

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimentari Risorse  
Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed  
Enologiche

**Metodi alternativi per il controllo di malattie fungine  
nella vite**

Relatore:

Professoressa Rita Musetti

Laureando:

Lorenzo Pradal

Matricola n 2052545

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

## INDICE

1. Abstract .....	4
2. Parete cellulare .....	5
3. MAMPs e PAMPs .....	6
4. Modificazioni della parete cellulare .....	8
5. Lignina .....	9
6. Recettori di riconoscimento .....	10
7. Proteine di patogenesi .....	12
6.1 Chitinasi .....	14
6.2 $\beta$ -1,3-glucanasi .....	15
8. Peronospora della vite .....	16
8.1 Sintomatologia .....	17
8.2 Ciclo biologico di <i>Plasmopara viticola</i> .....	20
8.3 Ciclo primario .....	22
8.4 Ciclo secondario .....	23
8.5 Controllo chimico .....	23
9. Metodi alternativi per il controllo biologico della Peronospora della vite ...	24
9.1 Estratti di <i>Salvia officinalis</i> .....	24
9.2 Luce UV-B e UV-C .....	29
9.3 Acido salicilico .....	31
9.4 Farine di roccia .....	31
9.5 Propoli .....	32
9.6 Funghi antagonisti .....	32
9.7 Olio di Neem .....	33
9.8 Equiseto .....	34
9.9 <i>Inula viscosa</i> .....	34
9.10 Oli .....	34
9.11 Estratti acquosi .....	35
9.12 Chitosano .....	35
10. Botrite della vite – Muffa grigia della vite .....	36
10.1 Sintomatologia .....	36
10.2 Ciclo biologico di <i>Botrytis cinerea</i> .....	38
10.3 Modalità di infezione .....	39
10.4 Controllo chimico .....	42
11. Metodi alternativi per il controllo biologico della Muffa grigia della vite ...	43
11.1 Agenti biologici di controllo .....	43
11.2 Lieviti .....	44
11.3 Oli essenziali .....	47
11.4 Ormoni vegetali .....	48
11.5 Estratti vegetali .....	48
11.6 Estratti di compost .....	49

11.7	Induzione induzione di resistenza .....	49
12.	Mal dell'esca – Esca della vite .....	50
12.1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	52
12.2	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	52
12.3	<i>Fomitiporia mediterranea</i> .....	53
12.4	Sintomatologia .....	54
12.5	Sindrome cronica .....	57
12.6	Sindrome acuta .....	59
12.7	Controllo chimico .....	60
13.	Metodi alternativi per il controllo biologico del Mal dell'esca .....	61
13.1	Agenti biologici di controllo .....	61
13.2	Ceppi batterici antagonisti di <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> .....	62
13.3	Proprietà fungicide dell'acqua ozonizzata contro <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> .....	65
13.4	<i>Epicoccum layuense</i> come potenziale agente di controllo biologico dei funghi associati all'esca nella vite .....	66
	Bibliografia .....	70

## 1. Abstract

La vite è una pianta costantemente attaccata dai microbi. Si basano su entrambe le difese preformate e sul loro sistema immunitario innato per difendersi dai patogeni microbici. Entrambi, grazie a processi evolutivi, hanno sviluppato caratteristiche per combattersi a vicenda; la pianta è dotata di sofisticati e rapidi meccanismi di difesa, mentre i loro patogeni hanno sviluppato armi per superare tali difese. In particolare, ci sono: le barriere strutturali preformate, che sono fattori di resistenza che agiscono prima della penetrazione del patogeno come le cere. Mentre nelle difese indotte, i meccanismi di resistenza che interferiscono con i meccanismi di penetrazione del microrganismo, ed impediscono/inibiscono la formazione di relazioni pianta/patogeno, e limitano la diffusione del patogeno nei tessuti dell'ospite.

I meccanismi di resistenza attivi comportano reazioni complesse a livello cellulare e biochimico e sono messe in atto nel momento in cui la pianta ospite riconosce il patogeno, così di conseguenza, può sviluppare reazioni di difesa che portano alla resistenza. Il processo che porta alla risposta di difesa si attua su due livelli, il primo è indotto dalla presenza di recettori per il riconoscimento di strutture molecolari associate al patogeno (elicitori o PAMPs) le PTI (*Pattern-triggered immunity*). Il secondo si esplica grazie a recettori specifici (*R-protein*) che riconoscono effettori specifici prodotti dal patogeno ETI (*Effector-triggered immunity*).

Le proteine PR di patogenesi (*Pathogenesis-related proteins*), sono delle proteine sintetizzate dalle piante in risposta a stress biotici e abiotici, tra cui stress fisici, chimici e biologici, come ferite, esposizioni a salinità, siccità, freddo, metalli pesanti, inquinanti atmosferici e raggi ultravioletti e attacchi di agenti patogeni, come funghi, batteri e virus, si accumulano soprattutto nel vacuolo o nell'apoplasto, sono indotte come parte della resistenza sistemica acquisita (SAR). Le infezioni attivano geni che producono proteine PR, dove alcune di queste proteine sono antimicrobiche e attaccano le molecole nella parete cellulare di un batterio o di un fungo. Altri possono funzionare come segnali che diffondono "notizie" dell'infezione alle cellule vicine.

La riduzione dell'impatto dei prodotti fitosanitari sulla salute umana, l'ambiente e la biodiversità è molto importante al giorno d'oggi e l'uso di tecniche innovative di difesa integrata e metodi alternativi come sistemi in grado di stimolare la risposta immunitaria

della vite, rappresentano soluzioni possibili contro le principali malattie fungine, in particolare quella osservata da più vicino, che sono: Peronospora (*Plasmopara viticola*), Botrite o Muffa grigia della vite (*Botrytis cinerea*) e Mal dell'esca (*Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia mediterranea*). Tra i vari metodi innovativi, in fase di studio e sperimentazione negli ultimi anni, ci sono: l'applicazione di trattamenti con radiazioni ultraviolette (UV-C), con estratti di *Salvia officinalis*, con oli essenziali, oppure con l'impiego di batteri e lieviti antagonisti o altri agenti biologici di controllo dei funghi patogeni responsabili delle malattie nella vite e tante altre possibili soluzioni di controllo.

## **2. Parete cellulare, la più importante barriera contro i patogeni**

La parete cellulare della pianta è una struttura complessa che svolge molte funzioni durante tutto il ciclo di vita della pianta. Essa permette il mantenimento dell'integrità strutturale della cellula opponendo resistenza alle pressioni idrostatiche interne, inoltre la parete cellulare è dotata di una notevole flessibilità per supportare la divisione cellulare, il tutto costituendo una barriera per tutti i gli stress biotici ed abiotici a cui è sottoposta (Houston et al., 2016). Le pectine, che sono probabilmente i più complessi ed eterogenei dei polisaccaridi della parete cellulare, esistono prevalentemente nella parete cellulare primaria e hanno ruoli nell'espansione, forza, porosità, adesione e segnalazione intercellulare. Altri abbondanti polisaccaridi non celluloseici includono xiloglucano,  $\beta$ -1,3;1,4-glucano, xilano, mannano e callosio, che svolgono vari ruoli nel supporto meccanico, nello stoccaggio di riserva e nello sviluppo (Houston et al., 2016). Tutte le cellule hanno una parete primaria e molte hanno una parete secondaria, che si sviluppa sulla superficie interna della parete primaria. La regione tra le pareti primarie di cellule adiacenti è uno strato ricco di pectine, indicato come lamella mediana (Evert and Eichhorn, 2013). Le microfibrille di cellulosa delle pareti primarie si trovano in una matrice costituita di molecole non celluloseiche legate trasversalmente, che comprendono le emicellulose, le pectine, le glicoproteine ed in alcuni casi può essere presente la lignina (essa conferisce alla parete rigidità e resistenza alla compressione). Le pareti secondarie contengono emicellulose, ma sono prive di pectine e glicoproteine. La parete cellulare della pianta funge da barriera strutturale preformata o passiva, definita anche barriera di difesa indotta o attiva. I microbi devono aggirare la parete cellulare e altre barriere

preformate per stabilire la relazione patogena desiderata con le piante ospiti (*Evert and Eichhorn, 2013*). Per poter addentrarsi nella pianta ospite, i patogeni devono aggirare le barriere preformate, tra cui la parete cellulare. Revisioni recenti hanno esplorato come i segnali abiotici modifichino la biosintesi della cellulosa, come le espansine e le perossidasi influenzino la rigidità della parete durante lo stress e come le modifiche nei polisaccaridi non cellulosici come lo xiloglucano accompagnino le risposte allo stress.

Non ci sono ancora studi approfonditi che facciano chiarezza se i componenti della parete cellulare, le famiglie di geni correlati alla parete cellulare o addirittura i singoli geni ortologhi della parete cellulare rispondano allo stesso modo a diversi stress in specie diverse, ma potrebbe fornire spiegazioni per la modifica delle risposte allo stress. All'interno di set di dati del trascrittoma disponibili pubblicamente da specie di monocotiledoni e dicotiledoni potrebbero esserci alcune delle risposte, che descrivono in dettaglio le risposte trascrizionali globali a stress biotici come batteri, funghi, oomiceti, insetti e stress abiotici come siccità, freddo e caldo (*Houston et al., 2016*).

### **3. MAMPs e PAMPs**

Gli elicitori sono prodotti molecolari (Pathogen- o Microbe-Associated Molecular Patterns, PAMPs o MAMPs) rilasciate da strutture cellulari della pianta ospite (elicitori endogeni) o da strutture cellulari del patogeno (elicitori esogeni) come risultato della loro interazione (*Houston et al., 2016*). Gli elicitori vengono percepiti dalla pianta tramite i recettori immunitari della membrana plasmatica che attivano cascate di segnalazione per avviare numerose risposte di difesa chiamate immunità innescata da DAMP o PAMP. L'attacco dei microrganismi può dar origine ad un'idrolisi enzimatica o una forte pressione applicata sulla parete, a cui la pianta risponde in vari modi, come ad esempio il riarrangiamento di materiali preesistenti della parete cellulare, l'incorporazione di materiali polimerizzati facilmente reticolati alla parete cellulare esistente e la deposizione locale della parete cellulare materiali nei siti di infezione. Esempi di PAMPs/MAMPs sono: peptidi, flagellina, fattore di elongazione-Tu, xilanasi, oligosaccaridi, glucani, frammenti di chitina, glicoproteine, lipopolisaccaridi (LPS), peptidoglicani. Questi successivamente possono indurre l'attivazione di segnali molecolari per l'attivazione dei

geni di difesa, tra cui vi sono Acido Salicilico (SA) Acido Jasmonico (JA) Etilene (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) Ossido Nitrico (NO).

I liposaccaridi (LPS), il componente principale della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, svolge varie funzioni nelle interazioni con l'ambiente esterno. Si ipotizza che aumenti la restrittiva permeabilità della membrana Gram-negativa, consentendo la crescita batterica in ambienti sfavorevoli (*Newman et al., 2013*). I liposaccaridi e i suoi derivati agiscono come MAMP e inducono risposte immunitarie innate nelle piante. Si pensa che gli effetti del pretrattamento con LPS siano correlati ad una maggiore resistenza del tessuto vegetale ai batteri patogeni. LPS è costituito da un lipide, un'oligosaccaride centrale e una parte O-polisaccaridica. Il lipide (lipide A), è situato nella porzione esterna del doppio strato fosfolipidico della membrana batterica. L'oligosaccaride centrale è costituito da una serie di zuccheri e finisce con l'antigene O, quest'ultimo costituito da unità oligosaccaridiche ripetute. All'interno dei LPS che innescano risposte immunitarie nella pianta, è stata individuata la formazione di una struttura a spirale con l'aumento della lunghezza della catena, indicando un ruolo per questa struttura come MAMP e questo significherebbe una funzione per l'antigene O dei batteri fitopatogeni nell'immunità innata delle piante. Può causare la sintesi di ossido nitrico (NO), indurre la produzione di ROS, una deposizione di callosio e persino la morte cellulare programmata in alcune specie di piante. I meccanismi attraverso cui le piante individuano i LPS sono ancora ignoti, ma le molecole somiglianti ai lipidi nelle piante potrebbero avere la funzione di segnali per regolare le risposte cellulari durante l'attacco dei patogeni delle piante (*Newman et al., 2013*).

Il sistema di difesa delle piante non solo riconosce gli elicitori microbici, ma anche alcune molecole di origine vegetale inducono risposte di difesa delle piante. Questa percezione è mediata dai DAMP, noti anche come modelli molecolari indotti dai microbi. Anche gli oligogalatturonidi (OG) e la cutina rilasciati dalle pareti delle cellule vegetali funzionano come DAMP (*Newman et al., 2013*).

#### **4. Modificazioni della parete cellulare a seguito dell'attacco dei patogeni**

Le papille sono una delle risposte più immediate ed efficaci indotte dalla pianta, attivate da un genotipo ospite, in contrasto soprattutto a microbi biotrofici, emi-biotrofici e batterici, capace di farle sviluppare in modo efficace con la composizione corretta e al momento giusto. Pertanto, la comprensione della composizione delle papille e dei fattori che coinvolgono lo sviluppo di papille efficaci è stata al centro di molti ricercatori (*Houston et al., 2016*). Negli ultimi tre decenni, gli studi hanno provato ad identificare i componenti delle papille formate contro diversi patogeni biotrofici in diverse colture. Per esempio, vari cambiamenti fisico-chimici osservati durante il rinforzo della parete cellulare mediata dalle papille sono ora ben descritti, molti altri aspetti sono ancora poco chiari. Molte ricerche sono state incentrate sull'accumulo e sulla lignificazione del callosio papillare a causa della disponibilità di coloranti fluorescenti per il callosio e dell'intrinseca autofluorescenza dei composti di lignina, mentre le funzioni di molti altri componenti della parete cellulare rimangono ignote (*Houston et al., 2016*).

L'interazione tra la pianta e i patogeni necrotrofici avviene a un livello più elevato rispetto a quanto osservato con i patogeni biotrofici. I patogeni con una fase necrotrofica, hanno lo scopo di uccidere le cellule ospiti e rilasciare i nutrienti, non come i microrganismi biotrofici che tengono in vita le quest'ultime alimentandosi di "nascosto", e per fare ciò hanno sviluppato un arsenale di enzimi di degradazione della parete cellulare progettati per deteriorare la parete cellulare della pianta, insieme a una serie di fattori di virulenza o tossine per eliminare la cellula (*Houston et al., 2016*). Gran parte dei patogeni necrotrofici si infiltra nei tessuti vegetali attraverso gli stomi e le ferite aperte che si diffondono tra i tessuti cellulari. L'interazione necrotrofica tra pianta-patogeno porta al riconoscimento dei segnali PAMP che causano l'attivazione di cascate di segnalazione che si interconnettono con auxina, citochinina, brassinosteroidi e acido abscissico per attivare l'espressione di geni associati alla difesa. La suscettibilità della parete cellulare alla degradazione e alla produzione di PAMP ha un ruolo fondamentale ruolo nella sfida tra pianta e patogeni. La funzione della pectina metilesterasi, contro una serie di patogeni delle piante, inclusi i necrotrofici, hanno evidenziato che l'esterificazione della pectina incide sulla suscettibilità della parete cellulare agli enzimi di degradazione della parete cellulare fungina (*Houston et al., 2016*).



Gli effetti della composizione alterata della parete cellulare sulla resistenza della pianta alle malattie sono stati oggetto di studio ed osservazioni, applicando sia approcci transgenici sia genetici. Si è concluso che fenotipi di resistenza alle malattie, a seconda del polisaccaride bersaglio e se il gene correlato alla parete cellulare è stato sovraespresso o mutato, possono generare una resistenza nelle piante ospiti. Solitamente viene applicato uno specifico stress biotico, che causa un'espressione dei geni bersaglio correlati alla parete cellulare, che vengono riconosciuti ed identificati tramite metodi trascrittomici (Houston et al., 2016).

## 5. Lignina

La lignina è derivata principalmente da alcoli idrossicinnamilici fenilpropanoidi e ha un ruolo importante nella difesa dell'ospite contro l'invasione di agenti patogeni. La lignificazione è un meccanismo di resistenza nelle piante, durante l'attacco ed invasione del patogeno. Dopo che il patogeno ha invaso la pianta, durante la risposta di difesa della pianta, è stato dimostrato che la lignificazione rende la parete cellulare più resistente sia alla pressione meccanica applicata durante la penetrazione dagli appressori fungini sia all'acqua e quindi meno accessibile agli enzimi che degradano la parete cellulare. La lignina ha un ruolo fondamentale nella difesa mediata dall'apposizione della parete cellulare contro la penetrazione di funghi patogeni nella pianta (Ebrahim et al., 2011).

La lignificazione può avere diversi ruoli in difesa, in particolare:

- 1) la lignina aumenta la resistenza delle pareti alle forze di compressione
- 2) La lignificazione nel punto di attacco rende la parete più resistente alla dissoluzione da parte degli enzimi fungini.
- 3) La lignificazione delle pareti può limitare la diffusione di enzimi e tossine dal fungo all'ospite, e di acqua e sostanze nutritive dall'ospite al fungo, così da rendere indisponibili i fattori di sopravvivenza del patogeno
- 4) Precursori fenolici a basso peso molecolare della lignina e radicali liberi prodotti durante la polimerizzazione, possono inattivare membrane fungine, enzimi, tossine ed elicitori. Molti composti fenolici hanno attività antimicotica.
- 5) La punta ifale può diventare lignificata e perdere la plasticità necessaria per la crescita.

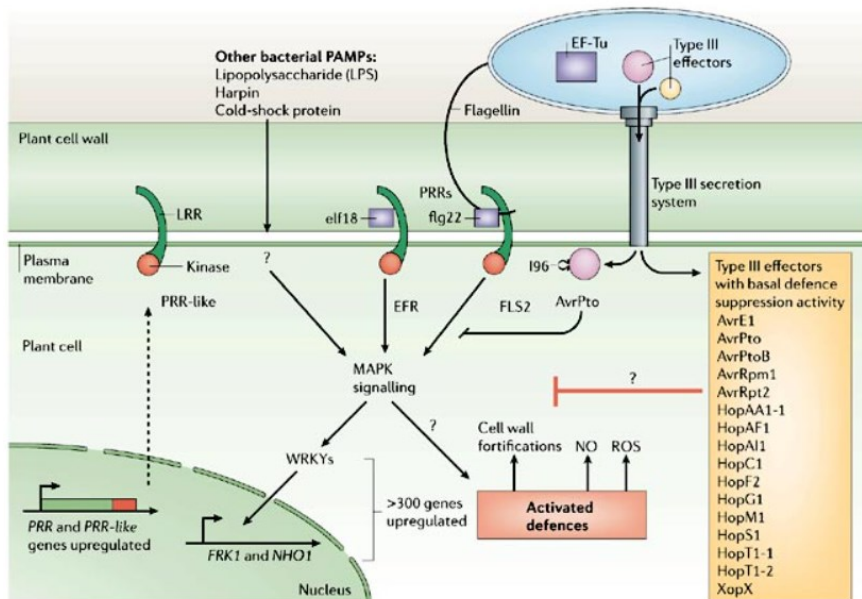
Le piante e la vite si proteggono dalle infezioni fungine o da altri fattori biotici e abiotici in modi diversi, per esempio rafforzando fisicamente la parete cellulare attraverso la lignificazione, la suberizzazione e producendo varie proteine correlate alla patogenesi (PR) come chitinasi,  $\beta$ -1,3-glucanasi, ecc. (*Ebrahim et al.*, 2011).

