ROMEO™, BIOFUNGICIDA A BASE DI CEREVISANE PER IL CONTROLLO DELLE PRINCIPALI MALATTIE DELLA VITE E DI ALTRE COLTURE: ASPETTI GENERALI

P. PUJOS[1], A. MARTIN[1], F. FARABULLINI[2], M. PIZZI[2]
[1] Agro-Levures et Derivés - 14 Rue D'Alembert, 59000 Lille, France
[2] Sumitomo Chemical Italia – Via Caldera 21, 20153 Milano, Italia
michele.pizzi@sumitomo-chem.it

RIASSUNTO

Romeo™ è un nuovo biofungicida a base di cerevisane, frazione inerte di un ceppo non modificato geneticamente del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. In questa prima pubblicazione sul prodotto si presentano le caratteristiche fisico-chimiche, gli aspetti tossicologici ed eco-ambientali, i risultati dei test di laboratorio volti alla determinazione del meccanismo d'azione. Cerevisane dimostra un'elevata attività di stimolo della produzione di composti fenolici e nell'attivazione del metabolismo ossidativo nella vite, con una conseguente induzione di resistenza alle principali malattie fungine della vite. Romeo è stato saggiato in Italia ed in Europa prevalentemente su vite per il controllo di *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* e *Erysiphe necator*, con risultati paragonabili a quelli degli standard biologici. Le prove di campo sono descritte in una specifica pubblicazione, in questo Volume.
Parole chiave: ISR, peronospora, oidio, botrite

SUMMARY

ROMEO™, CEREVISANE-BASED BIOFUNGICIDE AGAINST THE MAIN DISEASES OF GRAPE AND OF OTHER CROPS: GENERAL DESCRIPTION

Romeo™ is a biofungicide whose active ingredient is cerevisane, an inert fraction from a selected non-GMO strain of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Physico-chemical properties, toxicological and environmental aspects and the results of lab tests aimed at describing its mode of action are described in this first work about the product. *Cerevisane* proves to be very active in stimulating the production of phenolic compounds and it can activate the oxydative metabolism in vine cells, thus enhancing the plant resistance mechanism against the main vine diseases. Romeo was tested in Italy and in other European countries mainly on vine against *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*: results were comparable to other biorational compounds. The results of field trials are reported in a specific work in this Volume.
Keywords: SRI, downy mildew, powdery mildew, grey mould

INTRODUZIONE

Molte sostanze appartenenti alla categoria degli agrofarmaci di origine biologica, sono state recentemente introdotte sul mercato italiano ma poche sono riuscite a conquistarsi quote di mercato significative e paragonabili a quelli di prodotti di origine naturale di successo quale ad esempio il *Bacillus thuringiensis*.

Il livello di contenimento delle avversità, non sempre paragonabile a quello dei prodotti chimici, la limitata *shelf life* ed in qualche caso la difficoltà di utilizzazione (limitazioni nella combinazione con altri ingredienti attivi, rigide condizioni di stoccaggio, etc..), spesso comportano una certa diffidenza da parte degli operatori del settore verso questa tipologia di prodotti. In questo senso, cerevisane (sostanza su cui è basato Romeo™) potrebbe segnare un'inversione di tendenza, in virtù dell'elevata attività di contenimento dei patogeni, della

shelf life paragonabile agli agrofarmaci convenzionali ed alla facilità d'impiego. Il formulato si caratterizza inoltre per un processo industriale di produzione che garantisce un'elevata standardizzazione del formulato.

Il prodotto, brevettato a livello mondiale, è sviluppato dalla società francese "Agro-Levures et Derivés", specializzata in prodotti a base di lieviti e in biostimolanti. In Italia lo sviluppo del prodotto è stato realizzato in collaborazione con Sumitomo Chemical Italia. La registrazione europea è attesa per il 2014-2015.

In questo articolo vengono descritte le caratteristiche della sostanza attiva e, attraverso alcuni test di laboratorio, il suo meccanismo di azione ed i potenziali campi applicativi.

1 – Profilo di Romeo e di cerevisane

Generalità[1]

La sostanza attiva del formulato Romeo è cerevisane, una frazione inerte derivante da un ceppo selezionato (non geneticamente modificato) del lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Il formulato contiene 92,4 % di cerevisane. Quando applicato su foglie e frutti, cerevisane induce una difesa naturale delle piante che consente di proteggerle contro alcune fra le principali avversità fungine e batteriche.

