

## TRICHODERMA ATROVIRIDE SC1, UN NUOVO MEZZO DI LOTTA CONTRO I PATOGENI VASCOLARI DELLA VITE

S. FRATI<sup>1</sup>, A. NESLER<sup>1</sup>, J. DE SAEGHER<sup>1</sup>, P. RUGGIERO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> BiPA Biological Products for Agriculture, Technologielaan, 7. 1840 Londerzeel, Belgio

<sup>2</sup> Belchim Crop Protection Italia S.p.A., Centro Direzionale Milanofiori, Strada 6 Palazzo 3.

20089 Rozzano (MI)

[sandro.frati@bi-pa.com](mailto:sandro.frati@bi-pa.com)

### RIASSUNTO

*Trichoderma atroviride* SC1 è la sostanza attiva di un nuovo prodotto fitosanitario in corso di registrazione contro alcune malattie del legno della vite. Il microrganismo è stato isolato in nord Italia da legno di nocciolo e presenta un'ottima efficacia contro alcuni patogeni vascolari della vite: *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal) e *Eutypa lata*, associati, rispettivamente al mal dell'esca e all'eutipiosi. La sua efficacia è dovuta all'abilità ed alla velocità del fungo nel colonizzare substrati legnosi quali le ferite di potatura, impedendo l'insediamento dei patogeni attraverso una competizione per spazio e nutrienti. È, inoltre, in grado di antagonizzare altri microrganismi (fra cui i patogeni sopra citati) mediante la produzione di enzimi litici. Il prodotto è stato applicato in diversi momenti di produzione delle barbatelle in vivaio e dopo la potatura ma prima della ripresa vegetativa in vigneto. Nel corso delle numerose prove effettuate, *T. atroviride* SC1 è risultato in grado di controllare efficacemente Pal e Pch sia in vivaio durante la produzione delle barbatelle che in pieno campo.

**Parole chiave:** esca, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, lotta biologica

### SUMMARY

#### TRICHODERMA ATROVIRIDE SC1, A NEW CONTROL MEANS OF GRAPEVINE WOOD DISEASES

*Trichoderma atroviride* SC1 is the active ingredient of a new pesticide under registration against some wood diseases of grapevine. The microorganism was isolated in Northern Italy from hazelnut wood and has very high efficacy against the grape vascular pathogens *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal) and *Eutypa lata*, responsible for Esca and Eutypa dieback, respectively. Its efficacy is related to its ability to fast colonize wooden substrates such as pruning wounds, blocking the entrance to the pathogens and competing for space and nutrients. Furthermore, it produces lytic enzymes capable to degrade the hyphae of other fungi. The product was applied at different process stages in nursery and after pruning but before the vegetative restart in vineyard. *T. atroviride* SC1 efficiently controlled the pathogens in several trials carried out in grape nursery and in vineyard.

**Keywords:** esca, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, biocontrol

### INTRODUZIONE

Le malattie vascolari della vite sono causate da diversi funghi patogeni che si possono ritrovare all'interno dello xilema della pianta (Larignon e Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1999; Larignon *et al.*, 2009). Fra le specie microbiche maggiormente coinvolte si possono citare *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* ed altre *Botryosphaeriaceae*.

Una delle malattie vascolari della vite maggiormente diffuse è il complesso del mal dell'esca, già conosciuto ai tempi dell'Antica Roma. I principali agenti sono i patogeni vascolari *Phaeomoniella chlamydospora* (Chaetothyriales, Herpotrichiellaceae) e *Phaeoacremonium*

*aleophilum* (Diaporthales, Togniniaceae), oltre a diverse specie di basidiomiceti (Bertsch *et al.*, 2013). In funzione dell'importante ruolo che giocano nell'insorgenza di questo complesso patologico, in diversi studi sul mal dell'esca l'attenzione è stata focalizzata su *P. chlamydospora* e *P. aleophilum* (comunemente abbreviati Pch e Pal, rispettivamente) (Bertsch *et al.*, 2013). Per poter dare origine alla malattia, Pal e Pch devono entrare in contatto con i vasi xilematici della pianta. La via d'ingresso più importante affinché ciò avvenga è costituita dalle ferite di potatura, che lasciano abbondanti sezioni di tessuti legnosi scoperte (Larignon e Dubos, 2000; Eskalem e Gubler, 2001). Un'altra importante fonte di inoculo e di trasmissione è la diffusione del materiale vegetativo infettato già a partire dal vivaio. Diversi studi condotti con analisi molecolari hanno infatti confermato la presenza di Pch nelle vasche per l'idratazione delle barbatelle (Ridgway *et al.*, 2002; Retief *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2007; Aroca *et al.*, 2009). In Italia il mal dell'esca è diffuso in tutte le regioni viticole, dal Nord, al Centro e al Sud. In alcune regioni centro-meridionali (Toscana, Puglia, Sicilia) le percentuali di incidenza raggiunte in alcuni vecchi vigneti assumono valori molto elevati (fino al 60-80%) e, in certi casi, sono state osservate piante sintomatiche anche in impianti giovani, di soli 2-3 anni di età (Michelon *et al.*, 2007).

