DOSI ORMETICHE DI GLIFOSATE: EFFETTI SU PIANTE DI VITE IN VASO

R. PERRIA¹, A. ZOMBARDO¹, P. VALENTINI¹

¹CREA - Centro di ricerca Viticoltura ed Enologia - Viale Santa Margherita, 80, 52100 Arezzo rita.perria@crea.gov.it

RIASSUNTO

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare l'effetto delle dosi minime di glifosate sull'attività fisiologica della vite. La prova è stata condotta nel 2014 su piante di vite in vaso, tenute all'aperto, ponendo a confronto l'applicazione del prodotto alle dosi di 216 g/ha e di 432 g/ha con una tesi non trattata. L'effetto sulla fisiologia della vite è stato determinato tramite misure fluorimetriche (fluorescenza della clorofilla) a diversi tempi dal trattamento: tempo zero, dopo 3, 24, 72 e 144 ore. I risultati hanno mostrato che l'azione del glifosate sul metabolismo della vite é variabile nel tempo e proporzionale alla quantità di prodotto, quando questa è al di sotto delle dosi di tossicità.

Parole chiave: Vitis vinifera, fluorescenza della clorofilla, fotosintesi

SUMMARY

GLYPHOSATE HORMETIC DOSES: EFFECTS ON POT-GROWN GRAPEVINES

The aim of this study was to evaluate the effect of minimal glyphosate doses on the metabolic activity of grapevine. The trial was conducted during the 2014 vegetative season on potted vine plants, placed in open field, by comparing the application of glyphosate at 216 g/ha, 432 g/ha dose rates to the untreated check, as a reference. The effect on the grapevine physiology was assessed by fluorimetric measurements (chlorophyll fluorescence) at 0, 3, 24, 72 and 144 hours after the treatment. The results showed that the activity of glyphosate on grapevine metabolism was temporally proportional to the applied amount of active substance, provided that this is lower that the toxicity dose rates.

Key words: Vitis vinifera, chlorophyll fluorescence, photosynthesis

INTRODUZIONE

L'azione del glifosate nei vegetali si esprime mediante l'inibizione della formazione della fenilalanina; successivamente l'erbicida inibisce l'incorporazione di acido shikimico negli amminoacidi aromatici, causando un accumulo di tale acido nei tessuti (Steinrücken e Amrhein, 1980; Dayan e Zaccaro, 2012). La letteratura sull'argomento si riferisce prevalentemente a specie vegetali erbacee, come soia, mais, colza, orzo; più rari, invece, sono gli studi sulle specie arboree allo stadio giovanile (ad esempio Eucalipto e *Pinus caribea* - Velini et al., 2008). É stato dimostrato che dosi sub-tossiche, cioè ormetiche, favoriscono il metabolismo delle piante, formulando delle ipotesi sui meccanismi di risposta allo stress chimico, ed in particolare sulla fisiologia del fotosistema secondo (PS II) (Duke et al., 2006; Cedergreen, 2008; Olesen e Cedergreen, 2010).

Su *Vitis vinifera* L. non è stata definita la dose ormetica per il glifosate, mentre a dosi comunemente utilizzate per il diserbo in vigneto sono stati riscontrati effetti sul contenuto di antociani della bacca (Donnini et al., 2016). Pertanto l'obiettivo del presente lavoro è stato quello di individuare la dose minima di principio attivo in grado di provocare una reazione della pianta, e verificare se la molecola di glifosate consente di determinare un incremento della vitalità anche in *Vitis vinifera* e in quali dosaggi, misurando l'efficienza fotosintetica tramite misure fluorimetriche.

MATERIALI E METODI

Le prove sono state svolte durante la stagione vegetativa 2014 su 18 piante di vite, di circa 10 anni di età, allevate in vaso, all'aperto. Le viti sono state trattate con un diserbante contenente 360 g/L di glifosate, pari a come acido puro (30,4 g), a due diverse dosi. Lo schema utilizzato è stato il seguente: tesi 1 (T1), 6 piante trattate con una soluzione di 3 mL/L pari a 1,08 g/L di principio attivo (p.a.); tesi 2 (T2), 7 piante trattate con una soluzione di 6 ml/L pari a 2,16 g/L di p.a.; tesi 0 (T0), 5 piante controllo non trattate.