Proprietà fisico chimiche

Cerevisane si presenta sotto forma di polvere beige non infiammabile. Il formulato è una polvere bagnabile (WP), caratterizzata da elevata stabilità (tre anni di *shelf life*), elevata solubilità in acqua ed assenza di schiumosità.

Aspetti tossicologici

S. cerevisiae è un lievito il cui impiego è da sempre legato alla storia dell'uomo, in particolare nel campo delle industrie agrarie (prodotti da forno, birra, vino). Il lievito è ubiquitario in natura, è naturalmente presente su frutta e ortaggi e non è mai stato associato a patologie dell'uomo o degli animali. Analogamente, nessun rischio di tossicità acuta (orale, dermale o per inalazione) è stato evidenziato per cerevisane. Questa sostanza non è irritante per la pelle e per gli occhi e non provoca sensibilizzazione cutanea; essa inoltre non è cancerogena, non è mutagena o teratogena, non ha effetti neurotossici o immunosoppressori e non interferisce con il metabolismo del sistema endocrino. La lunga esposizione a cerevisane non comporta alcun effetto nel medio e lungo periodo e pertanto la sostanza risulta innocua per gli operatori e quanti, nel rispetto delle buone pratiche agricole, sono esposti indirettamente al prodotto.

In virtù di quanto sopra riportato, la registrazione del formulato non dovrebbe avere alcuna classificazione tossicologica né riportare frasi di rischio[1].

Residui

Saccharomyces cerevisiae (e di conseguenza la sua frazione cerevisane), essendo largamente presente ed utilizzato nell'alimentazione umana ed in virtù della norma sui livelli delle sostanze contenute negli alimenti il cui contenuto è basato sul principio del "quantum satis" (Direttiva 95/2/EC relative agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dolcificanti), non presenta alcuna problematica rilevante per quel che riguarda i residui.

---

[1] Il prodotto è attualmente in corso di registrazione. Alcune informazioni fornite in questo articolo potrebbero subire delle variazioni nel corso delle differenti fasi valutative.

Di conseguenza non ha alcun valore scientifico determinare indici quali l'ADI (*Acceptable Daily Intake*), il TMDI (*Theoretical Maximum Daily Intake*) e l'MRL (*Maximum Residue Level*).

Destino e comportamento nell'ambiente

Saccharomyces cerevisiae è un microrganismo ubiquitario che ha colonizzato numerosi *habitat* in differenti condizioni eco-ambientali (suoli, foreste, colture, acque superficiali, aria, etc.). Quando una cellula di *S. cerevisiae* muore, interviene un processo naturale di degradazione e, la frazione cerevisane della cellula, viene liberata e progressivamente degradata. Se ne deduce che cerevisane è presente nell'ambiente ogni qualvolta è presente *S. cerevisiae*.

La decomposizione di cerevisane nell'ambiente, dà luogo a materiale organico (proteine, carboidrati) ed alcune componenti minerali; tutte sostanze largamente diffuse nell'ambiente.

Ai dosaggi d'impiego, nessun fenomeno di bioaccumulo è possibile, considerando i quantitativi naturalmente presenti nel terreno. Inoltre, analogamente a *S. cerevisiae*, cerevisane non è mobile nel suolo e pertanto non esiste alcun rischio di accumulo nelle acque di falda.

Effetti su organismi non-target

S. cerevisiae ed indirettamente cerevisane, è utilizzato, per i suoi favorevoli effetti probiotici nel mangime per uccelli e pesci.

Cerevisane non è tossico per *Daphnia magna* e *Pseudokirchneriella subcapitata*. La EC50 per *Daphnia* è > 200 mg/L. La ErC50 a 72 ore e la EyC50 per le alghe sono pari rispettivamente a 194,4 mg/L e 81,6 mg/L. I residui di degradazione di cerevisane su suolo e acqua non sono dannosi per gli organismi acquatici. *S. cerevisiae* e indirettamente cerevisane, sono utilizzati come *pabulum* integrativo in apicoltura ed è quindi evidente che il prodotto non è pericoloso per le api.

S. cerevisiae è inoltre presente in tutti i suoli del pianeta ed è ampiamente dimostrato il suo ruolo nella dieta dei lombrichi e la relazione simbiotica fra i due organismi. Per ragioni analoghe cerevisane, essendo naturalmente presente nel suolo e non essendovi evidenze di effetti di lungo periodo su funghi e batteri, non rappresenta un pericolo per la microflora terricola.