## 6. I recettori

Il sistema immunitario delle piante non è adattivo, come per esempio quello dei vertebrati, ma è innato, ed in una strategia evolutiva di difesa e contro-difesa, le piante e i microrganismi hanno sviluppato dei geni corrispondenti che consentono ai funghi di aggredire ed alle piante di difendersi dalla malattia, tramite (*Marangi, 2020*):

- 1) Recettori di riconoscimento (PRRs - Pattern Recognition Receptors) sono in grado di riconoscere i modelli molecolari associati al patogeno/microrganismo (PAMPs/MAMPs) attivando l'immunità da PAMP (PTI – Plant Immunity Triggered). Oppure, i segnali endogeni rilasciati in seguito ad un attacco, noti come modelli molecolari associati al danno (DAMPs) possono innescare la medesima PTI, che rappresenta la prima linea di difesa delle piante contro i patogeni. La PTI porta a una cascata, che è contrassegnata da eventi di segnalazione comuni, come flussi ionici, cascate di fosforilazione proteica, accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), induzione di geni di difesa e rinforzo della parete cellulare mediante deposizione di callosio. L'evoluzione ha favorito lo sviluppo patogeni resistenti capaci di sintetizzare effettori contro la PTI (*Marangi, 2020*);
- 2) La resistenza alla PTI da parte del patogeno, ha permesso un'evoluzione nei sistemi di difesa della pianta, in cui la risposta della pianta è innescata da effettori rilasciati nella cellula vegetale dai patogeni. L'ETI deriva dall'interazione altamente specifica, diretta o indiretta degli effettori dei patogeni e delle proteine di resistenza (R) delle piante. Gli effettori sono delle piccole proteine secrete dal patogeno che interagiscono in modo specifico con i recettori della cellula, di conseguenza la pianta si è evoluta con un sistema in grado di trascrivere e la tradurre i geni di resistenza in proteine che riconoscono in modo diretto o indiretto le proteine effettrici dei patogeni. Ad esempio, i patogeni hanno geni, chiamati

geni di avirulenza (*avr*) che producono effettori, mentre le piante hanno sviluppato dei geni di resistenza (*R*) che codificano per proteine R, che riconoscono il corrispondente prodotto del gene *avr* del patogeno. Dall'interazione tra effettore *avr* e proteina R si attiva il sistema di difesa della pianta, che porta a una forte risposta di difesa locale, spesso associata alla morte cellulare programmata (PCD) come parte della risposta di ipersensibilità (HR) che arresta la crescita del patogeno. I patogeni però possono essere in grado di evitare l'identificazione da parte dei geni R della pianta, mutando velocemente i geni *avr*, e portando quindi ad una falla nella resistenza della pianta (Marangi, 2020).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1 – modello di attivazione delle PRRs e relativa soppressione mediata dagli effettori di tipo III.

(Marangi, 2020)

Se il patogeno è riconosciuto dall'ospite, si possono innescare vari sistemi di difesa, con i seguenti step:

- 1) Incremento della concentrazione dello ione  $\text{Ca}^{2+}$  nel citosol
- 2) Burst ossidativo - Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS):  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^-$

- 3) Produzione di etilene, e/o la deposizione di callosio sulla parete cellulare come rafforzante o bloccaggio, e/o l'espressione di geni deputati alla difesa immune ed all'arresto della crescita.
- 4) Partenza di segnali molecolari per l'attivazione dei geni di difesa, tra cui vi sono Acido Salicilico (SA) Acido Jasmonico (JA) Etilene (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) Ossido Nitrico (NO).

## **7. Le proteine di patogenesi [Pathogenesis-related (PR) proteins]**

A seguito del riconoscimento del patogeno, la cellula attiva vie di trasduzione del segnale intracellulare che alla fine si traducono nella repressione di una batteria di geni chiamati geni della risposta di difesa. Questi ultimi geni codificano la produzione di varie proteine correlate alla patogenesi (Pathogenesis-related (PR) proteins) come chitinasi, glucanasi, proteine attive del lisozima o proteine di rafforzamento della parete cellulare come le glicoproteine ricche di idrossiprolina oppure attraverso lignificazione, suberizzazione e deposizione di callosio (*Ebrahim et al.*, 2011). Le fitoalessine sono prodotte principalmente da cellule sane adiacenti a cellule danneggiate, sono composti fenolici ad attività antimicrobica, a basso peso molecolare ad azione aspecifica. Sono attive nei primissimi stadi del processo infettivo, accumulandosi nelle zone circostanti ai tessuti infetti. Possono essere prodotte anche in tessuti non infetti per prevenire ulteriori infezioni nelle piante colpite (*Ebrahim et al.*, 2011).

Le proteine (PR) sono tipicamente acide (a seconda dei loro punti isoelettrici possono essere proteine acide o basiche ma hanno funzioni simili), di bassa massa molecolare e altamente resistenti alla degradazione proteolitica ed a bassi valori di pH. Solitamente le proteine PR acide si trova negli spazi intercellulari, mentre le proteine PR basiche si trovano prevalentemente nel vacuolo (*Ebrahim et al.*, 2011). Comprendono 17 famiglie di proteine strutturalmente e funzionalmente correlate, alcune delle quali sono state rilevate nella vite. È stato dimostrato che i membri di molte di queste famiglie hanno azioni dannose sulle strutture del parassita, esibendo così attività antimicotica e supportando un possibile ruolo di queste proteine nella difesa delle piante. Questi includono le proteine PR-5 (proteine simili alla taumatina e osmotine), che si pensa creino pori transmembrana e sono state quindi chiamate permatine; le proteine PR-2 ( $\beta$ -1,3-glucanasi) e le proteine PR-3 e 4 (chitinasi), enzimi che idrolizzano rispettivamente i  $\beta$ -

1,3-glucani e la chitina.  $\beta$ -1,3-glucani e chitina sono anche componenti strutturali delle pareti cellulari nella maggior parte dei funghi superiori, tra cui  $\beta$ -1,3-glucanasi, chitinasi, proteine simili alla taumatina, perossidasi, proteine che inattivano i ribosomi, difese, tionine, trasferimento lipidico non specifico proteine, ossalato ossidasi e proteine ossalato-ossidasi simili. La loro quantità aumenta in modo significativo e svolge il ruolo principale della reazione di difesa contro il patogeno fungino degradando la parete cellulare, poiché la chitina e il  $\beta$ -1,3-glucano sono anche un importante componente strutturale delle pareti cellulari di molti funghi patogeni (Ebrahim et al., 2011). Molti studi hanno riportato una relazione diretta tra età della pianta e resistenza o suscettibilità ai patogeni. Nella maggior parte delle piante, la resistenza ai patogeni di solito aumenta con l'aumentare dell'età; ma in pochi casi la suscettibilità delle piante ai patogeni aumenta con lo sviluppo della pianta. Questa differenza di resistenza ad agenti patogeni a seconda dell'età della pianta è chiamata resistenza ai patogeni legata all'età. Ad esempio, le foglie più vecchie della parte inferiore dei tralci della vite mostravano più  $\beta$ -1,3-glucanasi e di conseguenza mostravano una maggiore resistenza alla *Plasmopara viticola* rispetto alle foglie più giovani dei tralci superiori (Ebrahim et al., 2011).

Altri meccanismi di difesa antifungini diversi dalle proteine PR nella vite sono, l'accumulo di fitoalessine, come gli stilbeni, che si tratta di un altro importante meccanismo di difesa osservato e ben caratterizzato nella vite. La loro produzione è controllata da un enzima chiave, lo stilbene sintasi, che produce il trans-resveratrolo, la principale fitoalessina di questa pianta (Rienth et al., 2019). Questo difenolo viene successivamente metabolizzato nelle altre principali fitoalessine della vite, e svolge un ruolo importante nella resistenza alla colonizzazione da parte dei funghi e presenta eccezionali proprietà biologiche per la salute umana. Si accumula selettivamente nelle foglie di vite e nelle bucce dell'uva in risposta a varie infezioni fungine, radiazioni UV o sostanze chimiche ed è presente nei vini in concentrazioni che dipendono dalle pratiche viticole ed enologiche. Presenta un carattere antimicotico piuttosto aspecifico a concentrazioni fisiologiche, aumentando la resistenza delle piante di vite a *B. cinerea*, *P. viticola* e *Phomopsis viticola*. Grazie alle sue proprietà antiossidanti, il resveratrolo migliora la conservazione dell'uva (Rienth et al., 2019).

Altre proteine di patogenesi, come le chitinasi e delle proteine simili alla taumatina sono note per avere proprietà antimicotiche. Le chitinasi note per degradare la chitina, un omopolimero insolubile di unità N-acetilglucosamina legate a  $\beta$ -(1-4), possono anche svolgere funzioni di segnalazione come rilascio di elicitori dall'invasione delle ife fungine. Le proteine simili alla taumatina migliorano la permeabilità della membrana cellulare fungina formando buchi, che consentono l'afflusso di acqua e provocano la rottura della membrana ifale. Inoltre, alcune proteine simili alla taumatina si legano ai  $\beta$ -1,3-glucani e mostrano attività  $\beta$ -1,3-glucanasica. Inoltre, esistono alcune prove per la regolazione dello sviluppo simile alla chitinasi e alla taumatina in tessuti specifici e in fasi specifiche durante lo sviluppo della pianta, suggerendo che entrambe le proteine potrebbero essere coinvolte in funzioni diverse dalla difesa della pianta (*Colas et al., 2012*).

## 7.1 Chitinasi

Le chitinasi sono enzimi che catalizzano la scissione di un legame tra C1 e C4 di due monomeri N acetil-Dglucosamina consecutivi della chitina. Le chitinasi vegetali sono solitamente endo-chitinasi in grado di degradare la chitina, un componente comune delle pareti cellulari dei funghi e dell'esoscheletro degli artropodi, e di inibire la crescita fungina (*Ebrahim et al., 2011*). Alcune chitinasi di classe I sono localizzate nel vacuolo, mentre altre chitinasi, comprese le chitinasi di classe III, si trovano all'esterno della cellula. Le chitinasi extracellulari possono bloccare direttamente la crescita delle ife che invadono gli spazi intercellulari e possibilmente rilasciare elicitori fungini, che quindi inducono un'ulteriore biosintesi della chitinasi e ulteriori reazioni di difesa nell'ospite (*Ebrahim et al., 2011*).

Le chitinasi sono classificate in due modi: endochitinasi ed esochitinasi. Le endochitinasi scindono la chitina in modo casuale nei punti interni del polimero, producendo multimeri solubili a basso peso molecolare di N-acetilglucosamina, come chitotriosio, chitotetraosio e il dimero, di-acetilchitobios. Le esochitinasi sono suddivise in due sottocategorie: chitobiosi, che catalizzano il rilascio di di-acetilchitobiosi dall'estremità non deossidante della microfibrilla di chitina, e  $\beta$ -1,4-N acetilglucosaminidasi, prodotti oligomerici di scissione di endochitinasi e chitobiosidasi con la produzione del monomero N-acetilglucosamina (*Ebrahim et al., 2011*).

È noto che la chitinasi è indotta nella pianta da infezioni fungine o altri fattori biotici e abiotici. L'effetto inibitorio della chitinasi vegetale sulla crescita dei funghi è stato dimostrato da studi in vitro sulla crescita di funghi che contengono chitina come componente della loro parete cellulare. La chitinasi purificata ha inibito la crescita di una sola specie fungina mentre una combinazione di chitinasi e un'altra proteina PR,  $\beta$ -1,3-glucanasi, ha inibito la crescita di tutti i funghi testati (*Ebrahim et al.*, 2011).

Nella trasformazione dei geni della chitinasi, nelle piante transgeniche, è stata raggiunta una maggiore resistenza alle malattie. Nella vite, il gene della chitinasi del riso ha aumentato la resistenza di queste piante contro l'oidio causato da *Uncinula necator* (*Ebrahim et al.*, 2011).

## 7.2 $\beta$ -1,3-glucanasi

Le  $\beta$ -1,3-glucanasi vegetali sono anch'esse PR proteins, che appartengono alla famiglia PR-2. Sono presenti nelle piante, ma sono state ritrovate anche nei lieviti, batteri, funghi, insetti e pesci (*Ebrahim et al.*, 2011). Le  $\beta$ -1,3-glucanasi sono in grado di catalizzare la scissione dei legami  $\beta$  nel  $\beta$ -1,3-glucano, un importante costituente strutturale delle pareti cellulari di molti funghi patogeni. Si pensa che le  $\beta$ -1,3-glucanasi abbiano sia un effetto diretto nella difesa contro i funghi patogeni, sia effetto indiretto sulla difesa delle piante provocando la formazione di elicitori di oligosaccaridi, che provocano la produzione di altre proteine PR o composti antimicotici a basso peso molecolare, come le fitoalessine (*Ebrahim et al.*, 2011).  $\beta$ -1,3-glucanasi vegetali aventi dimensioni da 30-40 kDa, con isoforme sia acide che basiche, finora sono identificati di classe I e di classe II. Le  $\beta$ -1,3-glucanasi di classe I contengono un peptide segnale N-terminale e una breve sequenza segnale C-terminale che è glicosilata. Si ritiene che la sequenza segnale C-terminale comunemente indicata come estensione C-terminale sia la sequenza segnale responsabile della localizzazione vacuolare di questi enzimi. Le  $\beta$ -1,3-glucanasi di classe II, III e IV sono solitamente acide e mancano di questo segnale C-terminale e quindi vengono secrete negli spazi extracellulari. Alcune  $\beta$ -1, 3-glucanasi sono regolate esclusivamente dallo sviluppo e non mostrano un'induzione correlata allo stress, mentre alcune combinazioni di classe I  $\beta$ -1, 3-glucanasi e chitinasi di classe I hanno mostrato un effetto sinergico nel contrastare il patogeno (*Ebrahim et al.*, 2011).

$\beta$ -1,3-glucanasi solitamente espressa a bassa concentrazione nelle piante, ma quando le piante sono infettate da agenti patogeni fungini, batterici o virali, la concentrazione dell'enzima  $\beta$ -1,3-glucanasi aumenta notevolmente.

L'induzione di  $\beta$ -1, 3-glucanasi e altre proteine PR nella pianta può verificarsi anche a causa di alcuni componenti di agenti patogeni o componenti degradati di agenti patogeni. Questi elicitori possono essere componenti della superficie cellulare del patogeno che vengono rilasciati dagli enzimi dell'ospite, tra cui  $\beta$ -glucano fungino, chitina, chitosano, glicoproteine e N-acetilchitooligosaccaridi. Possono anche essere sintetizzati e rilasciati dall'agente patogeno dopo che è entrato nell'ospite in risposta ai segnali dell'ospite. Le  $\beta$ -1,3-glucanasi vegetali sono indotte non solo dall'infezione da agenti patogeni, ma anche da fattori di stress come ferite, siccità, esposizione a metalli pesanti, ozono inquinante atmosferico e radiazioni ultraviolette possono stimolarne la sintesi (Ebrahim et al., 2011).

## 8. Peronospora della vite

*Plasmopara viticola*, agente causale della Peronospora della vite, è un oomicete biotrofo obbligato assoluto, che vive unicamente sulla vite europea, *Vitis vinifera*. Gli oomiceti differenziano spore biflagellate, le zoospore, caratterizzate da due flagelli con morfologia diversa che consentono il movimento in ambiente acquatico (Pertot et al., 2007).

La Peronospora della vite è una delle malattie fungine più impattanti in viticoltura, non tanto perché possa portare a morte le viti, ma piuttosto perché può indurre gravi perdite economiche. La malattia può causare sostanziali perdite quantitative se attacca il grappolo, se invece attacca le foglie, può portare danni dal punto di vista qualitativo, andando a condizionare la fotosintesi clorofilliana, e dunque la produzione di zuccheri e aromi (Pertot et al., 2007).

*Plasmopora viticola* ha una sovrapposizione del suo ciclo vitale con quello della pianta ospite, in primavera la oospora germina, con la “regola dei tre 10”:

- temperatura minima media 10 °C;
- 10 mm di pioggia nelle quarantott'ore precedenti;
- 10 cm di sviluppo del tralcio in lunghezza, in riferimento alle foglie che porta su 10 cm o 3/4 foglie distese (con stomi ben sviluppati) (Pertot et al., 2007).



## 8.1 Sintomatologia

Le foglie giovani, con un diametro inferiore ai 2 cm, presentano stomi non differenziati o poco numerose, questo rende le foglioline praticamente resistenti agli attacchi di *P. viticola*. Sulle foglie adulte attaccate, invece, sulla pagina superiore si formano discolorazioni a forma di cerchio che diventano sempre più visibili fino ad evolvere in macchia d'olio, così chiamata perché la foglia in controluce diventa quasi trasparente, dato che il patogeno sottrae elaborati dalla cellula vegetale diminuendo il turgore delle cellule attaccate (*Pertot et al., 2007*).

Successivamente, nella pagina inferiore, il fungo termina il ciclo e appare l'efflorescenza biancastra (muffa bianca) fatta di rametti conidiofori di zoospore.



Sporulazione sulla pagina inferiore (*Pertot et al., 2007*)

Nei grappoli, l'infezione precoce dell'infiorescenza (dalla prefioritura fino a fine fioritura) causa un imbrunimento e ripiegamento ad uncino (o ad "esse") della parte finale del raspo. Nei grappoli, come descritto sulle in precedenza, in caso di pioggia o elevata umidità, raspo e racimoli vengono rivestiti dalle fruttificazioni biancastre del fungo patogeno. Gli attacchi di *P. viticola* sui grappoli in post-fioritura possono dar origine a due diverse sindromi (marciume grigio e marciume bruno) in relazione al momento dell'attacco, dell'età dei grappoli e dell'umidità ambientale (*Pertot et al., 2007*). Gli acini

sono suscettibili all'infezione da quando si formano (allegagione) fino al momento in cui avvengono i primi cambiamenti di colore della bacca (invaiaitura).

Nelle infezioni primaverili, il fungo patogeno penetra tramite gli stomi degli acini, dei raspi, dei racimoli e dal cercine calicinare. L'infezione del giovane grappolo causa l'allessamento e ripiegamento ad "esse" del rachide. In seguito compare una muffetta bianco-grigiastra che fuoriesce dagli gli stomi e dalle ferite della buccia degli acini, dando origine al "marciume grigio". Nei grappoli già formati, gli acini e il rachide si imbruniscono, raggrinziscono e disseccano, e la sintomatologia prende il nome di "marciume bruno" o "Peronospora larvata", e ciò è generato dall'atrofizzazione degli stomi, che avviene nei grappoli che superano circa i 2 mm di diametro, non consentendo più un accesso diretto tramite gli stomi, ma indiretto, tramite il peduncolo. (Pertot et al., 2007).



*Peronospora larvata* (Pertot et al., 2007)

Nei germogli erbacei, l'attacco diretto principalmente avviene vicino ai nodi, mentre in maniera indiretta, attraverso infezioni dei piccioli fogliari. Qualsiasi organo non lignificato, con stomi differenziati ed attivi, può essere colpito da *P. viticola*. I sintomi che compaiono principalmente nei germogli non lignificati sono allessature ed imbrunimenti. In caso d'infezioni precoci la porzione terminale del tralcio o del viticcio appare ritorto e ripiegato su stesso, questo a causa di fenomeni di ipertrofia cellulare (Pertot et al., 2007).



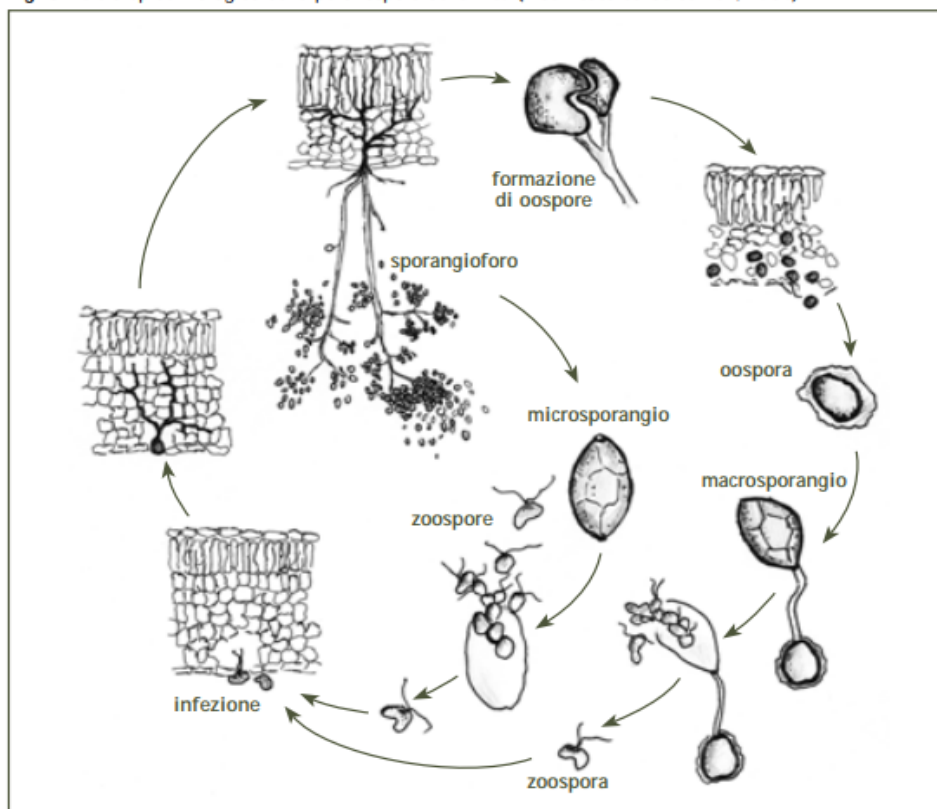
Viticchio infetto (*Pertot et al., 2007*)

Man mano che il germoglio lignifica diminuisce la sensibilità dei tralci nei confronti del fungo patogeno, e i sintomi, meno visibili che su altri organi, sono contraddistinti prevalentemente da lesioni dei tessuti corticali.

