheuveel, Tom Eilers, Babette Muyshondt, Els Prinsen, Roeland Samson, e Sarah Lebeer. 2020. «Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere». *Frontiers in Microbiology* 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01619>.
- Liu, Xiaoman, Aocheng Cao, Dongdong Yan, Canbin Ouyang, Qiuxia Wang, e Yuan Li. 2021. «Overview of Mechanisms and Uses of Biopesticides». *International Journal of Pest Management* 67 (1): 65–72. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>.
- Lorito, Matteo, Christopher K. Hayes, Astolfo Zoina, Felice Scala, Giovanni Del Sorbo, Sheridan L. Woo, e Gary E. Harman. 1994. «Potential of Genes and Gene Products from Trichoderma Sp. and Gliocladium Sp. for the Development of Biological Pesticides». *Molecular Biotechnology* 2 (3): 209–17. <https://doi.org/10.1007/BF02745877>.
- Matta, Alberto, Roberto Buonauro, Francesco Favaron, Aniello Scala, e Felice Scala. 2017. *Fondamenti di Patologia Vegetale*.
- Millardet, Alexis, e L. U. Gayon. 1885. «Traitement du mildiou par le mélange de sulphate de cuivre et chaux». *Journal Agriculture Pratique* 49 (2): 707–10.
- Miotto-Vilanova, Lidiane, Cédric Jacquard, Barbara Courteaux, Laurence Wortham, Jean Michel, Christophe Clément, Essaïd A. Barka, e Lisa Sanchez. 2016. «Burkholderia phytofirmans PsJN Confers Grapevine Resistance against Botrytis cinerea via a Direct Antimicrobial Effect Combined with a Better Resource Mobilization». *Frontiers in Plant Science* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01236>.
- Mulholland, Dulcie A., Barbara Thuerig, Moses K. Langat, Lucius Tamm, Dorota A. Nawrot, Emily E. James, Meywish Qayyum, Danni Shen, Kallie Ennis, e Amy Jones. 2017. «Efficacy of extracts from eight economically important forestry species against grapevine downy mildew (Plasmopara viticola) and identification of active constituents». *Crop protection* 102: 104–9.
- Mysore, Kirankumar S., e Choong-Min Ryu. 2004. «Nonhost Resistance: How Much Do We Know?». *Trends in Plant Science* 9 (2): 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.12.005>.
- Nackley, Lloyd L., Brent Warneke, Lauren Fessler, Jay W. Pscheidt, David Lockwood, Wesley C. Wright, Xiaocun Sun, e Amy Fulcher. 2021. «Variable-rate spray technology optimizes pesticide application by adjusting for seasonal shifts in deciduous perennial crops». *HortTechnology* 31 (4): 479–89.
- Nandini, Boregowda, Puttaswamy Hariprasad, Harohalli Nanjegowda Shankara, Harischandra Sripathy Prakash, e Nagaraja Geetha. 2017. «Total Crude Protein Extract of Trichoderma Spp. Induces Systemic Resistance in Pearl Millet against the Downy Mildew Pathogen». *3 Biotech* 7 (3): 183. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0816-4>.
- Nelson, Eric B. 1991. «Exudate Molecules Initiating Fungal Responses to Seeds and Roots». In *The Rhizosphere and Plant Growth*, a cura di Donald L. Keister e Perry B. Cregan, 197–209. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4\\_46](https://doi.org/10.1007/978-94-011-3336-4_46).

- O'Connell, Richard J., e Ralph Panstruga. 2006. «Tête à Tête inside a Plant Cell: Establishing Compatibility between Plants and Biotrophic Fungi and Oomycetes». *New Phytologist* 171 (4): 699–718. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01829.x>.
- Pal, K. K., e B McSpadden Gardener. 2006. «Biological Control of Plant Pathogens». *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>.