Per quanto sopra riportato, cerevisane dovrebbe essere inclusa fra le sostanze a basso rischio e nessuna limitazione dovrebbe essere indicata in seguito al processo di inclusione del prodotto nell'allegato 1 del Regolamento UE No.1107/2009.

2 – Studi sui meccanismi d'azione

Cerevisane è un induttore sistemico di resistenza che agisce preventivamente. Favorisce la liberazione di composti correlati ai meccanismi di difesa della pianta, preparandola a proteggersi dagli attacchi di funghi e batteri patogeni.

Il meccanismo d'azione di cerevisane è stato oggetto di alcuni studi condotti dall'INRA di Dijon nel 2010 che riportiamo nelle sezioni a), b) e c) di questo paragrafo. In particolare nel corso di due test specifici, è stata evidenziata la sua capacità di stimolare la produzione, da parte della pianta, di fitoalessine e H_2O_2 (perossido di idrogeno), composti direttamente coinvolti nei meccanismi endogeni di difesa della pianta (Langcake, 1981; Yoshikawa *et al.*, 1987; Apostol *et al.*, 1989; Lamb *et al.*, 1997; Hammerschmidt, 1999; Benhamou, 2009). In un terzo studio infine, è stato direttamente evidenziato come, stimolando la produzione delle sostanze sopra menzionate, cerevisane sia in grado di svolgere un'attività di contenimento di alcuni patogeni.

a) Produzione di sostanze fenoliche (fitoalessine)

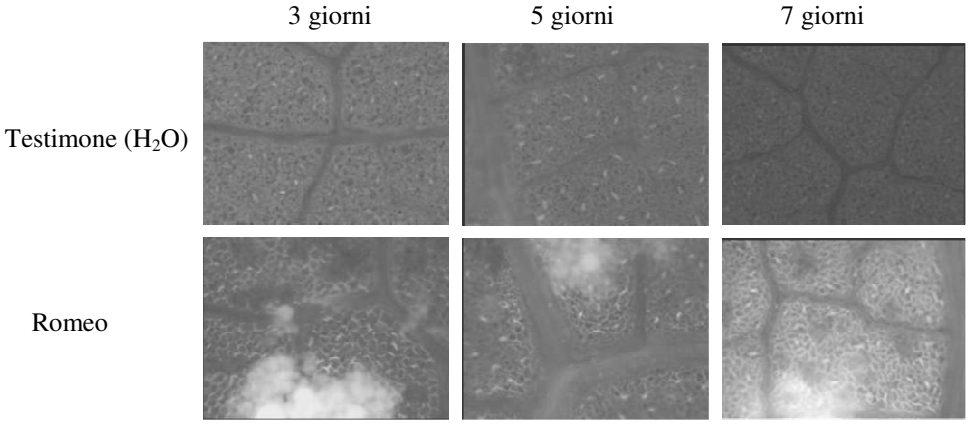
La sperimentazione è stata realizzata su piante di vite (allo stadio di 5-6 foglie, varietà Marselan) coltivate in serra. Ogni tesi comprendeva tre piante.

Queste piante sono state trattate con Romeo (2,5 g/L) su entrambe le pagine fogliari; successivamente alcune piante sono state inoculate (48 h dopo il trattamento) con una soluzione di *Plasmopara viticola* (10^4 sp/mL).

La produzione di fitoalessine è stata osservata su dischi fogliari a 3, 5 e 7 giorni dopo il trattamento. Questi dischi sono stati collocati fra vetrino e coprivetrino in una soluzione di Tween 0,1%, e la pagina dorsale è stata esaminata con un microscopio a fluorescenza dotato di blocco filtro di tipo A (λex: 340 a 380 nm, λem: 425 nm).

La produzione di sostanze fenoliche è stata osservata in piante trattate con Romeo in tutti i rilievi, mentre nelle tesi non trattate e non inoculate non si è osservata alcuna produzione di sostanze fenoliche (Figura 1). Quando le piante non trattate sono state inoculate con *P. viticola*, la produzione di fitoalessine è stata molto bassa rispetto alle piante trattate (Figura 2A).

Figura 1. Autofluorescenza (UV) di tessuti fogliari di vite a 3, 5 e 7 giorni dopo il trattamento



b) Produzione di H_2O_2

Il test è stato realizzato su piante di vite allo stadio di 5-6 foglie (varietà Marselan), coltivate in serra. Ogni tesi comprendeva sei piante.

