

UTILIZZO DI ACQUA ACIDA ELETTROLIZZATA IN VIVAIO NEI CONFRONTI DI PATOGENI DEL LEGNO DELLA VITE

S. DI MARCO¹, F. OSTI¹, D. BOSSIO², M. NOCENTINI², E. METRUCCIO¹,
E. BATTISON², L. MUGNAI²

¹ Istituto di Biometeorologia, CNR - Via G. Gobetti, 101, 40129 Bologna

² Dipartimento di Scienze Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente, Università degli Studi di Firenze, Piazzale delle Cascine, 28, 50144 Firenze
s.dimarco@ibimet.cnr.it

RIASSUNTO

Phaeomoniella chlamydospora (*Pch*) e *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) sono i principali funghi patogeni associati a malattie del legno della vite in vivaio. Questi patogeni possono causare nel materiale di propagazione infezioni latenti, spesso associate a forme di deperimento in impianti giovani. L'infezione può verificarsi durante diverse fasi del processo produttivo, in particolare durante l'idratazione. Per ridurre questo rischio è stata valutata l'attività di acqua acida elettrolizzata (EAW) utilizzata per idratare le talee prima dell'innesto. L'EAW è un igienizzante caratterizzato da pH 2,5, potenziale di ossidoriduzione (ORP)>1000 e cloro libero. Sono state effettuate prove su 3 portinnesti: 1103P, K5BB e SO4 (cultivar Trebbiano romagnolo) in ambiente controllato e in vivaio, su materiale inoculato artificialmente con *Pch*. I principali risultati indicano una significativa riduzione dell'infezione di *Pch* rilevata alla fine del ciclo vegetativo, su piante idratate in EAW.

Parole chiave: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum*, idratazione portinnesto, mal dell'esca

SUMMARY

ACTIVITY OF ELECTROLYZED ACID WATER TOWARDS TRUNK DISEASE PATHOGENS IN GRAPEVINE NURSERY

Phaeomoniella chlamydospora (*Pch*) and *Phaeoacremonium minimum* (*Pmi*) are the main grapevine trunk disease pathogens that cause infections in the nursery and are often associated to decline occurrence in young vineyards. The infection may occur during the grafting process, particularly during hydration. This study assessed the activity of electrolyzed acid water (EAW) to reduce the risk of infections during the hydration of cuttings before grafting. EAW is a sanitizing agent characterized by low values of pH (2.5), high oxidation-reduction potential (ORP>1000) and a certain amount of free chlorine. Trials were performed on three rootstocks 1103P, K5BB and SO4 (Trebbiano romagnolo as scion), under controlled conditions and in the nursery where plants were artificially inoculated with *Pch*. The most important results showed a significant reduction of the infection severity on cuttings inoculated with *Pch* and hydrated in EAW assessed in the nursery at the end of the vegetative growing season.

Keywords: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum*, cutting hydration

INTRODUZIONE

Phaeomoniella chlamydospora (*Pch*) e, in misura minore, *Phaeoacremonium* spp. - *P. minimum* (*Pmi*) in particolare - sono i principali patogeni associati al complesso Esca, la più importante e diffusa malattia del legno della vite (Surico et al, 2008). In vivaio, *Pch* e *Pmi* possono infettare il materiale di propagazione durante tutto il processo produttivo, soprattutto nella fase d'idratazione prima dell'innesto, e possono causare imbrunimenti al legno sotto forma

di punteggiature e strie bruno-nerastre. Gli imbrunimenti, nella maggior parte dei casi, non sono associati a sintomi esterni, rendendo impossibile distinguere una pianta in cui i patogeni sono presenti da una pianta esente da infezione. Tuttavia, sebbene numerosi studi indichino la presenza di patogeni nel legno delle viti alla fine del processo di propagazione, e questi siano stati dimostrati essere associati a fenomeni di deperimento nei nuovi impianti (Edwards e Pascoe, 2004) non è stato ancora dimostrato definitivamente il ruolo delle infezioni nel materiale di propagazione sulla *performance* delle piante in vigneto (Gramaje e Armengol, 2011).