Un'altra importante malattia a carico del sistema vascolare della vite è l'eutipiosi, causata da *Eutypa lata* (Ascomycota, Diatrypaceae). *E. lata* ha un numero molto elevato di ospiti ed è stata ritrovata in più di 80 specie legnose. Le sue ascospore sono rilasciate durante l'intero anno e sono disseminate da eventi piovosi maggiori di 0,5 mm (Carter, 1988). Questo patogeno si ritrova infatti più frequentemente in annate molto piovose (Carter, 1988). Così come nel caso di Pal e Pch, anche le ascospore di *E. lata* penetrano nella pianta attraverso le ferite di potatura.

In passato il controllo delle malattie vascolari della vite si effettuava unicamente con l'arsenito di potassio che veniva applicato sulla pianta dopo la potatura in modo da proteggere le ferite. Esso presenta tuttavia un profilo tossicologico molto sfavorevole; è infatti carcinogenico per l'uomo e molto dannoso per l'ambiente. Per queste ragioni in diversi Paesi, fra cui l'Italia, è stato bandito da diversi anni (Decoin, 2001; Bisson *et al.*, 2006; Larignon *et al.*, 2008). Allo stato attuale non esistono prodotti di sintesi registrati contro il mal dell'esca; un altro agente di lotta biologica è invece registrato per il solo uso in vigneto. Dalla collaborazione fra BiPA, Biological Products for Agriculture, e Fondazione Edmund Mach è stata sviluppata una formulazione WG a base di *Trichoderma atroviride* SC1 per il controllo dei patogeni vascolari della vite.

Il prodotto commerciale prende il nome di Vintec ed in Italia verrà distribuito da Belchim Crop Protection Italia S.p.A. Il ceppo SC1 è stato isolato da legno di nocciolo in nord Italia ed è stato subito incluso in un esteso programma di selezione per valutarne le potenzialità come agente di lotta biologica. Grazie alla sua elevatissima velocità di colonizzazione ed al fatto che è stato isolato proprio dalla stessa matrice, il legno, SC1 è particolarmente adatto all'utilizzo contro queste malattie. Vintec presenta un elevato contenuto di sostanza attiva, pari a 10<sup>13</sup> CFU/Kg ed è in corso di valutazione per l'approvazione ai sensi del Regolamento (CE) 1107/09 per l'applicazione in vivaio ed in pieno campo. Vintec contrasta efficacemente i patogeni vascolari grazie alla sua elevatissima capacità di colonizzazione delle ferite di potatura o di innesto, bloccandone l'ingresso. Il ceppo SC1 è inoltre in grado di produrre enzimi litici che degradano ife e corpi fruttiferi dei patogeni.

In questo lavoro vengono presentati i risultati di numerose prove, condotte in Italia e altri paesi viticoli europei, in cui *Trichoderma viride* SC1 è stato valutato per la sua efficacia sia in campo che in vivaio.

## MATERIALI E METODI

Negli ultimi tre anni sono state effettuate più di 30 prove di efficacia per l'applicazione di Vintec in vivaio ed in campo. Poiché l'applicazione in vivaio è volta a proteggere le barbatelle dall'infezione di Pal e Pch durante le fasi di preparazione del materiale vegetativo Vintec è stato applicato in quattro momenti individuati come maggiormente rischiosi sotto questo punto di vista, elencati in tabella 1.

Tabella 1. Fasi di applicazione di Vintec in vivaio

Applicazione in vivaio, tipo di applicazione (200 g/hL)	Fase di processo
T1, immersione del materiale vegetativo	Idratazione del materiale raccolto in campo precedente allo stoccaggio. Non eseguita nelle prove in Francia in quanto non parte delle normale tecnica produttiva francese.
T2, immersione del materiale vegetativo	Idratazione dopo lo stoccaggio, precedente all'innesto
T3, irrorazione	Stratificazione in sabbia o segatura post-innesto
T4, irrorazione	Radicazione pre-impianto