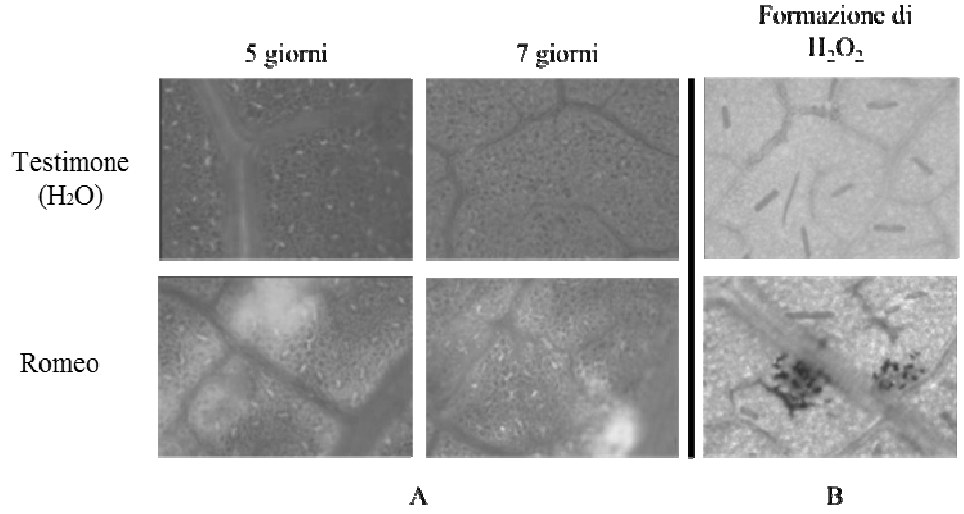
Queste piante sono state trattate con Romeo (2,5 g/L) su entrambe le pagine fogliari e successivamente inoculate (48 h dopo l'applicazione) con una soluzione di *P. viticola* (10^4 sp/mL).

Quattro giorni dopo il trattamento, le foglie sono state raccolte e poste dapprima in una soluzione di DAB (3,3'diaminobenzidine) e successivamente sotto una luce controllata (80 $\mu mol/m^2/s$) per 5 ore. In seguito i dischi fogliari (0,7 cm) sono stati raccolti, immersi in metanolo puro e chiarificati con acido cloridrico prima della preparazione del vetrino. Le osservazioni sono state fatte al microscopio retroilluminato con luce bianca. H_2O_2 è stata individuata sotto forma di precipitati scuri. La produzione di H_2O_2 è stata osservata in piante trattate con Romeo mentre alcun precipitato è stato riscontrato nelle tesi non trattate (Figura 2B).

c) Studi sugli effetti di cerevisane sui funghi

Gli effetti di Romeo sullo sviluppo di *Erysiphe necator* e *P. viticola* sono stati osservati al microscopio dai ricercatori dell'INRA di Dijon.

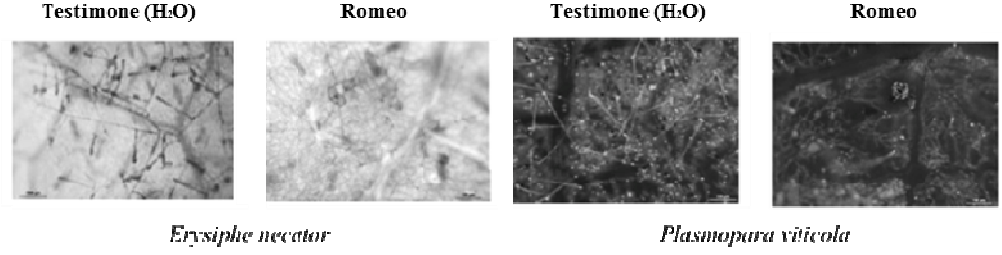
Figura 2. (A) Autofluorescenza (UV) di tessuti fogliari di vite inoculati con *P. viticola*, a 5 e 7 giorni dopo il trattamento con Romeo. (B) Induzione della produzione di H_2O_2 (precipitato scuro) in foglie di vite inoculate con *P. viticola*, 4 giorni dopo il trattamento (2 giorni dopo l'inoculo).



In base a questi risultati, Romeo riduce fortemente la colonizzazione interna, la crescita miceliale e la sporulazione dei due patogeni.