Molte ricerche condotte nelle principali fasi di produzione delle barbatelle sono state finalizzate allo sviluppo di una strategia che consenta il contenimento delle infezioni da *Pch* e *Pal* e il miglioramento qualitativo della barbatella. I risultati più promettenti, sebbene non risolutivi, sono stati conseguiti utilizzando formulati a base di *Trichoderma*, con una riduzione della severità delle infezioni e un miglioramento dell'apparato radicale della barbatella (Di Marco e Osti, 2007; Fourie et al., 2007; Gramaje e Di Marco, 2015; Pertot et al., 2016).

L'acqua acida elettrolizzata (EAW) è un disinfettante utilizzato prevalentemente su strumenti chirurgici e per la sterilizzazione di prodotti alimentari (Huang et al., 2008), ed è ottenuta per elettrolisi di soluzioni di NaCl o di KCl, eseguita in una speciale attrezzatura dove anodo e catodo sono separati da una membrana a scambio cationico. EAW è prodotta all'anodo ed è caratterizzata da pH 2,3-2,7, potenziale di ossido-riduzione (ORP)>1000 e una certa percentuale di cloro libero (Li et al., 2014).

Diversi studi hanno evidenziato effetti di acque acide elettrolizzate, utilizzate in vario modo, nei confronti di patogeni delle piante quali *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Helminthosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Epicoccum nigrum*, *Monilinia fructicola*, *Phomopsis longicolla*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum* o *Tilletia indica* (Fujiwara et al., 2011; Xiong et al., 2014) e, preliminarmente, su *Pch* e *Pmi* (Di Marco e Osti, 2009).

Il presente lavoro riporta gli effetti di applicazioni di EAW in vivaio finalizzate al contenimento di infezioni di *Pch* provocate artificialmente su talee di alcuni portinnesti tra i più utilizzati su vite.

MATERIALI E METODI

Trattamento e verifica di piante vegetanti e certificabili

L'acqua acida elettrolizzata (EAW) è stata ottenuta da un generatore EAW-AG25 (CBC Europe, Nova Milanese) attraverso un processo di elettrolisi a membrana. L'EAW utilizzata nel presente studio aveva i seguenti valori: pH = 2,5-2,7; ORP = 1120-1129 mV, e 40-42 ppm di cloro libero.

Il processo di idratazione è stato effettuato secondo la consuetudine del vivaio, operando con mazzi di 650-700 talee di ciascuno dei tre portinnesti 1103P, K5BB e SO4 oggetto di indagine. Le talee sono state prelevate in marzo, dopo conservazione in cella frigorifera a 3-5°C, e idratate in EAW o acqua. L'idratazione è stata condotta per 7-8 o 10-12 ore, all'interno dei contenitori in PVC normalmente utilizzati in vivaio. Le talee sono state quindi adoperate come portinnesto per marze della cv Trebbiano romagnolo. Dopo l'innesto a omega eseguito con innestatrice manuale, le piante sono state sottoposte a forzatura in segatura per circa tre settimane e, dopo una settimana di acclimatazione in serra non riscaldata, sono state messe a dimora su terreno in vivaio. Per ogni tesi, sono state previste tre parcelle randomizzate, ciascuna costituita da 150 piante e corrispondente a una ripetizione. Le barbatelle sono state periodicamente monitorate ed è stato eseguito un rilievo alla raccolta atto a verificare la percentuale di piante vive rispetto a quelle inizialmente piantate in vivaio, e la percentuale di piante certificabili di prima scelta (Dir. 2002/11/CE) rispetto a quelle vive alla raccolta.

Per ogni portinnesto e tempo di idratazione realizzato utilizzando acqua o EAW, i dati ottenuti esprimono la percentuale media di barbatelle raccolte rispetto a quelle inizialmente piantate in

terreno di vivaio, e la percentuale media di barbatelle certificabili rispetto a quelle raccolte. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante l'analisi della varianza Anova ($p=0,05$) per discriminare gli effetti dei diversi tipi di acqua utilizzati.

La prova è stata condotta nel 2015 e 2016 con analoghe modalità di esecuzione.