Il trattamento è stato effettuato in data 10 giugno, in fase di post-fioritura (BBCH 67), irrorando le piante fino allo sgocciolamento della soluzione; appena le foglie si sono asciugate, è stata effettuata una prima misurazione fluorimetrica (tempo zero, 0h) su foglia preadattata al buio, impiegando un fluorimetro portatile (Handy PEA Chlorophyll fluorimeter - Hansatech, UK). Le successive misure sono state realizzate dopo 3 ore (3h), dopo 24 ore (24h), dopo 72 ore (72h) e dopo 6 giorni (144h) dal trattamento. Dopo il preadattamento al buio per 30 minuti la foglia viene illuminata con luce continua di lunghezza d'onda inferiore a 670 nm, che induce la fluorescenza, i cui valori vengono registrati dal fluorimetro.

I parametri fluorimetrici presi in considerazione per il presente studio sono illustrati nella tabella 1. I dati raccolti sono stati analizzati tramite il software statistico SPSS. Le misurazioni fluorimetriche relative alle prime ore dopo la somministrazione delle soluzioni cioè, a 0, 3 e 24 ore dal trattamento non hanno una differenziazione così netta e pertanto giustificano l'impiego dell'analisi discriminante. Il secondo set di dati, rilevati a 24, 72 e 144 ore dal trattamento, è stato elaborato con test non parametrici, data la non normalità della distribuzione dei dati.

Tuotina II B	eserizione dei parametri naormietrier variatati	
Fo	Valore della fluorescenza basale	
Fm	Valore della fluorescenza massima	
Fv	Fluorescenza variabile di campioni adattati al buio	Fm-Fo
Fv/Fm	Efficienza massima di scissione dell'acqua	
F1	Valore fluorescenza a 50 µs (O step)	
F2	Valore fluorescenza a 100 µs	
F3	Valore fluorescenza a 300 µs	
FJ	Valore fluorescenza a 2 ms (J step)	
FI	Valore fluorescenza a 30 ms (I step)	
Vj	Valore relativo della fluorescenza J step (2 ms)	(FJ-Fo)/(Fm-Fo)
Vi	Valore relativo della fluorescenza a I step (30 ms)	(FI-Fo)/(Fm-Fo)
P.I. ABS	Capacità di conservare energia oltre il PSII	
Мо	Pendenza iniziale della curva di estinzione della fluorescenza	(F3-Fo)/(Fm-Fo)
ABS rc	Fotoni assorbiti da un centro di reazione	(Mo/Vj)/1-(Fo/Fm)
TRo rc	Fotoni trattenuti da un singolo centro di reazione	(Mo/Vj)
ETo/ABS	Quantum yield for electron transport	(Fv/Fm)/ (1-Vj)
DEX	De-eccitazione non fotochimica	Fo / Fm
δRo	Probabilità che un fotone assorbito sposti un elettrone oltre il	1-Vj
	Qa	
DensiRC	Densità dei centri di reazione per unità di clorofilla	(Vj/Mo)(Fv/Fm)
P.I. TOT	Capacità di conservare energia oltre il PSII e riduzione accettori finali	PIABS(δRo/1- δRo)

Tabella 1. Descrizione dei parametri fluorimetrici valutati

RISULTATI

Rilievi a 0, 3 e 24 ore

I valori dei parametri ottenuti dalle misurazioni fluorimetriche sono stati sottoposti all'analisi discriminante ed è stato realizzato un grafico a due dimensioni in cui sono riportati i centroidi delle nubi di dispersione dei dati (figura 1). Il grafico è un piano in cui la dimensione orizzontale è rappresentata dal parametro "Fluorescenza variabile a 30 mS = Vi". Secondo alcuni autori, l'entità della fluorescenza in questo punto della curva è influenzata dall'efficienza con cui gli accettori di elettroni del foto sistema 1 (PS I) assolvono alla loro funzione (Oukarroum et al., 2009; Kalachanis e Manetas, 2010). La dimensione verticale è data dal parametro Performance Index (P.I. ABS), che esprime la capacità potenziale di conservazione dell'energia dai fotoni assorbiti nel PS II alla riduzione degli accettori di elettroni situati tra il PS II e il PS I (Bussotti et al., 2012). Nel grafico di figura 1 si vede che nel quadrante in basso a destra si ritrovano i centroidi di tutte e tre le tesi al rilievo successivo subito successivo all'asciugatura della soluzione contenente il glifosate irrorata (0h).