L'applicazione in campo è stata eseguita con atomizzatore a spalla dopo la potatura al raggiungimento delle condizioni ambientali favorevoli alla crescita di *T. atroviride* SC1, quando la temperatura media si attestava intorno ai 12°C con un'umidità relativa superiore al 70%. È opportuno considerare che queste sono anche le condizioni in cui Pal e Pch possono infettare la pianta; il trattamento con Vintec è quindi stato posizionato in modo da contrastarne l'ingresso in tempo reale. I patogeni contro cui Vintec è stato valutato per l'applicazione in pieno campo sono Pal, Pch e *E. lata*. Il dosaggio utilizzato è stato 200 g/ha con un volume d'acqua di 100-300 L/ha. Il trattamento è stato diretto alla pianta in modo da irrorare bene le ferite di potatura. L'incidenza della malattia e l'efficacia sono state determinate, sia nelle prove in vivaio che in quelle in campo, mediante isolamento dei patogeni target (dalle barbatelle o dai tralci trattati in campo, rispettivamente). Per ciascuna tesi sono stati prelevati 15 pezzi di legno con tre ripetizioni. La superficie del campione è stata disinfettata con un rapido passaggio con garza sterile intrisa di alcol etilico. Il campione è poi stato sezionato in condizioni sterili in modo da prelevare piccole porzioni cubiche di xilema (lato 2-5 mm). I frammenti ottenuti sono stati immersi in ipoclorito di sodio (2%) per alcuni secondi e poi sciacquati con acqua sterile. Tale procedura aveva lo scopo di garantire la sterilità della loro superficie. Essi sono stati poi trasferiti su substrato agarizzato (Malt Agar. Malto: 15 g/L, Agar 20 g/L) in modo da permettere la crescita dei funghi di interesse. Le capsule Petri così preparate sono state incubate per 5 giorni a 25°C±1. La presenza/assenza dei patogeni di interesse è stata determinata mediante identificazione morfologica al microscopio (rilievo solamente qualitativo e non quantitativo). L'efficacia è stata valutata con la formula di Abbott.

## RISULTATI

I risultati delle prove in vivaio ed in vigneto sono state condotte nelle principali aree viticole europee (tabelle 2 e 3).

Tabella 2. Prove contro il mal dell'esca condotte in vivaio (4 trattamenti, vedi tabella 1): incidenza della malattia nel testimone non trattato ed efficacia media

Prova	Località, Paese (cultivar)	Patogeno	Incidenza malattia testimone (%)	Efficacia media Abbott (%)
1	Eger, Ungheria (Olazrizling)	Pal	67	68
2	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pal	38	100
3	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pal	57	100
4	Sarrians, Francia (Cabernet Sauvignon)	Pal	55	100
5	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pal	75	97
6	Xátiva, Spagna (Macabeo)	Pal	40	72
7	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pal	75	100
8	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pal	75	100
9	Eger, Ungheria (Olazrizling)	Pch	72	86
10	Sainte-Terre, Francia (Cabernet Sauvignon)	Pch	20	100
11	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pch	15	100
12	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pch	43	100
13	Sarrians, Francia (Cabernet Sauvignon)	Pch	29	100
14	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pch	50	95
15	Xátiva, Spagna (Tempranillo)	Pch	20	77
16	S. Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pch	75	93

L'incidenza della presenza dei patogeni è stata variabile nei diversi ambienti produttivi; indipendentemente da questo fattore, l'efficacia di Vintec è stata mediamente al di sopra del 70%, con punte del 100%. Vintec ha contrastato efficacemente la presenza dei patogeni in tutte le condizioni ambientali.

I dati di efficacia delle prove condotte in campo contro i principali patogeni responsabili del mal dell'esca (Pal e Pch) sono rappresentati in tabella 3.

Tabella 3. Prove di efficacia di Vintec contro il mal dell'esca condotte in campo: incidenza della malattia nel testimone non trattato ed efficacia media

Prova	Località, Paese (cultivar)	Patogeno	Incidenza malattia testimone (%)	Efficacia media Abbott (%)
17	Rovereto, Italia (Cabernet Sauvignon)	Pal	26,7	75
18	Neustadt an der Weinstraße, Germania (Portugieser)	Pal	20	79,5
19	San Michele all'Adige, Italia (Cabernet Sauvignon)	Pal	23,7	85,9
20	San Michele all'Adige, Italia (Cabernet Sauvignon)	Pal	56,7	72,4
21	San Michele all'Adige, Italia (Cabernet Sauvignon)	Pal	36,7	72,7
22	San Michele all'Adige, Italia (Cabernet Franc)	Pal	53,3	87,5
23	San Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pal	100	60
24	Rovereto, Italia (Cabernet Sauvignon)	Pch	30	77,8
25	Gamlitz, Austria (Sauvignon Blanc)	Pch	93,5	80
26	Malterdingen, Germania (Müller-Thurgau)	Pch	87,5	83,9
27	Veitshöchheim, Germania (Müller Thurgau / SO4)	Pch	21,4	81,8
28	San Michele all'Adige, Italia (Cabernet Sauvignon)	Pch	66,7	77,9
29	San Michele all'Adige, Italia (Cabernet Sauvignon)	Pch	46,7	64,3
30	San Michele all'Adige, Italia (Cabernet Franc)	Pch	60	72,2
31	San Michele all'Adige, Italia (Chardonnay)	Pch	100	100

Anche l'applicazione in campo ha permesso un efficace controllo della malattia. In tabella 4 sono invece rappresentati i primi risultati delle prove di efficacia contro eutipiosi, condotte in pieno campo.