Come si è potuto osservare, i danni da peronospora si diversificano in base alla fase fenologica e al momento dell'infezione, dove però, in ogni caso osservato, consegue un'importante perdita dal punto di vista quantitativo/qualitativo. Si è osservato che la vite oltre diventare più suscettibile ad altre fitopatie, a causa della peronospora, ha una riduzione delle riserve nutritive, causando una potenziale perdita di produzione anche nelle annate successive (*Pertot et al., 2007*).

## 8.2 Ciclo Biologico di *Plasmopara viticola*

Fig. 8 - Ciclo epidemiologico della peronospora della vite (modificato da Goidanich, 1964)



(Pertot et al., 2007)

Per la lotta contro la peronospora è importante conoscere il ciclo di *Plasmopara viticola*. Tutto il micelio è organizzato all'interno del tessuto vegetale di organi verdi della pianta, ciò rende difficile la lotta, infatti non ci sono agrofarmaci effettivamente penetranti ed efficaci dunque è difficile che raggiungano il target interno (Pertot et al., 2007).

*Plasmopara viticola* ha due forme di riproduzione:

1. Aessuata: garantito dall'intreccio dei suoi cicli durante la stagione vegetativa (primavera/estate), che ha un inoculo esponenziale.

Con l'evasione si formano microsporangio contenenti zoospore biflagellate (5-8). I flagelli sono uno a forma di frusta, l'altro a forma di pettine.

La zoospora in presenza di bagnatura sulla superficie fogliari sarà in grado di avvicinarsi alla rima somatica per poi iniziare il ciclo (Pertot et al., 2007).

Il microsporangio permette l'evasione di *P. viticola* dal tessuto vegetale per divisione cellulare semplice, cioè per mitosi.

2. Sessuata: già durante la fine dell'estate, negli organi fogliari inizia la differenziazione di ife fertili che portano alla differenziazione di anteridi (maschili) e oogoni (femminili). Dall'unione si forma la oospora, che è la struttura di conservazione, che subisce, nella stagione invernale, un processo di maturazione, dove si fondono i nuclei delle due ife fertili. Ciò comporta la riduzione ad un solo nucleo nell'oospora ed un ispessimento della parete attorno al citoplasma, per preservare il contenuto interno. L'oospora matura all'interno di foglie che la proteggono, nel terreno oppure nel ritidoma (corteccia) (Pertot et al., 2007).



Sporangi della peronospora (Ilaria Pertot et al., 2007)

Le prime oospore sono pronte a germinare quando le temperature giornaliere sono maggiori agli 8 °C. Acqua, umidità e temperature superiori ai 10°C, favoriscono la germinazione delle oospore, che emettono un macrosporangio, nel quale si originano alcune decine di zoospore. Schizzi d'acqua e movimenti dell'aria sono i vettori responsabili della diffusione, durante la prima pioggia dopo la germinazione, degli sporangi e zoospore sulla vegetazione. Una volta aderito sulla foglia bagnata, le zoospore sono in grado di nuotare verso gli stomi, si incistano perdendo i flagelli ed emettono un tubetto miceliare in grado di penetrare attraverso le aperture stomatiche e, dalla camera sottostomatica, avviare la colonizzazione dei tessuti della pianta (Pertot et al., 2007).

Se l'infezione ha esito positivo, al termine del periodo di incubazione, il fungo patogeno svilupperà i primi sintomi. Il periodo d'incubazione può durare da 5 fino a 18 giorni, varia

ed è influenzato dalla temperatura e dall'umidità dell'aria. Il ciclo secondario (agamico) ha inizio in seguito alle infezioni oosporiche (primarie), ed è contraddistinto dalla produzione di sporangiofori e sporangi, visibili sotto forma di muffa bianca sulla lamina inferiore delle foglie e sui tessuti verdi della pianta (*Pertot et al., 2007*). La sporulazione, che avviene solo di notte ed a temperature superiori a 12 °C ed una umidità relativa elevata, sulla lamina superiore delle foglie, appare sottoforma di decolorazioni giallastre denominate “macchie d'olio”. Gli sporangi, durante il ciclo secondario, come in quello primario, rilasciano zoospore che nuotano sullo strato d'acqua, che ricopre la pagina inferiore delle foglie, lungo tutto il tratto verso gli stomi. La durata del periodo necessario per avviare l'infezione ha un decorso fortemente influito dalla temperatura, infatti può variare da un minimo di 2-3 ore a 20-25°C, ma può protrarsi fino a 9 ore a 6°C ed arrestarsi con temperature superiori ai 29-32°C (*Pertot et al., 2007*).

### **8.3 Ciclo primario**

La formazione delle oospore può avvenire dalla comparsa delle prime macchie, fino al termine della stagione vegetativa della vite. A partire da aprile/maggio, con condizioni climatiche favorevoli (“la regola dei tre dieci”), una parte delle oospore presenti nel vigneto inizia a germinare, e in seguito le oospore possono iniziare il processo di infezione; caso mai non dovessero riuscirci, muoiono (*Pertot et al., 2007*). L'eterogeneità nella germinazione non si ripercuote solamente all'anno successivo della loro formazione, bensì può estendersi negli anni successivi, questo grazie all'abilità di *Plasmopara viticola* di sopravvivere per molteplici anni nei residui fogliari e nel terreno del vigneto.

Con l'avanzare della stagione, da maggio verso agosto, la frazione di oospore atte a germinare si riducono sempre di più, possibilmente in seguito ad un decadimento fisiologico o di condizioni climatiche non favorevoli (*Pertot et al., 2007*). La germinazione delle oospore durante tutta la stagione può essere responsabile di un buon numero di infezioni primarie in vigneto, anche se in termini quantitativi sono inferiori rispetto all'infezioni secondarie, soprattutto nella fase finale del periodo estivo.

#### **8.4 Ciclo secondario**

Gran parte delle lesioni primarie non sembrano moltiplicarsi in modo asessuato. Il rimanente 25% sembra generare, nella maggioranza dei casi, solamente una o due lesioni nel corso dell'epidemia. Le lesioni secondarie provenienti da una specifica lesione primaria sono concentrate sulla stessa foglia e sulle foglie immediatamente sottostanti, difficilmente sulle foglie più distanti (*Pertot et al., 2007*). Ancora oggi non è ancora chiaro se la comparsa di tali genotipi sia dovuta ad un vantaggio genetico o se è solamente dato dal fatto che essi si trovano in condizioni ambientali microclimatiche ottimali, permettendogli di moltiplicarsi più velocemente degli altri, producendo numerosi cicli secondari.

Considerando che le prime lesioni della stagione siano esclusivamente causate da infezioni primarie e non provenienti da un'immigrazione di sporangi secondari, all'inizio di ogni epidemia si hanno unicamente lesioni primarie e nessuna lesione secondaria. Dopo la comparsa dei primi sintomi, in un periodo che varia da un minimo di sette giorni a più di un mese, la proporzione delle lesioni primarie subisce una drastica riduzione. Dopo la comparsa dei primi sintomi, le lesioni primarie diminuiscono in modo netto, e successivamente a ciò, si riscontra una fase di stabilizzazione della percentuale delle lesioni primarie che permane almeno fino al mese di agosto. Questa percentuale varia molto a seconda dei casi, dell'annata e della zona; infatti possono osservare casi dove le infezioni primarie costituiscono solo il 20%, altre invece che arrivano addirittura al 90%. Per il patogeno sembra però che la fase clonale di riproduzione (ciclo secondario) sia piuttosto una fase di selezione di genotipi ottimali tra i tanti genotipi creati dalla fase sessuata (ciclo primario) (*Pertot et al., 2007*).

#### **8.5 Controllo chimico**

Nella lotta alla peronospora è importante stabilire il periodo d'incubazione, così da poter intervenire uno o due giorni prima della scadenza del periodo adatto, e permettere al fungicida di contrastare al meglio il fungo patogeno al momento della sua fuoriuscita, ed allo stesso tempo proteggere la pianta da nuove contaminazioni. Il tutto considerando l'andamento meteorologico legato alle condizioni di temperatura, umidità e piovosità. A carattere cautelativo, è importante effettuare trattamenti nei periodi dove la vite è più suscettibile all'attacco di peronospora, cioè nei momenti di differenziazione dei

grappolini, in stadio pre-fiorale ed allegagione. Per quanto concerne la scelta dei fungicidi, si possono utilizzare sia principi attivi efficaci solo contro la peronospora sia prodotti a più ampio spettro d'azione, per altre malattie crittogamiche. Solitamente si utilizzano prodotti acuprici fino all'allegagione per poi procedere con preparati rameici. I nuovi antiperonosporici, dotati di attività endoterapica e sistemica, si stanno rivelando molti efficaci. Infine, in caso di utilizzo di antiperonosporici attivi in un solo sito, si consiglia fortemente di somministrarli in miscela con altri fungicidi, ed inoltre, di non effettuare non più di 3 interventi all'anno per scongiurare la diffusione di ceppi resistenti (Pollini and Ponti, 2018).

## **9. Metodo alternativi per il controllo biologico della Peronospora della vite**

### **9.1 Estratti di *Salvia officinalis***

È stata testata la capacità dell'estratto di salvia (*Salvia officinalis*) nel controllare la peronospora della vite in serra e in campo. Sono state studiate anche la persistenza e la resistenza alla pioggia dell'estratto di salvia. L'estratto di salvia ha fornito un elevato livello di controllo prolungato della malattia nelle viti in vaso inoculate artificialmente in condizioni di serra. Nonostante ciò, anche piccole quantità di precipitazioni simulate (10 mm) hanno ridotto notevolmente l'efficacia dell'estratto di salvia. In un esperimento sul campo nel 2006, l'estratto di salvia ha fornito una riduzione del 94% dell'incidenza della malattia e una riduzione del 63% dell'area sotto la curva di progressione della malattia per la gravità della malattia rispettivamente su bacche e foglie, raggiungendo un livello di controllo della malattia non molto diverso da quello fornito dall'idrossido di rame (Dagostin et al., 2010).

In serra: Negli esperimenti iniziali per valutare l'attività dell'estratto di salvia, i trattamenti (estratto di salvia, idrossido di rame e acqua) sono stati eseguiti 6 ore prima dell'inoculazione con la sospensione di *Plasmopara viticola*. L'assolo di solvente (etanolo) è stato incluso come controllo negli esperimenti iniziali. In ulteriori esperimenti per analizzare la persistenza dell'attività nel tempo, i trattamenti sono stati applicati una volta a 6, 3, 2 o 1 giorno o 6 ore prima dell'inoculazione del patogeno. Per stimare la resistenza alla pioggia, le piante sono state trattate con estratto di salvia, idrossido di rame

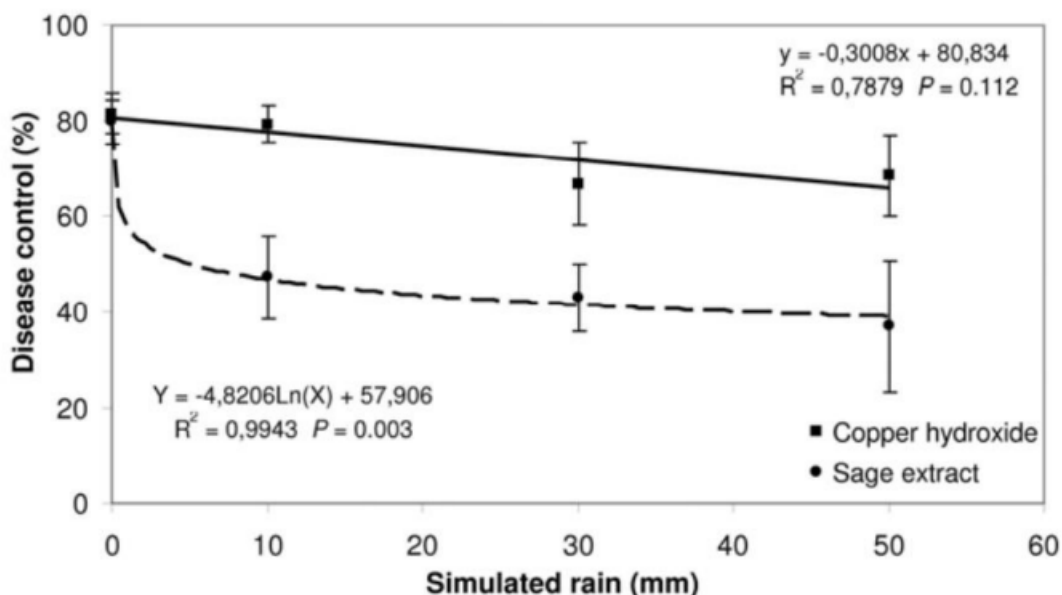


o acqua e poi, 4 ore dopo, sono state sottoposte a 0, 10 o 30 mm di pioggia simulata (30 mm/h) eseguita per riprodurre gocce di dimensioni simili a quelle della pioggia (da 0,3 a 2,5 mm). Dopo aver ricevuto la pioggia simulata, le piante sono state lasciate asciugare (4 ore) e quindi inoculate con il patogeno come descritto di seguito. Tutti i trattamenti sono stati eseguiti su viti che avevano da 10 a 15 foglie completamente sviluppate su uno o tre germogli. *Plasmopara viticola* è stata isolata da foglie infette raccolte da vigneti non trattati su varie cultivar (Chardonnay, Pinot grigio, Merlot e Cabernet) nella regione Trentino (nord Italia) sono stati usati come inoculo (Dagostin et al., 2010). Successivamente, le piante sono state trasferite in serra (temperatura da 18 a 25°C, umidità relativa dal 60 all'80% e regime di luce naturale), dove sono state mantenute per 10 giorni (periodo di incubazione). Al termine del periodo di incubazione, le piante sono state poste in una camera di crescita per favorire la sporulazione di *Plasmopara viticola* per una notte (12 h).

In campo: Le prove in campo sono state condotte nel nord Italia (Rovereto; 204 m s.l.m.) in due annate differenti (2006 e 2007). Il vitigno sperimentale è stato coltivato secondo le pratiche di produzione biologica europea (regolamento del Consiglio n. 2092/91). È stato utilizzato Cabernet Sauvignon su portainnesto Kober 5BB, con un sistema di allevamento a pergola trentina (2,80 per 0,91 m). I trattamenti sono stati l'estratto di salvia (applicato in ragione di 60 litri/ha), l'idrossido di rame (1,2 kg/ha) e il controllo dell'acqua. I prodotti sono stati sciolti in acqua e spruzzati con un atomizzatore sperimentale (Waibl Diethart, Merano, Italia) utilizzando un volume di spruzzo di 1.200 litri/ha. I prodotti sono stati applicati settimanalmente, iniziando quando ogni pianta aveva tre foglie spiegate (fase 13 delle chiavi di identificazione BBCH per la crescita fenologica di *Vitis vinifera*) (Dagostin et al., 2010). L'attività contro *Plasmopara viticola* è stata valutata in base alla presenza di sintomi o segni di malattia sulle foglie (macchie oleose o sporulazione) e sui grappoli (sporulazione o necrosi). La fitotossicità è stata valutata durante tutta la stagione monitorando il colore delle foglie o degli acini e la necrosi su foglie e grappoli. Al termine della maturazione, sono stati controllati il numero ed il peso totale dei grappoli e per ogni trattamento sono stati calcolati la resa media per pianta e il peso medio dei grappoli. Le bacche sono state poi schiacciate e dal succo ottenuto, è stata rilevata percentuale di zuccheri (grammi per millilitro, espressi in °Brix) tramite un

rifrattometro digitale, mentre l'acidità è stata espressa in grammi per litro di acido tartarico. Il pH del succo è stato misurato utilizzando un pH-metro.

In ogni esperimento condotto in condizioni di serra, l'estratto di salvia ha mostrato un alto livello di attività preventiva, con un'efficacia compresa tra il 79,9 e il 95,8%, simile a quella dell'idrossido di rame (dall'80,5 al 96,0%). Nello studio della persistenza, l'effetto significativo dell'estratto di salvia e del rame sulla peronospora della vite è diminuito progressivamente nei 6 giorni successivi all'applicazione del prodotto. Nello studio sulla resistenza alla pioggia, l'estratto di salvia ha mostrato un alto livello di controllo della malattia (circa l'80%) senza pioggia, mentre l'analisi di regressione ha indicato che il livello di controllo delle malattie fornito dall'estratto di salvia diminuiva proporzionalmente alla quantità di pioggia seguendo una curva logaritmica (Dagostin et al., 2010).

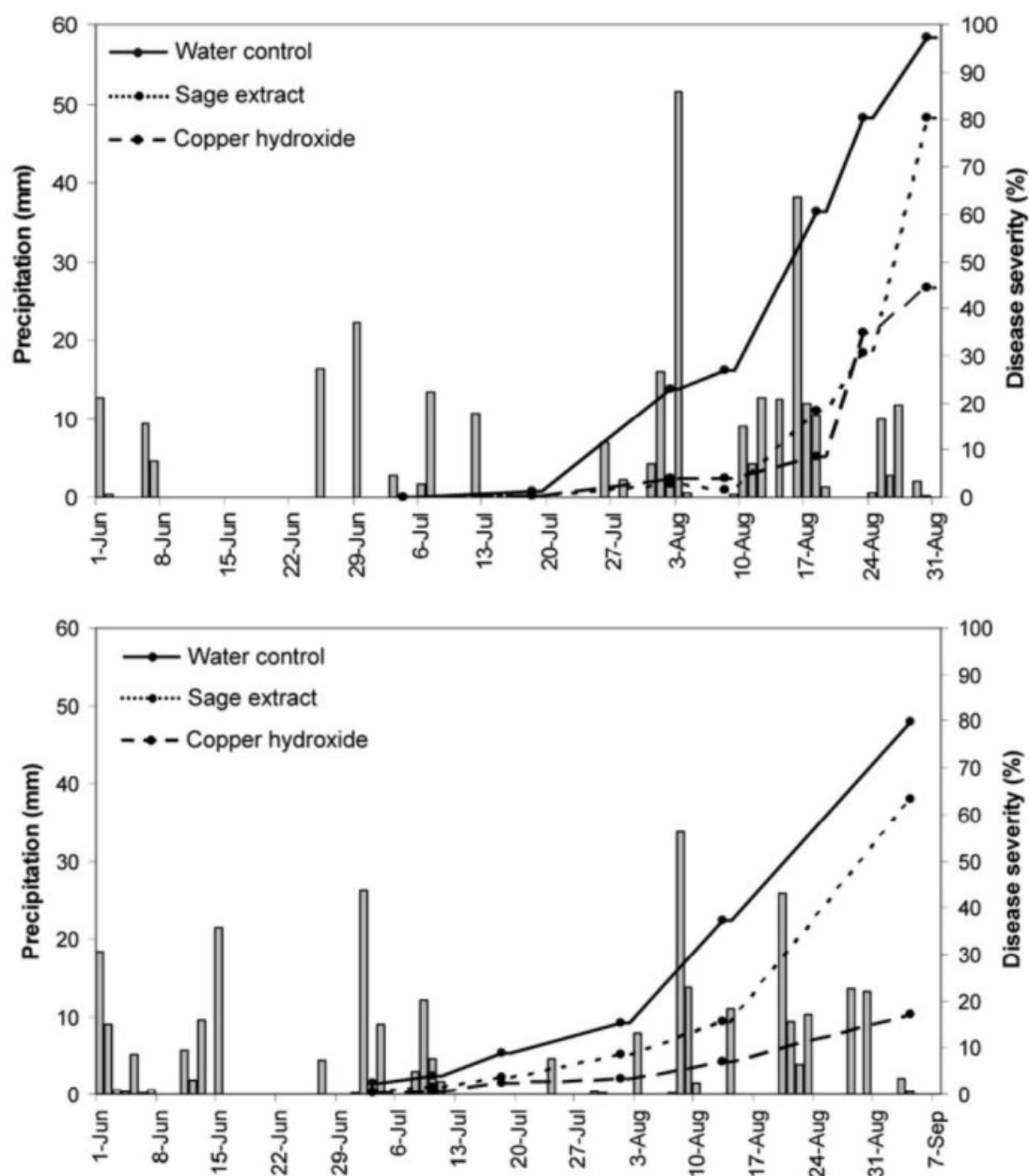


Effetto della pioggia simulata sugli effetti dell'estratto di *Salvia officinalis* e dell'idrossido di rame sulla gravità della peronospora sulle foglie di vite in vaso (Pinot Grigio) in condizioni di serra. La linea continua rappresenta la linea di regressione per l'idrossido di rame e la linea tratteggiata rappresenta la linea di regressione per l'estratto di salvia (Dagostin et al., 2010).

