



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente  
Dipartimento di Territorio e Sistemi Agro-Forestali

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Agrarie

UTILIZZO DEGLI AGENTI DI BIOCONTROLLO NELLA  
LOTTA CONTRO *BOTRYTIS CINEREA* SU VITE

Relatore  
Prof. Francesco Favaron

Laureanda  
Marta Gentili  
Matricola n.1201473

ANNO ACCADEMICO 2021-2022



# INDICE:

Riassunto .....	4
Abstract .....	5
1. Introduzione .....	7
2. Generalità sulla vite .....	7
3. <i>Botrytis cinerea</i> : la muffa grigia .....	9
3.1- Sintomi su vite.....	9
3.2- Ciclo di malattia .....	10
4. Gestione della malattia .....	10
4.1- Prevenzione agronomica .....	10
4.2- Mezzi chimici.....	11
5. Alternative ai mezzi chimici: gli agenti di biocontrollo (BCA) .....	12
5.1- Lotta biologica, agricoltura biologica e integrata .....	12
5.2- Cosa sono gli agenti di biocontrollo.....	15
5.3- Cautele nell'impiego dei BCA .....	16
6. Esempi di agenti di biocontrollo contro <i>Botrytis cinerea</i> su vite .....	19
6.1- <i>Bacillus subtilis</i> .....	20
6.2- <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	25
6.3- <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	29
6.4- <i>Trichoderma atroviride</i> .....	32
6.5- <i>Pythium oligandrum</i> .....	35
7. Conclusioni .....	39
8. Bibliografia .....	41

## RIASSUNTO

In molte zone viticole il patogeno *Botrytis cinerea* è in grado di causare gravi danni alla vite e in particolare all'uva matura. In questo ospite è causa della malattia nota come muffa grigia. I fungicidi sono largamente utilizzati per prevenire e contrastare questa malattia. Tuttavia, è sempre più necessario ridurre l'utilizzo di prodotti chimici perché rappresentano una minaccia per la salute dell'uomo e per l'ambiente. Una alternativa promettente per proteggere le colture è l'utilizzo degli agenti di biocontrollo (BCA), che presentano numerosi vantaggi.

Questa tesi, dopo una breve descrizione della specie ospite *Vitis vinifera*, di *B. cinerea*, della muffa grigia e dei principali mezzi di lotta, tratta l'importanza dell'utilizzo degli agenti di biocontrollo. I BCA possono essere usati in alternativa o in successione ai prodotti chimici. Successivamente vengono presentati cinque BCA (ovvero *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma atroviride* e *Pythium oligandrum*), i loro meccanismi d'azione contro il patogeno, i relativi prodotti commerciali registrati su vite in Italia e alcune sperimentazioni effettuate con questi microrganismi. Il loro utilizzo risulta promettente, sia quando vengono utilizzati singolarmente sia in successione tra di loro o con prodotti chimici.

## ABSTRACT

In many viticulture areas, the pathogen *Botrytis cinerea* is capable of causing serious damage to the vine and in particular to ripe grapes. In the host, it causes the disease known as grey mould. Fungicides are widely used to prevent and counteract this disease. Nonetheless, it is increasingly necessary to reduce the use of chemical products because they represent a threat to human health and the environment. A promising alternative to protect crops is the usage of biocontrol agents (BCAs), which have numerous advantages.

This dissertation, after a brief description of the host species *Vitis vinifera*, of *B. cinerea*, the grey mould and protective measures, deals with the importance of the use of biocontrol agents. The BCAs can be used alternatively or in succession to chemical products. Five BCAs are then presented (*Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma atroviride* and *Pythium oligandrum*), their action mechanisms against the pathogen, the related commercial products registered on grapevine in Italy and some experiments carried out with these microorganisms. Their utilization is promising, both when they are individually used and in succession with each other or with chemical products.



## 1. Introduzione

La viticoltura sembra abbia avuto origine all'inizio del Neolitico. Successivamente, i primi processi di selezione e di domesticazione iniziarono nel vicino Oriente, perché in quelle regioni la formazione dei villaggi stabili fu più precoce, così come l'uso dell'aratro (Scienza et al., 2007).

Furono i Fenici a portare la vite in Grecia, e poi gli antichi Greci colonizzarono l'Italia meridionale e fecero arrivare la coltivazione della vite nella nostra penisola. La viticoltura venne successivamente ripresa dagli Etruschi e poi dagli antichi Romani. Dalla seconda metà dell'Ottocento in poi in Italia la viticoltura ebbe sempre più importanza, fino ai giorni nostri.

Inizialmente le tecniche agronomiche erano molto essenziali, ma agli inizi del Ventesimo secolo lo sviluppo della tecnologia e delle conoscenze riguardanti la biologia hanno portato a grandi innovazioni anche nel campo della viticoltura.

Nel panorama mondiale e nazionale la vite gioca un ruolo importante. In tutto il mondo vengono prodotte circa 77.518.000 tonnellate di uva all'anno. Secondo i dati della FAO la Cina è il più grande produttore di uva al mondo con 14.283.532 tonnellate di volume di produzione all'anno. L'Italia è seconda con una produzione annua di 7.900.120 tonnellate. Al terzo posto ci sono gli Stati Uniti con una produzione di 6.233.270 tonnellate annue, seguiti da Spagna, Francia e Turchia. I maggiori produttori di vino al mondo sono l'Italia, la Francia e la Spagna.

## 2. Generalità sulla vite

La vite è una pianta arborea rampicante che afferisce alla specie botanica denominata *Vitis vinifera* L. Le varietà coltivate (vitigni) sono classificate nella sottospecie *sativa*, mentre le forme selvatiche da cui derivano quelle domestiche sono invece classificate nella sottospecie *silvestris*. Altre specie del genere *Vitis*, importanti per la viticoltura, sono quelle di origine nord americana che direttamente o mediante ibridazione hanno dato origine a varietà per portinnesti o per la produzione di uva. In quest'ultimo caso si

distinguono i cosiddetti ibridi americani da quelli denominati ibridi produttori diretti o ibridi francesi. Tra le specie impiegate nella costituzione dei portinnesti si devono citare *Vitis rupestris*, *V. riparia* e *V. berlandieri*; tra quelle impiegate per la costituzione degli ibridi fruttiferi anche *Vitis labrusca* e *V. aestivalis*.

Il ciclo annuale della vite si articola dalla ripresa vegetativa (marzo-aprile) all'entrata nel riposo invernale (novembre-dicembre). Il risveglio primaverile della pianta è caratterizzato dalla progressiva idratazione dei tessuti legnosi. Il fenomeno è visibile nelle viti potate poiché causa il gocciolamento dell'acqua dai tagli di potatura (pianto). A una settimana circa dal pianto inizia il rigonfiamento delle gemme (gemme rigonfie). Dapprima diviene visibile una folta peluria prodotta all'interno delle perule per proteggere gli apici meristemati (gemma cotonosa), poi diviene visibile la punta della prima fogliolina (punte verdi). Segue la comparsa delle foglioline basali, ancora avvolte una nell'altra (rosetta di foglie visibili) e quindi la distensione della prima fogliolina e l'allungamento dell'internodo a essa sotteso (prima foglia distesa distaccata dall'apice). A questa fase si deve considerare completato il processo di germogliamento (metà marzo-metà aprile).

Inizia quindi la vera e propria crescita del germoglio. In questa fase divengono visibili anche i grappolini. L'infiorescenza diviene visibile circa quando la quinta foglia è separata dall'apice. A quello stadio però non sono ancora distinguibili i rachilli e i fiorellini formano un ammasso informe (grappoli visibili). Successivamente il rachide si distende e i grappolini si separano dall'apice (grappoli separati). Poi i rachilli si separano e i singoli fiorellini si distinguono (fiori separati). La fioritura inizia quando circa 16 foglie si sono separate dall'apice (metà di maggio e la metà di giugno) e si protrae per circa 10-15 giorni. L'allegagione segue senza soluzione di continuità la fioritura. Inizia anche la crescita delle bacche che provoca la chiusura del grappolo, e inizia l'invaiaatura. In questa fase generalmente i germogli cessano di crescere. Nel corso della maturazione dell'uva inizia la lignificazione dei tralci (agostamento).

Si giunge così alla maturazione dell'uva, quindi la pianta si avvia all'entrata in riposo invernale con la senescenza e la caduta (abscissione) delle foglie, delle femminelle e delle estremità dei germogli non lignificati. Le parti lignificate si disidratano progressivamente prima dell'inverno (Scienza et al., 2007).



### 3. *Botrytis cinerea*: la muffa grigia

La muffa grigia (o marciume grigio o botrite) è causata da *Botrytis cinerea*, un fungo necrotrofico che attacca molte specie vegetali tra cui la vite. È pericolosa soprattutto per gli attacchi ai grappoli. *B. cinerea* è un fungo prevalentemente asessuato il cui teleomorfo (*Botryotinia fuckeliana*) compare in natura sporadicamente. Possiede un micelio ramificato da ialino a leggermente grigio, da cui si dipartono lunghi conidiofori scuri con cellula basale globosa, ramificati nella regione terminale fino a dare cellule conidiogene producenti conidi lisci ovoidali e non settati, che possono disperdersi nell'ambiente. Può formare anche sclerozi di colore nero lunghi 1-5 mm che hanno funzione di sopravvivenza.

*B. cinerea* può produrre diversi enzimi che possono modificare o degradare i polisaccaridi della parete cellulare dell'ospite, e inoltre produce anche proteine, metaboliti secondari e ROS che possono uccidere direttamente le cellule o indurre la morte cellulare programmata nelle cellule vegetali attaccate (Matta et al., 2017).

#### 3.1 Sintomi su vite

I sintomi della muffa grigia sulla vite possono mostrarsi su tutti gli organi aerei della pianta, in particolare sugli acini, sulle foglie, sulle infiorescenze e sui tralci.

Sugli acini causa marciumi molli (Figura 1), causati da elevate produzioni di enzimi litici; inoltre, in presenza di elevata umidità durante la stagione gli acini si ricoprono di una abbondante muffa grigia che finisce per avviluppare aree più o meno ampie, trasformando anche l'intero grappolo in un ammasso marcescente. Sulle foglie possono comparire macchie necrotiche più o meno estese. Le infiorescenze, i piccioli, i peduncoli e i tralci possono invece imbrunire e disseccare (Scienza et al., 2007).



Figura 1.  
Progressivo sviluppo di botrite.  
(Mazzilli, 2019)

## 3.2 Ciclo di malattia

*B. cinerea* può svernare come sclerozio o come micelio sulla corteccia, dopodiché il micelio si espande e produce i conidi che vengono rilasciati nell'ambiente. I conidi per germinare richiedono acqua libera oppure una umidità relativa maggiore del 90%, e i tubuli germinativi possono penetrare direttamente o indirettamente la cuticola. Nel grappolo l'inoculo rimane latente fino all'inizio della maturazione. Nelle fasi iniziali si osserva solo un imbrunimento e poi con il progredire della colonizzazione si sviluppano micelio e conidi e la buccia si fessura.