Inoculazione di *Pch* e trattamento

Ulteriori 100 talee per ciascuno dei 3 diversi portinnesti oggetto d'indagine sono state prelevate in febbraio durante la frigo-conservazione a 3-5°C e sono state inoculate mediante sospensione acquosa di conidi di *Pch*. L'inoculo è stato ottenuto da colonie di *Pch* (*Phaeomoniella chlamydospora*, CBS 229.95) di 15-20 giorni, cresciute su PDA e mantenute in frigo-termostato a 25°C e fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 di buio. Dopo deposizione di acqua sterile nella piastra, la colonia è stata leggermente raschiata con ansa e la sospensione conidica è stata aggiustata alla concentrazione d'uso di 1×10^5 /mL, determinata in cella Thoma. L'inoculazione è stata condotta immergendo la base della talea (2 cm) per 2 ore, in recipienti di PVC contenenti la sospensione conidica, che è stata periodicamente agitata per evitare la deposizione dell'inoculo sul fondo del recipiente. Altre 50 talee per ogni portinnesto sono state immerse in acqua, secondo le stesse modalità, a rappresentare la tesi non inoculato e non trattato. Le talee sono state poi ricollocate in frigo-conservazione.

A 45 giorni dall'inoculazione, 50 talee inoculate sono state trattate per idratazione in EAW e 50 in acqua, per 7-8 ore. Parallelamente, le 50 talee non inoculate sono state idratate in acqua per la valutazione dell'infezione naturale.

La prova è stata condotta nel 2016.

Isolamento di *Pch* da talee e barbatelle

Gli isolamenti sono stati effettuati nel tessuto legnoso di talee prelevate prima dell'inoculazione e di barbatelle alla raccolta, focalizzando l'attenzione sulla presenza di *Pch*.

Venti talee prelevate a campione prima dell'inoculazione sono state decorticate, fiammate superficialmente e sezionate longitudinalmente in tutta la loro lunghezza. Frammenti di legno prelevati a diverse altezze e, sempre, da aree di legno imbrunito, sono stati posti in piastre Petri contenenti PDA + streptomicina. Le piastre sono state collocate in frigo-termostato alla temperatura e fotoperiodo sopra riportati per il mantenimento di colonie di *Pch* in crescita, verificando l'eventuale sviluppo del patogeno.

Dopo la raccolta, 20 barbatelle, ognuna delle quali rappresentante una ripetizione, di ogni combinazione innesto/portinnesto, inoculate e trattate in EAW o acqua (non inoculate e trattate in acqua per l'infezione naturale) sono state decorticate e fiammate superficialmente. Sono state poi ricavate dal tronco sezioni trasversali di legno, a diverse altezze a partire dal punto di inoculazione. Ciascuna sezione legnosa è stata suddivisa in 4-6 frammenti che sono stati collocati in piastre Petri contenenti PDA + streptomicina. Attraverso passaggi successivi in altre piastre con analogo substrato nutritivo, si è valutata la presenza di colonie di *Pch*. Per ogni tesi, portinnesto e distanza dalla base della barbatella i dati provenienti da tutte le piante sono stati mediati e analizzati statisticamente con Tukey MRT, $P = 0,05$.

Per ogni portinnesto, sono stati analizzati i dati relativi al reisolamento del fungo fino alla distanza dal luogo di inoculazione in cui la percentuale media di frammenti fertili per *Pch* ha evidenziato valori statisticamente simili tra le talee idratate in acqua inoculate e non inoculate (infezione naturale).