- Paris, Franck, Yuko Krzyżaniak, Christian Gauthier, Frank Jamois, Frédéric Domergue, Jérôme Joubès, Vincent Ferrières, et al. 2016. «An Ethoxylated Surfactant Enhances the Penetration of the Sulfated Laminarin through Leaf Cuticle and Stomata, Leading to Increased Induced Resistance against Grapevine Downy Mildew». *Physiologia Plantarum* 156 (3): 338–50. <https://doi.org/10.1111/ppl.12394>.
- Park, Eun Woo, R. C. Seem, D. M. Gadoury, e R. C. Pearson. 1997. «DMCAST : A Prediction Model for Grape Downy Mildew Development». In *Wein-Wissenschaft*, 52:182–89. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2244697>.
- Pertot, I., T. Caffi, V. Rossi, L. Mugnai, C. Hoffmann, M. S. Grando, C. Gary, et al. 2017. «A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture». *Crop Protection* 97: 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.025>.
- Pertot, I., Dagostin, S., Ferrari, A., Gobbin, D., Prodorutti, D., Gessler, C. 2007. *La Peronospora della Vite*.
- Pertot, Ilaria. 2007. *La peronospora della vite*. 2. ed. San Michele all'Adige (TN): Istituto agrario di San Michele all'Adige.
- Pertot, Ilaria, Tito Caffi, Vittorio Rossi, Laura Mugnai, Christoph Hoffmann, Maria S. Grando, Christian Gary, David Lafond, C. Duso, e Denis Thiery. 2017. «A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture». *Crop Protection* 97: 70–84.
- Pieterse, C M, S C van Wees, E Hoffland, J A van Pelt, e L C van Loon. 1996. «Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression.» *The Plant Cell* 8 (8): 1225–37. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1225>.
- Planchon, J. E. 1887. «Monographie des Ampélidées vraies». *Monographiae phanerogamarum* 5: 452.
- Reuveni, M. 1998. «Relationships between Leaf Age, Peroxidase and  $\beta$ -1,3-Glucanase Activity, and Resistance to Downy Mildew in Grapevines». *Journal of Phytopathology* 146 (10): 525–30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04615.x>.
- Roatti, Benedetta, Michele Perazzolli, Cesare Gessler, e Ilaria Pertot. 2013. «Abiotic Stresses Affect *Trichoderma Harzianum* T39-Induced Resistance to Downy Mildew in Grapevine». *Phytopathology*® 103 (12): 1227–34. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-13-0040-R>.
- Rosa, M., R. Genesio, B. Gozzini, G. Maracchi, e S. Orlandini. 1993. «PLASMO: a computer program for grapevine downy mildew development forecasting». *Computers and Electronics in Agriculture* 9 (3): 205–15. [https://doi.org/10.1016/0168-1699\(93\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0168-1699(93)90039-4).
- Rosa, M., B. Gozzini, S. Orlandini, e L. Seghi. 1995. «A computer program to improve the control of grapevine downy mildew». *Computers and Electronics in Agriculture* 12 (4): 311–22. [https://doi.org/10.1016/0168-1699\(95\)00007-Q](https://doi.org/10.1016/0168-1699(95)00007-Q).
- Samada, Lukmanul Hakim, e Usman Sumo Friend Tambunan. 2020. «Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status». *Online J. Biol. Sci* 20 (2): 66–76.
- Savary, Serge, Laetitia Willocquet, Sarah Jane Pethybridge, Paul Esker, Neil McRoberts, e Andy Nelson. 2019. «The Global Burden of Pathogens and Pests on Major Food Crops». *Nature Ecology & Evolution* 3 (3): 430–39. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>.
- Sawant, I. S. 2023. «Microbes in Management of Fungal Diseases of Grape». *Grape Insight*, giugno, 59–69. <https://doi.org/10.59904/gi.v1.i2.2023.17>.