Le infezioni sono facilitate da ferite e lesioni determinate da fattori abiotici (grandine, gelo, lavorazioni) o biotici (insetti o precedenti attacchi fungini) (Matta et al., 2017). È importante fare attenzione ad alcune fasi fenologiche della vite che possono essere critiche durante l'infezione: la fase di fioritura, chiusura grappolo, invaiatura e maturazione.

## 4. Gestione della malattia

La muffa grigia sulla vite può essere prevenuta e gestita in diversi modi. Innanzitutto non può mai mancare una buona prevenzione agronomica che si effettua principalmente con la gestione del verde (sfogliature). Oltre a questo, spesso risulta necessario eseguire trattamenti con mezzi chimici o biologici, soprattutto quando vi è una maggiore suscettibilità della vite alla malattia.

Nei due capitoli seguenti verranno esposte brevemente le principali tecniche agronomiche e i principali trattamenti chimici che di solito si effettuano contro *B. cinerea*.

### 4.1 Prevenzione agronomica

La prevenzione della botrite si basa innanzitutto sulle buone pratiche agronomiche per regolare la vigoria (Mazzilli, 2019). Solitamente gli interventi decisivi sono le sfogliature precoci in pre-fioritura e in fase di maturazione. Per una sfogliatura

efficace vanno tolte tutte le foglie davanti e sotto ai grappoli anche nella parte interna della vegetazione per evitare il contatto tra grappoli e foglie, con una tempestività e intensità da valutare anche in funzione dell'andamento meteo.

Nelle parti più vigorose della chioma si può effettuare la potatura in due tempi, anticipando la pre-potatura subito dopo la vendemmia e rifinando i tagli alla giusta lunghezza il più tardi possibile. La potatura a Guyot è preferibile, perché si possono ottenere grappoli più spargoli e una vegetazione più aperta.

Nelle scelte pre-impianto vanno valutate le migliori esposizioni per quanto riguarda la ventilazione per orientare i filari in modo adeguato, ed è importante garantire un buon drenaggio in testata. Le cultivar con grappoli compatti e con bucce sottili sono maggiormente predisposte all'attacco di *B. cinerea*. Inoltre, durante tutta la stagione e soprattutto durante la maturazione la presenza di una copertura erbacea "filtra" e rende meno altalenanti le disponibilità idriche e nutrizionali.

La concimazione, soprattutto azotata, va limitata allo stretto necessario e per un miglior irrobustimento dei tessuti si possono eseguire trattamenti fogliari o in fascia grappolo con potassio, calcio o silicio (Mazzilli, 2019).

## 4.2 Mezzi chimici

Nelle condizioni colturali e ambientali più favorevoli allo sviluppo della muffa grigia, i metodi di prevenzione agronomici vengono spesso affiancati da trattamenti con fungicidi. Bisogna fare attenzione anche alle cultivar più suscettibili, ad esempio quelle a grappolo compatto (Matta et al., 2017) come il Pinot e Chardonnay.

I momenti di intervento consigliati sono due, uno in fase di pre-chiusura grappolo e l'altro durante l'invasatura (circa 20-30 giorni prima della raccolta). Solitamente vengono effettuati trattamenti a base di fungicidi monosito come ad esempio cyprodinil+fludioxonil, fenexamid o boscalid. È consigliabile utilizzare lo stesso prodotto solo una volta all'anno e quindi di alternare l'impiego dei diversi principi attivi nel corso dell'annata (Bottura, 2011). Tra i fungicidi multisito, utilizzati spesso in biologico, troviamo il bicarbonato di potassio, i prodotti rameici e lo zolfo.

## 5. Alternative ai prodotti chimici: gli agenti di biocontrollo

Gli agenti patogeni sono la causa del 20-30% delle perdite globali di resa delle colture (Savary et al., 2019). Per garantire una resa sufficiente e costante delle colture come la vite spesso dipendiamo dall'utilizzo di prodotti chimici. Tuttavia sono urgentemente necessari fungicidi sicuri per controllare i patogeni, perché i fungicidi sintetici rappresentano una minaccia per la salute dell'uomo e per l'ambiente (Legein et al., 2020). Inoltre, la resistenza ai fungicidi è una delle principali sfide nella gestione del patogeno *B. cinerea*, infatti questa specie è riconosciuta dalla FRAC come ad alto rischio di sviluppo di resistenze ai fungicidi monosito (<https://www.frac.info/>) a causa dell'elevato numero di spore che produce e per gli eventi di ricombinazione genica (Matta et al., 2017). L'uso ripetuto di fungicidi monosito per intere stagioni porta alla rapida comparsa di resistenze ai fungicidi nelle popolazioni di *B. cinerea* e porta anche ad un elevato rischio di residui di fungicidi sull'uva alla vendemmia (Rotolo et al., 2018).

Per tutti questi motivi e per la crescente consapevolezza e preoccupazione degli esperti e dell'opinione pubblica sui rischi e gli effetti collaterali negativi associati ai prodotti chimici, è aumentata la richiesta di ridurre queste sostanze. Un'alternativa promettente per proteggere le colture è la lotta biologica con l'utilizzo di prodotti a base microbica classificati con il nome di agenti di biocontrollo, che hanno dimostrato, anche grazie alle diverse prove di campo effettuate, di avere un'efficacia spesso paragonabile alle strategie chimiche.

### 5.1 Lotta biologica, agricoltura biologica e integrata

Negli ultimi anni le nuove normative europee e italiane, predisponendo misure per un uso sostenibile degli agrofarmaci, hanno stimolato sempre di più lo sviluppo di metodi di lotta alternativi a quelli fondati sull'impiego dei prodotti di sintesi.

Con questa prospettiva, in agricoltura ha assunto un ruolo importante la lotta biologica, ovvero l'impiego di qualsiasi entità biologica vivente oppure di molecole derivate da organismi viventi per controllare la crescita di organismi patogeni o parassiti per

contenerne l'attività nociva (Cervone e Lorito, 2007). Anche la lotta agronomica, quindi la corretta gestione dei fattori colturali e ambientali (es. avvicendamenti, rotazioni, varietà resistenti), può rientrare nella lotta biologica nel momento in cui esercita effetti benefici contro le malattie delle piante attraverso modificazioni delle popolazioni dei microrganismi associati (Matta et al., 2017).

La lotta biologica contro gli organismi fitopatogeni come ad esempio *B. cinerea* ha avuto un importante impulso nell'ultimo ventennio, anche perché in tutto il mondo vengono sviluppati sempre di più nuovi bioagrofarmaci e inoltre sono state individuate una grande varietà di funghi e batteri utili come agenti di biocontrollo e sono state studiate in dettaglio le basi molecolari di molte interazioni (Cervone e Lorito, 2007).

Molto spesso la lotta biologica viene effettuata nei regimi di agricoltura biologica, un settore dell'agricoltura in rapida crescita (<https://ec.europa.eu/info/>). Si tratta di un metodo volto a produrre utilizzando sostanze e processi naturali e che tende ad avere un impatto ambientale limitato. L'agricoltura biologica si basa su diversi principi tra cui la difesa della biodiversità, la conservazione e il miglioramento della fertilità del suolo, il mantenimento dell'equilibrio degli ecosistemi, la tutela delle acque e l'utilizzo dell'energia e delle risorse naturali in modo responsabile. Viene quindi escluso l'utilizzo di prodotti di sintesi (agrofarmaci e diserbanti di sintesi), e per conservare la fertilità del suolo si prevede l'utilizzo di fertilizzanti di origine organica o minerale oppure la pratica del sovescio. Per la difesa dalle avversità delle piante si possono utilizzare sostanze di origine vegetale o animale oppure microrganismi e sostanze prodotte da microrganismi, oltre a strategie di lotta agronomiche come le scelte e le tecniche colturali adeguate (scelta oculata delle varietà da utilizzare, potature adeguate..), la salvaguardia degli insetti utili e il monitoraggio degli organismi dannosi (Bottura, 2011). In sintesi l'agricoltura biologica “pone l'attenzione verso il sistema agricolo nel suo complesso e non solo verso la protezione della coltura in senso stretto” (Bottura, 2011).

La lotta biologica che prevede l'utilizzo di microrganismi utili viene sempre più spesso effettuata anche nell'agricoltura integrata, un sistema agricolo di produzione a basso impatto ambientale. La produzione integrata prevede l'uso razionale di tutti i fattori

della produzione con lo scopo di ridurre al minimo il ricorso a mezzi che possono avere un impatto negativo sull'ambiente e sulla salute degli operatori e dei consumatori. Gli ambiti di applicazione sono molteplici, tra cui rientra anche la difesa dei vegetali, la fertilizzazione, il controllo delle infestanti e le lavorazioni del terreno. Nell'ambito della difesa dei vegetali l'agricoltura integrata può sfruttare la lotta biologica con lo scopo di ridurre al minimo l'uso delle sostanze chimiche di sintesi. In quest'ottica risulta importante il monitoraggio dell'andamento delle infezioni, e la scelta dei principi attivi deve ricadere su prodotti con ridotto spettro d'azione o ad alta selettività, prodotti a basso rischio di induzione di fenomeni di resistenza e con bassa persistenza (<https://it.wikipedia.org/>).

Alcuni principi generali di difesa integrata sono elencati nell'Allegato III del D.Lgs 150/2012:

- La prevenzione e la soppressione di organismi nocivi dovrebbero essere perseguite o favorite in particolare da: rotazione colturale, utilizzo di tecniche colturali adeguate, uso di cultivar resistenti/tolleranti e materiale di moltiplicazione standard/certificato, utilizzo di pratiche equilibrate di fertilizzazione e di irrigazione/drenaggio, misure igieniche, protezione e accrescimento di popolazioni di importanti organismi utili.
- Gli organismi nocivi devono essere monitorati con metodi e strumenti adeguati, ove disponibili.
- In base ai risultati del monitoraggio, l'utilizzatore professionale deve decidere se e quando applicare adeguate misure di controllo. Valori soglia scientificamente attendibili e validi costituiscono elementi essenziali ai fini delle decisioni da prendere.
- Ai metodi chimici devono essere preferiti metodi biologici sostenibili, mezzi fisici e altri metodi non chimici se questi consentono un adeguato controllo degli organismi nocivi.
- I prodotti fitosanitari sono quanto più possibile selettivi rispetto agli organismi da combattere e hanno minimi effetti sulla salute umana, gli organismi non bersaglio e l'ambiente.
- L'utilizzatore professionale dovrebbe mantenere l'utilizzo dei prodotti fitosanitari e di altre forme d'intervento ai livelli necessari, per esempio utilizzando dosi ridotte, riducendo la frequenza dei trattamenti o ricorrendo a trattamenti localizzati, avendo

cura che il livello di rischio di malattia sia accettabile e che non aumenti il rischio di sviluppo di resistenza in popolazioni di organismi nocivi.

- Ove il rischio di resistenza a un trattamento fitosanitario sia conosciuto e il livello di organismi nocivi richieda trattamenti ripetuti sulla coltura, le strategie antiresistenza disponibili dovrebbero essere messe in atto per mantenere l'efficacia dei prodotti. Ciò può includere l'utilizzo di diversi prodotti fitosanitari con diversi modi di azione.
- Sulla base dei dati relativi all'utilizzo dei prodotti fitosanitari e del monitoraggio di organismi nocivi, l'utilizzatore professionale dovrebbe verificare il grado di successo delle strategie di difesa applicate.