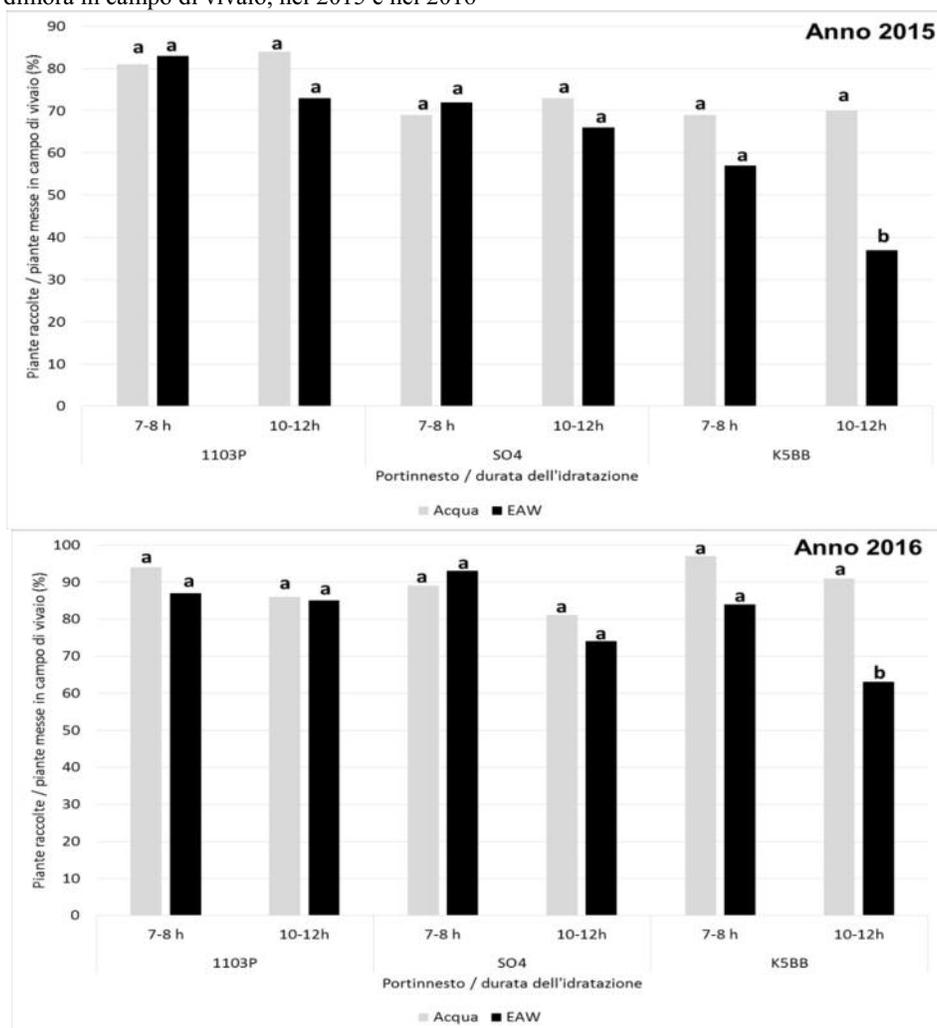
La prova è stata eseguita nel 2016.

RISULTATI

Verifica di piante vegetanti e certificabili

L'idratazione in EAW per 10-12 ore ha evidenziato, in entrambi gli anni di prova, un decremento statisticamente significativo di piante vive alla raccolta per la sola combinazione K5BB/Trebbiano. Questo decremento non è stato rilevato in alcuna combinazione innesto/portinnesto idratando le talee per 7-8 ore (figura 1).