Per interpretare questo grafico bisogna tener presente che l'esperimento è condotto su piante in vaso, facilmente influenzabili dalle condizioni ambientali luce, acqua e temperatura.

In figura 1 viene rappresentato l'andamento nel tempo; la fluorimetria a 0h indica che la molecola non ha ancora agito e la vicinanza delle tre tesi suggerisce che le piante si trovano ancora nelle medesime condizioni ambientali. Dopo tre ore dal trattamento i centroidi si sono spostati a sinistra senza variare il livello di vitalità funzionale (P.I.) e comunque anche in questo caso le tesi trattate T1-3h e T2-3h si trovano vicine al controllo T0-3h e anche a T0-24h, a causa dell'aumento di temperatura nell'arco della giornata.

Solamente le osservazioni sulle tesi trattate T1-24h e T2-24h mostrano un incremento sensibile del parametro Performance Index in accordo con la letteratura esistente sull'argomento (Christensen et al., 2003). La posizione dei centroidi ci induce a pensare che, pur in presenza di condizioni stressanti, la vitalità delle piante trattate aumenti notevolmente.

Figura 1. Grafico delle funzioni discriminanti canoniche. La funzione 1 rappresenta prevalentemente Vi, la funzione 2 rappresenta P.I. ABS, i quadrati neri rappresentano i centroidi



Nelle figure 2 e 3 sono riportati gli andamenti dei parametri Performance Index e P.I. ABS, che indicano la conservazione dell'energia potenziale dopo che l'elettrone ha attraversato il PS II e la capacità di ridurre l'accettore finale nel tempo dal trattamento. Dai valori ottenuti si può notare come i campioni trattati decrescano dal tempo 0h, mentre il non trattato prima aumenta per poi decrescere più lentamente.







Figura 3. Decadenza nel tempo del parametro P.I. ABS a 0, 3 e 24 ore dal trattamento

Rilievi a 24, 72 e 144 ore

Come detto precedentemente, uno degli scopi del presente lavoro è stato quello di determinare la durata dell'effetto della somministrazione di glifosate sulla fisiologia del fotosistema II.

Sottoponendo il confronto tra le tesi all'analisi statistica, mediante il test non parametrico della mediana a campioni indipendenti, risultano significativamente differenti solamente alcuni parametri fluorimetrici. Per brevità, nelle figure 4 e 5 sono riportati solamente l'evoluzione di due parametri Performance Index e P.I. ABS, i quali sintetizzano meglio la vitalità delle piante e, quindi, anche il decadimento dovuto all'effetto della molecola.

Dai grafici delle due figure si può osservare che a 24 ore dalla somministrazione delle soluzioni il controllo ha valori di Performance Index e P.I. ABS inferiori alle tesi trattate. Al momento del rilievo a 72 ore il valore del testimone è nettamente superiore a quello della tesi T1 e di poco inferiore al valore di T2. A 144 ore la situazione è completamente ribaltata: le tesi trattate risultano entrambe inferiori al controllo.

Tabella 2. Analisi non parametrica per campioni indipendenti di tutti i parametri considerati

Tuo ona 2. Thiansi non parametrica per campioni maipenaena ai cami i parametri constactari					
VARIABILI	TEST MEDIANA	VARIABILI	TEST MEDIANA		
Fo	***	Performance Index	*		
Fm	n.s.	ABS	***		
Fv	n.s.	TRo	**		
Fv/Fm	n.s.	ЕТо	*		
F1	**	Dio	n.s.		
F2	**	RC/CSo	n.s.		
F3	***	RC/CSm	n.s.		
F4	***	Мо	**		
F5	**	Vj	*		
Vi	***	P.I. ABS	*		
Δρ	*	P.I.TOT	***		

(n.s. = non significativo; ***= 0; **<0.01; *<0.05)

Figura 4. Decadenza nel tempo del parametro Performance Index, a 24, 72 e 144 ore dal trattamento





Figura 5. Decadenza nel tempo del parametro P.I. ABS, a 24, 72 e 144 ore dal trattamento

CONCLUSIONI

L'applicazione del glifosate sulla vite ha fatto registrare un effetto evidente e positivo sulla vitalità delle piante evidenziando un'azione della molecola si verifica a 24 ore dalla somministrazione delle soluzioni.