## 5.2 Cosa sono gli agenti di biocontrollo

Gli agenti di biocontrollo (BCA, Biological Control Agents) contro le malattie fungine sono microrganismi antagonisti (funghi, batteri, lieviti) che vengono impiegati nei trattamenti e che, attraverso vari meccanismi, possono interagire e contrastare i patogeni delle piante (Fedele et al., 2019). 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, e vengono utilizzati non solo in agricoltura biologica ma anche nelle più evolute strategie di protezione integrata, venendo anche affiancati in maniera sinergica agli agrofarmaci tradizionali (Tosi, 2019).

Le modalità di azione degli agenti di biocontrollo sono molteplici. Ad esempio possono agire per antibiosi (producendo metaboliti con attività antimicrobica nei confronti di microrganismi fitopatogeni), per competizione per il substrato (sottraendo nutrienti al patogeno riducendone lo sviluppo oppure la capacità di colonizzare l'habitat) o per iperparassitizzazione dell'organismo patogeno. I BCA possono avere anche un'azione di antagonismo indiretto, infatti possono essere in grado di indurre i meccanismi di difesa della pianta aumentandone così la resistenza ai diversi patogeni (fenomeno della resistenza indotta), oppure possono aumentare la disponibilità di nutrienti per le piante promuovendone la crescita (Cervone e Lorito, 2007).

I fattori di biocontrollo quindi possono agire contro i patogeni direttamente (agente di biocontrollo - agente patogeno) oppure anche indirettamente (agente di biocontrollo - pianta ospite).

Quando si utilizzano gli agenti di biocontrollo per prevenire e contrastare le infezioni di *B. cinerea* su vite vengono effettuati generalmente tre o quattro interventi mirati in determinate fasi fenologiche: alla fine della fioritura (BBCH 68-69), in pre-chiusura grappolo (BBCH 77), all'invasatura (BBCH 81-83) e in pre-raccolta (BBCH 88-89). Lo scopo del trattamento a fine fioritura è quello di impedire l'insediamento di *B. cinerea* sui residui floreali, quello in pre-chiusura grappolo colpisce i conidi presenti tra gli acini, quello all'invasatura è finalizzato a proteggere i grappoli nella loro fase più sensibile e quello in pre-raccolta serve a proteggere i grappoli dalle infezioni di fine estate-inizio autunno che sono solitamente favorite dalle perturbazioni atmosferiche tipiche di quella stagione (Cavazza et al., 2018).

### 5.3 Cautele nell'impiego dei BCA

Per impiegare gli agenti di biocontrollo (BCA) contro le infezioni di *B. cinerea* su vite deve esserci una certa attenzione da parte dell'agricoltore. Infatti questi microrganismi sono abbastanza delicati, e uno dei principali fattori che può ridurre l'efficacia del prodotto è la non corretta conservazione che spesso avviene a temperature troppo alte o in presenza di umidità (Pertot et al., 2021). Inoltre i BCA non si possono conservare in sospensione per un lungo periodo di tempo e la botte dell'atomizzatore va risciacquata con cura prima dell'uso per evitare contaminazioni. Va anche controllata la scadenza del prodotto, che può variare anche in base alla temperatura di conservazione. Bisogna inoltre considerare che non sempre esiste una piena compatibilità dei BCA con alcuni prodotti chimici, quindi quando si vuole impiegare una strategia di difesa integrata risulta opportuno leggere attentamente le etichette dei prodotti per tenere conto delle eventuali incompatibilità. Tutti questi fattori devono essere tenuti in debito conto dall'agricoltore per garantire il miglior risultato che possono offrire questi microrganismi.



Le condizioni ambientali sono uno dei fattori più importanti che influenzano l'efficacia degli agenti di biocontrollo (Fedele et al., 2020). In particolare, la temperatura e l'umidità influenzano le dinamiche di crescita dei microrganismi (la sopravvivenza, l'insediamento e la crescita) (Elad e Freeman, 2002). Tenendo conto che la colonizzazione da parte dei BCA è considerata un prerequisito per il successo del biocontrollo, Fedele et al. (2020) hanno studiato gli effetti della temperatura e dell'umidità sulla colonizzazione dei grappoli d'uva da parte di diversi prodotti commerciali contenenti microrganismi (tra cui *Bacillus subtilis* QST 713, *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, *Aureobasidium pullulans* e *Trichoderma atroviride* SC1). I risultati dello studio hanno messo in evidenza che le condizioni ottimali di temperatura e umidità per la colonizzazione dei grappoli differiscono in base al BCA (vedi Figura 2). Secondo gli autori questa variabilità potrebbe facilitare il controllo di *B. cinerea* perché consentirebbe agli agricoltori di scegliere il microrganismo migliore in base alle condizioni meteo; in questo modo il BCA scelto avrebbe una maggiore probabilità di crescere e di competere contro il patogeno. Con i risultati ottenuti dallo studio, Fedele et al. (2020) hanno sviluppato delle equazioni in grado di prevedere le dinamiche di crescita sui grappoli d'uva degli agenti di biocontrollo studiati in base alla temperatura e all'umidità. Queste equazioni potrebbero aiutare gli agricoltori a selezionare il microrganismo da utilizzare per i trattamenti in base alle condizioni meteorologiche al momento del trattamento e dei giorni successivi, e anche a decidere se e quando potrebbe risultare necessario un ulteriore trattamento con i BCA (Fedele et al., 2020).

Altri studi simili in futuro potrebbero aiutare sempre di più gli agricoltori a fare scelte più precise in modo tale da massimizzare gli effetti degli agenti di biocontrollo, effettuando meno trattamenti ma con una efficacia maggiore con un risvolto positivo anche sui costi delle singole applicazioni.

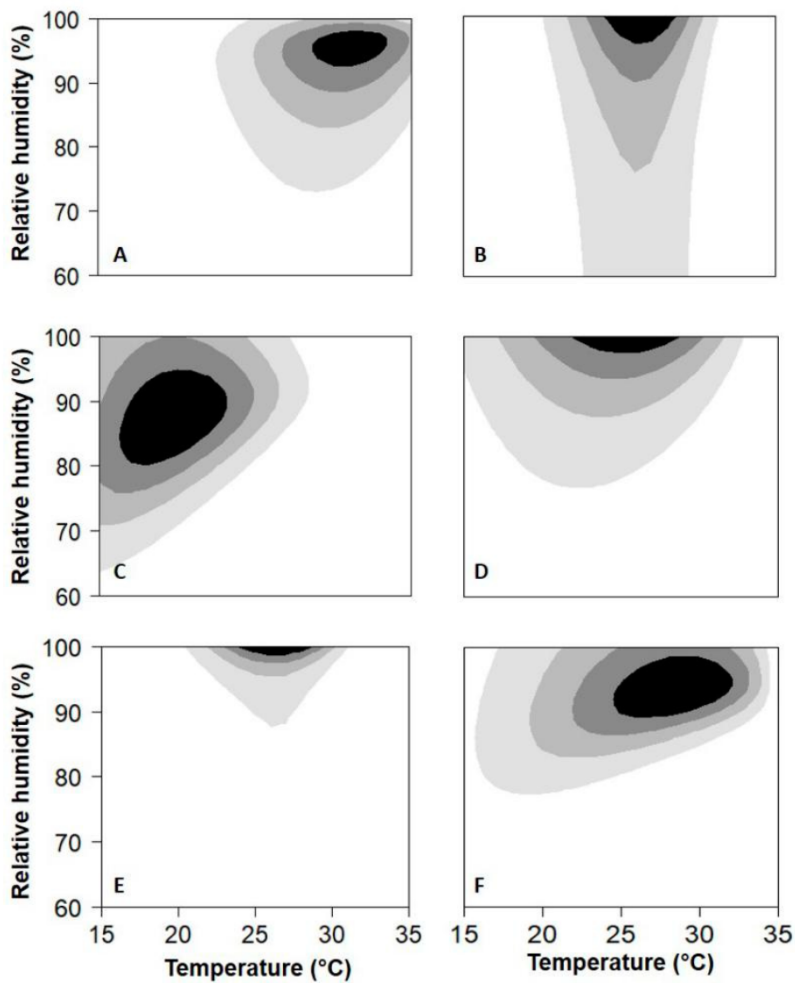


Figura 2. Colonizzazione relativa dei grappoli trattati con uno dei sei BCA (A: *B. amyloliquefaciens* D747; B: *A. pullulans* DMS 14941-14940; C: *M. fructicola*; D: *B. subtilis* QST 713; E: *B. amyloliquefaciens* FZB24; F: *T. atroviride* SC1) e incubati a diverse temperature e a diversi livelli di umidità relativa. Le trame di contorno, che sono state generate con diverse equazioni e parametri, identificano cinque aree di colonizzazione relativa dei grappoli da parte dei sei BCA: L (bassa, l'area bianca); ML (medio-bassa, l'area grigio chiaro); M (media, l'area grigio medio); MH (medio-alta, l'area grigio scuro); e H (alta, l'area nera). (Fedele et al., 2020)

## 6. Esempi di agenti di biocontrollo contro *Botrytis cinerea* su vite

Ricercatori di tutto il mondo stanno cercando di sviluppare fungicidi sicuri e validi per sostituire in tutto o in parte l'utilizzo dei prodotti sintetici per controllare le malattie delle piante. Diversi studi hanno confermato l'efficacia degli agenti di biocontrollo contro numerosi fitopatogeni come *B. cinerea* ed è stata individuata una grande varietà di funghi e batteri utili.

Nell'ultimo ventennio sono stati sviluppati nuovi biofitofarmaci a base di microrganismi che sono oggi disponibili sul mercato di Stati Uniti, Europa e Giappone (Cervone e Lorito, 2007). La disponibilità di microrganismi da utilizzare in agricoltura sta crescendo in maniera esponenziale, anche grazie alle moderne tecniche di biologia molecolare che hanno permesso lo studio dei meccanismi d'azione dei BCA contro i patogeni delle piante. Informazioni sempre più dettagliate su tali meccanismi risultano di fondamentale importanza per la progettazione di nuovi agenti di biocontrollo e per aumentare la protezione e di conseguenza la produzione delle colture (Legein et al., 2020).

Nei capitoli che seguono verranno esposti cinque microrganismi e i relativi prodotti commerciali utilizzabili in Italia contro *B. cinerea* su vite, ovvero *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma atroviride* e *Pythium oligandrum*. Verrà spiegata brevemente la biologia del microrganismo, i prodotti disponibili, le principali modalità d'azione contro la muffa grigia e riportati i risultati di alcune sperimentazioni effettuate con questi BCA in Italia e in Europa.

## 6.1 *Bacillus subtilis*

*B. subtilis* è un batterio Gram-positivo a forma di bastoncino, in alcune fasi vitali flagellato, che fa parte del *phylum* batterico *Firmicutes*. Questo microrganismo si può dividere simmetricamente e generare due cellule figlie, oppure in condizioni di stress nutrizionale o ambientale ha la capacità di formare una endospora resistente (<https://it.wikipedia.org/>). Le spore sono dormienti e resistono al calore e al disseccamento. Quando vi è una limitazione dei nutrienti possono anche attivarsi una serie di risposte che aiutano il microrganismo a sopravvivere, tra cui la sintesi di antibiotici, la capacità di assorbire DNA, la motilità e la formazione di biofilm (Piggot, 2009).

