

## CARATTERIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI UN FERTILIZZANTE ORGANO-MINERALE NEI CONFRONTI DI *PLASMOPARA VITICOLA*

F. BOVE, T. CAFFI, S. PONI, L. LANGUASCO, V. ROSSI

DIPROVES, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via E. Parmense 84, 29122 Piacenza  
tito.caffi@unicatt.it

### RIASSUNTO

È noto che la resistenza alle malattie fungine, compresa la peronospora, può essere indotta da fattori fisici, chimici e da microrganismi (o loro composti e metaboliti). Anche vari prodotti fertilizzanti arricchiti di amminoacidi, elementi minerali o metalli vengono proposti come induttori di resistenza, spesso in abbinamento a fungicidi. Un fertilizzante organo minerale che contiene acidi gluconici, oligosaccaridi e zuccheri riducenti (Acticlaster™, Euro-TSA) è stato utilizzato per verificare, su piante di vite di cv Merlot, la capacità di indurre resistenza alle infezioni di peronospora sia in applicazioni fogliari che in fertirrigazione. Il prodotto ha mostrato un'efficacia media del 35% nel controllare le infezioni di *Plasmopara viticola* con le applicazioni fogliari in tutte le fasi fenologiche testate, pur con un'ampia variabilità da prova a prova. Le applicazioni in fertirrigazione hanno avuto efficacia media del 25%, con una risposta più pronta nelle prime fasi di sviluppo della pianta, che è andata via via scomparendo con la maturazione. Il fertilizzante ha offerto risultati interessanti che, anche non permettendo un suo uso esclusivo per la protezione dalla peronospora, forniscono utili informazioni per inserire il prodotto in strategie di lotta integrata al fine di supportare i tradizionali fungicidi, specialmente quelli di copertura ed in particolari fasi fenologiche.

**Parole chiave:** vite, peronospora, difesa, induttori di resistenza

### SUMMARY

#### EVALUATION OF AN ORGANO-MINERAL FERTILIZER EFFECTIVENESS IN *PLASMOPARA VITICOLA* CONTROL

It is well known that resistance can be induced by physical, chemical factors and micro-organisms (or their compounds and metabolites). Various fertilizing products enriched with amino acids, mineral elements or metals are also proposed as resistance inducers, often in combination with fungicides. A mineral organic fertilizer containing glucose, oligosaccharide and reducing sugars (Acticlaster™, Euro-TSA) was used to verify on grapevine cv Merlot the ability to induce resistance to downy mildew infections by foliar application and irrigation. The tested product showed 35% average efficacy by foliar applications across all the phenological stages tested, but with high variability. The average protection provided by irrigation treatment was lower, on average 25% with the same variability, but also with higher efficacy in the first development stages of the host. The tested product gave interesting results because, even if it cannot provide complete protection against *Plasmopara viticola* infections alone, it can successfully be inserted in disease control strategies in order to help classical fungicides, in particular phenological stages.

**Keywords:** grapevine, downy mildew, control, resistance inducers

### INTRODUZIONE

Gli induttori di resistenza stanno, sempre più, attirando l'attenzione di viticoltori e tecnici per la loro possibile attività nel controllare le malattie fungine, compresa la peronospora. Anche prodotti fertilizzanti arricchiti di amminoacidi, elementi minerali o metalli vengono proposti come biostimolanti e induttori di resistenza.

In questo studio è stata valutata la capacità di un fertilizzante di indurre resistenza nei confronti della peronospora della vite, causata dall'oomicete *Plasmopara viticola*, sia in seguito ad applicazione fogliare che all'impiego in fertirrigazione. Il prodotto è un fertilizzante commerciale organo minerale contenente acidi gluconici, oligosaccaridi e zuccheri riducenti (Acticlaster™, Euro-TSA).