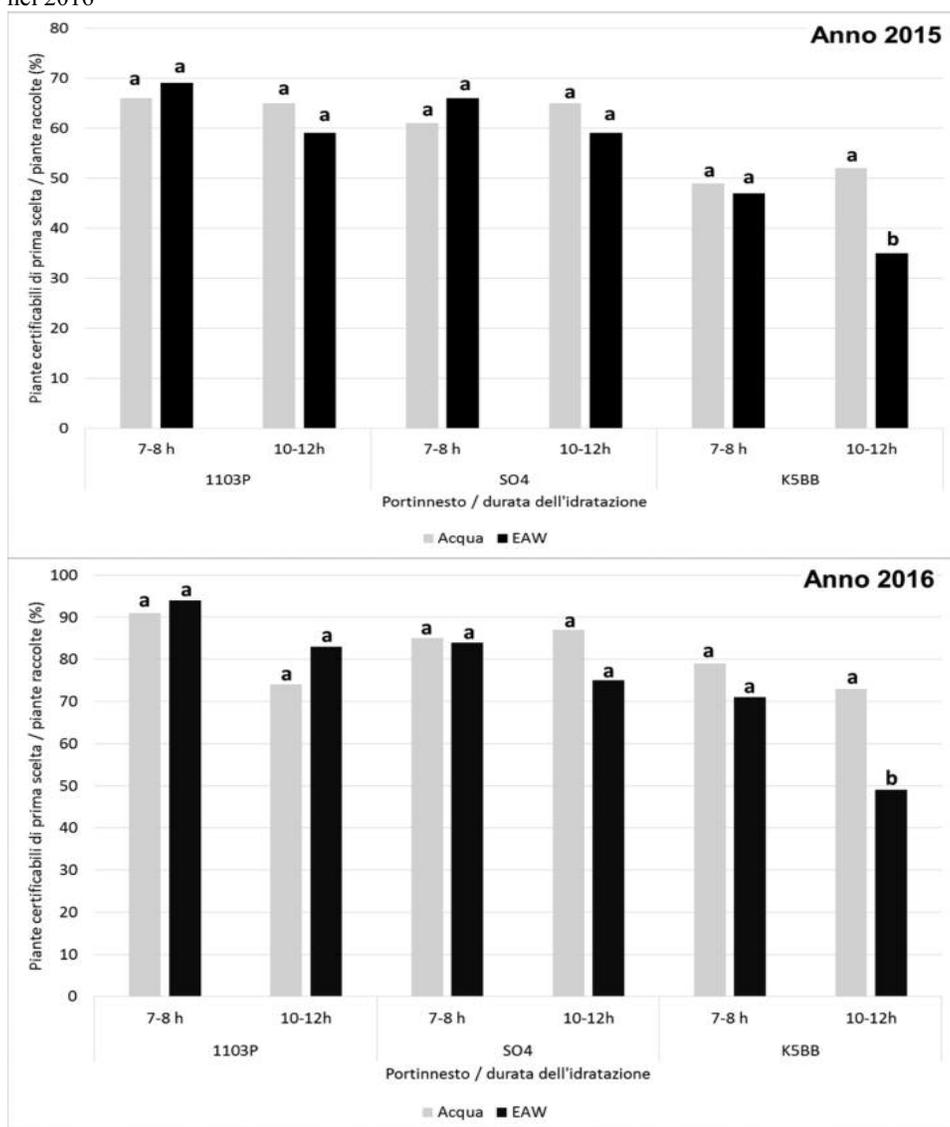
Figura 1. Percentuale di piante raccolte a fine stagione vegetativa rispetto a quelle messe a dimora in campo di vivaio, nel 2015 e nel 2016



Per ogni tesi, i dati ottenuti si riferiscono alla percentuale media di barbatelle raccolte rispetto a quelle piantate in campo di vivaio. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante Anova ($p=0,05$) per discriminare tra i diversi tipi di acqua utilizzati. Per ogni anno di prova, portinnesto e tempo di idratazione, lettere differenti indicano differenze statisticamente significative tra le tesi

La percentuale di barbatelle certificabili in relazione a quelle raccolte non è stata influenzata dal tipo di idratazione in EAW o in acqua. I dati ottenuti, infatti, hanno mostrato valori statisticamente simili per le 3 combinazioni innesto/portinnesto (figura 2).

Figura 2. Percentuale di piante certificabili di prima scelta rispetto a quelle raccolte, nel 2015 e nel 2016



Per ogni tesi, i dati ottenuti si riferiscono alla percentuale media di barbatelle certificabili di prima scelta rispetto a quelle raccolte. I dati sono stati analizzati statisticamente mediante Anova ($P=0,05$) per discriminare tra i diversi tipi di acqua utilizzati. Per ogni anno di prova, portinnesto e tempo di idratazione, lettere differenti indicano differenze statisticamente significative tra le tesi.

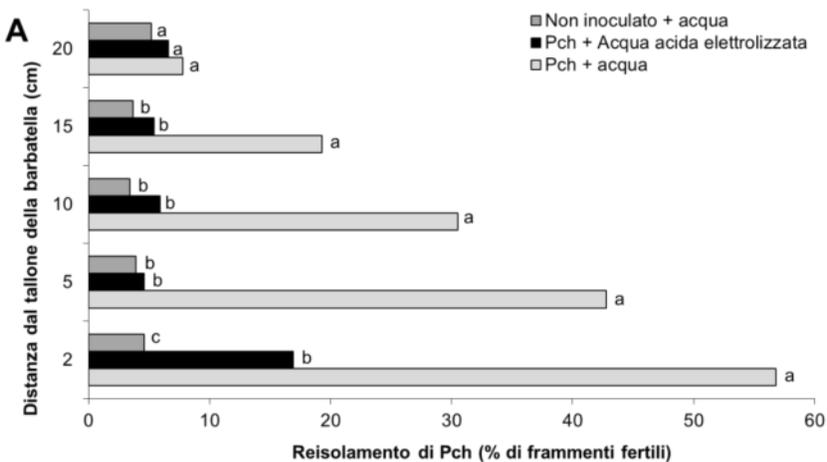
Isolamento di *Pch* da talee e da barbatelle