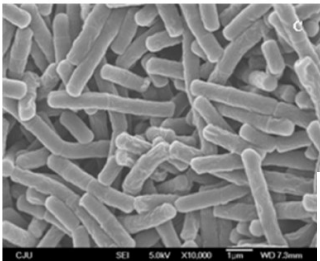


Figura 3. *B. subtilis* al microscopio ottico. (<https://www.microbiologiaitalia.it/>)

*B. subtilis* in natura si trova comunemente nel suolo, nelle radici delle piante, negli alimenti e negli ambienti acquatici. In laboratorio si coltiva e si manipola facilmente, e per questo viene ampiamente utilizzato nelle biotecnologie (Martinez, 2013). Non manifesta patogenicità per le piante, per gli animali e per l'uomo (US EPA, 2005).

Per contrastare la botrite su vite in Italia viene utilizzato *B. subtilis* ceppo QST 713, scoperto dai ricercatori Agraquest in California.

I prodotti commerciali in vendita contenenti questo microrganismo sono diversi, come ad esempio i prodotti Serenade Max e Rhapsody distribuiti in Italia dalla azienda Bayer. Serenade Max è un prodotto biologico in formulazione polvere bagnabile, che può essere applicato sulla vite con atomizzatore. Si possono fare al massimo cinque trattamenti all'anno e l'intervallo di sicurezza (il numero minimo di giorni che deve intercorrere tra la data in cui è stato eseguito il trattamento e la data di raccolta) è di tre giorni. Il prodotto Rhapsody invece, venduto in sospensione concentrata, non ha

bisogno di un intervallo di sicurezza e può essere utilizzato massimo quattro volte all'anno (<https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/>).

*B. subtilis* può formare endospore, il che ne garantisce la fattibilità commerciale perché si possono produrre dei prodotti con requisiti di conservazione ridotti e di lunga durata.

Questo microrganismo può colonizzare la superficie o le ferite dei frutti, e le principali modalità d'azione contro il patogeno *B. cinerea* sono la produzione di lipopeptidi, la formazione di biofilm (Chen et al., 2019) e l'induzione di resistenza (Ongena e Jacques, 2008).

I lipopeptidi che *B. subtilis* può produrre agiscono come sostanze antimicotiche e appartengono alla classe delle surfattine, delle iturine e delle fengicine, e agiscono spesso in modo sinergico. Questi antibiotici lipopeptidici possono avere effetti inibitori diretti o indiretti sul patogeno, e non sono tossici per la pianta (Chen et al., 2019). Inoltre i lipopeptidi sono di natura relativamente stabile e questo garantisce che possano esercitare effetti antagonistici per un periodo di tempo prolungato (Fan et al., 2017).

La formazione di biofilm è considerato un altro importante meccanismo di antagonismo contro *B. cinerea* perché ha la funzione di agire come una barriera sia fisica sia chimica contro il patogeno (Chen et al., 2019).

È interessante il fatto che a volte le surfattine non sembrano avere un ruolo nell'attività antagonista in vitro, però sono necessarie in campo (Zeriouh et al., 2014) perché hanno un ruolo nella formazione di un biofilm stabile e quindi nella colonizzazione della fillosfera; questo fa pensare che le surfattine possano essere anche fattori di adattamento (Legein et al., 2020) oltre che di biocontrollo. La topologia 3D e la natura anfifilica della surfattina fa sì che essa agisca come un agente bagnante riducendo la tensione superficiale (Leclère et al., 2006) e questo può spiegare il suo ruolo nell'adesione cellulare e nella formazione del biofilm (Bonmatin et al., 2012).

Inoltre, grazie alla loro natura anfifilica (catene laterali cariche che sporgono nella fase acquosa e porzioni apolari che raggiungono il nucleo idrofobo della membrana del patogeno) le surfattine possono ancorarsi agli strati lipidici di *B. cinerea* interferendo con l'integrità della membrana portando ad una destabilizzazione del doppio strato

fosfolipidico; a dosi molto elevate può portare alla distruzione e solubilizzazione della membrana con formazione di micelle miste (Ongena e Jacques, 2008). Il meccanismo di fungitossicità della famiglia delle iturine invece si basa principalmente sulla formazione di pori conduttori di ioni che creano una perturbazione osmotica (Aranda et al., 2005; Ongena e Jacques, 2008).

Le fengicine, dette anche plipastatine, hanno una azione meno nota rispetto alle surfattine e alle iturine; si sa però che interagiscono con gli strati lipidici del patogeno e possono anche alterarne la permeabilità in modo dose-dipendente (Deleu et al., 2005; Ongena e Jacques, 2008).

Gli LP (lipopeptidi ciclici) della famiglia delle surfattine, iturine e fengicine, oltre ad agire come antagonisti inibendo la crescita di *B. cinerea*, possono anche interagire con le cellule vegetali della vite come determinanti batterici che possono far attivare una risposta immunitaria attraverso il fenomeno della resistenza sistemica indotta (ISR) (Ongena e Jacques, 2008). La ISR innalza il potere difensivo delle piante e può determinare una riduzione dei sintomi o non dare luogo a malattia in seguito ad un attacco del patogeno grazie ad una forte e più pronta capacità difensiva della pianta (Matta et al., 2017).

Non è ancora chiaro il quadro completo degli eventi molecolari che avvengono durante il fenomeno della resistenza sistemica indotta dai lipopeptidi di *B. subtilis*. Poiché la maggior parte dell'attività biologica dei lipopeptidi ciclici agisce sulla parte lipidica delle membrane, queste molecole potrebbero essere in grado di indurre disturbi transitori nella membrana plasmatica delle cellule della vite in grado di attivare cascate biochimiche di eventi molecolari che portano all'attivazione di risposte difensive (Ongena e Jacques, 2008). Queste risposte difensive possono attivarsi in diversi siti portando quindi a un rinforzo sistemico della pianta.

Diversi studi confermano l'efficacia dei prodotti a base di *B. subtilis* contro *B. cinerea* su vite, anche grazie alle sperimentazioni che sono state effettuate sia in vitro che in campo.

Nel biennio 2004-2005 sono state effettuate delle prove su campo per testare l'efficacia del formulato commerciale Serenade (biofungicida a base di *B. subtilis*

ceppo QST 713) nel contenere i danni da botrite su vite (Benuzzi et al., 2006). Il prodotto è stato impiegato da solo e in strategia integrata ed è stato confrontato con un testimone non trattato e con linee di difesa convenzionali. Nel 2004 le prove sono state effettuate a Granarolo Faentino (RA) dal Servizio Tecnico Intrachem Bio Italia S.p.A., mentre nel 2005 sono state effettuate a Godo di Russi (RA) dal Consorzio Agrario di Ravenna (Centro di Saggio) in vigneti di Trebbiano allevati a Casarsa. Le diverse epoche di intervento sono state effettuate nei periodi di fine fioritura (A=BBCH 69), chiusura grappolo (B=BBCH 77), invaiatura (C=BBCH 83) e pre-raccolta (D=BBCH 85). La Tabella 1 mostra le diverse prove eseguite. I rilievi sono stati effettuati sui grappoli delle viti centrali di ogni parcella, e in prossimità della raccolta è stata valutata l'incidenza (% grappoli colpiti) e l'intensità del danno causato dalla botrite valutando ciascun grappolo attraverso una scala composta da cinque classi (da 0=nessun danno a 5=76-100% di danno). Successivamente i diversi dati sono stati sottoposti ad analisi statistica.

Tesi	Principio attivo (p.a.)	% p.a.	Prodotto commerciale	Dose/hl	Fase trattamenti *
Anno 2004 - Prova di Granarolo Faentino (RA)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	300 g	A, B, C, D
2	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
	Pyrimethanil	37,4	Scala	200 ml	C
	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	300 g	D
3	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
	Pyrimethanil	37,4	Scala	200 ml	C
4	Testimone non trattato	-	-	-	-
Anno 2005 - Prova di Godo di Russi (RA)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g	B, C, D
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g	B, C, D
3	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g	C, D
4	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
5	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B, C
6	Testimone non trattato	-	-	-	-

\* volume di distribuzione: 850 l/ha in A e 1.100 l/ha in B, C, D nel 2004; 1.000 l/ha nel 2005.

Tabella 1. Tesi a confronto nelle prove eseguite su vite nel biennio 2004-2005 (Benuzzi et al., 2006)

Dai risultati è emerso che “i trattamenti con *B. subtilis* impiegato da solo sono risultati efficaci nel ridurre significativamente l'intensità del danno da botrite rispetto al

testimone non trattato, con un'efficacia spesso comparabile a quella delle linee di difesa di riferimento”, e che “sia nel 2004 che nel 2005, l'impiego di *B. subtilis* in strategia integrata ha portato a valori di diffusione e intensità del danno da botrite più bassi, in alcuni casi significativamente diversi da quelli registrati per le linee di difesa convenzionali” (Benuzzi et al., 2006). Queste prove hanno quindi messo in luce il fatto che le applicazioni di questo prodotto a base di *B. subtilis* possono avere effetti positivi nel ridurre il danno da botrite su vite sia in un'ottica di agricoltura biologica e sia in agricoltura convenzionale utilizzandolo nei calendari di produzione integrata.



## 6.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

*B. amyloliquefaciens* è un batterio sporigeno Gram-positivo appartenente al phylum *Firmicutes*, scoperto nel 1943 da uno scienziato giapponese di nome Fukumoto che ha dato questo nome al batterio perché scoprì che produceva (*faciens*) l'enzima amilasi (*amyl*) responsabile della degradazione (*lique*) di zuccheri complessi in zuccheri semplici (Fukumoto, 1943); per questo motivo viene molto utilizzato nei processi industriali per la produzione di enzimi. In natura si trova comunemente nel suolo e sulla vegetazione (Ladurner et al., 2012).

Questo microrganismo può formare spore resistenti, e grazie ad esse si possono trovare in commercio diversi prodotti a base di *B. amyloliquefaciens* con requisiti di conservazione abbastanza ridotti. Le spore una volta miscelate in acqua iniziano i processi germinativi che si concludono sulla superficie della coltura da proteggere. Questo batterio è considerato sicuro, infatti non manifesta patogenicità per l'uomo e gli animali (EFSA, 2007).

I ceppi utilizzabili in Italia a base di questo batterio per ridurre il danno da botrite su vite sono tre: *B. amyloliquefaciens* FZB24, *B. amyloliquefaciens* MBI 600 e *B. amyloliquefaciens plantarum* D747.

Il prodotto commerciale TAEGRO distribuito da Syngenta, a base di *B. amyloliquefaciens* ceppo FZB24, è in formulazione polvere bagnabile, può essere utilizzato al massimo dieci volte all'anno e ha un intervallo di sicurezza ridotto (4 ore). Il prodotto SERIFEL, in formulazione polvere bagnabile, è distribuito in Italia da Basf ed è a base di *B. amyloliquefaciens* ceppo MBI 600; può essere utilizzato al massimo dieci volte all'anno, non è necessario un intervallo di sicurezza ma non è ammesso in fioritura. Il terzo prodotto è AMYLO-X distribuito da Biogard: contiene *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* D747 ed è formulato in granuli idrodispersibili (sono consentiti al massimo sei trattamenti all'anno). Tutti e tre i prodotti possono essere utilizzati fino in prossimità della raccolta (<https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/>).