È stata osservata una notevole diminuzione della persistenza degli estratti di *Salvia officinalis* fino a 10 mm di pioggia, poi all'aumentare delle precipitazioni, la diminuzione

della persistenza è stata molto meno accentuata, con valori che non si discostavano molto da quelli ottenuti con trattamenti a base di rame. (*Dagostin et al., 2010*).

Nell'annata in cui è stato condotto l'esperimento in campo, le condizioni meteorologiche sono state molto favorevoli all'infezione. L'idrossido di rame ha controllato efficacemente la peronospora, riducendo la gravità della malattia sulle foglie del 73% e riducendo l'incidenza della malattia sui grappoli del 95%. I risultati ottenuti per l'estratto di salvia non erano significativamente diversi da quelli ottenuti per l'idrossido di rame. Trattamenti con l'estratto di salvia hanno causato una riduzione del 63% della gravità della malattia sulle foglie e una riduzione del 94% dell'incidenza della malattia sui grappoli. Nell'annata successiva, le condizioni meteorologiche sono state molto favorevoli all'infezione per tutta la stagione di crescita, in particolare nel mese di agosto. I trattamenti a base di idrossido di rame hanno ridotto del 79% la gravità della peronospora e del 74% l'incidenza della malattia sui grappoli. L'estratto di salvia ha controllato la malattia sulle foglie ma non sui grappoli. Fino ad allora, l'estratto di salvia forniva il 58% di controllo delle malattie rispetto al controllo dell'acqua. Il livello di controllo delle malattie fornito dall'estratto di salvia è stato del 56% sui grappoli (dati non mostrati) fino alla fine della stagione, quando il livello di controllo è sceso al 37% (*Dagostin et al., 2010*).



Andamento dell'infezione sulle foglie delle piante non trattate (linea continua), delle piante trattate con salvia (linea tratteggiata) e delle piante trattate con rame (linea tratteggiata) e delle precipitazioni giornaliere (barre verticali) (Dagostin et al., 2010).

I risultati ottenuti in condizioni di serra sono stati confermati in campo. Questi risultati lo dimostrano l'estratto di salvia è un prodotto naturale promettente per il controllo di *Plasmopara viticola* nella viticoltura biologica. La sua efficacia è quasi paragonabile a quella di un fungicida di rame commerciale. Tuttavia, le prestazioni dell'estratto di salvia sono state fortemente influenzate dalle precipitazioni simulate. La sua bassa resistenza alla pioggia può essere attribuita alla sua elevata solubilità in acqua. Questo problema

dovrebbe essere affrontato quando questo estratto grezzo deve essere formulato. Tuttavia, il livello di attività non è diminuito linearmente all'aumentare della quantità di pioggia simulata e gran parte della perdita di attività è stata osservata con basse quantità di pioggia, mentre l'efficacia dell'estratto è rimasta pressoché stabile con l'aumentare della pioggia. Inoltre, l'intensità della pioggia e l'impatto meccanico delle gocce di pioggia giocano un ruolo importante nella resistenza alla pioggia dei fungicidi da contatto. Una pioggia di breve durata/alta intensità lava via molto più fungicida rispetto a una pioggia di lunga durata/ bassa intensità, quindi dovrà essere sviluppata una formulazione di estratto di salvia con un alto livello di resistenza alla pioggia per migliorare la ritenzione, l'adesione dello spray ed evitare il ruscellamento del prodotto, utilizzando ad esempio dei coadiuvanti chimici, anche se nella protezione organica delle colture sono consentiti pochi coadiuvanti e quelli consentiti sono generalmente meno efficaci dei coadiuvanti convenzionali. Ciononostante, dovranno essere effettuati ulteriori studi per identificare la struttura chimica del principio attivo o della miscela di ingredienti rispetto ai suoi effetti su vite e *Plasmopara viticola*. Inoltre, l'identificazione dei principi attivi consentirà gli studi tossicologici ed eco-tossicologici necessari per la registrazione di un prodotto a base di estratto di salvia nell'Unione Europea (Dagostin et al., 2010).

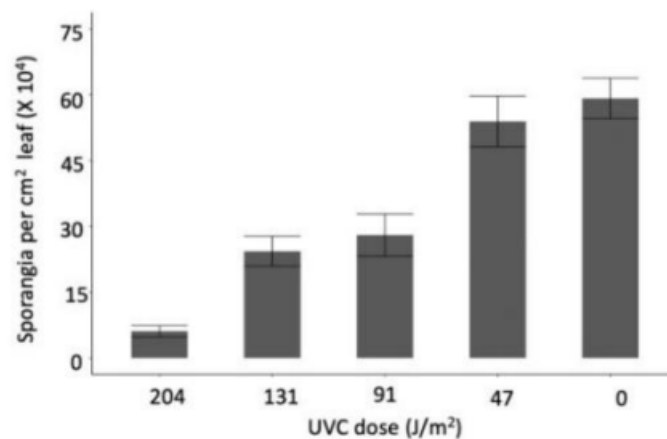
## **9.2 Luce UV-C e UV-B**

Le applicazioni notturne della luce ultravioletta nella larghezza di banda UV sono state eseguite per i seguenti obiettivi: determinare se le applicazioni UV notturne possono sopprimere i funghi patogeni della vite (in particolare *E. necator*, *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea*) e per verificare se queste applicazioni UV-C influenzano la crescita della vite, la resa o la qualità del raccolto. Lo spettro UV utilizzato in tali studi variava da una banda d'onda UV-B compresa tra 280 e 290 nm, ad una UV-C con un picco vicino a 254 nm. I trattamenti notturni nei vigneti hanno reso necessario l'utilizzo di un macchinario adatto nell'emettere tale luce ultravioletta, sia tramite trasporto trainato che autonomo, ed è stato configurato per le viti a graticcio (Gadoury et al., 2022).



Carrello robotizzato autonomo e carrello trainato dal trattore (*Gadoury et al., 2022*).

Quando le foglie di vite staccate sono state esposte durante l'oscurità ai raggi UV-C a  $100 \text{ J/m}^2$  fa partire da 7 giorni prima dell'inoculazione di *Plasmopara viticola*, l'infezione e la successiva sporulazione si sono ridotte di oltre il 70% rispetto alle foglie di controllo non trattate, indicando una soppressione indiretta di l'agente patogeno esercitato attraverso l'ospite (*Gadoury et al., 2022*).



Effetto di una singola applicazione preinfezione di UV-C a *Vitis vinifera* 'Chardonnay'. Le foglie sono state esposte ai raggi UV-C durante l'oscurità e sono state quindi inoculate con sporangi di *Plasmopora viticola* 12 ore dopo. Gli sporangi sono stati raccolti e contati 7 giorni dopo (*Gadoury et al., 2022*).

Nel 2019 e 2020 in un vigneto di ricerca di Chardonnay contenente circa il 10% di viti non irrorate o irrorate minimamente, la gravità dell'oidio sull'uva è stata significativamente ridotta rispetto ai grappoli non trattati e i risultati delle applicazioni

bisettimanali a 200 J/m<sup>2</sup> sono stati più o meno equivalenti ad un fungicida tradizionale. Sebbene le applicazioni settimanali di UV-C a 100 e 200 J/m<sup>2</sup> in combinazione con un programma fungicida minimo abbiano fornito un'adeguata soppressione della peronospora nel 2019, nessun trattamento UV-C applicato da solo ha ridotto la gravità di *P. viticola* sullo Chardonnay nel 2020 (Gadoury et al., 2022). Sembrerebbe che la luce UV-C non sia sufficiente per controllo della peronospora se usata da sola sull'uva sulle cultivar più suscettibili, ma potrebbe utilizzata combinata con fungicidi su quest'ultime, oppure applicata su determinate cultivar ibride interspecifiche resistenti. Le applicazioni notturne di UV-C non hanno prodotto indicazioni rilevabili di fitotossicità, riduzione della crescita o riduzioni della resa dei frutti o dei parametri qualitativi, anche alle dosi più elevate e agli intervalli più frequenti impiegati (Gadoury et al., 2022).

L'UV-C è una tecnologia con un'efficacia significativa, sostanziale e riproducibile contro un ampio spettro di agenti patogeni in molte colture, a cui il presente studio ha aggiunto l'uva. Mentre la modalità di azione dei raggi UV-C sembra essere principalmente eradicante, si sono osservati anche effetti secondari che hanno aumentato la resistenza alla *Plasmopara viticola*.

### **9.3 Acido salicilico**

Questo prodotto è in grado di aumentare la resistenza della pianta alle malattie, aumentare la vita dei fiori e promuovere la sintesi di etilene che stimola la maturazione dei frutti. La resistenza delle piante è associata spesso con l'attivazione di alcuni meccanismi di difesa, permettendo alla pianta di riconoscere il patogeno e attivare il più velocemente possibile la risposta immunitaria più adatta. L'acido salicilico è considerato un'alternativa al rame per combattere la peronospora e si può applicare prima e durante la fioritura. L'efficacia però è influenzata a condizioni di bassa pressione della malattia (Michelon et al., 2007).

### **9.4 Farine di roccia**

Le caratteristiche variano a seconda dei minerali che compongono la roccia macinata, solitamente il principale componente della farina di roccia è l'acido silicico che arriva fino al 75% nel basalto. In queste polveri possono essere presenti anche altri elementi come magnesio, calcio e microelementi come ferro, rame e molibdeno. Si usano come protettivi, sia in campo, sia in serra. L'acido silicico, come già detto, favorisce

l'irrobustimento delle foglie e degli steli, inoltre gli altri elementi minerali e microelementi, contribuiscono a rinforzare la pianta. La polvere di roccia funge anche da barriera fisica nei confronti dei patogeni e, grazie alle sue caratteristiche igroscopiche, può agire come disidratante dei parassiti. Ulmasud<sup>TM</sup> e Mycosin<sup>TM</sup> sono delle preparazioni commerciali di minerale calcareo formulato come polvere bagnabile. Sono state utilizzate in Svizzera e in Germania con dei risultati positivi, in cui si contraddistingue una parte di attività antiperonosporica, ma anche una parte di fitotossicità dipendente dal metodo di applicazione, dalla concentrazione e dal tipo di pianta. Tuttavia, la loro azione non è paragonabile al rame, in particolare nell'Italia settentrionale dove le condizioni ambientali e meteorologiche (elevata piovosità e prolungate bagnature fogliari) non garantiscono una sufficiente protezione nei confronti della peronospora. Infatti, se utilizzata alla dose di 1000- 1500 g/ha, l'algamatolite, ha dimostrato di essere in grado di contenere l'attacco di peronospora in maniera modesta se confrontato con i classici fungicidi, ma nell'eventualità di epidemie forti e precoci le argille si sono dimostrate inefficaci (Michelon et al., 2007).

### **9.5 Propoli**

Prodotto dall'elaborazione, da parte delle api, di sostanze di natura resinosa, gommosa e cerosa presenti nei tessuti vegetali di numerose piante arboree. Contiene composti di natura fenolica (flavoni, flavonoidi e flavononi) che rivelano proprietà fitostimolanti, che stimolano l'autodifesa della pianta e rafforzano l'azione di alcuni antiparassitari. Solitamente è associata allo zolfo o ai sali di rame, dei quali potenzia l'azione e ne permette un uso in concentrazioni basse, tuttavia, in ambito agrario, l'efficacia è estremamente limitata (Michelon et al., 2007).

### **9.6 Funghi antagonisti**

L'antagonismo microbico si basa solitamente sui meccanismi di: predazione, iperparassitismo, antibiosi e competizione; che possono avvenire separatamente o in contemporanea. La competizione avviene quando due specie necessitano degli stessi substrati per vivere, e competono per il cibo, per lo spazio o altre risorse. L'antibiosi consiste nella produzione di una o più sostanze tossiche (es. *Trichoderma* che produce sostanze quali la triclorodermina) che inibiscono o provocano la morte di altri microrganismi, mentre l'iperparassitismo suppone che uno dei due organismi parassitizzi



l'altro. In conclusione, nella predazione sono gli individui predatori che attaccano le prede, nutrendosi di esse.

Pare che l'azione di alcuni agenti di biocontrollo si espliciti in modo diretto anche sulla pianta, mediante l'induzione di uno stress che la porta ad un aumento delle difese. Contro la peronospora della vite sono stati studiati microrganismi come il *Bacillus licheniformis* e il *Trichoderma sp.* + *Gliocladium virens*, capaci di produrre delle sostanze volatili. *Trichoderma* agisce inoltre in modo competitivo e come iperparassita. Altri organismi quali *Streptomyces*, *Erwinia herbicola* o *Bacillus subtilis* pare abbiano una buona azione antagonista nei confronti della peronospora come anche alcuni batteri appartenenti al genere *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e altri *Actinomycetes*. *Fusarium proliferatum* diminuisce la produzione di sporangi e previene la sporulazione del patogeno. In uno studio condotto è stato osservato che *Trichoderma harzianum* T39 ha ridotto la peronospora del 63% nella vite, se applicato più di una volta 48-72 ore prima dell'inoculazione, senza un'inibizione diretta del patogeno, il che suggerisce che questo BCA stimola l'ISR, cioè la resistenza sistemica indotta, un metodo di difesa della vite che può essere provocato da microrganismi non patogeni (Jacometti et al., 2009). Ad oggi non sono presenti sul mercato fungicidi microbiologici attivi contro la peronospora della vite (Michelon et al., 2007).

## 9.7 Olio di Neem

È un agrofarmaco botanico estratto dalla specie arborea *Azadirachta indica*, o *Mangrova*, appartenente alla famiglia delle Meliacee, molto presente in India, America (nord, centro e sud), in Sudafrica, Medio Oriente e Australia. Nelle foglie, semi, frutti, legno e corteccia di questa pianta sono presenti dei limonoidi, principi attivi con caratteristiche molto interessanti per la patologia vegetale. Uno di questi, in particolare un limonoide triterpenoide, comunemente chiamato azadiractina, pare sia il componente più attivo. Quest'ultimo ha una spiccata attività insetticida, ma si ipotizza abbia anche un'azione fungicida capace di contrastare alcune crittogame tra cui la peronospora o la botrite. Come insetticida agisce alterando lo sviluppo degli insetti negli stadi giovanili interferendo con la muta oppure arrestando la peristalsi intestinale impedendo loro di evacuare e di nutrirsi. Il suo meccanismo d'azione fungicida pare sia dovuto al suo contenuto in derivati dello zolfo. L'olio di neem, considerato da sempre non dannoso per gli agenti di biocontrollo e

altri insetti utili, ha dimostrato ultimamente di causare alcuni effetti negativi sulle api. Con una soluzione al 75% di olio, la percentuale di acari morti si aggira intorno al 100% mentre per le api è più o meno del 10%. Si è dimostrato che quest'effetto dipende dalla concentrazione di olio di neem utilizzato, anche se non è ancora definito quale dei suoi componenti lo provochi (*Michelon et al., 2007*).

### **9.8 Equiseto**

La pianta da cui viene estratto questo prodotto (*Equisetum arvense*) esige quantità molto elevate di silicio per la loro sopravvivenza. Di conseguenza i suoi estratti sono ricchi di questo minerale (15-40%). La sua azione fungicida è dovuta prevalentemente al silicio, un elemento con note proprietà anticrittogamiche. Esso può essere applicato singolarmente oppure in miscela con fungicidi a base di rame, zolfo o con prodotti a base di ortica (*Michelon et al., 2007*).

### **9.9 *Inula viscosa***

Pianta perenne, della famiglia delle *Compositae*, prevalentemente presente nella regione mediterranea. Le sue foglie emanano un odore tipico e contengono dei composti che la proteggono da animali e insetti. L'estratto dalle sue foglie pare abbia un'azione erbicida anche se altri esperimenti in vitro e in vivo hanno invece dimostrato che questa pianta dispone di proprietà fungicide nei confronti di Oomiceti, Ascomiceti e Basidomiceti. L'attività fungicida si pensa sia dovuta alla presenza di sette terpeni, di cui la maggior parte a carattere lipofilo. Se irrorati sulla superficie fogliare questi estratti controllano adeguatamente l'attacco di peronospora sulla vite, fino ad una percentuale del 90%, se l'estrazione viene fatta con acetone ed esano. Le molecole attive sono, come precedentemente, di origine lipofila e vengono veicolate meglio in solventi quali acetone, metanolo, etanolo (*Michelon et al., 2007*).

### **9.10 Oli**

Oli minerali, oli essenziali, vegetali e acidi grassi, possono essere applicati contro gli attacchi degli insetti e contro gli attacchi fungini. Si pensa che gli oli proteggono dagli attacchi fungini tramite un'azione idrorepellente che ostruisce l'apporto d'acqua al fungo e quindi la sua crescita. Uno dei prodotti commerciali di questi oli è lo *Stylet-oil*<sup>TM</sup> (olio minerale) che può essere considerato sia insetticida, sia fungicida. Esso è primis un agente

di protezione, ma per quanto riguarda la sua attività fungicida, agisce tramite un'azione di prevenzione dell'inoculazione, un blocco dell'infezione e un'inibizione nella germinazione delle spore. Un'adeguata copertura delle foglie da parte di Stylet-oil™ è importante per la sua azione protettiva, quindi dev'essere applicato tramite l'uso di un ugello capace di fornire una micronizzazione uniforme. La formazione di particelle piccolissime garantisce una miglior copertura della superficie trattata rispetto a quella che si otterrebbe con delle dimensioni particellari maggiori. La micronizzazione aumenta l'attività del prodotto diminuendo allo stesso tempo la sua fitotossicità. La fitotossicità di questo prodotto si ha se esso viene usato ad una temperatura inferiore ai 10 °C o sopra i 32 °C, su piante in condizioni di stress. Uno dei problemi che quest'olio può causare è la rimozione della cera dagli acini, anche se pare non abbia conseguenze nella qualità del vino (*Michelon et al., 2007*).

### **9.11 Estratti acquosi**

Gli estratti acquosi di compost si preparano facilmente e la miscela che si ottiene si può utilizzare sia come applicazione fogliare, sia come concime capace di aumentare la crescita delle piante e di apportare nutrienti al terreno, ma gli stessi estratti possiedono anche un elevato numero di prodotti microbici e microbi quali gli actinomiceti capaci di competere con i funghi e limitarne la loro diffusione. Questi composti sembrano avere un'azione di tipo fungistatico, attivata tramite un cambio di microflora sulla superficie delle foglie o una competizione attiva da parte dei microrganismi. Alcuni studi dimostrano che è possibile trovare anche un meccanismo di tipo fungicida, anche se la loro efficacia è bassa ed estremamente variabile (*Michelon et al., 2007*).