L'attività del glifosate ha una durata che è funzione della quantità di principio attivo assorbita dalle foglie, dato che la tesi con la dose di 6 mL/L (T2) ha marcato le differenze anche a 72 ore dal trattamento mentre la dose di 3 mL/L (T1) ha avuto effetto solo al rilievo delle 24 ore. Anche per quanto riguarda *Vitis vinifera*, dunque, si conferma ciò che emerge dagli studi sull'argomento già presenti in letteratura.

Per avere un effetto più duraturo bisognerebbe aumentare la quantità assorbita dalle piante fino alla comparsa dei sintomi di tossicità; andrebbero intensificati, dunque, gli studi per individuare la concentrazione ottimale utile a stabilizzare gli effetti della bassa dose della molecola di glifosate.

L'incremento della vitalità è dovuto soprattutto ad una più alta resa della fotosintesi ed il merito va ascritto alla maggiore efficienza nella fissazione della CO₂. Si può quindi concludere che basse dosi di glifosate possono stimolare la fotosintesi, anche se le cause di questo aumento non sono ancora state comprese completamente in questa specie, come già riportato da altri autori per le colture erbacee (Cedergreen e Olesen, 2010).

Ulteriori e più accurate analisi a livello fisiologico potrebbero essere avviate in modo più vantaggioso, ad esempio aggiungendo ai rilievi fluorimetrici anche delle misurazioni relative agli scambi gassosi a livello fogliare.

LAVORI CITATI

- Bussotti F., Kalaji M.H., Desotgiu R., Pollastrini M., Łoboda T., Bosa K., 2012. Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla. Vol. 137. Firenze University Press.
- Cedergreen N., 2008. Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time?. *Environmental Pollution*, 1099–1104.
- Cedergreen N., Olesen C. F., 2010. Can glyphosate stimulate photosynthesis?. Pesticide Biochemistry and Physiology, 96(3), 140-148.

Christensen M.G., Teicher H.B., Streibig J.C., 2003. Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening. *Pest management science* 59(12), 1303-1310.

- Dayan F.E., Zaccaro M.L.d.M., 2012. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. *Pesticide biochemistry and physiology*, 102(3), 189-197.
- Donnini S., Tessarin P., Ribera-Fonseca A., Di Foggia M., Parpinello G.P., Rombolà A.D., 2016. Glyphosate impacts on polyphenolic composition in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berries and wine. *Food chemistry*, 213, 26-30.
- Duke S.O., Cedergreen N., Velini E.D., Belz R.G., 2006. Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy?. *Outlooks on Pest Management*, 17(1), 29-33.
- Kalachanis D., Manetas Y., 2010. Analysis of fast chlorophyll fluorescence rise (O-K-J-I-P) curves in green fruits indicates electron flow limitations at the donor side of PS II and the acceptor side of both photosystems. *Physiologia Plantarum*, 139, 313-323.
- Olesen C.F., Cedergreen N., 2010. Glyphosate uncouples gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Pest management science*, Wiley Online Library.
- Oukarroum A., El Madidi S., Schansker G., Strasser R.J., 2009. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotollerance analyzed using Chla fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, 137, 188-199.
- Steinrücken H.C., Amrhein N., 1980. The erbicide Glyphosate is a potent inhibitor of 5enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate syntetase. *Biochemical and biophysical research communication*. Vol. n. 4, 1207-1212.
- Velini E.D., Alves E., Goody M.C., Meschede D.K., Souza R.T., Duke S.O., 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. *Pest management science*. 64(4), 489-496.