Questi studi sono stati condotti su piante di vite (stadio 6 foglie = 2 mesi, cultivar Marselan) sensibili a oidio e peronospora, coltivate in vaso sotto serra. Le piante di vite sono state trattate con Romeo (2,5 g/L) su entrambe le foglie e successivamente inoculate (72 h dopo il trattamento) in un caso con conidi di *E. necator* e, in un altro, con una sospensione di *P. viticola* (10^4 sp/mL). L'evoluzione di *E. necator* e *P. viticola* è stata osservata rispettivamente dopo 15 e 7 giorni dalla contaminazione; di seguito alcuni dettagli sul protocollo.

Figura 3. Effetto di Romeo sullo sviluppo di *P. viticola* e *E. necator*: osservazione al microscopio



I dischi fogliari (0,7 cm) sono stati raccolti, immersi in metanolo puro per 24 h e chiarificati con acido cloridrico (2,5 g/mL) per una notte. Successivamente l'acido cloridrico è stato eliminato con 2 bagni successivi di 5 min con tampone fosfato (0,1 M a pH 8). Infine i dischi sono stati posti in una soluzione basica di blu anilina (0,05 % in tampone fosfato) per una notte e posta su vetrino. Le osservazioni sono state effettuate su un minimo di 10 dischi per tesi, utilizzando un microscopio retroilluminato per *E. necator* ed un microscopio ad epi-fluorescenza con filtri a UV (vibrazione a 340-380 nm, filtro a LP 425 nm) per *P. viticola*.
Romeo riduce drasticamente la colonizzazione interna, la crescita miceliale e la sporulazione di *E. necator* e *P. viticola* (Figura 3).

3 – Campi di applicazione di Romeo

Romeo è stato saggiato in Italia ed in Europa in prove di campo su vite, fragola (muffa grigia), pomodoro (peronospora, alternariosi, muffa grigia), insalate (peronospora e muffa grigia) e frumento (septoriosi), garantendo un generale aumento di efficacia delle strategie in cui è stato inserito. In particolare su vite, il prodotto ha dimostrato un livello di efficacia su *Botrytis cinerea*, *Palmopara viticola* e *Erysiphe necator,* paragonabile agli standard biologici. In strategia con i prodotti chimici ed in miscela con gli stessi standard biologici (es. prodotti cuprici, zolfo), Romeo è in grado di inserirsi perfettamente in un'ottica di difesa integrata, migliorando le performance dei partner in miscela e garantendo il controllo di un ampio spettro di agenti patogeni. Rimandiamo ad un lavoro pubblicato in questo stesso volume la trattazione dell'attività sperimentale svolta recentemente in Italia su vite (*Pujos et al.*, 2014).

CONCLUSIONI

Romeo è un nuovo fungicida multi-funzione caratterizzato da attività preventiva. Il prodotto, distribuito sulla parte aerea delle colture è in grado di stimolare una risposta sistemica nella pianta consistente nell'innesco e nell'amplificazione delle difese endogene. Impiegato nei programmi di difesa, Romeo migliora la gestione della difesa contro le principali malattie fungine della vite, dimostrando di essere un biofungicida efficace e versatile. Il suo inserimento nelle linee guida della difesa della vite, riveste un particolare interesse anche per la gestione dei residui nei prodotti agricoli e per contribuire al contenimento dell'insorgenza di fenomeni di resistenza ai fungicidi chimici.

LAVORI CITATI

Apostol I., Heinstein P.F., Low P.S., 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.*, 90: 109-166.

Benhamou N., 2009. La résistance chez les plantes: Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Editions TEC&DOC.

Hammerschmidt R., 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Ann. Rev. Phytopathol*, 37: 285-306.

Lamb C.J., Dixon R.A., 1997. The oxydative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 4: 251-275.

Langcake P., 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, Σ-viniferin, α-viniferin, and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.*, 9: 77-86.

Yoshikawa M., Masago H., Onoe T., Matsuda K., 1987. Mode of biochemical action of phytoalexins. *In:* Molecular Determinants of Plant Diseases (Nishimura S., Vance C.P., Doke N.). Jpn. Scient. Soc. Press, Tokyo, Springer-Verlag, Berlin, 253-267.

Pujos, P., Martin A., Farabullini F., Pizzi M., 2014. Risultati dell'attività sperimentale condotta in Italia su vite con il biofungicida Romeo™. *Atti Giornate Fitopatologiche*