### **9.12 Chitosano**

Normalmente isolato dall'esoscheletro (guscio) dei crostacei, è possibile ricavarlo anche dagli insetti e altri organismi quali funghi, alghe e lieviti. Strutturalmente è un polimero simile alla cellulosa che invece è costituita da una lunga catena di molecole di glucosio. Nelle piante, il chitosano agisce sia come regolatore di crescita che come induttore di resistenza. La sua azione si esplica mediante l'induzione dell'accumulo di fitoalessine, il cambiamento nella composizione degli steroli liberi, attivazione di glucanasi e lipossigenasi, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e la stimolazione della lignificazione dei tessuti vegetali. Studi ancora in corso sostengono inoltre che il

chitosano potrebbe anche essere utilizzato per originare delle membrane idrofobiche e gas permeabili che, se applicate sulla superficie fogliare, sarebbero capaci di inibire l'entrata di microrganismi patogeni nei tessuti della pianta. Il chitosano è impiegato prevalentemente nella difesa delle piante da peronospora, oidio e botrite. Vista la sua naturale presenza e la sua bassa tossicità è possibile escludere rischi per l'uomo e animali derivanti da un suo uso che rispetti le indicazioni di etichetta. Non sono stati rilevati problemi di fitotossicità. Preparato in polvere solubile in acqua è difficilmente miscibile con zolfo (Michelon et al., 2007).

## **10. Botrite della vite – Muffa grigia della vite**

*Botrytis cinerea* è l'agente patogeno responsabile della botrite, una malattia che colpisce più di 1000 specie coltivate nel mondo, ed in particolare nella vite riduce sostanzialmente la resa e la qualità della produzione di uva nelle regioni temperate e umide del mondo.

*B. cinerea* è un fungo emibiotrofo che attacca gli organi aerei della vite, nello specifico, le bacche sono molto sensibili durante la maturazione, cioè dall'invaiaitura fino alla raccolta. L'abbondante produzione di inoculo, l'elevata efficienza di disseminazione, l'ampia gamma di ospiti e l'elevata variabilità genetica di *B. cinerea*, sono le ragioni principali nella difficoltà incontrate per controllare la botrite della vite (Latorre et al., 2015). Raramente è stata osservata la sua forma perfetta *Botryotinia fuckeliana*, costituita da apotecie portanti gli aschi con le ascospore (Pollini and Ponti., 2018).

### **10.1 Sintomatologia**

I sintomi della Muffa grigia della vite si osservano su bacche, foglie, germogli, gemme e canne, di cui le bacche sono l'organo dell'uva più colpito. I sintomi delle bacche si presentano spesso prima e anche dopo la raccolta, ed appaiono comunemente come scolorimento bruno-rossastro che inizia dal peduncolo e progredisce verso l'estremità stilare. Macchie necrotiche rotonde di colore bruno-rossastro compaiono sull'acino dopo la pioggia, in prossimità del periodo di raccolta, e con il progredire dell'infezione, la buccia dell'acino diventa sempre più flaccida, si rompe e la bacca diventa molle ed acquosa. La bacca infetta agevola la colonizzazione e la sporulazione di *Botrytis cinerea*

sulla superficie della bacca e stimola la diffusione del fungo patogeno alle bacche vicine, formando un agglomerato di bacche marce.



Grappoli con acini attaccati da muffa grigia (*Borgo, 2016*)

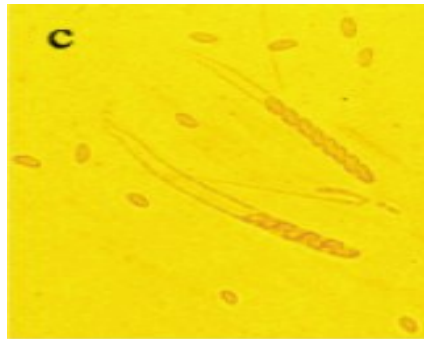
I sintomi fogliari si manifestano all'inizio della stagione di crescita e sono contraddistinti da piccole macchie necrotiche marroni vicino alle nervature e lesioni marroni a forma di "U o V" ai margini della lamina fogliare. In condizioni di umidità, si può osservare un'abbondante sporulazione del fungo nella parte inferiore dei tessuti fogliari malati. *B. cinerea* può infettare i fusti in parte lignificati dopo le prime gelate autunnali, causando lo sviluppo di lesioni necrotiche biancastre con sclerozi grandi, irregolari e neri (*Latorre et al., 2015*).



Tralcio legnoso con presenza di sclerozi di *Botryotinia fuckeliana* (*Borgo, 2016*)

## 10.2 Ciclo biologico di *Botrytis cinerea*

*B. cinerea* sviluppa colonie producendo miceli filamentosi, ramificati e settati con pareti cellulari prominenti. È caratterizzata da una bassa percentuale di chitina e un'alta percentuale di zuccheri neutri e proteine, e differisce in ciò nei confronti degli altri funghi. La maggior parte dei funghi isolati produce un numero elevato di conidi multinucleati (3-6 nuclei) (macroconidi) che sono unicellulari, lisci, da ovoidali a ellissoidi, e le clamidospore osservate e descritte in *B. cinerea* possono anche fungere da struttura di sopravvivenza. *B. cinerea* produce apoteci macroscopici e stipitati che si formano dagli sclerozi. Sebbene la fase sessuale si presenti raramente in natura, è stata segnalata un'elevata variabilità genetica nelle popolazioni di *B. cinerea*, difatti sono stati descritti due tipi di accoppiamento, MAT1-1 e MAT1-2, entrambi devono essere presenti per la produzione di ascospore poiché la maggior parte degli isolati di *B. cinerea* sono eterotallici. (Latorre et al., 2015).



Due aschi contenenti ciascuno otto ascospore, circondati da ascospore rilasciate da aschi danneggiati (Williamson et al., 2007)



Apoteci di *Botryotinia fuckeliana*, circa 10 settimane dopo la spermatizzazione (Williamson et al., 2007)

*B. cinerea* è un microrganismo saprofita necrotrofo facoltativo che può sopravvivere come micelio e/o sclerozi sull'uva (viticci, grappoli senescenti e piccioli fogliari senescenti), in numerosi ospiti alternativi e residui vegetali nei vigneti, su altre colture limitrofe e su varie piante selvatiche. Gli sclerozi si sviluppano all'interno dei tessuti ospiti morenti e rappresentano un meccanismo di sopravvivenza fondamentale per *B. cinerea*, ma sono di dimensioni molto variabili e non sono facilmente evidenti in tutte le colture sensibili. La parete melanizzata e i  $\beta$ -glucani che contengono il micelio interno proteggono gli sclerozi dall'essiccazione, dalle radiazioni UV e dall'attacco microbico per lunghi periodi. Nelle regioni temperate, ad inizio primavera, gli sclerozi iniziano la crescita per produrre conidiofori e conidi multinucleati, che fungo da fonte primaria di inoculo all'interno di una coltura (Williamson et al., 2007). Un numero elevato di conidi è prodotto in strutture di svernamento multiple e molto diverse, ed è plausibile che dall'inizio della primavera ci sia sempre un'abbondante e costante presenza di conidi vitali nell'aria, le più alte concentrazioni si riscontrano nei giorni caldi e umidi dopo la pioggia. I conidi sono l'inoculo primario durante la fioritura e la maturazione, (Latorre et al., 2015) e seguono un ciclo diurno ben definito di inizio, produzione e disseminazione regolato dalle fluttuazioni di temperatura e umidità; un rapido calo dell'umidità con l'aumento della temperatura al mattino presto provoca l'essiccazione dei conidiofori per disperdere i conidi tramite correnti d'aria, goccioline d'acqua o addirittura insetti che infestano i grappoli d'uva (ad esempio le larve di *Lobesia botrana* possono trasportare conidi vitali di *Botrytis cinerea* nei vigneti) (Williamson et al., 2007). Nei grappoli d'uva si osserva molto la diffusione della botrite tramite contatto acino-acino, dovuto alla crescita miceliale da acino malato a acino sano, e ciò è favorito su grappoli molto compatti e cultivar a buccia sottile.

### **10.3 Modalità d'infezione**

Le bacche immature sono considerate relativamente resistenti a *B. cinerea*, ma con l'avanzare della maturazione, aumenta la suscettibilità nei confronti del patogeno, dove, con l'umidità relativa oltre il 90%, che mantiene bagnate le piante per almeno 15 ore a temperatura media di almeno 15°C (la nota regola dei "2 quindici"), si creano le condizioni ideali per l'attacco del fungo patogeno.

In seguito alla deposizione, l'idratazione e l'attaccamento (primo stadio) alla superficie dell'ospite, i conidi sono in grado di germinare, formando un tubo germinativo singolo o ramificato, solitamente con un appressorio all'estremità distale. L'appressorio facilita l'attaccamento (secondo stadio) e la penetrazione diretta, tramite ife penetranti, delle superfici dell'ospite intatto. Secondo studi recenti, il principale responsabile della penetrazione attiva è un complesso processo enzimatico, piuttosto che la pressione causata dalla penetrazione delle ife. La penetrazione passiva, o indiretta, può avvenire attraverso aperture naturali (stomi) e ferite, che possono essere causate da altri funghi patogeni, come *Uncinula necator* (responsabile dell'Oidio della vite) oppure da insetti come la *Lobesia botrana*, la tignoletta della vite (Latorre et al., 2015). È ampiamente accertato che le condizioni microclimatiche all'interno della chioma dell'uva, in particolare la temperatura e l'umidità (umidità relativa e umidità assoluta), siano fattori chiave per l'infezione da *B. cinerea*, che, oltre alla compattezza del grappolo, è influenzata da fattori genetici, che rientrano nelle caratteristiche morfologiche, anatomiche e chimiche della buccia dell'acino, come cuticole sottili della bacca, basso contenuto di cera epicuticolare, elevata porosità della bacca, e il numero e lo spessore degli strati cellulari della bacca. La penetrazione della cuticola e la formazione della lesione primaria da parte di *B. cinerea* innesca uno scoppio ossidativo, sia nella membrana plasmatica della pianta che nella guaina extracellulare che ricopre la superficie delle ife fungine. Si crea un'esplosione ossidativa, con e la produzione simultanea di perossido di idrogeno e ossido nitrico, nonché la formazione di vescicole proteolitiche simili all'autofagosoma all'interfaccia ospite-patogeno. L'infezione causa l'accumulo di radicali liberi, sia all'interfaccia ospite-patogeno che a una certa distanza dalle ife invasori culminando nella perossidazione lipidica e deplezione di antiossidanti. Complessivamente, questi processi ossidativi causano una massiccia perturbazione dello stato redox all'interno e attorno al tessuto infetto, favorendo così il progresso della malattia (Williamson et al., 2007).

Sono state osservate e descritte 3 tipi di infezioni:

- 1) Infezione dell'estremità del pedicello attraverso la cicatrice del cappello o l'area del ricettacolo all'inserzione del peduncolo nella bacca. I sintomi iniziano alla base dell'acino come una colorazione bruno-rossastra e procede verso l'estremità stilare



dell'acino d'uva. Questa sembra essere la via di infezione da *B. cinerea* più frequente durante la fioritura.

- 2) Infezione all'estremità stilare delle bacche mature. Questo percorso sembra essere il meno frequentemente osservato ed è quasi inesistente nella maggior parte delle regioni viticole.
- 3) Infezione nella porzione laterale delle bacche. I sintomi iniziano con piccole macchie necrotiche rotonde di colore bruno-rossastro e lacerazioni della buccia. Questo percorso di infezione è abbastanza frequente dopo la pioggia durante la raccolta ed è collegato alla deposizione di conidi sulla superficie della bacca. Tale è la via di infezione più diffusa osservata nelle varie regioni viticole (*Latorre et al., 2015*).

*Botrytis cinerea* può effettuare un'infezione latente nelle bacche immature, infatti dopo la fioritura, il fungo patogeno resta latente nell'estremità stilare dell'acino, per poi, riprendere a svilupparsi dopo l'invasatura, causando marciumi precoci alla maturità dell'acino. La latenza di *B. cinerea* negli acini d'uva è stata correlata alla difesa costitutiva della vite. In particolare, l'accumulo di fitoalessine (es. resveratrolo, un derivato dello stilbene), le quali sono metaboliti secondari di autodifesa elaborati dalla pianta, nelle uve immature, e la sintesi delle proteine PR (*Latorre et al., 2015*).

I processi di rilevamento e segnalazione appena descritti portano infine alla produzione di molecole effettrici che permettono a *B. cinerea* di uccidere l'ospite e decomporre il tessuto vegetale per trasformarlo in biomassa fungina. Gli agenti patogeni che si depositano su una foglia devono penetrare nella superficie dell'ospite, composta da cutina ricoperta di cera. *B. cinerea* differenzia gli appressori che hanno il compito di rompere la cuticola per mezzo di un piolo di penetrazione, e verosimilmente secerne enzimi per violare la superficie della pianta, in particolare si pensa abbiano un ruolo centrale la cutinasi e la lipasi, insieme inoltre ad un altro enzima, il superossido dismutasi (*Williamson et al., 2007*). Durante la penetrazione fungina si verifica uno scoppio ossidativo, con la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Dopo aver rotto la cuticola, il piolo di penetrazione solitamente si sviluppa nella parete anticlinale della cellula epidermica sottostante, dove c'è una concentrazione elevata di pectina. L'invasione di questo strato implica quindi l'azione delle pectinasi, in particolare

dell'endopoligalatturonasi, che però si pensa non possa depolimerizzare efficacemente la pectina altamente metilata, quindi la demetilazione si ipotizza sia dovuta grazie all'azione della pectina metilesterasi (PME).

*B. cinerea* può produrre una gamma di metaboliti fitotossici a basso peso molecolare, nonché proteine fitotossiche. Il metabolita fitotossico meglio studiato è il botridio. Il botridio è stato inizialmente identificato nelle colture liquide, ma i metodi spettroscopici hanno permesso di accertarne l'accumulo nel tessuto vegetale infetto, a concentrazioni superiori alla soglia di tossicità, anche se la funzione delle proteine fitotossiche nella patogenesi di *B. cinerea* è ancora oggetto di studio.

L'abilità di produrre acido ossalico può essere un cofattore nella patogenesi, infatti quest'ultimo può favorire l'idrolisi della pectina derivante dall'azione dell'endopoligalatturonasi sequestrando ioni  $Ca^{2+}$  dalla parete cellulare. La rimozione di quest'ultimi disturba le interazioni intermolecolari tra i polimeri pectici e, di conseguenza, la matrice pectica assorbe acqua e si gonfia. *B. cinerea* produce ossalato in vitro per mezzo dell'ossalacetato idrolasi (BcOAH1), un enzima che converte l'ossalacetato in piruvato e ossalato (*Williamson et al., 2007*).

#### **10.4 Controllo chimico**

L'applicazione fogliare di fungicidi viene eseguita per proteggere il grappolo e ridurre il più possibile il tasso di infezione durante la stagione vegetativa. Ad ogni modo, l'uso di fungicidi è sempre più limitato a causa dei maggiori problemi ambientali e di salute umana e a causa del frequente sviluppo di ceppi resistenti di *B. cinerea*. La maggior parte dei fungicidi sviluppati di recente sono composti specifici per sito con modalità di azione a sito singolo, mentre i fungicidi più vecchi sono composti con modalità di azione multisito. Il controllo chimico si basa principalmente sull'uso di fungicidi con modalità di azione a sito singolo. Questi fungicidi appartengono ai seguenti gruppi: le Anilino pirimidine (ciprodinil, mepanipirim, pirimetani), inibitori del succinato deidrogenasi (SDHI) (boscalid, penthiopyrad), inibitori della demetilazione (DMI), Classe I (ad es. tebuconazolo); DMI, classe III, idrossianilidi (ad es. fenhexamid); Dicarbossimidi (es. iprodione); 2,6-Dinitro aniline (es. fluazinam); Fenilpirroli (p. es., fludioxonil); e Chinone fuori in inibitori (QoI) (strobilurine) (ad esempio, azoxystrobin). I benzimidazoli sono ancora disponibili, ma a causa di problemi di resistenza, non

vengono più utilizzati contro la botrite dell'uva. I fungicidi con modalità di azione multi-sito, come i derivati ftalimmidici (captano e folpet), i derivati sulfamidici (diclofluanide e tolifluanide) e i derivati del cloronitrile (clorotalonil), sono tuttora utilizzati contro *B. cinerea* (Latorre et al., 2015).

Interventi fitoiatrici effettuati in vigneto contro fitofagi e altre malattie crittogamiche possono, indirettamente, contenere i danni della muffa grigia. Per esempio, i sali di rame, frenano la vegetazione ed aumentano la resistenza della cuticola dell'acino.

I momenti d'intervento, seguono uno schema fenologico, che prevedono quattro trattamenti predeterminati nella fase di post-fioritura, pre-chiusura grappolo, invaiatura e 20-25 giorni prima della vendemmia, e quello climatico, che invece segue le condizioni ambientali favorevoli all'infezione (Pollini and Ponti., 2018).

Oggi vi è una notevole preoccupazione per il rapido sviluppo di ceppi di *B. cinerea* resistenti ai fungicidi, questo è dovuto all'abilità del patogeno che è in grado di produrre un numero abbondante di conidi come inoculo primario, che viene poi disseminato in modo efficiente. Inoltre, questo fungo ha un'elevata variabilità genetica e un'ampia gamma di ospiti; pertanto, per il controllo è richiesto un numero elevato di applicazioni di fungicidi a causa della natura policiclica. Per il controllo chimico sono disponibili fungicidi con modalità di azione a sito singolo e multisito; questi sono correlati rispettivamente con un rischio da moderato ad alto e basso di sviluppo di ceppi resistenti; pertanto, per evitare la resistenza, è necessario alternare fungicidi con diverse modalità di azione biochimica o combinato ogni stagione di crescita.

## **11. Metodi alternativi per il controllo della Muffa grigia della vite**

### **11.1 Agenti biologici di controllo**

Mediante il controllo biologico inondativo si liberano, in elevate quantità, un agente di controllo che può essere utile nel contrastare *B. cinerea* nella vite. Gli agenti biologici di controllo possono contrastare il patogeno in due modalità: in modo diretto, mediante il parassitismo od aderendo alle superfici di *Botrytis cinerea*, oppure in modo indiretto, tramite lo sviluppo di composti inibitori, la concorrenza, stimolando la resistenza della malattia nelle piante. I più conosciuti agenti biologici di controllo di *B. cinerea*,

appartengono ai generi *Trichoderma*, *Ulocladium* e *Gliocladium* nei funghi, nei batteri sono *Bacillus* e *Pseudomonas*. I biofungicidi non hanno effetti se utilizzati dopo l'infezione, difatti vengono adoperati per trattamenti preventivi, per esempio nei periodi della fioritura e la sfogliatura/rifilatura, e dopo l'invasatura, con, ovviamente, le condizioni climatiche favorevoli alla colonizzazione della vite da parte dell'agenti di controllo (Jacometti et al., 2009).

La bassa consistenza in campo e l'efficacia legata alle condizioni climatiche rallentano lo sviluppo di questo metodo di difesa contro *Botrytis cinerea*. I biofungicidi non rilasciano residui chimici nel vino e non hanno nessun impatto nei confronti della vite. Gran parte dei viticoltori non considerano ancora l'utilizzo dei biofungicidi sebbene questo metodo di difesa si stia sviluppando sempre di più, ed applicabile in sinergia con i fungicidi tradizionali. (Jacometti et al., 2009).

## 11.2 Lieviti

Per esaminare l'attività di biocontrollo, sono stati testati 11 lieviti in vigneto, a Washington, tra i quali: *Candida saitoana*, *Curvibasidium pallidicorallinum*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *M. pulcherrima*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Wickerhamomyces anomalus*, per esaminare la capacità di colonizzare i grappoli d'uva senza semi di Thompson, per contrastare lo sviluppo di *Botrytis cinerea* in vitro e sopprimere i sintomi della malattia su bacche isolate (Wang et al., 2018). Tutti i ceppi di lievito hanno, contrastato in maniera, più o meno, considerevole, almeno uno dei quattro isolati di *Botrytis* sugli acini d'uva. I ceppi più efficaci sono stati *A. pullulans* P01A006, *Metschnikowia chrys operlae* P34A004 e P40A002, *M. pulcherrima* P01A016 e P01C004, *Meyerozyma guilliermondii* P34D003 e *S. cerevisiae* HNN11516 (Wang et al., 2018).