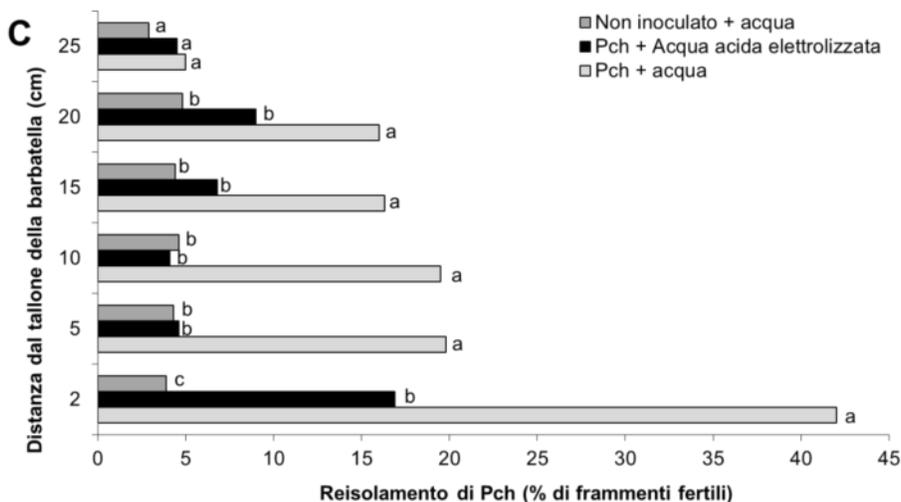
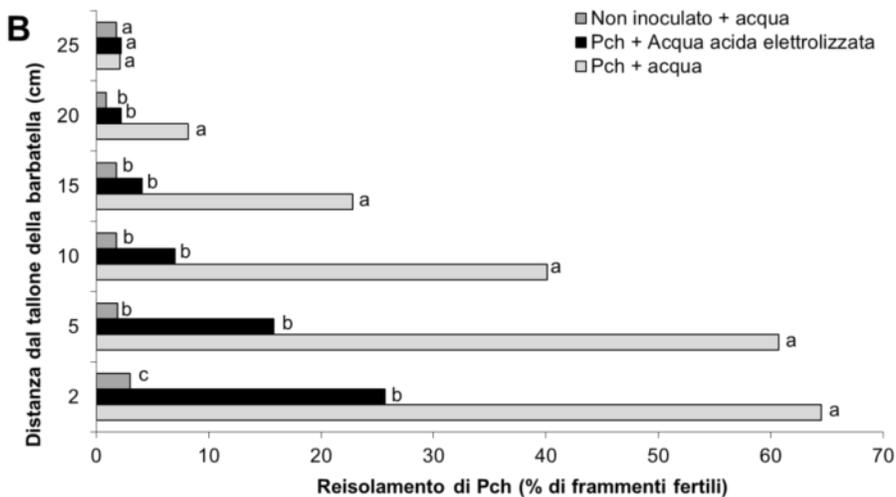
Gli isolamenti effettuati su talee prelevate a campione da magazzino prima dell'inoculazione hanno mostrato una scarsa presenza di *Pch* nei tessuti legnosi, con una frequenza media variabile tra 1 e 3% di frammenti fertili. Al contrario, la percentuale di talee in cui è stato rilevato il *Pch* è risultata del 65% (33 su 60) indipendentemente dal tipo di portinnesto.