Nel corso dello studio, condotto nel 2016 e 2017, sono state valutate: i) l'efficacia del prodotto nel controllo d'infezioni artificiali di peronospora in diverse fasi fenologiche, a diversi tempi dal trattamento e a diverse dosi (quest'ultimo aspetto solo per le applicazioni in fertirrigazione) e ii) le variazioni del contenuto di fitoalessine e, in particolare, di stilbeni (t-piceidi e t-resveratrolo) nelle foglie.

## MATERIALI E METODI

### Gestione del campo sperimentale

Le prove sono state realizzate presso il vigneto sperimentale del DI.PRO.VE.S. su piante di *Vitis vinifera* cv. Merlot (sensibile a peronospora) allevate a Guyot semplice, impiantato nel 2011. Il vigneto è stato suddiviso in parcelle omogenee e completamente randomizzate di quattro piante ciascuna, replicate tre volte per ciascuna tesi. La prova di valutazione della velocità di assorbimento del prodotto è stata realizzata su piante della stessa varietà, allevate in vaso presso le serre del DI.PRO.VE.S..

I trattamenti fogliari sono stati eseguiti con pompa irroratrice a spalla a volume normale alla dose di etichetta, fino a sgocciolamento, in tre diverse fasi fenologiche: “accrescimento germogli” (BBCH 55-58, Lorenz et al., 1995), “fioritura” (BBCH 63-69) ed “invaiatura” (BBCH 81-83).

I trattamenti di fertirrigazione sono stati applicati ogni due settimane alla dose piena di etichetta, nel 2016, mentre nel 2017 sono state valutate tre dosi crescenti (bassa, media e alta rispettivamente 1, 1,3 e 1,6 volte la dose di etichetta).

Come tesi di confronto è stato mantenuto un testimone non trattato e non fertirrigato.

### Campionamento del materiale vegetale

I campionamenti sono stati eseguiti con cadenza periodica da 1 a 10 giorni a seguito di ciascun trattamento, prelevando in modo casuale 15 foglie giovani completamente sviluppate (terza o quarta foglia dall'apice del germoglio), dalle quali sono stati ricavati 15 dischi fogliari del diametro di 25 mm. I dischi fogliari sono stati quindi inoculati con 4 gocce di una sospensione di sporangi di *P. viticola* ( $10^4$  sporangi per mL) e posti ad incubare in una camera umida a 20 °C, con fotoperiodo di 12 ore. Dopo 8-9 giorni, i dischi fogliari sono stati osservati con uno stereomicroscopio (ingrandimento 40×) per determinare la presenza di zoosporangiofori in corrispondenza dei siti precedentemente inoculati. L'incidenza d'infezione è stata valutata come % di siti sporulanti rispetto al totale dei siti inoculati, mentre l'efficacia del trattamento è stata valutata usando la formula di Abbott (1925).

I valori di incidenza sono stati trasformati con la funzione arcoseno e sottoposti all'analisi della varianza (Anova). Il numero di giorni è stato espresso in classi di due (I, II, III, IV, V) in funzione della distanza dal trattamento. Le tre fasi fenologiche in cui è stato ripetuto l'esperimento, le due tesi (trattato e non trattato) e le classi sono stati considerati come fattori fissi; il fattore anno è stato considerato come una replica, dato che non è risultato significativo in un'analisi preliminare. Per i fattori risultati significativi ( $p < 0,05$ ) è stato condotto il test LSD (Least Significant Differences) con  $\alpha = 0,05$  per la separazione delle medie.

## Analisi degli stilbeni

Porzioni di lamina fogliare sono state sottoposte a liofilizzazione, macinate in mulino, congelate e infine analizzate per determinare il contenuto in *t-resveratrolo* e *t-piceide*. I macinati sono stati sottoposti a estrazione (Downey e Rochfort, 2008) e gli estratti sono stati centrifugati (5 min a 10.000 rpm a 4 °C), filtrati attraverso un filtro in polipropilene da 0,22 µm e trasferiti per l'analisi cromatografica in HPLC (con Agilent mod. 1260 Infinity Quaternary LC). La quantificazione degli stilbeni, identificati sulla base di standard della Extrasynthese, si è basata sull'area dei picchi ottenuti ed è stata eseguita a seguito di una calibrazione esterna effettuata con gli stessi standard. Per due esperimenti (uno in seguito a trattamento fogliare e uno in seguito a fertirrigazione) sono stati analizzati anche i dischi fogliari inoculati per valutare la variazione nel contenuto di stilbeni indotta dall'infezione di *P. viticola*.