La loro rapidità nel colonizzare le lesioni sull'acino d'uva e l'abilità nel limitare la gravità della malattia di uno o più isolati patogeni sull'acino senza produrre una risposta significativa della ferita sono uno dei motivi per cui i lieviti potrebbero avere un ruolo importante come agenti biologici di controllo contro questo patogeno. Diversi ceppi di lievito posseggono una buona tolleranza ai fungicidi, e ciò potrebbe significare un utilizzo in combinazione con quest'ultimi in futuro, con un grande potenziale come strumento nella viticoltura del futuro, ma lo sviluppo ovviamente necessiterà studi sulla

compatibilità, la formulazione e l'ottimizzazione dei tempi (Wang et al., 2018). I principali meccanismi di azione applicati da gran parte dei lieviti antagonisti contro i patogeni sono stati lo spazio e la competizione per i nutrienti. *B. cinerea*, come gli altri funghi emibiotrofi, nel momento in cui attaccano la ferita per dare il via al processo di infezione, necessita di nutrienti per la germinazione e l'inizio dell'infezione e, di conseguenza, sono molto sensibili all'esclusione spaziale causata da altri microrganismi. I lieviti riescono ad inibire più efficacemente *B. cinerea* sono quando si stabiliscono sull'ospite prima e quando sono in grado di colonizzare velocemente i tessuti dell'ospite, come dimostrato dai ceppi commerciali di lievito di biocontrollo, utilizzando isolati di lievito che non competono per le risorse nutritive o non si antagonizzano a vicenda. Detto ciò, la possibilità che i lieviti utilizzano l'antibiosi come meccanismo per contrastare il patogeno non è esclusa dagli esperti, poichè la produzione di antibiotici è influenzata da fattori ambientali e dalle interazioni con l'ospite e altri microrganismi (Wang et al., 2018).

In un altro studio, vari ceppi di lievito isolati dal mosto d'uva sono stati ottenuti dalla collezione di colture del South African Grape and Wine Research Institute (SAGWRI), Università di Stellenbosch. Questo studio mirava a svelare i tratti antimicotici dei lieviti non convenzionali derivati dall'uva da vino e dal mosto. È stata valutata l'espressione dell'attività antimicotica in vitro e sugli acini d'uva di 31 ceppi di lievito contro tre ceppi di *B. cinerea* (Maluleke et al., 2022).

Per determinare se l'attività antimicotica del lievito variava tra le condizioni di coltura, sono stati condotti saggi di co-coltura liquida. Dopo lo screening iniziale, le specie di lievito con attività antimicotica contro i patogeni testati sono state selezionate e studiate per la loro concentrazione minima inibente (MIC) e la produzione di enzimi litici della parete cellulare. È stato dimostrato che i lieviti esprimono vari meccanismi nelle interazioni antagoniste, tra queste la competizione per lo spazio e i nutrienti, la secrezione di enzimi litici extracellulari come proteasi, glucanasi e chitinasi e composti organici volatili. Tra i composti volatili, gli esteri e gli alcoli superiori come l'acetato di etile, l'acetato di fenile, l'alcool isoamilico, l'alcool benzilico, l'ottanoato di isoamile, il 2-metil-1-propanolo e il 2-feniletanolo, sono stati implicati in attività inibitorie (Maluleke et al., 2022). Per il test in vivo, i ceppi di lievito che si sono dimostrati gli antagonisti più efficaci contro tutti i patogeni studiati in questo studio sono stati selezionati e valutati per la loro attività inibitoria su uva.

23 ceppi che rappresentano 15 specie hanno mostrato un'attività inibitoria variabile contro i patogeni fungini nei saggi a doppia piastra, ed hanno anche inibito la crescita dei funghi filamentosi nelle colture liquide. Ciò è stato evidenziato dall'assenza o dalla formazione limitata di ife nelle colture quando visualizzate al microscopio. Tra i 23 ceppi, 12 hanno mostrato un'ampia attività antagonista inibendo tre ceppi di *B. cinerea*, mentre 11 avevano un'attività a spettro ristretto (Maluleke et al., 2022).

La variabilità intraspecifica è stata osservata sotto forma di differenze nella presenza e nell'assenza di attività, nello spettro e nella forza dell'attività. Ad esempio, all'interno della specie *Candida oleophila*, il ceppo Y994 potrebbe inibire tutti i fitopatogeni testati ma mostrava una debole attività di glucanasi e chitinasi, mentre Y964 e NOVACH inibivano due dei patogeni ed esprimevano una forte attività di glucanasi e chitinasi. Al contrario, all'interno dei ceppi *Wickerhamomyces anomalus* e *Zygoascus meyeriae*, sono stati osservati spettri di attività antimicotica simili e concentrazioni minime inibitorie (MIC), ma questi differivano principalmente nei livelli di chitinasi e glucanasi visualizzati. Inoltre, i ceppi di lievito differivano nella loro inibizione dei ceppi di *B. cinerea*. Ad esempio, all'interno della specie *W. anomalus* Y517 e Y541 hanno mostrato una maggiore inibizione contro IWBT FF1 mentre Y934 ha mostrato livelli di inibizione simili tra diversi ceppi di *B. cinerea* (Maluleke et al., 2022). Nel presente studio, i ceppi di lievito con attività antimicotica contro i patogeni testati hanno emesso chitinasi e  $\beta$ -1,3-glucanasi in presenza di *B. cinerea* con una riduzione concomitante variabile dei livelli di chitina e glucano nelle pareti cellulari di *B. cinerea* in seguito all'esposizione a *H. pseudoburtonii* così come ceppi di *W. anomalus*, *L. elongisporus*. La riduzione di questi polisaccaridi della parete cellulare potrebbe essere in parte dovuta all'idrolisi da parte delle chitinasi e glucanasi. Infatti, in uno studio hanno osservato un rammollimento delle pareti ifali e una consistenza elastica in *Aspergillus flavus* nelle ife esposte a chitinasi e glucanasi da *W. anomalus* (precedentemente *Pichia anomala*). Questo rammollimento ifale è progredito in una moderata lisi ifale e infine nella completa degradazione (Maluleke et al., 2022).

Numerosi studi su lieviti antagonisti come *A. pullulans*, *P. occidentalis*, *M. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii* hanno rivelato la produzione di composti volatili identificati appartenenti a diverse famiglie chimiche, come alcoli superiori,

aldeidi, esteri, composti organosolforici, monoterpeni, chetoni e idrocarburi aromatici. In particolare, alcol fenil-etilico, alcool isoamilico, n-butanolo, 2,5-dimetilpirazina, apparentemente originati da queste specie di lieviti. Questi dati potrebbero suggerire che per sopprimere la crescita di fitopatogeni un lievito come *W. anomalus* esprima varie attività sinergiche tra cui la produzione di enzimi di degradazione della parete cellulare così come composti volatili che inibiscono la germinazione delle spore e la biosintesi dei polisaccaridi della parete cellulare. La valutazione dell'efficacia dei lieviti nel prevenire lo sviluppo di *B. cinerea* sull'uva ha evidenziato una notevole riduzione del marciume. *W. anomalus* ha rivelato la massima efficacia nel controllo dello sviluppo fungino per cui sono stati registrati solo marciumi molli. Poiché l'esperimento è stato condotto in contenitori ermetici, la soppressione della crescita di *B. cinerea* in presenza di *W. anomalus* potrebbe confermare la produzione di diversi composti volatili come modalità di azione tra le altre (Maluleke et al., 2022). Diversi agenti o prodotti di controllo biologico come Aspire® (*Candida oleophila*), Candifruit® (*Candida sake*), Shemer® (*Metschnikowia fructicola*) e BoniProtect® (*Aureobasidium pullulans*) costituiti da lieviti o funghi simili a lieviti come ingredienti attivi sono stati registrati e sono stati immessi sul mercato (Maluleke et al., 2022).

In conclusione, lieviti derivati dal mosto d'uva si sono rivelati efficaci contro *Botrytis cinerea*, dando a questi lieviti il potenziale per essere sviluppati ed applicati come agenti di controllo biologico. L'efficacia di queste specie di lievito può essere ulteriormente valutata in vivo contro vari patogeni delle piante considerando vari fattori ambientali. Questo studio ampiamente confermato che vari meccanismi tra cui la degradazione della parete cellulare del patogeno, l'inibizione della biosintesi dei polisaccaridi della parete cellulare e l'inibizione della germinazione delle spore attraverso la produzione di composti volatili (Maluleke et al., 2022).

### **11.3 Oli essenziali**

Grazie alle loro ottime proprietà di diffusione e adesione, i trattamenti con oli essenziali possono essere applicati in modo efficace a bassi dosaggi, e se altamente raffinate, sono abbastanza specifiche per la malattia. Uno dei prodotti commerciali più conosciuti usati, JMS Stylet-Oil (JMS Flowers Farms, Inc.), è un olio minerale altamente raffinato con un residuo non solfonato del 99,1%. È efficace per il controllo dell'oidio e di *B. cinerea* nella

vite, sia se applicato da solo oppure insieme ai fungicidi sintetici, tra cui benzimidazolo, dicarbossimide e iprodione. I risultati ottenuti applicando solo gli oli essenziali (JMS Stylet-Oil) sono stati inferiori dei risultati ottenuti dall'olio essenziale insieme i fungicidi tradizionali (*Wang et al., 2018*).

Negli ultimi anni sono stati studiati e sperimentati diversi composti biotici e abiotici, che possono contrastare in modo efficace *B. cinerea* in campo. Tra questi composti vi sono: ormoni vegetali, stimolanti abiotici, estratti vegetali e microbici e microbi.

#### **11.4 Ormoni vegetali**

Gli ormoni vegetali più efficaci a sopprimere *Botrytis cinerea* nella vite sono l'acido salicilico e l'acido  $\beta$ -aminobutirrico, in particolare, l'acido salicilico è in grado di stimolare una resistenza indotta nella vite nei confronti del fungo patogeno, mentre l'acido jasmonico, un altro ormone vegetale, agisce stimolando la produzione di stilbeni, composto fenolico di difesa della pianta. Questi composti inducono resistenza stimolando un cambiamento nella fisiologia della vite, per esempio causando un ritardo nella maturazione dell'acino e provocando delle conseguenze anche nella qualità dell'uva. Come conseguenza dell'elevato livello di sensibilità delle piante a questi composti, esiste un margine ristretto che separa la fitotossicità e il tasso di applicazione richiesto per un controllo efficace dei patogeni delle piante, che concerne l'utilizzo di questi ormoni in viticoltura. Ad oggi, questi stimolanti, vengono ancora considerati come troppo rischiosi e poco pratici per l'uso nei vigneti commerciali (*Jacometti et al., 2009*).

#### **11.5 Estratti vegetali**

Gli estratti vegetali possono essere potenti stimolanti della difesa delle piante. Gli estratti del poligono della penisola di Sachalin (*Reynoutria sachalinensis*), registrato come "Milsana®" (estratto etanologico al 5%), sono efficaci nel contrastare *B. cinerea* in colture come il pomodoro, fragola, cetriolo e uva. Milsana causa un aumento nei livelli di resveratrolo presente nell'uva. In un vigneto in Germania, l'applicazione di Milsana ogni 7-10 giorni ha diminuito l'incidenza della malattia di *B. cinerea* a livelli uguali o inferiori rispetto a trattamenti a base di zolfo o ad un agente contenente rame, mentre in un altro esperimento condotto in campo negli USA sono bastate solamente quattro applicazioni di



Milsana, applicate tra la chiusura del grappolo e la raccolta, hanno diminuito del 50% il marciume del grappolo da Muffa grigia. Gli estratti vegetali descritti potranno rivelarsi degli efficaci strumenti di gestione delle malattie nei vigneti, applicandoli insieme ad altri prodotti, inclusi fungicidi sintetici e biofungicidi (*Jacometti et al., 2009*).

### **11.6 Estratti di compost**

Gli estratti di compost possono sopprimere le malattie in modo diretto, tramite l'attività antimicotica, oppure in modo indiretto mediante l'induzione delle difese delle piante. Estratti di animali e piante possono essere utilizzati per controllare vari patogeni delle piante tra cui *B. cinerea*, come anche *Plasmopara viticola* (Peronospora della vite) e *Uncinula necator* (Oidio della vite). Un estratto a base di vinacce e letame equino e bovino può sopprimere *B. cinerea* su foglie di vite differenziate fino al 95%, e su uve differenziate fino al 70%. Se utilizzato da solo, questo estratto non risulta molto efficace in condizioni di campo, ma se applicato con caseina o olio di pino, l'efficacia può addirittura avvicinarsi a quella di un fungicida convenzionale. Il meccanismo di soppressione di *B. cinerea* e altri patogeni delle piante da parte degli estratti di compost al momento non è ancora compreso a pieno ed attualmente è poco studiato. Osservando i risultati ottenuti, gli estratti di compost si dimostrano un metodo di difesa con un elevato potenziale in ottica futura, applicabile insieme ad altri prodotti come oli essenziali e agenti di controllo biologico; avrà sicuramente un ruolo importante nel sistema integrato di gestione dei parassiti nella viticoltura del domani (*Jacometti et al., 2009*).

### **11.7 Induzione di resistenza**

È stato dimostrato che alcuni microrganismi possono indurre una risposta di difesa delle piante nelle piante. Questo può essere provocato da microrganismi non patogeni, un fenomeno noto come resistenza sistemica indotta (ISR), o da microrganismi patogeni, tramite un fenomeno noto come resistenza sistemica acquisita (SAR). La risposta della pianta può essere di due tipi: sistemica o locale. L'ISR può essere un componente del meccanismo d'azione dei microrganismi che sopprimono le malattie che vengono principalmente rilasciati nella chioma come agenti di controllo biologico. Ad esempio, è stato dimostrato che la produzione di cellulasi dall'agente biologico di controllo *Trichoderma viride* induce l'accumulo di resveratrolo nell'uva e l'accumulo di perossidasi di isoenzima nelle foglie e negli steli dell'uva. Nel SAR, che è un meccanismo

sistemico, non c'è bisogno del contatto diretto con l'agente patogeno. Questo potrebbe rivelarsi un metodo da tenere in considerazione nei trattamenti nelle uve dopo la chiusura del grappolo, dove l'applicazione a spruzzo per contatto diretto difficilmente penetrerà nel grappolo. L'applicazione efficace di questo meccanismo di risposta di difesa delle piante, insieme con gli altri meccanismi utilizzati nel controllo biologico che sono stati discussi in precedenza, è probabile che renda i biofungicidi più performanti ed efficaci nelle condizioni di campo rispetto a quelli che agiscono attraverso un singolo meccanismo (Jacometti et al., 2009).

## 12. Mal dell'Esca – Esca della vite

Il mal dell'esca è una malattia fungina che, a differenza di altre (peronospora ed oidio ad esempio), è provocata dalla colonizzazione non di una, ma di diverse specie di funghi, di cui tre sono considerate essere gli agenti causali principali della malattia in Italia: *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*. *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* sono responsabili della tracheomicosi, cioè attaccano i vasi della pianta ostruendo così la traslocazione d'acqua e nutrienti dalle radici alla parte aerea della pianta, mentre *Fomitiporia mediterranea* è il fungo patogeno responsabile della carie bianca o carie bruna nella vite (Michelon et al., 2007).



Venature brune (Michelon et al., 2007)



Caries bianca (Lorenza Michelon et al., 2007)

*Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* sono i due ifomiceti (funghi nei quali manca, la riproduzione sessuata o se presente, è ancora ignota) che colpiscono il legno del fusto e delle branche. Le lunghe venature colonnari brune, normalmente causate da ferite, si sviluppano lungo l'asse del legno in maniera discontinua. Le venature brune coincidono a gruppi di elementi strutturali dello xilema, cioè vasi conduttori (trachee, tracheidi) e cellule del parenchima del legno. Le alterazioni possono differenziarsi in numero, estensione ed intensità di colore secondo l'età della vite. In condizioni idriche e vegetative della vite favorevoli, questi funghi possono anche procedere rapidamente nei vasi xilematici. La pianta infetta deve quindi difendersi da *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* tramite barriere fisiche e chimiche (Michelon et al., 2007).

Le barriere fisiche si basano nella produzione di tille, vescicole che le cellule del legno creano all'interno dei vasi. Le tille, vanno ad occludere il lume dei vasi, ostruendo così la progressione verticale dei due funghi patogeni. Le barriere chimiche si basano invece nella produzione di sostanze da stress. Solitamente vengono prodotti varie sostanze in particolare il trans- $\epsilon$ -viniferina, associato a sintomi nel legno, mentre il transresveratrolo che è associato a sintomi sia sugli acini che sul legno. Queste sostanze si comportano nella vite come fitoalessine, Per fitoalessine s'intendono dei composti antimicrobici, prodotti a seguito di interazioni con patogeni, a basso peso molecolare sintetizzati dalla pianta ed in essa accumulati in seguito all'attacco da parte di microrganismi o in

condizioni di stress. Le fitoalessine non sono presenti nelle piante sane, ma si concentrano in corrispondenza del punto di penetrazione del patogeno.

*Fomitiporia mediterranea* appartiene ai basidiomiceti, ovvero funghi che producono le spore all'interno di una struttura chiamata basidio. Tramite la produzione di enzimi che decompongono la lignina, determina la degradazione del legno del fusto; tale alterazione comporta la formazione di una massa spugnosa e friabile di colore bianco-giallastro, la carie bianca. Come abbiamo detto in precedenza, si distinguono due tipi di carie: la carie bianca e la carie bruna. Nel primo caso il legno ha una colorazione biancastra dovuta alla degradazione delle componenti ligniniche e delle suberine, mentre nel secondo caso, sono le componenti cellulose ed emicellulose del legno ad essere degradate, conferendo così al legno un colore scuro (*Michelon et al., 2007*).

### **12.1 *Phaeomoniella chlamydospora***

Questo fungo penetra attraverso le ferite (sia in vivaio, sia in campo) e colonizza i vasi del legno. La pianta si difende mediante la produzione di talle e di gomme il cui scopo è quello di ostacolare il fungo o di eliminarlo; questo causa l'imbrunimento dei vasi con conseguente comparsa di striature scure. In natura *Phaeomoniella chlamydospora* produce i picnidi, ovvero le strutture che contengono i conidiofori e che, tramite un'apertura apicale denominata ostiolo, liberano i conidi nell'ambiente; tali strutture hanno un diametro tra i 75-200  $\mu\text{m}$ , sono di colore scuro e si trovano sulla superficie o appena immersi nella matrice vegetale. Questi rappresentano la principale forma di svernamento del fungo e, in presenza di pioggia, possono liberare e diffondere i conidi. Sono state trovate sulla superficie di vecchie ferite di potatura (3-5 anni), su tessuti vascolari esposti da tagli, sulla corteccia del tronco (*Michelon et al., 2007*).

### **12.2 *Phaeoacremonium aleophilum***

Causa, a partire dal midollo, una necrosi bruno-rosa che si unisce alle punteggiature di *Phaeomoniella chlamydospora* che andranno a formare una necrosi bruna in posizione centrale. Il micelio che si sviluppa passa dal bianco a color miele (sul retro della colonia da giallo a bruno). Le ife possono essere singole oppure raggruppate in cordoni di colore marrone chiaro. I conidi prodotti sono di piccola dimensione (3- 4,5  $\times$  1,5-2,5  $\mu\text{m}$ ) e assumono una forma oblunga-ellissoidale. In laboratorio è stata riprodotta la forma

sessuata che prende il nome di *Togninia minima*; in natura la forma perfetta (sinonimo di sessuata) di un fungo assume un ruolo fondamentale nella ricombinazione genetica del patogeno. *Togninia minima* è un ascomicete, cioè funghi che producono le spore all'interno di un sacco, che può essere di forma allungata, chiamato asco, che produce dei corpi fruttiferi chiamati periteci, strutture dove sono prodotte le ascospore. I periteci liberano le ascospore che, possono essere diffuse nell'ambiente tramite il vento oppure gli schizzi d'acqua, nei giorni di pioggia, e possono depositarsi sulle ferite aperte di una pianta, diffondendo la malattia (Lorenza Michelon et al., 2007).