Relativamente ai risultati ottenuti sulle barbatelle derivate da talee inoculate artificialmente con *Pch*, la dinamica di reisolamento del patogeno lungo il tronco verificata alla raccolta è risultata uguale nelle tre combinazioni innesto-portinnesto. Una riduzione costante della colonizzazione in seguito all'infezione artificiale (frammenti fertili per *Pch*) è stata osservata dal tallone della pianta andando verso il punto di innesto (figura 3).

Le percentuali rilevate di frammenti fertili per *Pch* evidenziano una minore colonizzazione da parte del patogeno nelle barbatelle con portinnesto K5BB, rispetto a quelle con 1103P e a quelle con SO4, dove si è registrata la massima percentuale di colonizzazione. Gli isolamenti effettuati nei primi 15 cm dal tallone per 1103P e nei primi 20 cm dal tallone per SO4 e K5BB, hanno evidenziato una percentuale media di frammenti di legno colonizzati da *Pch* sempre statisticamente inferiore nelle piante inoculate e idratate in EAW, rispetto alle corrispondenti piante inoculate e idratate in acqua (figura 3).

Figura 3. Reisolamento di *Pch* effettuato dopo la raccolta in barbatelle innestate su portainnesti 1103P (A), SO4 (B) o K5BB (C)





Per ogni tesi, portinnesto e distanza dalla base della barbatella i dati provenienti da tutte le piante sono stati mediati e analizzati statisticamente con Tukey MRT, a $P = 0,05$. Per ogni distanza dal tallone, lettere differenti indicano differenze statisticamente significative tra le tesi

Ad eccezione di quanto rilevato nei primi 2 cm dal luogo di inoculazione (fino a 5 cm per SO4), le piante inoculate e idratate in EAW hanno mostrato una percentuale di frammenti fertili per *Pch* statisticamente simile a quanto rilevato nelle piante non inoculate e trattate in acqua. Le piante inoculate artificialmente e idratate con acqua hanno mostrato una percentuale media di

frammenti fertili di *Pch* simile a quella rilevata nelle piante non inoculate e idratate in acqua solo a una distanza dal tallone di 20 cm per 1103P e 25 cm per SO4 e K5BB.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio è stato condotto a completamento e conferma di una più ampia ricerca atta a valutare caratteristiche, modalità d'azione e interazioni con i patogeni e la pianta ospite dell'EAW, e finalizzata allo sviluppo di una strategia di contenimento delle infezioni di patogeni fungini del legno di vite in vivaio (Di Marco et al., 2017).

I dati qui riportati mostrano che l'idratazione con EAW non ha mai interferito sulla percentuale di piante certificabili rispetto a quelle raccolte.

Tuttavia si è rilevata una riduzione di piante vegetanti a seguito dell'idratazione in EAW ma solo in una combinazione, K5BB/Trebbiano romagnolo, e solo se sottoposta ad una prolungata idratazione (10-12 ore). Tale effetto fitotossico potrebbe costituire un limite dell'applicazione e dovrebbe essere valutato preliminarmente nelle diverse cultivar e combinazioni nesto/portainnesto, ma va ricordato che rilievi precedentemente condotti sull'assorbimento e sull'idratazione delle talee per i portinnesti investigati e le condizioni della prova, hanno mostrato che un'idratazione di 7-8 ore in acqua o EAW era adeguata a garantire una corretta idratazione della talea (Di Marco e Osti, 2009).

Considerando globalmente i risultati ottenuti, è stato possibile osservare una consistente riduzione della colonizzazione in seguito all'infezione artificiale di *Pch* nelle barbatelle derivanti da talee idratate in EAW, rispetto a quelle idratate in acqua.

Nel materiale proveniente da magazzino prelevato prima dell'idratazione, si è notata una scarsa presenza di legno naturalmente infetto da *Pch*, ovvero una bassa percentuale di frammenti risultati fertili. Su barbatelle alla raccolta, dopo innesto, forzatura e radicazione, l'incidenza delle infezioni naturali, era maggiore rispetto a quanto rilevato sulle talee in magazzino, pur sempre a fronte di una limitata colonizzazione ovvero limitata frequenza di isolamento. Tale fatto conferma che il rischio d'infezione è crescente durante le diverse fasi di lavorazione del materiale di propagazione (Gramaje e Armengol, 2011).