Tabella 4. Prove di efficacia di Vintec contro l'eutipiosi condotte in campo: incidenza della malattia nel testimone non trattato ed efficacia media

Prova	Località, Paese (cultivar)	Incidenza della malattia testimone (%)	Efficacia media Abbott (%)
32	Latresne, Francia (Cabernet Sauvignon)	12	79
33	Nîmes, Francia (Carignan)	20	100
34	Camblanes-et-Meynac, Francia (Cabernet Sauvignon)	8	69

### CONCLUSIONI

Vintec è un nuovo prodotto microbiologico per la difesa di alcune importanti malattie vascolari della vite, che in Italia verrà distribuito da Belchim Crop Protection Italia S.p.A. I dati di efficacia ottenuti in diversi anni di sperimentazione nei principali areali produttivi viticoli hanno evidenziato performances molto buone. *Trichoderma atroviride* ceppo SC1, la sostanza attiva di Vintec, è stato in grado di contrastare efficacemente l'infezione di Pal e Pch sia nelle fasi di produzione del materiale propagativo in vivaio che con l'applicazione sulle ferite di potatura in vigneto. In vigneto sono state ottenute buone performances anche nel controllo di *E.lata*. Inoltre, a differenza di altri prodotti simili, Vintec non deve essere applicato entro un tempo massimo dopo la potatura per poter proteggere le ferite: è semplicemente necessario effettuare il trattamento alle condizioni ambientali descritte sopra, anche settimane dopo la potatura. Questo prodotto è altamente idoneo all'applicazione su legno (durante la produzione di barbatelle o sulle ferite di potatura) in quanto questo rappresenta proprio la matrice su cui il ceppo SC1 di *T. atroviride* si è evoluto e selezionato. Esso possiede infatti una capacità di colonizzazione estremamente veloce. Inoltre, Vintec è in corso di registrazione anche per l'applicazione in vivaio, dove attualmente non sono disponibili mezzi di lotta contro i patogeni vascolari della vite.

### LAVORI CITATI

- Aroca A., Gramaje D., Armengol J., García-Jiménez I., Raposo R., 2009. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 165-174.
- Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clément C., Fontaine F., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62, 243-265.
- Bisson M., Houeix N., Hulot C. *et al.*, 2006. Arsenic et ses dérivés inorganiques. Verneuil-en-Halatte, France: INERIS, Fiches des données toxicologiques et environnementales des substances chimiques.
- Carter M.V., 1988. Eutypa dieback. In: Pearson R.C., Goheen A.C. eds. *Compendium of grape diseases*, St. Paul, MN, USA. APS Press, 32-34.
- Decoin M., 2001. Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. *Phytoma*, 543, 28-33.

- Edwards J., Constable F., Wiechel T., Salib S., 2007. Comparison of the molecular tests – single PCR, nested PCR and qualitative PCR (SYBR Green and TaqMan) – for detection of *Phaeoconiella chlamydospora* during grapevine nurstery propagation. *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 58-72.
- Eskalen A., Gubler W.D., 2001. Association of spores of *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Ph. Aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, S429-S432.
- Larignon P., Dubos B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 147-157.
- Larignon P., Dubos B., 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 184-189.
- Larignon P., Darne G., Menard E., Desache F., Dubos B., 2008. Comment s’agissait l’arsénite de sodium sur l’esca de la vigne ? *Progrès Agricole et Viticole*, 125, 642-651.
- Larignon P., Fontaine F., Farine S., Clément C., Bertsch C., 2009. Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la vigne. *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences III-Vie*. 333, 765-783.
- Michelon L., Pellegrini C., Pertot I., 2007. Il mal dell’Esca della vite. Istituto Agrario di San Michele all’Adige, SafeCrop Centre, 71 pp.
- Mugnai L., Graniti A., Surico G., 1999. Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines, *Plant Disease*, 83, 404-417.
- Retief E., McLeod A., Fourie P.H., 2006. Potential inoculum sources of *Phaeoconiella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 331-339.
- Ridgway H.J., Sleight B.E., Stewart A., 2002. Molecular evidence for the presence of *Phaeoconiella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology*, 31, 267-271.