Sezione del fusto di una vite appena tagliata, dove è ben visibile la colorazione rosa dovuta alla presenza del fungo *Phaeoacremonium aleophilum*

### **12.3 *Fomitiporia mediterranea***

Colonizzano il legno delle branche e del fusto della vite. I tessuti legnosi, in particolare quelli adiacenti al midollo ed il midollo stesso, inizialmente imbruniscono, poi degradano fino a perdere la maggior parte della loro consistenza. Con il trascorrere del tempo l'alterazione si espande alle zone limitrofe del legno, sia in senso longitudinale, sia radiale. L'azione di *Fomitiporia mediterranea*, perché abbia successo, dev'essere solitamente preceduta dalla presenza di *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* (funghi pionieri) per avere la carie. Il micelio, che all'inizio è di colore bianco, dopo circa 5 giorni, diventa giallo-ocra, fino a bruno cotonoso. In natura *Fomitiporia mediterranea* è in grado di produrre corpi fruttiferi che originano e diffondono le spore di tipo sessuato, le basidiospore; queste strutture, a forma di ovoidale, hanno uno spessore di circa 15 mm e sono distinguibili dal loro peculiare

color cannella. Solitamente sono situate sulla parte alta del tronco di viti vecchie (Michelon et al., 2007).

La diffusione delle spore fungine può realizzarsi in vari modi. In particolare, tramite sono le correnti d'aria che con il loro movimento sollevano, anche a grandi altezze, le spore e le spingono in aree geografiche anche molto distanti. Infine, un'ulteriore modalità di diffusione, che si rivela essere anche la più efficace, è l'acqua piovana che, nella sua caduta, trascina spore sospese nell'aria o ne preleva altre scorrendo lungo i rami e i tronchi delle piante o sul terreno, luoghi sempre ricchi di funghi in sporulazione. Anche gli insetti in alcuni casi possono rivelarsi dei buoni vettori delle spore fungine.

Si pensa che le ferite di potatura siano una delle maggiori vie di penetrazione delle spore dei tre funghi responsabili del mal dell'esca. Diversi studi stanno provando a fare chiarezza su quali siano i periodi di maggiore suscettibilità delle ferite e se alcuni vari fattori, quali epoca di potatura, condizioni climatiche, età ed entità della ferita, giocano un ruolo cruciale nell'infezione. I vari risultati ottenuti per il momento affermano che le condizioni più favorevoli per la disseminazione aerea delle spore di *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* sono probabilmente da individuare nei periodi immediatamente successivi ad una precipitazione. Non si conosce ancora bene il ciclo biologico di *Fomitiporia mediterranea*, questo perché in nessuna parte del mondo sono state ancora isolate spore aeree. Visto che i corpi fruttiferi del fungo si formano quasi unicamente su viti molto vecchie, si ipotizza che l'inoculo del fungo patogeno possa giungere nel vigneto da fonti esterne, come ad esempio da vigneti vecchi limitrofi oppure corpi fruttiferi formati su ospiti diversi (Michelon et al., 2007).

#### **12.4 Sintomatologia**

Il mal dell'esca della vite si può considerare come un complesso di malattie; dove c'è la presenza, contemporanea o meno, di specie fungine differenti che agiscono in punti diversi della stessa pianta può, infatti, dare luogo alla sovrapposizione od alla successione di malattie diverse.

##### Venature brune delle barbatelle

La barbatella affetta da questa malattia esternamente presenta un aspetto del tutto normale, non manifestando nessun sintomo particolare. Se però viene fatta una sezione

lungo l'asse longitudinale, si potranno osservare delle striature bruno-nerastre, isolate oppure raggruppate. In aggiunta a tutto questo vi è la comparsa di una gomma bruna nei vasi. La sezione trasversale della barbatella presenta delle punteggiature nere vicino al midollo centrale oppure distribuite su tutta la superficie del taglio, dalle quali vi è la possibilità di isolare *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*. Dai vasi corrispondenti ai puntini neri fuoriesce spesso un essudato gommoso e scuro (Michelon et al., 2007).

#### Malattia di Petri o “Black goo”

La malattia di Petri, causata da *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum*, può insorgere in campo o costituire l'evoluzione della malattia delle venature brune delle barbatelle. La malattia, se colpisce viti giovani, dal primo anno di età in poi, causa una crescita, parzialmente o totalmente, stentata della pianta. Sono stati osservati altri vari sintomi causati da questa malattia, come per esempio il blocco completo dello sviluppo, clorosi fogliare e graduale declino del vigore e della resa. In qualche caso la malattia può degenerare provocando addirittura la morte della pianta, mentre nel caso in cui la pianta continua a vegetare, con il passare del tempo la malattia può evolvere in esca giovane e/o in esca propria. In sezione trasversale la pianta presenta un anello nero attorno ad un midollo anch'esso di colore scuro, oppure macchie nere diffuse o disposte a mezzaluna nel legno del tronco e dei tralci. Dai vasi corrispondenti alle lesioni fuoriesce spesso un liquido gommoso e scuro (Michelon et al., 2007).



Goccioline di essudato che fuoriescono dai vasi colonizzati da *Phaeomoniella chlamydospora* e *Phaeoacremonium aleophilum* (Michelon et al., 2007).

### Esca giovane

L'esca giovane solitamente è causata da *Phaeoconiella chlamydospora* ed a volte anche da *Phaeoacremonium aleophilum*. La malattia si presenta esternamente con i caratteristici sintomi fogliari dell'esca e, internamente, le già descritte striature bruno-nerastre; colpisce prevalentemente le giovani piante di vite, di 3-4 o più anni. Si ipotizza che l'esca giovane sia la conseguenza dell'evoluzione della malattia delle venature brune delle barbatelle o quella della malattia di Petri, quando questa non causa la morte della vite. Nonostante tutto ciò che è stato detto, l'esca giovane può comunque insorgere anche in campo nel caso di infezioni su viti sane (Michelon et al., 2007).



Tipici sintomi fogliari di esca su una vite giovane di Cabernet Sauvignon (Michelon et al., 2007).

### Carie bianca

È la conseguenza dell'azione di *Fomitiporia mediterranea*, che degrada soprattutto la lignina (che è di colore scuro) e solo parzialmente la cellulosa (di colore chiaro). Il legno assume le sembianze di una massa spugnosa, friabile, di colore bianco-giallastro. Tutt'intorno la zona cariata è presente una linea scura e si espande fino alla corteccia in dove si possono formare degli spacchi longitudinali. Sono stati osservati casi dove sembra che la pianta non manifesti il sintomo per alcuni anni, ma questo non è stato ancora dimostrato da nessuna prova sperimentale; in ogni caso, una pianta malata non può essere risanata in nessun modo, quindi la sua presenza in vigneto costituisce una possibile fonte di inoculo per una probabile propagazione della malattia (Michelon et al., 2007).





Carie bianca (Michelon et al., 2007).

### Esca propria

Questa malattia avviene con la presenza di tutti e tre i principali funghi che si ritiene siano responsabili dell'esca: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* e *Fomitiporia mediterranea*. Solitamente l'esca propria si manifesta su viti mature e può rappresentare l'ultima evoluzione delle sindromi precedentemente descritte. I sintomi si distinguono in cronici e in acuti. L'infezione della pianta può partire dal vivaio, per esempio direttamente dalle piante madri infette o durante la formazione delle barbatelle, oppure in vigneto mediante i tagli di potatura. Si pensa che la malattia delle venature brune delle barbatelle possa originarsi in vivaio e svilupparsi in campo con la malattia di Petri, l'esca giovane e l'esca propria (Michelon et al., 2007).

### **12.5 Sindrome cronica**

La forma cronica si presenta esternamente con alterazioni che riguardano soprattutto gli organi verdi della pianta, ma anche ferite interne nel tronco e nelle branche, che possono causare un graduale disseccamento dei tralci e con l'avanzare dell'infezione la pianta subirà una prematura caduta delle foglie. Spesso piante malate non presentino sintomi esterni anche per molti anni, di conseguenza la prevenzione è fondamentale nell'evitare conseguenze negative in campo, quindi effettuare rilievi su un periodo di tempo lungo è importante per avere un chiaro quadro della situazione in vigneto.

### Foglie e tralci

I sintomi si presentano dopo la fioritura, durante l'estate o nel primo autunno. Tra le nervature principali, che mantengono sempre il colore verde, spuntano macchie clorotiche, piccole e isolate, poi si ingrandiscono e si evolvono in ampie macchie giallastre che virano al rosso-bruno prima di seccare durante la stagione più calda; attribuendo così alle foglie una caratteristica tigratura. Nei tralci colpiti si può osservare un ritardo nel processo di lignificazione, oppure un germogliamento stentato delle gemme, con graduale perdita di turgore, che infine causa il completo disseccamento del tralcio. (Michelon et al., 2007).



Caratteristica tigratura nelle foglie (Michelon et al., 2007).

### Grappoli

La malattia si manifesta colpendo solo la buccia di pochi acini per grappolo, con la formazione di macchie puntiformi bruno-violacee sparse più o meno irregolarmente che vanno a costituire ampie bande longitudinali pochi giorni prima dell'invasatura. Solitamente i grappoli disseccano completamente o solo parzialmente, ma sono stati osservati alcuni casi in California, dove gli acini manifestavano lo sviluppo di macchie nere, chiamate "Black measles". Nei casi più gravi l'acino può diventare flaccido, raggrinzire e presentare delle spaccature longitudinali, che attirano insetti o marciumi vari. (Michelon et al., 2007).



Macchie nere su grappolo d'uva e un grappolo raggrinzito (*Michelon et al., 2007*).

### Legno

I primi sintomi sono la comparsa di venature nere longitudinali (che in sezione trasversale appaiono come punteggiature), isolate o riunite in piccoli gruppi ed inoltre possono originarsi vari imbrunimenti del legno (settori brunastrì, con legno più o meno duro). In seguito, è facilmente visibile, sezionando longitudinalmente o trasversalmente le branche ed il fusto ammalati, il sintomo più noto, la carie bianca del legno. Nei casi più gravi, il legno cariato può dare origine a profonde fenditure longitudinali, e la maggior parte delle volte, la porzione di vite interessata è il legno delle parti più alte del fusto, infatti è raro si possa sviluppare sotto il punto di innesto. Nei vigneti giovani, all'origine del fenomeno ci sono, prevalentemente, le ferite d'innesto (*Michelon et al., 2007*).

### **12.6 Sindrome acuta**

Le viti colpite da questa forma della malattia manifestano, già a partire dal mese di giugno, improvvisi disseccamenti, che possono comprendere le singole branche oppure la pianta intera, del fogliame e/o dei grappoli. La pianta può sopravvivere e riprendere a vegetare, emettendo polloni dalla parte inferiore del tronco, oppure può degenerare con la morte improvvisa della vite.

La causa scatenante di questa sindrome può essere ricondotta alla traslocazione all'interno della pianta di sostanze tossiche, prodotte dai funghi del mal dell'esca, originate nei tessuti alterati. Le sostanze tossiche, trasportate velocemente tramite il

sistema vascolare raggiungono la chioma, dove si raggruppano in concentrazioni tali a dar luogo ad azioni tossiche. Le fitotossine individuate nelle viti attaccate da *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, sono lo scitalone, l'isosclerone e il pullulano, che sono correlati alle zone dove compaiono gli imbrunimenti nelle parti di legno alterato, nelle macchie clorotiche e nella deformazione della lamina fogliare. Mentre *Fomitiporia mediterranea* è risultato essere capace di sintetizzare vari enzimi, tra cui: laccasi, endo-glucanasi,  $\beta$ -glucosidasi, fenolossidasi, perossidasi, fosfatasi acida ed idrolasi (Michelon et al., 2007).



Forma apoplettica (Pollini and Ponti, 2018)

### 12.7 Controllo chimico

Da quando l'arsenito di sodio è stato ritirato dal commercio, non sono più state individuate delle efficaci strategie di lotta. L'arsenito di sodio, considerato l'unico prodotto di sintesi in grado di contrastare questa malattia, agisce accumulandosi nei tessuti e probabilmente ostacolando lo sviluppo dei funghi, con una modalità ancora sconosciuta; la comprensione del suo meccanismo di azione potrebbe essere molto utile al fine di individuare metodi di lotta curativi ed alternativi nei riguardi di questi patogeni. I derivati dell'arsenito, utilizzati inizialmente nella lotta alle tignole, sono vietati in Germania dal 1944, in Italia dal 1977 ed in Francia dal 2001. Non avendo, ad oggi, un

principio attivo efficace per curare la malattia, è necessario mettere a punto misure profilattiche per evitarne lo sviluppo in vivaio e in campo (*Michelon et al., 2007*).

### **13. Metodi alternativi per il controllo biologico del Mal dell'esca**

#### **13.1 Agenti biologici di controllo**

Gli agenti di difesa biologica di natura microbica sono funghi o batteri, capaci di contrastare lo sviluppo di un organismo patogeno. I meccanismi utilizzati dagli agenti di biocontrollo, nei confronti di un patogeno possono essere: (*Michelon et al., 2007*)

- antibiosi: l'antagonista produce una o più sostanze tossiche che inibiscono o causano la morte del patogeno; l'antibiosi si manifesta con la mancata germinazione delle spore e con ritardi nello sviluppo del micelio;
- competizione: avviene ogni volta che due organismi competono per la stessa risorsa (ad esempio spazio, sostanze nutritive, ossigeno). L'antagonista è caratterizzato dalla capacità di adattarsi molto bene all'ambiente ed alle sue variazioni, e di colonizzare rapidamente un substrato, rendendo perciò difficile una successiva colonizzazione da parte del patogeno;
- iperparassitismo: si ha quando un fungo ne parassitizza un altro, nutrendosi delle cellule vive dell'ospite oppure sfruttando il patogeno solo dopo averlo portato alla morte.

I funghi del genere *Trichoderma* attuano un'efficace azione antagonista nei confronti di molti funghi patogeni e per questo sono utilizzati come mezzo di lotta biologica. La loro efficacia è dovuta ad una forte capacità competitiva, alla produzione di antibiotici e altri metaboliti tossici e all'attività di parassitismo (*Michelon et al., 2007*). In relazione all'impiego di *Trichoderma* contro i funghi dell'esca, pare che l'applicazione dell'antagonista, in diverse fasi della produzione di barbatelle, produca condizioni favorevoli nella pianta, specialmente mediante un incremento quali-quantitativo dell'apparato radicale; che favorirebbe una migliore capacità da parte della vite di fronteggiare malattie legate a situazioni di stress. Prove condotte in Francia avevano già portato a risultati analoghi. Talee (portainnesto) sono state immerse in una sospensione di *Trichoderma* subito prima e appena dopo l'innesto delle marze. Il parassita è stato

aggiunto anche nel terreno al momento dell'impianto e sull'apparato radicale in periodi differenti. A distanza di tempo le piante trattate sono apparse più vigorose, con un apparato radicale più voluminoso e con una bassa presenza di funghi (*Michelon et al., 2007*).

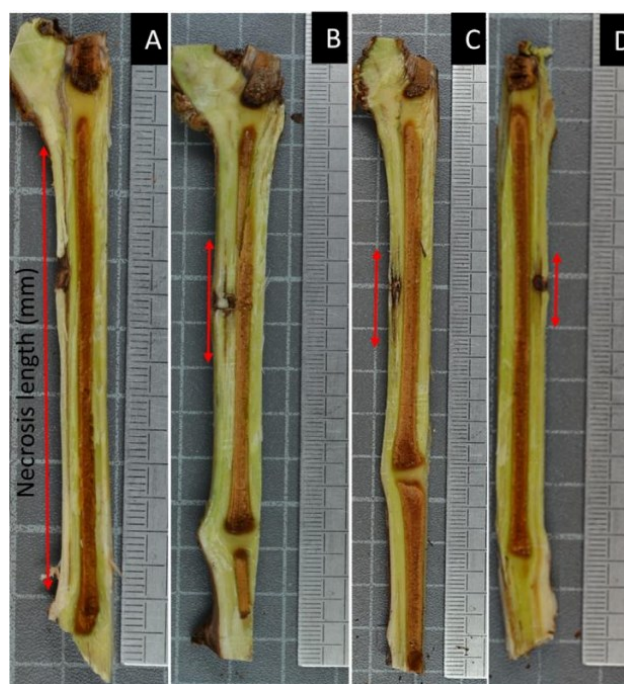
### **13.2 Ceppi batterici antagonisti di *Phaeomoniella chlamydospora***

L'attività antagonistica di 46 ceppi batterici isolati dai vigneti di Bordeaux è stata esaminata nei confronti di *Phaeomoniella chlamydospora*, un importante patogeno della vite coinvolto nel Mal dell'Esca. Gli obiettivi di questo studio erano: esaminare i 46 ceppi batterici isolati dalla vite per un antagonismo significativo contro *P. chlamydospora* e riconoscere i meccanismi di azione che causavano l'inibizione del patogeno da parte dei ceppi batterici più efficaci. Per di più, è stata valutata l'efficacia di controllo delle malattie dei batteri selezionati confrontando tre metodi di applicazione (ossia, co-inoculazione, inoculazione preventiva nel foro e inoculazione preventiva tramite inzuppamento del terreno) (*Haidar et al., 2016*). Tutti i ceppi sono stati isolati dalla vite, inclusi 35 ceppi dal tessuto legnoso e 11 ceppi dalla superficie dell'acino. Per il co-inoculo, una ferita fresca è stata immediatamente inoculata a goccia con 40 mL di sospensione batterica. Una volta che il liquido si è asciugato per 20-40 minuti a temperatura ambiente, il foro è stato inoculato con un tappo miceliale di *P. chlamydospora*. Nel metodo di inoculazione preventiva nel foro, la ferita fresca è stata inoculata a goccia come descritto sopra, ma sono stati lasciati trascorrere quattro giorni prima dell'inoculazione con il patogeno fungino. Nel metodo di inoculazione preventiva del terreno, le talee radicate sono state inoculate versando 50 mL di sospensione batterica sul colletto di ciascuna pianta. Per quest'ultimo metodo, i campioni sono stati forati lo stesso giorno del trattamento batterico. Le ferite trattate e non trattate in entrambi i metodi di inoculazione preventiva (cioè, nella buca e sul terreno) sono state rivestite con Parafilm® (pellicola Scellofrais) per la protezione prima e dopo l'inoculazione fungina (*Haidar et al., 2016*).

È stato condotto uno studio in vitro per determinare la potenziale secrezione di metaboliti volatili antimicotici da parte dei ceppi batterici che influivano nella crescita miceliale di *P. chlamydospora*, dopo 14 giorni di incubazione, sono stati esaminati due diametri di colonie perpendicolari per calcolare la percentuale di inibizione miceliale. Due ceppi batterici *B. pumilus* (S32) e *Paenibacillus sp.* (S19) sono stati selezionati per questo studio



a seguito della loro elevata attività antagonista nei confronti di *P. chlamydospora*, come indicato nei test biologici antecedenti. I composti volatili elaborati dai batteri sono stati raccolti tramite microestrazione in fase solida (SPME) (Haidar et al., 2016). In esperimenti successivi, i due ceppi sono stati applicati a talee di vite mediante co-inoculazione e inoculazione preventiva per valutare la loro capacità di indurre una difesa della pianta. In tutti i biotest di biocontrollo, tutte le talee (cv. Cabernet Sauvignon) inoculate con *P. chlamydospora* da sole e co-inoculate con un ceppo batterico e il patogeno, hanno manifestato lesioni necrotiche interne. Le lesioni si sono sviluppate sia sopra che sotto il punto di inoculazione.



Lesioni di necrosi osservate su talee di vite dovute a *P. chlamydospora* e/o effetto perforante. A) inoculato solo con *P. chlamydospora*. B) Co-inoculato con *P. chlamydospora* e *B. pumilus*. C) Co-inoculato con *P. chlamydospora* e *Paenibacillus* sp. D) Lesioni di necrosi dovute solo all'effetto perforante (Haidar et al., 2016).