## RISULTATI

### Efficacia del trattamento fogliare

L'Anova ha evidenziato differenze significative ( $p < 0,0001$ ) tra la tesi trattata e quella di controllo (tabella 1). Le interazioni con i giorni dal trattamento sono state significative ( $p < 0,001$ ) e pertanto la variazione della risposta al trattamento varia in funzione del tempo in modo non costante nelle diverse prove.

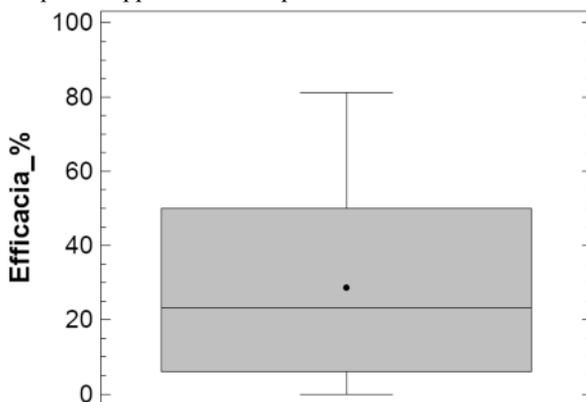
Le interazioni tra trattamento × fase fenologica al momento del trattamento, trattamento × giorni e tra trattamento × fase fenologica × giorni sono state significative ( $p < 0,001$ ) indicando che l'incidenza delle infezioni di *P. viticola* nelle due tesi ha mostrato un comportamento differente nei tre periodi fenologici e nei giorni dal trattamento. Sebbene queste interazioni siano significative, il loro contributo percentuale alla varianza spiegata è trascurabile, mentre i tre fattori principali ne spiegano oltre l'80% (tabella 1).

Tabella 1. Risultati dell'Anova per l'incidenza di *P. viticola* su foglie prelevate da piante trattate con Acticlaster e non trattate, da 1 a 10 giorni dal trattamento; l'esperimento è stato ripetuto in tre fasi fenologiche: accrescimento germogli, fioritura e invaiatura.

Fonte di variazione	Gradi libertà	Sign.	Varianza spiegata dalla fonte (%)
Trattamento	1	< 0,0001	20,834
Fase fenologica	2	< 0,0001	54,309
Giorni dal trattamento (classe)	4	< 0,0001	7,206
Trattamento × Fase fenologica	2	< 0,0001	5,565
Trattamento × Giorni	4	< 0,0001	3,628
Fase fenologica × Giorni	8	< 0,0001	6,523
Trattamento × Fase fenologica × Giorni	8	0,005	1,934

L'incidenza media di malattia è stata del 60% nel testimone non trattato e del 45% nelle foglie trattate con Acticlaster ( $p < 0,0001$ ); pertanto, l'efficacia media è stata di circa il 25%. La variabilità fra le fasi fenologiche e i giorni dal trattamento è stata però molto ampia, con valori estremi fra nessuna efficacia e efficacia superiore all'80% (figura 1).