L'utilizzo di *B. amyloliquefaciens* è uno strumento promettente per ridurre l'uso di sostanze chimiche contro il patogeno *B. cinerea*. Applicato in trattamenti preventivi per via fogliare, può agire direttamente e indirettamente sui patogeni attraverso tre principali modalità d'azione, simili a quelle di *B. subtilis*: la competizione (con formazione di biofilm), l'antibiosi con rilascio di metaboliti secondari (produzione di lipopeptidi) e la stimolazione dei meccanismi di difesa della pianta.

Questo microrganismo formando biofilm può colonizzare i frutti e può agire contro il patogeno per competizione spaziale, formando una barriera sia fisica sia chimica in grado di impedire al patogeno di attecchire sulla pianta di vite (<https://www.agro.basf.it/it/>). Dunque la presenza di un elevato numero di questo batterio protegge le foglie e i frutti (lesioni comprese) dai patogeni (Chen et al., 2019). *B. amyloliquefaciens* può agire anche per competizione sottraendo le fonti nutritive, come ad esempio i composti organici, che sono essenziali per la proliferazione e la colonizzazione del patogeno sulla pianta (Budiharjio et al., 2014), andando così a sopprimere la malattia.

Contro *B. cinerea* questo batterio può anche secernere lipopeptidi che possono inibire la germinazione delle spore e la crescita del micelio del patogeno. Gli antibiotici lipopeptidici che può produrre sono le iturine (iturina A e micosubtilina), le fengicine e le surfattine (Mendiara et al., 2019; Stein, 2005). Queste molecole non sono tossiche per la pianta di vite e sono caratterizzate da una forte attività antimicotica con azione anche a livello delle membrane cellulari del target; infatti possono interferire con l'integrità del doppio strato fosfolipidico del patogeno (vedi capitolo 6.1) bloccando così la sua crescita.

Come accade anche per *B. subtilis*, i lipopeptidi oltre ad agire come molecole tossiche per il patogeno possono interagire con le cellule della vite come determinanti batterici in grado di indurre meccanismi di resistenza nella pianta attraverso il fenomeno della resistenza sistemica indotta (ISR) (Ongena e Jacques, 2008), utile a creare un rinforzo sistemico nella pianta.

Nel 2014 sono state effettuate delle prove sperimentali condotte in pieno campo per valutare l'efficacia di *B. amyloliquefaciens* FZB24 (utilizzando il formulato

commerciale Taegro alle dosi di 370 g/ha) per il controllo della botrite su vite (vedi Tabella 2) (Galeazzi et al., 2018). Le prove sono state effettuate in Italia e in altri paesi europei dai centri di saggio di Syngenta Crop Protection e da istituti di ricerca accreditati. I trattamenti sono stati effettuati in maniera preventiva partendo dalla fase fenologica di pre-chiusura grappolo.

Il prodotto è stato valutato attraverso due modalità: nella prima sono state effettuate cinque applicazioni fogliari del prodotto Taegro ovvero a pre-chiusura grappolo, sette giorni dopo, a invaiatura e poi quattordici giorni dopo, mentre nella seconda modalità è stata effettuata una applicazione di Geoxe (fludioxonil) in pre-chiusura grappolo e poi Taegro a invaiatura e poi sette e quattordici giorni dopo. Dunque, nella tesi 2 è stato testato il prodotto in un'ottica di agricoltura biologica mentre nella tesi 4 in un'ottica di agricoltura integrata, e sono state confrontate con un testimone non trattato e due testimoni che prevedevano applicazioni di soli prodotti chimici (fludioxonil in pre-chiusura grappolo, e cyprodinil+fludioxonil in pre-chiusura grappolo e invaiatura).

Nome commerciale	Sostanze attive	Concentrazione	Formulazione	Dose/ha
Taegro	<i>B. amyloliquifaciens</i> FZB24	13% $1 \times 10^{10}$ CFU/g	WP	370 g
Switch	Cyprodinil + fludioxonil	37,5 + 25%	WG	1000 g
Geoxe	Fludioxonil	50%	WG	1000 g

Tabella 2. Prodotti utilizzati nelle prove (modificato da Galeazzi et al., 2018)

Ad ogni rilievo sono stati osservati 50 grappoli d'uva per parcella ed è stata valutata l'incidenza percentuale della malattia e la sua gravità e dopodiché i risultati ottenuti sono stati sottoposti a diverse analisi statistiche. Dai risultati di queste prove sperimentali (vedi Tabella 3) il prodotto a base di *B. amyloliquifaciens* applicato da solo ha dimostrato un buon livello di efficacia nel contenimento di *B. cinerea* su vite. Inoltre, utilizzato nella strategia integrata con una applicazione di fludioxonil nella fase di pre-chiusura grappolo si è notata un'ottima efficacia paragonabile allo standard chimico bi-componente.

Tesi/Principio attivo	Dose Formulato kg/ha	Bagnacavallo (RA) cv. Trebbiano	Unterfranken DE cv. Domina	Trelou sur marne FR cv. Pinot meunier	Chemin des Landes FR cv. Chardonnay	Kenzingen-nordweil DE cv. Grauburgunder
		% efficacia (sev. Grappoli%)				
1/ Testimone n. t.		(41,6) a	(18,3) a	(13,4) a	(7,1) a	(31,5) a
2/ <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24 13WP (B + 7 + C + 7 + 14)	0,37	81,4 d	55,9 b	0 a	0 a	65,4 cd
3/ Testimone parziale: 1 fludioxonil 50% (B)	1	86 d	47,8 b	10,6 b	12,1 b	50,8 c
4/ fludioxonil 50% (B) <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24 13WP (C+7+14)	0,37	86,2 d	68,4 b	45 b	43,5 b	70,7 d
5/ ciprodinil+fludioxonil 62,5% (B+C)	1	97,3 f	70,7 cd	18,4 b	25,1 b	58,9 cd

Tabella 3. Risultati delle prove, espressi come % di efficacia sulla severità della malattia nei grappoli. (Galeazzi et al., 2018)

Questo studio ha dunque evidenziato le potenzialità di questo microrganismo sia in agricoltura biologica e sia in agricoltura integrata in un’ottica di ottimizzazione dell’utilizzo di prodotti chimici per la difesa della vite. Inoltre il prodotto Taegro “non ha mai evidenziato alcun fenomeno di fitotossicità sulle colture saggiate e sui principali insetti utili” (Galeazzi et al., 2018).

### 6.3 *Aureobasidium pullulans*

*A. pullulans* è un fungo ascomicete appartenente alla famiglia delle Dothioraceae che si può trovare in diversi ambienti, ad esempio nel suolo, sulla vegetazione e in acqua. Può essere un epifita o endofita di diverse specie vegetali, vite compresa, senza causare sintomi di malattia (Andrews et al., 2002).

È caratterizzato da una forma riproduttiva asessuata, e si propaga producendo blastospore. Può anche formare clamidospore con funzione di sopravvivenza. È inoltre in grado di abitare un'ampia varietà di habitat, tra cui gli ambienti salini, freddi, in condizioni di stress idrico e con livelli bassi di nutrienti (Gostinčar et al., 2011).

I ceppi utilizzabili in Italia a base di questo microrganismo per ridurre il danno da botrite su vite sono *A. pullulans* ceppo DSM 14940 e DSM 14941. Il prodotto commerciale a base di questi microrganismi si chiama BOTECTOR NEW ed è distribuito dall'azienda Manica. Viene venduto in formulazione granuli idrodispersibili, si possono effettuare massimo quattro trattamenti all'anno in via preventiva (da post-fioritura a pre-raccolta), resiste al dilavamento e non è necessario un intervallo di sicurezza. I trattamenti si effettuano preferibilmente in quattro diversi stadi fenologici: BBCH 68=fine fioritura (contro le infezioni latenti), BBCH 77=pre-chiusura grappolo (contro le infezioni del rachide e degli acini), BBCH 83=inizio invaiatura (contro le infezioni dell'acino) e BBCH 85-89=maturazione (contro le infezioni dell'acino) (<https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/>).

I ceppi DSM 14940 e DSM 14941 hanno un optimum termico compreso tra i 24 e i 29 °C, e cessano di moltiplicarsi (ma senza morire) con temperature superiori ai 35 °C.

In condizioni di campo *A. pullulans* è in grado di fornire un livello di controllo elevato della botrite, grazie alla sua elevata tolleranza a diversi stress ecologici e alla sua elevata attività antagonista (Galli et al., 2021). I principali meccanismi d'azione di contro il patogeno *B. cinerea* sono la competizione per lo spazio e gli elementi nutritivi e la produzione di enzimi e composti organici volatili.

*A. pullulans* può colonizzare la superficie e le microlesioni che si possono formare sugli acini d'uva, che rappresentano anche la principale via di penetrazione di *B.*

*cinerea* (Pertot et al., 2017). Questo agente di biocontrollo colonizzando le superfici agisce quindi come uno scudo naturale proteggendo i grappoli dal patogeno, andando a competere sia per lo spazio sia per i nutrienti nel sito di infezione che sono essenziali per la proliferazione e la colonizzazione del patogeno sulla pianta (figura 4).

- Aureobasidium pullulans
- Botrytis cinerea

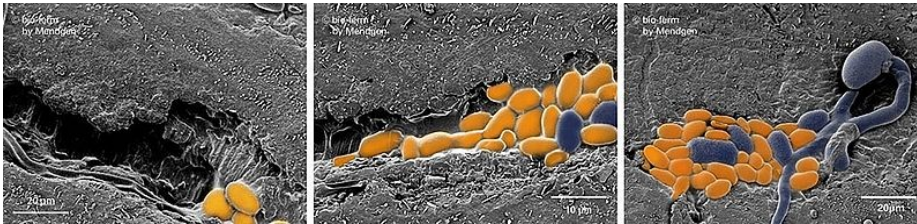


Figura 4. Antagonismo e competizione per lo spazio e gli elementi nutritivi (<https://bioferm.com>)

*A. pullulans* può produrre enzimi che possono degradare la parete cellulare del patogeno, ovvero produce gli enzimi proteasi e le  $\beta$ -1,3-glucanasi. Questi enzimi hanno la capacità di creare un danno fisico all'ifa di *B. cinerea* impedendole così di crescere (Parafati et al., 2015).

Questo microrganismo può anche produrre composti organici volatili (VOCs) con proprietà antimicrobiche, ovvero etanolo, 2-metil-1-propanolo, 3-metil-1-butanolo e 2-feniletanolo (Yalage Don et al., 2021). I composti organici volatili riescono a sopprimere la crescita di *B. cinerea* perché hanno il potenziale di innescare la produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di causare la perossidazione lipidica e la perdita di elettroliti nei microrganismi (Yalage Don et al., 2021). Secondo gli autori citati nella frase precedente, questi composti, a causa della loro lipofilia, possono penetrare e interagire con gli strati fosfolipidici della membrana plasmatica del patogeno, alterandone la permeabilità attraverso la perossidazione dei lipidi di membrana. La perdita della semipermeabilità e dell'integrità della membrana è strettamente correlata alla perdita di elettroliti cellulari (Leverentz et al., 2002). Inoltre, i VOC possono mirare al complesso enzimatico I della catena respiratoria mitocondriale innescando la formazione di ROS. Il principale ROS è il radicale superossido, ed è in grado di indurre un danno alle cellule attraverso la formazione di

radicali idrossilici che sono altamente reattivi (Perrone et al., 2008).