Questi due controlli non trattati hanno presentato una differenza chiara e notevole nella lunghezza della necrosi del patogeno, ma hanno mostrato un effetto stimolante nutritivo del mezzo batterico sullo sviluppo del patogeno. Questi risultati hanno mostrato che il trattamento batterico, a prescindere dal metodo di applicazione, ha causato lesioni considerevolmente più piccole rispetto alle talee di controllo non trattate inoculate con il solo patogeno. La riduzione della lunghezza della lesione necrotica interna da parte dei

sette ceppi batterici selezionati variava dal 29,3% per *B. firmus* (S41) al 36,6% per *Paenibacillus sp.* (S18), confermando che questi ceppi batterici selezionati proteggevano efficacemente contro *P. chlamydospora* nel legno della vite e che l'effetto era indipendente dal metodo di inoculazione batterica. Il potenziale effetto dei ceppi batterici sulla crescita del micelio fungino si pensa sia dovuto all'azione di metaboliti diffusibili o composti volatili prodotti dai batteri (Haidar et al., 2016). I composti organici volatili batterici possono ridurre la crescita dei funghi, danneggiare le spore e le ife dei funghi e/o favorire la crescita delle piante. Diversi composti volatili prodotti dalle specie *Bacillus* e *Paenibacillus* hanno dimostrato di possedere attività antibatterica e/o antimicotica. Infatti, la microestrazione in fase solida (SPME) unita alla gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) permette l'analisi di una vasta gamma di composti volatili batterici. In confronto ai composti diffusibili, i metaboliti volatili potrebbero agevolare le interazioni tra microrganismi fisicamente separati. Una potenziale interazione antagonistica potrebbe facilmente verificarsi tra composti volatili prodotti da batteri endofiti e patogeni presenti nello stesso ambiente legnoso. Tutti i ceppi testati hanno dato origine a composti volatili con attività antifungine che variavano dal 34% al 74,3% (Haidar et al., 2016).

In questo studio è dimostrato per la prima volta l'effetto di 1-otten-3-olo (*Paenibacillus sp.*) e 2,5-dimetil pirazina (*B. pumilus*) nei confronti di *P. chlamydospora*, si tratta di composti antibiotici che costituiscono un altro importante meccanismo di inibizione che spiega l'efficacia dei batteri di biocontrollo. È stata osservata anche un'induzione della difesa della vite da parte dei batteri, soprattutto, nelle piante trattate solamente con batteri (*B. pumilus*), l'espressione di vari geni tra cui PR trascrittasi e il gene del callosio sintasi (VvCALS) è stata indotta quattro giorni dopo il trattamento batterico, suggerendo che la attivazione diretta dei processi di difesa della vite da parte di questo batterio. Per concludere, due dei ceppi batterici più efficienti originari dei vigneti, *B. pumilus* e *Paenibacillus sp.* sono potenti agenti biologici contro l'infezione da *P. chlamydospora* nella vite per prevenire i sintomi dell'esca. La produzione di composti volatili è stata identificata come una delle principali modalità di azione di questi due ceppi batterici. Per di più, specifiche risposte di difesa della vite sono state indotte in seguito al trattamento con ognuno di questi batteri da solo, in particolare nelle piante pretrattate con *B. pumilus*,



in cui l'induzione della resistenza nella vite era ancora più a lungo termine (Haidar et al., 2016).

### 13.3 Proprietà fungicide dell'acqua ozonizzata contro *Phaeoacremonium aleophilum*

Il presente studio indaga se l'acqua ozonizzata possa essere utilizzata per controllare la dispersione dei conidi del fungo associato all'esca *Phaeoacremonium aleophilum*. L'ozono si sta rivelando un'interessante alternativa per il controllo dei patogeni fungini e può essere utilizzato per controllare la malattia dell'esca. L'ozono disciolto nell'acqua (chiamata per comodità "acqua ozonizzata") è già utilizzato in agricoltura e nell'industria alimentare, con la funzione di colpire i microbi direttamente e/o attraverso i radicali liberi. Questi composti ossidano i lipidi delle pareti cellulari dei microrganismi e possono anche innescare la segnalazione di morte cellulare. Un ulteriore vantaggio dell'acqua ozonizzata è la sua bassa persistenza. Difatti, l'ozono si decompone rapidamente in diossigeno: il suo tempo di dimezzamento in acqua distillata è di 20-30 min (Pierron et al., 2015). L'ozono può decomporsi anche in radicali liberi, con un tempo di dimezzamento molto breve, dando origine ad acqua pura, il tutto legato a temperatura, pH e concentrazione dei radicali liberi. Questa varietà di composti ossidativi potrebbe spiegare anche l'effetto battericida, antivirale e fungicida acqua. Le proprietà fungicide dell'acqua ozonizzata sono state dapprima valutate *in vitro* esponendo le spore a diverse concentrazioni di acqua ozonizzata (2,2, 4,5 o 13,5 g/m<sup>3</sup> di ozono disciolto in acqua) e osservando il tasso di germinazione su piastra. In seguito è stato condotto un approccio *in planta* su talee di vite di (cv. clone di Cabernet Sauvignon). *P. aleophilum* conidia è stato inoculato nelle ferite di potatura, che sono state poi ozonizzate (4,5 g/m<sup>3</sup>) o acqua sterile. Il DNA di *P. aleophilum* è stato quantificato mediante una reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR) 4 e 9 settimane dopo l'inoculazione. L'effetto dell'acqua ozonizzata sull'espressione genica di difesa delle piante è stato monitorato mediante qPCR con trascrittasi inversa (RT-qPCR) 48 ore dopo il trattamento. I risultati denotano che l'acqua ozonizzata sopprime totalmente la germinazione delle spore *in vitro*. Inoltre, a 9 settimane dall'inoculazione, lo sviluppo fungino è stato notevolmente ridotto del 50% *in planta*. L'analisi RT-qPCR mostra che l'acqua ozonizzata non ha indotto geni correlati alla difesa delle piante 48 ore dopo il trattamento. Le proprietà fungicide dell'acqua ozonizzata e l'assenza di induzione

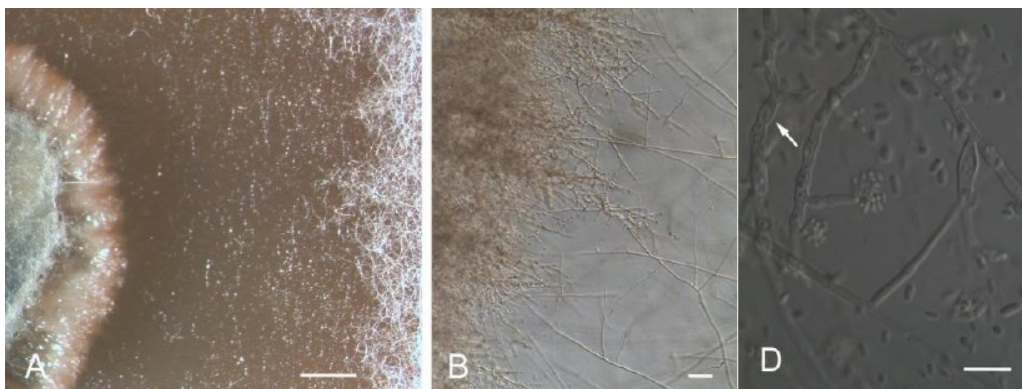
genica *in planta* rendono tuttavia l'acqua ozonizzata un candidato promettente per limitare l'infezione della vite da *P. aleophilum* nei vivai (Pierron *et al.*, 2015).

#### **13.4 *Epicoccum layuense* come potenziale agente di controllo biologico dei funghi associati all'esca nella vite**

*Epicoccum* è un genere di ascomiceti spesso associato al micobioma della vite. *Epicoccum spp.* si trovano nel suolo, oltre che nel bosco, dove interagiscono sia con la pianta che con altri endofiti e patogeni (Del Frari *et al.*, 2019). Questo studio ha analizzato l'interazione tra *Epicoccum spp.* e i tre funghi associati al Mal dell'esca, con l'obiettivo di definire se sono candidati idonei per il controllo biologico. Uno screening condotto in vitro, mediante doppia coltura, ha dimostrato che tutti gli *Epicoccum spp.* ha inibito la crescita dei patogeni *Phaeoconiella chlamydospora* e *Fomitiporia mediterranea*, mentre solo alcuni di essi hanno inibito il minimo *Phaeoacremonium aleophilum*. *Epicoccum layuense* E24, identificato come l'antagonista più efficace, è stato testato su talee di vite radicata delle cultivar Cabernet Sauvignon e Touriga Nacional, in condizioni di serra, contro *P. chlamydospora*.

*Epicoccum spp.* isolati sono stati testati in doppia coltura contro due funghi associati all'esca, *P. chlamydospora* CBS 161.90 e un ceppo locale di *F. mediterranea*. Tutte le possibili combinazioni di patogeno-*Epicoccum spp.* sono stati testati, così come ogni fungo da solo o contro sé stesso. Sono stati misurati trenta conidi di *P. chlamydospora* e *Fomitiporia mediterranea* e sono state calcolate le medie, a intervalli di confidenza del 95%. Le dimensioni delle spore sono presentate come valori medi con valori estremi tra parentesi (Del Frari *et al.*, 2019). Gli esperimenti condotti in vivo si sono concentrati su un isolato di *E. layuense*, precisamente 'E24', selezionato dai saggi in vitro come antagonista con le migliori prestazioni. Gli esperimenti sono stati condotti su piante in vaso di vite. Precedentemente all'inoculazione, le talee sono state disinfettate in superficie con etanolo al 70%. I dischi di micelio sono stati inseriti in una ferita (4 mm di diametro, 4 mm di profondità) effettuate nel legno con un trivellatore di sughero, 40 mm sotto il germoglio superiore. Dopo l'inoculazione, le piante sono state posizionate in modo casuale in una serra munita di ventilatore e sistema di evaporazione a tampone (24 ± 5°C giorno/18°C notte) e annaffiate tre volte alla settimana. Tre mesi dopo l'inoculazione dei patogeni, le piante sono state ispezionate visivamente per la comparsa di sintomi fogliari

ed è stata registrata la lunghezza dei germogli. Successivamente, le viti sono state estirpate, private della loro corteccia e sono state applicate sezioni longitudinali per determinare la presenza ed entità dei sintomi nel legno (striatura bruna), a partire dai punti di inoculazione. *Epicoccum mezzettii* (E17) e tutti i ceppi di *E. layuense* hanno inibito la crescita di *P. chlamydospora* e *F. mediterranea*, dopo 14 giorni di crescita, mediante la doppia coltura. L'interazione *Epicoccum* - *P. chlamydospora* era contraddistinta da una grande riduzione delle dimensioni della colonia del patogeno, dove la riduzione media è stata del 71,0%. Per quanto riguarda *F. mediterranea*, *E. layuense* (E24) si è dimostrato uno degli inibitori più efficaci, diminuendo le dimensioni della colonia del 71,8%. Tutti gli isolati di *Epicoccum* si sono dimostrati efficaci nell'inibire la crescita miceliale di questo patogeno, nonostante vi fossero differenze significative tra loro (Del Frari et al., 2019).



*Phaeoconiella chlamydospora* isolato CBS 161.90 (lato sinistro) ed *E. layuense* (lato destro) nell'area di interazione all'ottavo giorno (A); ife di *P. chlamydospora* con clamidospore gonfie (freccia) e un aumento della sporulazione nella linea di contatto con *E. layuense* (BD) rispetto a *P. chlamydospora* che cresce da sola (Del Frari et al., 2019).

Lo studio mostra un'interazione specie-specifica di *Epicoccum spp.* su *P. chlamydospora*, e *F. mediterranea*, dove *E. mezzettii* sovrasta tutti e i patogeni, mentre per *E. layuense* si è verificata un'inibizione reciproca. La rapida crescita di *E. mezzettii* ed *E. layuense*, insieme alla diffusione nel mezzo di coltura dei pigmenti, suggeriscono che l'antagonismo sia principalmente dovuto alla competizione per lo spazio, i nutrienti e probabilmente l'interazione chimica. Il diverso comportamento dei patogeni riportato in risposta alla presenza di *E. layuense* E24, è stato l'aumento della produzione di conidi lungo la linea di contatto in *P. chlamydospora* e la formazione di filamenti ifali, la degradazione delle

punte ifali e la formazione di connessioni a morsetto in *F. mediterranea*, sono considerate interazioni antagoniste in altri studi in cui diversi funghi si sono confrontati. Tuttavia, lo studio approfondito di queste interazioni necessita di ulteriori approfondimenti (*Del Frari et al., 2019*). Nell'esperimento in serra, la sintomatologia del legno causata da *P. chlamydospora*, durante l'interazione con *E. layuense* E24, è stata sempre inferiore in entrambe le cultivar di vite, con una riduzione del 67,5% della lunghezza delle striature del legno marrone nel Cabernet Sauvignon e del 73,8% nella Touriga Nacional. L'esame del legno a diverse distanze dal punto di inoculazione del patogeno ha aumentato la comprensione del loro successo nella colonizzazione del legno. Quando la presenza di agenti patogeni è simile a quella dei controlli vicino al punto di inoculazione (15 mm sotto), si riduce notevolmente più in basso nel legno (45 mm). Ciò suggerisce che la presenza di *E. layuense* E24 abbia rallentato o bloccato completamente la diffusione dei patogeni. Combinando la lunghezza delle striature brune del legno, è interessante rimarcare quanto velocemente *P. chlamydospora* possa colonizzare i tessuti legnosi, circa 17 mm/mese, e questo dimostra la gravità quando delle infezioni nel vivaio, dove i patogeni possono colonizzare completamente le talee appena radicate nel giro di pochi mesi. Sono necessarie ulteriori indagini per determinare se il successo della colonizzazione del legno da parte di *E. layuense* E24 e l'antagonismo osservato variano nel tempo (es. invecchiamento della vite) e nelle condizioni del campo (es. stagionalità, condizioni meteorologiche estreme). In conclusione, *E. layuense* E24 è un promettente candidato per il controllo biologico e la sua futura applicazione nei vivai e nei giovani vigneti è il naturale seguito di questo studio, nella ricerca finale di tenere sotto controllo questi patogeni correlati al Mal dell'esca (*Del Frari et al., 2019*).

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone, senza le quali questo lavoro di tesi non esisterebbe nemmeno.

Ringrazio di cuore la mia famiglia. Grazie per avermi sempre sostenuto ogni giorno e per avermi permesso di portare a termine gli studi universitari.

Un ringraziamento particolare va alla mia fidanzata Rebecca, che con la sua pazienza, idee e riflessioni, mi ha dato la forza e la motivazione per esprimere il meglio di me stesso.

Grazie.

## BIBLIOGRAFIA

- Borgo Michele** “*Avversità della vite - Parte Prima – Guida al riconoscimento*”, ©Gianni Sartori Editore, p. 125-126, 2016.
- Colas Steven, Afoufa-Bastien Damien, Jacquens Lucile, Clément Christophe, Baillieul Fabienne, Mazeyrat-Gourbeyre Florence, Monti-Dedieu Laurence** *Expression and In Situ Localization of Two Major PR Proteins of Grapevine Berries during Development and after UV-C Exposition*. PLoS ONE 7(8): e43681, 2012.
- Dagostin Silvia, Formolo Tiziano, Giovannini Oscar, Pertot Ilaria and Schmitt Annegret** *Salvia officinalis extract can protect grapevine against Plasmopara viticola*. *Plant disease*, 94(5), p. 575-580. doi: 10.1094/PDIS-94-5-0575. 2010.
- Del Frari G., Cabral, A., Nascimento, T., Boavida Ferreira, R., & Oliveira, H.** *Epicoccum layuense a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine*. *PLoS One*, 14 (3). e0213273. doi: 10.1371/journal.pone.0213273. 2019.
- Ebrahim Saboki, K. Usha and Singh Bhupinder** *Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, p. 1043-1054, 2011.
- Evert Ray F., Eichhorn Susan E.** *La biologia delle piante di Raven*. Zanichelli, p. 63-68, 2013.
- Gadoury David M., Sapkota Surya, Cadle-Davidson Lance, Underhill Anna, McCann Tyler, M. Gold Kaitlin M., Gambhir Nikita, Combs David B. and Nyrop Jan P.** *Use of Germicidal UV Light to Suppress Grapevine Diseases and Arthropod Pests*. In: *BIO Web of conferences* (Vol. 50, EDP Sciences, p. 01002), 2022.
- Haidar Rana, Roudet Jean, Bonnard Olivier, Dufour Marie Cécile, Corio-Costet Marie France, Fert Mathieu, Gautier Thomas, Deschamps Alain and Fermaud Marc** *Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen Phaeoemoniella chlamydospora involved in grapevine trunk diseases*. *Microbiological research*, 192, p. 172-184, 2016.
- Houston Kelly, Tucker Matthew R., Chawdhury Jamil, Shirley Neil and Little Alan** *The Plant Cell Wall - A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions*. *Frontiers in plant science*, 7, p. 984. doi: 10.1016/j.micres.2016.07.003. 2016.
- Jacometti M.A., S.D. Wratten and M. Walter** *Alternatives to synthetic fungicides for Botrytis cinerea management in vineyards*. © *Australian journal of Grape and Wine research*, 16, p. 154-172, 2009.
- Latorre Bernardo A., Elfar Karina, and Ferrada Enrique E.** *Gray mold caused by Botrytis cinerea limits grape production in Chile*. *Ciencia e investigación agraria*, 42(3): p. 305-330. doi: 10.4067/S0718-16202015000300001. 2015.

**Maluleke Evelyn, Jolly Neil Paul, Patterson Hugh George and Setati Mathabatha Evodia** *Antifungal activity of non-conventional yeasts against Botrytis cinerea and non-Botrytis grape bunch rot fungi. Frontiers in Microbiology*, 13, p. 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2022.986229. 2022.

**Marangi Matteo (2020)** *Microrganismi patogeni: P/MAMPs-DAMPs. Microbiologia Italia*. <https://www.microbiologiaitalia.it/didattica/microrganismi-patogeni-p-mamps-damps/>

**Michelon Lorenza, Pellegrini Chiara, Pertot Ilaria** *Il mal dell'esca della vite*. ©Istituto Agrario di San Michele all'Adige – Centro SafeCrop, p. 12-35, 2007.

**Newman Mari-Anne, Sundelin Thomas, Nielsen Jon T. and Erbs Gitte** *MAMP (Microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. Frontiers in plant science*, 4, 139. doi: 10.3389/fpls.2013.00139. 2013.

**Pierron, R. J. G., Pages, M., Couderc, C., Compant, S., Jacques, A., and Violleau, F.** *In vitro and in planta fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus Phaeoacremonium aleophilum. Scientia Horticulturae*. (Amsterdam) Vol. 189, p. 184-191, 2015.

**Pertot Ilaria, Dagostin Silvia, Ferrari Alessandro, Gobbin Davide, Prodorutti Daniele, Gessler Cesare** *La peronospora della vite*. © Istituto Agrario di San Michele all'Adige – Centro Safecrop, p. 10-49. 2007.

**Pollini Aldo, Ponti Ivan** “*Avversità delle piante coltivate. Diagnosi, prevenzione e difesa*”, ©L'Informatore agrario s.r.l., 2018.

**Rienth, M., Crovadore, J., Ghaffari, S., & Lefort, F.** *Oregano essential oil vapour prevents Plasmopara viticola infection in grapevine (Vitis Vinifera) and primes plant immunity mechanisms. PLoS One*, 14(9), e0222854, p. 11-12, 2019.

**Wang Xuefei, Glawe Dean A., Kramer Elizabeth, Weller David, and Okubara Patricia A.** *Biological Control of Botrytis cinerea - Interactions with Native Vineyard Yeasts from Washington State. Phytopathology®*, vol. 108, p. 691–701, 2018. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0306-R>.

**Williamson Brian, Tudzynski Bettina, Tudzynski Paul and Jan A.L. Van Kan** *Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease”. Molecular Plant Pathology*, 8: p. 561-580, 2007.