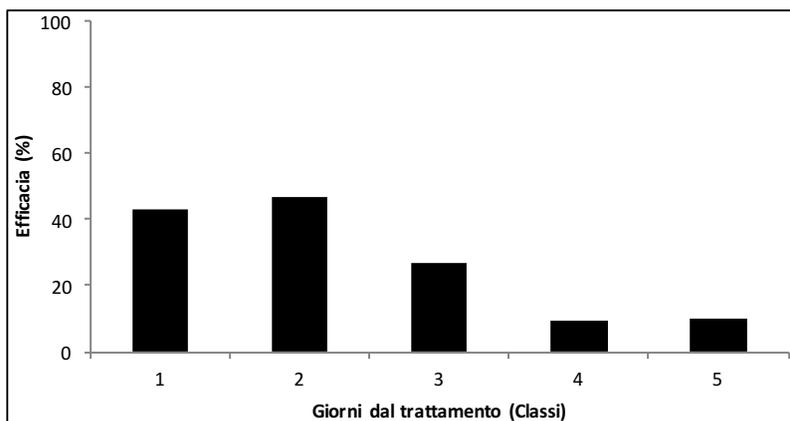
Figura 1. Efficacia della protezione contro le infezioni di *P. viticola* fornita dai trattamenti fogliari con Acticlaster. Il box-plot contiene il 50% dei casi, i baffi rappresentano il max e il min, il punto è la media, la linea il valore mediano delle prove eseguite in tre fasi fenologiche, in due anni e in 5 tempi dall'applicazione del prodotto



La fase fenologica in cui il prodotto ha espresso l'efficacia media più elevata (51,8%) è stata quella di accrescimento germogli (BBCH 55-57), mentre in fioritura (BBCH 63-69) è stato riscontrato il minor livello di protezione ottenuto nelle varie prove (5,2%). In invaiatura (BBCH 81-83), infine, si è registrato un incremento dell'efficacia media (24,2%).

La maggior protezione fornita dal prodotto è stata osservata nei primi giorni dal trattamento (classi 1 e 2), mentre a partire dal 5° giorno (classe 3), questa è via via diminuita divenendo rilevabile solo in tracce (figura 2).

Figura 2. Dinamica dell'efficacia della protezione contro le infezioni di *P. viticola* fornita dai trattamenti fogliari con Acticlaster nei giorni successivi al trattamento (classi omogenee di due giorni)



L'analisi degli stilbeni non ha evidenziato andamenti significativamente differenti nelle diverse tesi trattate con applicazioni fogliare rispetto al testimone non trattato ( $P = 0,787$ ).

### Valutazione in fertirrigazione

L'Anova ha evidenziato differenze significative ( $p < 0,0001$ ) tra i trattamenti, le fasi fenologiche e i giorni trascorsi dal trattamento (tabella 2).

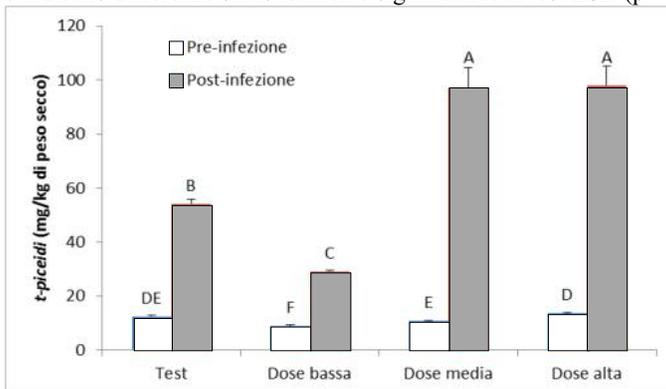
Tabella 2. Risultati dell'Anova per l'incidenza di *P. viticola* su foglie trattate mediante fertirrigazione con Acticlaster e non trattate, da 1 e a 10 giorni dal trattamento; l'esperimento è stato ripetuto in tre fasi fenologiche: accrescimento germogli, fioritura e invaiatura

Fonte di variazione	Gradi libertà	Sign.	Varianza spiegata dalla fonte (%)
Trattamento	1	< 0,0001	87,18
Giorni dal trattamento (classi)	6	< 0,0001	1,80
Fase Fenologica	2	< 0,0001	6,64
Trattamento × Giorni	6	0,321	2,29
Trattamento × Fase fenologica	2	0,001	1,63
Giorni × Fase fenologica	12	< 0,0001	0,28
Trattamento × Giorni × Fase fenologica	12	0,723	0,18

Nella tesi trattata in fertirrigazione con Acticlaster l'incidenza media delle infezioni di *P. viticola* è stata più bassa del testimone non trattato, con un'efficacia media del 25%. Nelle prime due fasi fenologiche considerate la protezione offerta dal prodotto ha permesso di contenere la malattia in modo significativo rispetto al testimone non trattato, con efficacia media del 44% e del 7%, rispettivamente; i trattamenti a invaiatura non hanno consentito un controllo significativo.