- Schäfer, Ralf B., Matthias Liess, Rolf Altenburger, Juliane Filser, Henner Hollert, Martina Roß-Nickoll, Andreas Schäffer, e Martin Scheringer. 2019. «Future Pesticide Risk Assessment: Narrowing the Gap between Intention and Reality». *Environmental Sciences Europe* 31 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0203-3>.
- Schweinitz, Lewis David von. 1832. «Synopsis fungorum in America boreali media degentium». (*No Title*). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1130282273327916160>.

- Seiber, James N., Joel R. Coats, Stephen O. Duke, e Aaron D. Gross. 2018. «Pest management with biopesticides». <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/94429>.
- Slusarenko, A. J., R. S. Fraser, e L. C. van Loon. 2012. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Springer Science & Business Media.
- Stummer, Belinda E., I. Leigh Francis, Timothy Zanker, Kate A. Lattey, e Eileen S. Scott. 2005. «Effects of Powdery Mildew on the Sensory Properties and Composition of Chardonnay Juice and Wine When Grape Sugar Ripeness Is Standardised». *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11 (1): 66–76. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00280.x>.
- Taibi, O., V. Bardelloni, F. Bove, F. Scaglia, T. Caffi, e V. Rossi. 2022. «Activity of Resistance Inducers against *Plasmopara Viticola* in Vineyard». A cura di T. Caffi, V. Rossi, e G. Fedele. *BIO Web of Conferences* 50: 03003. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20225003003>.
- Toffolatti, Silvia L, Giuseppe Russo, Paola Campia, Piero A Bianco, Paolo Borsa, Mauro Coatti, Stefano Ff Torriani, e Helge Sierotzki. 2018. «A Time-course Investigation of Resistance to the Carboxylic Acid Amide Mandipropamid in Field Populations of *Plasmopara Viticola* Treated with Anti-resistance Strategies». *Pest Management Science* 74 (12): 2822–34. <https://doi.org/10.1002/ps.5072>.
- Tosi, Lorenzo. 2019. «Agenti di biocontrollo, così cambia la difesa». *VVQ, vigne vini & qualita* 3 (2): 32–35.
- Underdown, R. S., K. Sivasithamparam, e M. J. Barbetti. 2008. «Inhibition of the Pre- and Postinfection Processes of *Plasmopara Viticola* on *Vitis Vinifera* Leaves by One Protectant and Four Systemic Fungicides». *Australasian Plant Pathology* 37 (4): 335. <https://doi.org/10.1071/AP08031>.
- Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker, e C. M. J. Pieterse. 1998. «SYSTEMIC RESISTANCE INDUCED BY RHIZOSPHERE BACTERIA». *Annual Review of Phytopathology* 36 (1): 453–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>.
- Weitbrecht, Karin, Stefan Schwab, Christoph Rupp, Evi Bieler, Markus Dürrenberger, Gottfried Bleyer, Stefan Schumacher, Hanns-Heinz Kassemeyer, René Fuchs, e Eberhard Schlücker. 2021. «Microencapsulation—An innovative technique to improve the fungicide efficacy of copper against grapevine downy mildew». *Crop Protection* 139: 105382.
- Werner, Stefan, Ulrike Steiner, Rayko Becher, Andreas Kortekamp, Eva Zyprian, e Holger B Deising. 2002. «Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*». *FEMS Microbiology Letters* 208 (2): 169–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11077.x>.
- Xu, Shengjun, e Byung-Sup Kim. 2016. «Evaluation of *Paenibacillus Polymyxa* Strain SC09-21 for Biocontrol of Phytophthora Blight and Growth Stimulation in Pepper Plants». *Tropical Plant Pathology* 41 (3): 162–68. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0077-5>.
- Yin, Ling, Yunhe An, Junjie Qu, Xinlong Li, Yali Zhang, Ian Dry, Huijuan Wu, e Jiang Lu. 2017. «Genome sequence of *Plasmopara viticola* and insight into the pathogenic mechanism». *Scientific Reports* 7 (April): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep46553>.