In sintesi, *A. pullulans* producendo i VOC ha la capacità di sopprimere la crescita del micelio e la germinazione delle spore di *B. cinerea*, danneggiando o alterando la membrana plasmatica (Yalage Don et al., 2021).

L'utilizzo di *A. pullulans* risulta quindi efficace in termini di biocontrollo della muffa grigia sulla vite, sia quando viene usato singolarmente effettuando trattamenti durante le principali fasi fenologiche a rischio insorgenza di botrite (dalla pre-chiusura del grappolo fino alla raccolta), e sia quando viene usato in sequenza insieme ad altri microrganismi, come rivelano le sperimentazioni descritte da Pertot *et al.* (2017).

## 6.4 *Trichoderma atroviride*

*T. atroviride* è un fungo ascomicete appartenente alla famiglia delle Hypocreacee che si può trovare principalmente nel terreno, nel legno e sulle foglie. Si propaga producendo spore (conidi) e può anche formare clamidospore con funzione di sopravvivenza (Harman et al., 2004). Possiede l'abilità di interagire con le piante in qualità di simbionte opportunisto ed avirulento, riuscendo a vivere endofiticamente nelle radici, nelle foglie e fasci vascolari (Sellitto, 2020).

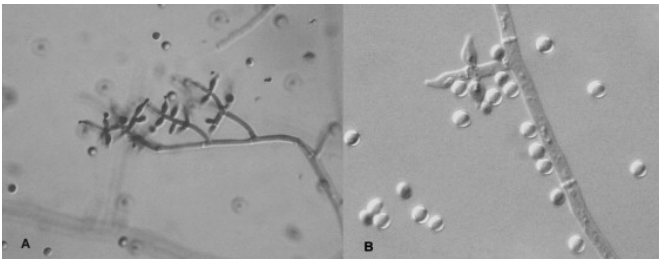


Figura 5. *T. atroviride* al microscopio (Ranque et al., 2008)

*T. atroviride* è in grado di garantire una forte inibizione della crescita di *B. cinerea*, dimostrando che può essere usato come un efficace agente di biocontrollo fungino contro la contaminazione pre e post raccolta dei grappoli d'uva (Savas et al., 2021). Questo effetto è dato dai molteplici meccanismi d'azione che lo rendono efficace nella lotta contro la botrite, quali ad esempio la competizione, la produzione di enzimi e molecole con attività antimicrobica.

Questo agente di biocontrollo una volta che si trova sulla pianta comincia a svilupparsi e a colonizzare rapidamente anche i possibili siti di infezione del patogeno *B. cinerea*, entrando così in competizione sia per lo spazio vitale sia per le sostanze nutritive; in questo modo si crea una barriera protettiva in grado di impedire la penetrazione e/o lo sviluppo e la diffusione del patogeno (Pertot et al., 2017). La rapida colonizzazione di un grande numero di substrati è in parte dovuta alla capacità del microrganismo di sfruttare come fonti di carbonio e di azoto un ampio gruppo di composti (ad esempio monosaccaridi, polisaccaridi, purine, aminoacidi, tannini, acidi organici, ecc) (Sellitto, 2020). Inoltre, è un buon colonizzatore dei tessuti vegetali morti e quindi può essere applicato senza problemi nella fase di chiusura del grappolo per colonizzare i residui



fiorali che rimangono intrappolati (Pertot et al., 2017) e dove *B. cinerea* può sopravvivere e dove può iniziare l'infezione durante la maturazione (Mundy et al., 2012).

Un ulteriore meccanismo d'azione di *T. atroviride* è quello di poter entrare in contatto con le ife del patogeno, crescere lungo il micelio e produrre enzimi litici, ovvero chitinasi, beta-glucanasi e proteasi che sono in grado di degradare la parete cellulare del patogeno (Sellitto, 2020). Può anche produrre il pirone 6-Pentil-2H-piran-2-one (6PP), ovvero una sostanza organica contenente un anello esa-atomico costituito da cinque atomi di carbonio insaturi e un atomo di ossigeno. Il 6PP tende a passare facilmente allo stato gassoso ricadendo così nella categoria dei composti organici volatili (VOCs). Questa molecola possiede proprietà antifungine contro diversi fitopatogeni tra cui *B. cinerea* e riesce a stimolare la crescita delle cellule della vite (es. germogli) interferendo con i processi di sviluppo della pianta in modo auxino-simile a basse concentrazioni (Sellitto, 2020). Inoltre è stato dimostrato che il 6PP può fungere da elicitore di risposte di difesa della pianta attraverso il fenomeno della resistenza indotta: la pianta riesce a percepire questa molecola e quindi incrementa nei tessuti vegetali i livelli dei composti di difesa come le proteine correlate alla patogenesi (PR-proteins glucanasi e chitinasi) (Sellitto, 2020).

Tutte queste modalità d'azione rendono *T. atroviride* un fungo in grado di prevenire e contrastare efficacemente *B. cinerea*.

In Italia per combattere la botrite della vite è possibile utilizzare *T. atroviride* ceppo SC1: il prodotto commerciale VINTEC viene distribuito dall'azienda Belchim Crop Protection e contiene questo microrganismo. Questo fungicida biologico ad azione preventiva viene venduto in formulazione granuli idrodispersibili e il numero di trattamenti consigliati varia da due a quattro all'anno a partire dall'80% della fioritura, avendo cura di distribuire il prodotto su tutta la pianta e in modo particolare sui grappoli. Un aspetto interessante di questo formulato è che non è previsto né un tempo di carenza, né un tempo di rientro. (<https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/>).

Oltre alle sperimentazioni che validano l'efficacia di *T. atroviride* usato singolarmente contro la muffa grigia, ne sono state effettuate anche alcune in un'ottica di una

strategia combinata con diverse specie di microrganismi applicate in sequenza (Pertot et al., 2017). Dal 2011 al 2014 sono state effettuate delle prove di campo in vigneti commerciali in tre località del Nord e Centro Italia, ovvero a San Michele all'Adige (Trentino-Alto Adige), Ziano Piacentino (Emilia-Romagna) e San Casciano in Val di Pesa (Toscana) (Pertot et al., 2017). L'idea è stata quella di combinare tre specie diverse di microrganismi, ovvero *T. atroviride* SC1 (Vintec, a 1000 g/ha), *A. pullulans*-DMS 14941-DMS 14940 (Botector, a 400 g/ha) e *B. subtilis* QST 713 (Serenade Max, a 3000 g/ha). La strategia ha previsto l'applicazione in sequenza di ciascun prodotto microbico nella fase fenologica in cui si supponeva fosse il più efficace: in fase di chiusura del grappolo è stato applicato *T. atroviride* (essendo un buon colonizzatore di tessuti vegetali morti come i residui fiorali), in fase di invaiatura *A. pullulans* (buon competitore per lo spazio e i nutrienti) e in prossimità della raccolta è stato applicato *B. subtilis*, che possiede una rapida attività diretta dovuta alla produzione di sostanze antimicotiche. Oltre a questo sono state anche seguite le buone pratiche agronomiche per diminuire la suscettibilità dell'uva alla botrite.

Pertot et al. (2017) affermano che grazie a questo sistema il controllo di *B. cinerea* sui grappoli è stato molto soddisfacente. I tre microrganismi, essendo che hanno meccanismi d'azione diversi e che hanno potuto occupare nicchie ecologiche diverse, non hanno interferito negativamente tra loro e si è ottenuto un buon controllo della malattia. Questo è stato provato dal fatto che “la colonizzazione delle bacche da parte di ciascuno dei diversi agenti di biocontrollo microbico al momento della raccolta non differiva per i trattamenti individuali o quando applicati nella strategia combinata” (Pertot et al., 2017). Questa strategia, che ha previsto l'uso di diversi prodotti microbici applicati in sequenza in diverse fasi fenologiche della vite, si è quindi rivelata efficace e non ha portato a problemi in termini di compatibilità tra i microbi, a differenza di quando si mischiano nei serbatoi prodotti che contengono microrganismi diversi, fatto che porta all'insorgenza di problemi di incompatibilità e meccanismi di reciproco antagonismo (Pertot et al., 2017).

## 6.5 *Pythium oligandrum*

*P. oligandrum* è un oomicete appartenente alla famiglia delle Pythiaceae. Si tratta di un micoparassita di oltre venti funghi patogeni di interesse agrario compresa *B. cinerea*. Il suo ambiente naturale di crescita è rappresentato dai propri ospiti microbici e dal suolo, dove può anche vivere come saprofita (Brožová, 2002).

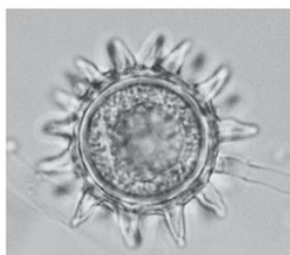


Figura 6. Oospore di *P. oligandrum* (You et al., 2019)

Questo oomicete si è rivelato uno strumento promettente per contrastare il patogeno *B. cinerea*. Applicato in trattamenti sulla pianta di vite può agire direttamente e indirettamente sul patogeno attraverso tre principali meccanismi d'azione, ovvero il micoparassitismo, la produzione di enzimi (Picard et al., 2000) e l'induzione della resistenza della pianta (Mohamed et al., 2007).

*P. oligandrum* produce oospore, che possono germinare ed entrare in contatto con le ife del patogeno. Una volta avvenuto questo contatto può produrre enzimi litici come proteasi, beta-1,3-glucanasi e lipasi, che hanno la capacità di lisare la parete cellulare dell'ospite e consentire la penetrazione del micoparassita all'interno delle ife (Picard et al., 2000). A questo punto *P. oligandrum* comincia a trarre il proprio nutrimento dall'ospite, crescendo e sviluppandosi all'interno del fungo (Brožová, 2002). Tutto questo può portare ad alterazioni della permeabilità della membrana con conseguente formazione di squilibri osmotici interni, alla disorganizzazione del citoplasma, al collasso e alla perdita di turgore delle cellule di *B. cinerea*, con conseguente cessazione della crescita di quest'ultimo (Picard et al., 2000; Brožová, 2002; Lewis e Papavizas, 1987).

*P. oligandrum* si può riprodurre per via asessuata e formare gli zoosporangi da cui si liberano le zoospore, che possono diffondersi e sviluppare nuove ife. Oltre alla riproduzione asessuata, il tallo può formare strutture sessuate che possono dare vita a

nuove oospore, che possono anch'esse diffondersi e parassitizzare altri miceli patogeni (Matta et al., 2017).