Dai risultati relativi all'utilizzo di diverse dosi di applicazione di Acticlaster in fertirrigazione è emerso che la dose non ha influenzato l'incidenza dell'infezione ( $P = 0,637$ , dati non mostrati). L'analisi dei *t-piceidi* e del *t-resveratrolo* ha però evidenziato un andamento particolare e degno di nota: mentre il *t-resveratrolo* era presente solo in tracce non quantificabili, il contenuto in *t-piceidi* ha mostrato differenze statisticamente significative ( $p < 0,0001$ ) tra le foglie campionate dalle piante fertirrigate a diverse dosi prima e dopo l'inoculazione con *P. viticola* (figura 5). In particolare, alle dosi più alte di applicazione del formulato commerciale la risposta nella biosintesi dei *t-piceidi* è risultata più evidente e nettamente più alta rispetto al testimone non trattato; quindi il prodotto potrebbe avere un ruolo nella stimolazione della biosintesi degli stilbeni che merita un ulteriore approfondimento.

Figura 5. Contenuto in *t-piceidi* in mg/kg di peso secco evidenziato dall'analisi molecolare in foglie di viti allevate secondo diversi regimi di fertirrigazione, prima e dopo l'inoculazione con sospensione di sporangi di *P. viticola*. Le barre d'errore rappresentano l'errore standard. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative al test LSD ( $p < 0,05$ )



## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'utilizzo di prodotti che contribuiscono all'equilibrio nutrizionale e vegeto-produttivo della pianta, rendendola anche meno sensibile alle malattie, può fornire un contributo alla difesa integrata, diventata obbligatoria secondo quanto stabilito dalla direttiva 128/2009/EC e successivamente indicato dal PAN. Avere piante equilibrate consente, infatti, un aumento dei meccanismi di difesa nei confronti delle malattie, con una conseguente limitazione e migliore gestione delle applicazioni di agrofarmaci.

Alcune di queste sostanze sono registrate come prodotti fitosanitari (es. fosetil-al) mentre altre sono commercializzate come biostimolanti o fertilizzanti. Questo potrebbe generare confusione da parte degli utilizzatori finali e quindi portare anche ad utilizzi non corretti delle sostanze.

Un fertilizzante, Acticlaster (Euro-TSA) che contiene acido gluconico, oligosaccaridi e zuccheri riducenti, sostanze ritenute in grado di promuovere meccanismi endogeni di difesa delle piante - oltre a ridurre i problemi di interruzione del flusso linfatico dovuti a stress biotici o abiotici della pianta (Vera et al., 2011; Berg, 2009). Gli elementi minerali, interagendo con alcuni processi fisiologici, sono in grado di sfavorire o meno i meccanismi di difesa fisici e/o chimici dalle malattie. Studi svolti hanno evidenziato gli effetti di alcuni elementi minerali nei confronti delle malattie fungine: eccessi di azoto manifestano sempre effetti negativi, riducendo la sintesi delle fitoalessine (resveratrolo e viniferine) nelle foglie e nelle bacche, a differenza del potassio e altri microelementi che favoriscono la sintesi di queste molecole e quindi la resistenza alle malattie. L'acido gluconico, presente nel prodotto in questione, facilita l'assimilazione e la traslocazione degli elementi all'interno delle piante, stimolando così le difese naturali delle stesse (De Werra, 2009).