L'incremento di infezione rilevato anche in questo lavoro, potrebbe attribuire un ulteriore valore all'azione di contenimento dell'infezione da *Pch* da parte dell'EAW. Infatti, la percentuale di frammenti fertili nelle piante inoculate e idratate in EAW, rilevata per le 3 combinazioni innesto/portainnesto già a 5 cm dal punto di inoculazione e a distanze superiori, è generalmente allineata a una naturale presenza di *Pch* nella pianta. In altre parole l'idratazione in EAW ha ridotto un'infezione artificiale di gravità elevatissima, a livelli di contaminazione della barbatella "fisiologici" per le condizioni in cui si è operato e la partita di materiale legnoso utilizzata.

Ulteriori verifiche potranno evidenziare l'eventuale effetto di riduzione da parte di EAW delle infezioni che si verificano naturalmente in vivaio, in un contesto in cui non sono attualmente disponibili strategie di difesa che consentano la produzione di materiale di propagazione esente da patogeni del legno.

In conclusione, i risultati acquisiti in questo lavoro e le recenti evidenze sull'efficacia di EAW nel contenimento della germinazione conidica di *Pch* e *Pmi*, e sul mantenimento di favorevoli valori di pH e ORP anche dopo il contatto con i tessuti della pianta ospite (Di Marco e Osti 2009; Di Marco et al., 2017), suggeriscono un potenziale utilizzo dell'acqua acida elettrolizzata per la riduzione del livello di contaminazione delle viti da patogeni del legno nel processo di propagazione delle barbatelle in vivaio.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Dr. Gianluca Mordenti, MIVA - Ampelos Italia, i Vivai Dalmonte Guido e Vittorio, Brisighella (RA) e Vitis Rauscedo, San Giorgio della Richinvelda (PN) per l'assistenza tecnica durante l'esecuzione delle prove.

LAVORI CITATI

- Di Marco S., Osti F., 2007. Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeoconiella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 73–83.
- Di Marco S., Osti F., 2009. Activity of Electrolyzed Acid Water for the control of *Phaeoconiella chlamydospora* in the nursery. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 1, 183.
- Di Marco S., Osti F., Nocentini M., Mugnai L., 2017. Activity of electrolyzed acid water for the control of trunk disease pathogens of grapevine in the nursery. 10thIWGTD, 4-7 Luglio 2017, Reims. *Phytopathologia Mediterranea*, 56, 3.
- Edwards, J., Pascoe, I. G., 2004. Occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 33(2), 273–279.
- Fourie P.H., Halleen F., van der Vyver J., Schrueder W., 2001. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens on the roots and rootstocks of nursery plants. *Phytopathologia Mediterranea* 40S, 473-478
- Fujiwara K., Fujii T., Park J-S., 2011. Successive spraying efficacy of acidic electrolyzed oxidizing water and alkalic electrolyzed reducing water on controlling powdery mildew infection and suppressing visible physiological disorder on cucumber leaves. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52 (4), 387-392.
- Gramaje D., Armengol J., 2011. Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. *Plant Disease*, 95, 1040–1055.
- Gramaje D., Di Marco S., 2015. Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. *Phytopathologia Mediterranea*, 54, 313–324.
- Huang Y.R., Hung Y.C., Hsu S.Y., Huang Y.W. Hwang, D.F., 2008. Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*, 19, 329–345.
- Li J. B., Lin T., Lu Q., Wang J. J., Liao C., Pan Y. J., Zhao Y., 2014. Changes in physicochemical properties and bactericidal efficiency of acidic electrolyzed water ice and available chlorine decay kinetics during storage. *LWT-Food Science and Technology* 59, 43–48.
- Pertot I., Prodorutti D., Colombini A., Pasini L., 2016. *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *BioControl*, 61, 257–267.
- Surico G., Mugnai L., Marchi G., 2008. The Esca Disease Complex. In: Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria (Ciancio A., Mukerji K.). Cap. 6, Springer, 119-136.
- Xiong K., Li X.T., Guo S., Li L.T., Liu H.J., 2014. The antifungal mechanism of electrolyzed oxidizing water against *Aspergillus flavus*. *Food Science and Biotechnology*, 23, 661–669.