Questo oomicete, oltre alle azioni dirette può anche agire indirettamente contro i patogeni attraverso l'induzione della resistenza della vite (Mohamed et al., 2007). *P. oligandrum* produce un metabolita chiamato oligandrina, ovvero una proteina a basso peso molecolare (<10 kDa) appartenente alla famiglia delle elicetine; si tratta di un elicitore della difesa delle piante, che attraverso diversi meccanismi non ancora del tutto chiari riesce a indurre l'espressione di geni correlati alla difesa (Mohamed et al., 2007). L'oligandrina è dunque in grado di innescare reazioni di difesa nella vite, infatti è in grado di indurre un aumento dello spessore della cuticola, accumulo di composti fenolici nei vacuoli delle cellule del parenchima fogliare, formazione di papille (deposito di materiale presso il sito di infezione del patogeno, es. proteine, composti fenolici, lignina) in seguito all'attacco di *B. cinerea*, e l'induzione dell'espressione della stilbene sintasi, un enzima chiave per la produzione di fitoalessine (sostanze antimicrobiche che si accumulano nel vacuolo dopo l'infezione) (Mohamed et al., 2007). Tutte queste risposte di difesa sono utili per la protezione e il contenimento degli eventuali attacchi del fungo *B. cinerea*.

*P. oligandrum* produce anche la triptamina (TNH<sub>2</sub>), ovvero un alcaloide precursore della sintesi della auxina (Acido indol-3-acetico) che viene assorbito dalla pianta ed è associato al miglioramento della crescita delle piante e al miglioramento dell'assorbimento radicale dei micronutrienti (Le Floch et al., 2003), che può portare a una migliore resistenza della vite.

Per combattere la botrite su vite è possibile utilizzare *P. oligandrum* ceppo M1, un ceppo selvatico isolato dal suolo naturale, non modificato geneticamente. In Italia il prodotto commerciale in vendita a base di questo microrganismo si chiama POLYVERSUM ed è distribuito dall'azienda Gowan in formulazione polvere bagnabile: il ceppo selezionato di *P. oligandrum* si trova sotto forma di oospore durevoli pronte a germinare quando disperse in acqua. Si possono effettuare massimo quattro trattamenti all'anno (con un intervallo fra i trattamenti di 5-8 giorni) a partire dalla fase di fioritura (80% di fiori aperti= BBCH 68) fino alla maturazione delle

bacche/pre-vendemmia (BBCH 89), e non è necessario un intervallo di sicurezza (<https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/>).

Studi tossicologici effettuati su *P. oligandrum* ceppo M1 non hanno rilevato alcun pericolo per la salute umana e non sono stati identificati effetti dannosi per l'ambiente, sugli organismi del suolo e sulle api e altri artropodi (Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products - *P. oligandrum* M1 Assesment Report, 2015).

Nel corso degli anni sono state svolte diverse sperimentazioni in campo per valutare l'efficacia dei prodotti a base di *P. oligandrum* per prevenire e contrastare gli attacchi della muffa grigia sulla vite, sia in Italia che all'estero, con risultati promettenti.

Nell'anno 2014 in Italia e Spagna sono state condotte diverse indagini da parte di centri di ricerca certificati per la sperimentazione di agrofarmaci in cui si è testata l'efficacia di *P. oligandrum* ceppo M1 con il prodotto Polyversum (Chromy e Alegi, 2018). I risultati dell'indagine sono stati riassunti in un grafico che mostra le percentuali d'efficacia media rispetto alla coltura non trattata messe a confronto con la miscela chimica cyprodinil+fludioxonil (Figura 7).

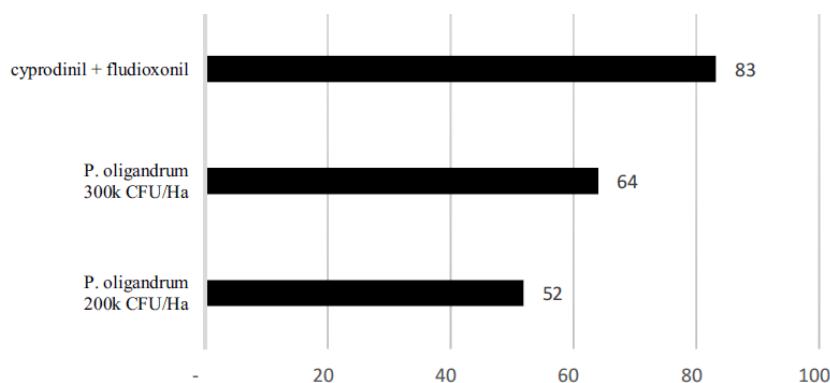


Figura 7. Efficacia espressa come % di riduzione della gravità dei sintomi rispetto alla coltura non trattata: media di 10 prove. (modificato da Chromy e Alegi, 2018)

Nelle prove sperimentali il prodotto Polyversum è stato utilizzato nelle principali fasi fenologiche di intervento (prechiusura grappolo, invaiatura, preraccolta) e sono anche state seguite le buone pratiche agricole. I dati riportati sintetizzano i risultati di diverse prove e mostrano che l'agrofarmaco a base di *P. oligandrum*, utilizzato alle dosi

autorizzate (200-300 g/ha), possiede una buona attività biologica nei confronti di *B. cinerea* e quindi può essere una valida alternativa per la protezione di questa fitopatia nella vite da vino e da tavola in un'ottica di agricoltura biologica.

Negli anni 2016 e 2017 sono state eseguite delle indagini nella località Sorbara di Bomporto (MO) sulla varietà Lambrusco salamino (Nannini e Bortolotti, 2018). Lo scopo delle sperimentazioni era quello di valutare l'efficacia di alcuni formulati a ridotto impatto ambientale tra cui il prodotto Polyversum, intervenendo nelle fasi di pre-chiusura grappolo, invaiatura e pre-raccolta. Anche in questo caso l'attività di *P. oligandrum* è stata soddisfacente nel ridurre l'attacco della muffa grigia rispetto al testimone non trattato (Nannini e Bortolotti, 2018).

Nel 2017 sono state condotte delle prove in collaborazione con il Servizio fitosanitario della regione Abruzzo e con il CdS Agritek presso un'azienda di Cerratina di Pianella (PE) su vigneti della varietà Montepulciano (Alessandri et al., 2018). In queste prove è stata valutata l'efficacia di uno standard chimico a base di cyprodinil+fludioxonil (Switch) utilizzato nelle fasi di pre-chiusura grappolo e invaiatura, in confronto con una strategia integrata che prevedeva l'utilizzo di Switch nella fase di pre-chiusura grappolo e l'utilizzo del prodotto Polyversum nelle fasi di invaiatura e pre-raccolta. In questa sperimentazione Switch ha garantito il miglior controllo della malattia ma un'ottima performance è stata riscontrata anche dalla strategia integrata con Polyversum; questo significa che “è possibile sostituire il secondo trattamento chimico eseguendo due interventi con un prodotto a basso impatto senza pregiudicare l'efficacia finale” (Alessandri et al., 2018).

L'utilizzo di *P. oligandrum* si è quindi rilevato uno strumento promettente per la lotta contro la muffa grigia sulla vite nell'ambito di moderni programmi di difesa, anche grazie al suo minore impatto rispetto ai prodotti chimici, all'assenza di residui al momento della raccolta e alla possibilità di utilizzarlo senza intervalli di sicurezza.

## 7. Conclusioni

Per combattere la muffa grigia sulla vite risulta sempre più necessario l'utilizzo di alternative ai prodotti chimici. Questo perché i prodotti chimici rappresentano una minaccia per la salute dell'uomo e per l'ambiente. Inoltre, *B. cinerea* è una specie ad alto rischio di sviluppo di resistenze ai fungicidi monosito.

Un'alternativa promettente per proteggere le colture è l'utilizzo degli agenti di biocontrollo, che presentano numerosi vantaggi. Tra i vantaggi dei BCA si evidenzia il fatto che hanno un profilo ecotossicologico migliore e quindi non sono tossici per l'uomo, gli animali e l'ambiente, aiutano a ridurre la presenza di residui sulle colture e possono essere applicati in prossimità della raccolta in quanto non è necessario un intervallo di sicurezza (e neanche un tempo di rientro).

In Italia su vite è consentito utilizzare prodotti a base dei microrganismi *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *A. pullulans*, *T. atroviride* e *P. oligandrum*. Questi cinque agenti di biocontrollo presentano meccanismi d'azione efficaci per prevenire e contrastare il patogeno *B. cinerea*, come ad esempio la produzione di sostanze antimicotiche, la competizione per il substrato e l'induzione dei meccanismi di difesa della pianta. Nel corso degli anni sono state effettuate numerose sperimentazioni in campo per verificare la validità di questi prodotti, sia utilizzati singolarmente sia in successione tra di loro o con prodotti chimici in un'ottica di una agricoltura integrata, e i risultati sono promettenti.

Le tabelle 4 e 5 nella pagina seguente riassumono, alla luce della letteratura consultata, alcune caratteristiche dei cinque microrganismi analizzati e qualche criticità che è possibile riscontrare nel loro utilizzo.

Data la crescente richiesta da parte degli esperti e della comunità di ridurre l'utilizzo di sostanze chimiche in viticoltura, l'utilizzo degli agenti di biocontrollo può essere quindi una buona alternativa, e in futuro sarà sempre più necessaria la conoscenza di questi microrganismi, dei loro meccanismi d'azione contro i patogeni, della loro efficacia in situazioni ambientali diverse e delle modalità di applicazione. In tal modo sarà possibile progettare nuovi formulati anche prevedendo combinazioni tra diversi

tipi di BCA sempre più efficaci per aumentare la protezione e di conseguenza la produzione delle colture anche in un'ottica di sostenibilità ambientale.

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Pythium oligandrum</i>
Organismo	Batterio	Batterio	Fungo ascomicete	Fungo ascomicete	Oomicete
Ceppi	QST 713	FZB24, MBI 600, D747	DSM 14940, DSM 14941	SC1	M1
Principali meccanismi d'azione	Produzione lipopeptidi, formazione biofilm, induzione resistenza.	Produzione lipopeptidi, induzione resistenza, competizione.	Competizione, produzione di enzimi e VOC.	Produzione di enzimi, competizione.	Produzione di enzimi, micoparassitismo, induzione resistenza.
Prodotti	Serenade Max, Rhapsody	Taegro, Serifel, Amylo-X	Botector New	Vintec	Polyversum
Range ottimale T x la crescita	19 - 30°C	24 - 35°C	24 - 29°C	22 - 33°C	16 - 35°C
Range ottimale UR x la crescita	92 - 100%	89 - 100%	90 - 100%	86 - 100%	88 - 100%
Tempo di carenza	0-3 giorni	0 giorni	0 giorni	0 giorni	0 giorni
T conservaz. prodotto	< 30°C	< 35°C	8 - 21°C	4 - 20°C	5 - 25°C
Strutture utili x conservazione prodotti	Spore	Spore	Blastospore, clamidospore	Conidi, clamidospore	Oospore

Tabella 4. Confronto di alcune caratteristiche dei cinque BCA analizzati.