Le prove svolte in un biennio con inoculazioni di *P. viticola* in tempi successivi ai trattamenti fogliari con il prodotto Acticlaster in diverse fasi fenologiche hanno evidenziato una discreta efficacia di quest'ultimo nel controllo delle infezioni di peronospora. L'efficacia del trattamento fogliare è risultata variabile nei giorni dal trattamento, ma non nelle tre fasi fenologiche testate. Non risultano infatti esserci differenze in termini di efficacia quando il trattamento viene effettuato in fase di accrescimento dei germogli, in fioritura o in allegagione.

L'efficacia è risultata molto variabile nei giorni che seguono il trattamento, ma è mediamente molto bassa nei confronti delle infezioni a partire dall'ottavo giorno dall'ultimo trattamento, e pertanto si può ritenere pronta e di ridotta persistenza.

Le analisi sul contenuto fogliare di stilbeni hanno suggerito che l'attività del prodotto impiegato in trattamento fogliare non sembra attivare una resistenza antiperonosporica legata ad una stimolazione nella via biosintetica del *t-resveratrolo*, che risulta coinvolto in risposte di difesa alle infezioni di peronospora (Alonso-Villaverde et al., 2011; Ahuja, 2012).

Nell'utilizzo in fertirrigazione il prodotto ha evidenziato un'efficacia inferiore, ma comunque significativa, in particolare durante le prime fasi di sviluppo e di accrescimento dei germogli. Questo fenomeno è molto probabilmente legato ad una più rapida risposta fisiologica dell'ospite in queste fasi con una traslocazione degli elementi più attiva (Conradie et al., 2017). I trattamenti in fertirrigazione a dosi crescenti hanno mostrato un'efficacia non differente dalla dose standard, ma l'analisi molecolare ha evidenziato un contenuto in *t-piceidi* significativamente maggiore in seguito all'inoculazione rispetto al pre-inoculazione nelle piante trattate. Questo potrebbe indicare un'azione da parte di Acticlaster alla quale consegue un'attivazione più pronta e/o più intensa di questi composti. Questo aspetto necessita di indagini più approfondite per essere chiarito ed eventualmente confermato.

La protezione nei confronti delle infezioni di *P. viticola* ottenuta con il solo impiego di questo prodotto, un fertilizzante, non raggiunge una soglia di protezione soddisfacente dal punto di vista dell'efficacia e della stabilità.

Nondimeno i risultati ottenuti mostrano una certa efficacia collaterale che non deve essere trascurata e che, integrando propriamente il prodotto all'interno di strategie ragionate, può portare concreti benefici ai viticoltori. Studi approfonditi e ripetuti nel tempo, come quelli sopra esposti, possono fornire valide e robuste informazioni che potrebbero essere integrate all'interno dei sistemi di supporto alle decisioni oggi in crescente diffusione nel settore viticolo ed essere quindi facilmente trasferite alla pratica agricola quotidiana.

#### LAVORI CITATI

- Abbott W. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic entomology*, 18(2), 265-267.
- Ahuja I., Kissen R., Bones A. M., 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, 17(2), 73-90.
- Alonso-Villaverde V., Voinesco F., Viret O., Spring J. L., Gindro, K., 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during Plasmopara viticola infection process. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(3), 265-274.
- Berg G., 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Conradie W. J., 2017. Seasonal uptake of nutrients by Chenin blanc in sand culture: II. phosphorus, potassium, calcium and magnesium. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2(1), 7-13.
- De Werra P., Péchy-Tarr M., Keel C., Maurhofer M., 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4162-4174.
- Downey M. O., Rochfort S., 2008. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201(1), 43-47.

- Lorenz D. H., Eichhorn K. W., Bleiholder H., Klose R., Meier U., Weber E., 1995. Growth Stages of the Grapevine: Phenological growth stages of the grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). Codes and descriptions according to the extended BBCH scale. Australian Journal of Grape and Wine Research, 1(2), 100-103.
- OIV., 2009. OIV Descriptor List for Grape Varieties and *Vitis* Species (2nd edition). Office International de la Vigne et du Vin (OIV), Paris.
- Vera J., Castro J., Gonzalez A., Moenne A., 2011. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. Marine drugs, 9(12), 2514-2525.