	<b>Caratteristiche comuni dei cinque BCA e qualche precauzione(↓)</b>
Tempo di rientro	0 giorni
Utilizzo	Da fine fioritura (BBCH 67) fino in prossimità della raccolta (BBCH 89)
Tossicità	Non sono tossici per l'uomo, gli animali e l'ambiente
Residui lasciati sulle colture	Limitati/nulli
Utilizzabili in biologico	Sì
Utilizzabili in strategia integrata	Sì
Pulizia botte atomizzatore	Va risciacquata con molta cura prima dell'utilizzo (↓)
Periodo conservaz. in sospensione	Limitato (qualche ora)(↓). Non lasciare la miscela alla luce diretta del sole
Sensibilità alle condizioni ambientali	Alta (↓). Per un miglior utilizzo vedi range ottimali di crescita nella Tabella 4
Miscelazione con altri prodotti	Limitata (↓). Anziché miscelare i prodotti è preferibile utilizzarli in successione tra di loro

Tabella 5. Caratteristiche comuni dei BCA e alcune precauzioni da adottare per mantenere invariata la loro efficacia.



## 8. Bibliografia

- Alessandri S., Cavazza F., D'Ascenzo D., Crivelli L., Viglione P., Giorgino D. e Ceredi G. 2018. Prove sperimentali con il nuovo biofungicida *Pythium oligandrum* contro botrite su uva da vino, botrite su fragola e sclerotinia su lattuga e lattughino. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 347-356
- Andrews J. H., Spear R. N. e Nordheim E. v. 2002. Population biology of *Aureobasidium pullulans* on apple leaf surfaces. Canadian Journal of Microbiology, 48(6), 500–513
- Aranda F. J., Teruel J. A. e Ortiz A. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1713(1): 51–56
- BASF Agricultural Solutions Italia. <https://www.agro.basf.it/it/>
- Benuzzi M., Ladurner E. e Fiorentini F. 2006. Efficacia di Serenade, nuovo biofungicida a base di *Bacillus subtilis*, nel contenimento di microrganismi patogeni delle colture. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 429-436
- Bio-ferm. <https://bio-ferm.com>
- Bonmatin J.-M., Laprevote O. e Peypoux, F. 2012. Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to Design New Bioactive Agents. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 6(6): 541–556
- Bottura M. 2011. Manuale di viticoltura. Fondazione Edmund Mach.
- Brožová J. 2002. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. Plant Protection Science, 38: 29-35
- Budiharjo A., Chowdhury S. P., Dietel K., Beator B., Dolgova O., Fan B., Bleiss W., Ziegler J., Schmid M., Hartmann A. e Borriss R. 2014. Transposon Mutagenesis of the

Plant-Associated *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42 Revealed That the *nfrA* and RBAM17410 Genes Are Involved in Plant-Microbe-Interactions. PLOS ONE, 9(5): e98267

- Cavazza F., Preti M., Franceschelli F., Landi M., Montanari M., Antoniaci L. e Bugiani R. 2018. Valutazione dell'attività antibotritica di diversi prodotti a basso impatto ambientale per il contenimento di *Botrytis cinerea* su vite in Emilia-Romagna. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 567-574
- Cervone F. e Lorito M. 2007. Lotta biologica. Enciclopedia della Scienza e della Tecnica. <https://www.treccani.it/>
- Chen X., Wang Y., Gao Y., Gao T. e Zhang D. 2019. Inhibitory Abilities of *Bacillus* Isolates and Their Culture Filtrates against the Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* on Postharvest Fruit. The Plant Pathology Journal 35(5): 425–436
- Chromy Z. e Alegi S. 2018. *Pythium oligandrum*, nuovo biofungicida per il controllo di botrite e sclerotinia su vite, fragola e orticole. Atti Giornate Fitopatologiche, 2: 41-50
- Commissione europea. <https://ec.europa.eu/info/>
- Corazzina E. 2019. La defogliazione per la qualità e la sanità dell'uva. L'informatore agrario. <https://www.informatoreagrario.it/>
- Decreto legislativo 14.8.2012 n. 150. Attuazione della direttiva 2009/128/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi. Supplemento ordinario n. 177/L alla Gazzetta Ufficiale, 30 agosto
- Deleu M., Paquot M. e Nylander T. 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. Journal of Colloid and Interface Science, 283(2): 358–365
- EFSA. 2007. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. The EFSA Journal, 587: 1-16
- Elad Y. e Freeman S. 2002. Biological Control of Fungal Plant Pathogens. Agricultural Applications, 93–109

- Fan H., Ru J., Zhang Y., Wang Q. e Li Y. 2017. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*, 199: 89–97
- Fedele G., Brischetto C., González-Domínguez E. e Rossi V. 2020. The Colonization of Grape Bunch Trash by Microorganisms for the Biocontrol of *Botrytis cinerea* as Influenced by Temperature and Humidity. *Agronomy* 2020, 10(11): 1829
- Fedele G., Gonzalez-Dominguez E. e Rossi V. 2019. Il biocontrollo di *Botrytis cinerea*. *Terra e Vita*, <https://terraevita.edagricole.it/>
- Fitogest. <https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/>
- FRAC, Fungicide Resistance Action Committee. <https://www.frac.info/>
- Fukumoto J. 1943 Studies on the production of bacterial amylase: Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. *Journal Agricultural Chemical Society of Japan*, 19: 487–503
- Galeazzi M., Infantino A. e Zuffa M. 2018. Nuovo biofungicida a base di *Bacillus amyloliquefaciens* ceppo FZB24: esperienze nel contenimento di oidio su pomodoro e botrite vite. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 51-58
- Galli V., Romboli Y., Barbato D., Mari E., Venturi M., Guerrini S. e Granchi L. 2021. Indigenous *Aureobasidium pullulans* Strains as Biocontrol Agents of *Botrytis cinerea* on Grape Berries. *Sustainability* 2021, Vol. 13, Page 9389, 13(16): 9389
- Gostinčar C., Grube M. e Gunde-Cimerman N. 2011. Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments. *Fungal Biology*, 115(10): 1008–1018
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I. e Lorito M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2004, 2(1): 43–56
- Ladurner E., Benuzzi M., Fiorentini F. e Lucchi A. 2012. Amylo-X, nuovo fungicida/battericida a base di *Bacillus amyloliquefaciens* ceppo D747 ad ampio spettro di azione. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 229-236

- Le Floch G., Rey P., Benizri E., Benhamou N. e Tirilly Y. 2003. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil*, 257(2): 459–470
- Leclère V., Marti, R. Béchet, M. Fickers, P. e Jacques, P. 2006. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Archives of Microbiology*, 186(6): 475–483
- Legein M., Smets W., Vandenneuvel D., Eilers T., Muyschondt B., Prinsen, E. Samson R. e Lebeer S. 2020. Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*, 0: 1619.
- Leverentz M. K., Wagstaff C., Rogers H. J., Stead A. D., Chanasut U., Silkowski H., Thomas B., Weichert H., Feussner I. e Griffiths G. 2002. Characterization of a novel lipoxygenase-independent senescence mechanism in *Alstroemeria peruviana* floral tissue. *Plant Physiology*, 130(1): 273–283
- Lewis J. A. e Papavizas G. C. 1987. Permeability Changes in Hyphae of *Rhizoctonia solani* Induced by Germling Preparations of *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Phytopathology*, 77(5): 699
- Martinez R. M. 2013. *Bacillus subtilis*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*; 246–248
- Matta A., Buonauro R., Favaron F., Scala A. e Scala F. 2017. *Fondamenti di patologia vegetale*. Bologna: Pàtron Editore
- Mazzilli R. 2019. *Viticultura biologica: tecniche agronomiche e strategie di difesa*. Milano, Bologna: Edagricole
- Mendiara I., Calvo H., Blanco D., Oria R. e Venturini M. E. 2019. Role of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 against *Botrytis cinerea* and *Monilinia* species. *Acta Horticulturae*, 1256: 413–418
- Microbiologia Italia. <https://www.microbiologiaitalia.it/>

- Mohamed N., Lherminier J., Farmer M. J., Fromentin J., Béno N., Houot V., Milat M. L. e Blein J. P. 2007. Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. *Phytopathology*, 97(5): 611–620
- Mundy D. C., Agnew R. H. e Wood P. N. 2012. Grape tendrils as an inoculum source of *Botrytis cinerea* in vineyards - A review. *New Zealand Plant Protection*, 65: 218–227
- Nannini R. e Bortolotti P.P. 2018. Contenimento di *Botrytis cinerea* su vite con l'impiego di sostanze a basso impatto ambientale. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2: 575-580
- Ongena M. e Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3): 115–125
- Parafati L., Vitale A., Restuccia C. e Cirvilleri G. 2015. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47: 85–92
- Perrone G. G., Tan S. X. e Dawes I. W. 2008. Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(7): 1354–1368
- Pertot I., Di Marco S., Di Francesco A. e Ruocco M. 2021. Biocontrollo: funghi per la difesa delle piante. *Fitogest*, <https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/>
- Pertot I., Giovannini O., Benanchi M., Caffi T., Rossi V. e Mugnai L. 2017. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Protection*, 97: 85–93
- Picard K., Tirilly Y. e Benhamou N. 2000. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10): 4305–4314
- Piggot P. J. 2009. *Bacillus subtilis*. In *Encyclopedia of Microbiology*, 45-56. Academic Press

- Ranque S., Garcia-Hermoso D., Michel-Nguyen A. e Dumon H. 2008. Isolation of *Trichoderma atroviride* from a liver transplant. *Journal de Mycologie Médicale*, 18(4): 234–236
- Rotolo C., de Miccolis Angelini R. M., Dongiovanni C., Pollastro S., Fumarola G., di Carolo M., Perrelli D., Natale P. e Faretra F. 2018. Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards. *Pest Management Science*, 74(3): 715–725
- Savary S., Willocquet L., Pethybridge S. J., Esker P., McRoberts N. e Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology and Evolution*, 3(3): 430–439
- Savas N. G., Yildiz M., Eltem R. e Ozkale E. 2021. Determination of antifungal efficiency of some fungicides and secondary metabolites of *Trichoderma* species against *Botrytis cinerea*. *Journal of Environmental Biology*, 42(3): 705–713
- Scienza A., Failla O. e Raimondi S. 2007. *La vite e il vino*. Bologna: Script
- Sellitto V. M. 2020. *I microrganismi utili in agricoltura*. Milano: Edagricole
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845–857
- The Czech Republic, 2015. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products - Evaluation of active substances: *Pythium oligandrum* M1 Assesment Report, 3-25
- Tosi L. 2019. Agenti di biocontrollo, così cambia la difesa. *Vigne, vini e qualità*. <https://vigneviniequalita.edagricole.it/>
- US EPA. 2005. *Bacillus subtilis* strain QST 713 (006479) biopesticide registration action document. <https://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>
- Wikipedia, l'enciclopedia libera. <https://it.wikipedia.org/wiki>

- Yalage Don S. M., Schmidtke L. M., Gambetta J. M. e Steel C. C. 2021. Volatile organic compounds produced by *Aureobasidium pullulans* induce electrolyte loss and oxidative stress in *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. *Research in Microbiology*, 172(1): 103788
- You X., Barraud J. e Tojo M. 2019. Suppressive effects of *Pythium oligandrum* on soybean damping off caused by *P. aphanidermatum* and *P. myriotylum*. *Annual Report of The Kansai Plant Protection Society*, 61(0): 9–13
- Zeriouh H., Romero D., García-Gutiérrez L., Cazorla F. M., de Vicente A. e Pérez-García A. 2011. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(12): 1540–1552