VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIBOTRITICA DI DIVERSI PRODOTTI A BASSO IMPATTO AMBIENTALE PER IL CONTENIMENTO DI *BOTRYTIS CINEREA* SU VITE IN EMILIA-ROMAGNA

F. CAVAZZA[1], M. PRETI[1], F. FRANCESCHELLI[1], M. LANDI[1], M. MONTANARI[1], L. ANTONIACCI[2], R. BUGIANI[2]
[1]Astra Innovazione e Sviluppo CdS, Via Tebano 45, 48018 Faenza (RA)
[2]Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna, Via di Saliceto 81, 40128 Bologna (BO)
michele.preti@astrainnovazione.it

RIASSUNTO

Scopo di questo lavoro, realizzato in un'azienda sita a Faenza (RA) nelle annate 2016 e 2017 su cv Trebbiano Romagnolo, è stato valutare l'efficacia antibotritica di diversi prodotti ecocompatibili applicati in linea efficacia. I prodotti saggiati, sono stati: *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Pythium oligandrum, Trichoderma gamsii + Trichoderma harzianum,* estratti di *Reynoutria sachalinensis*, eugenolo-geraniolo-timolo, cerevisane e bicarbonato di K, sono stati comparati con l'attività di uno standard chimico di riferimento (p.a. cyprodinil + fludioxonil). Dai risultati emerge come in presenza di forti attacchi nessun prodotto garantisce un buon controllo della malattia; comunque nel breve periodo l'attività di questi prodotti a basso impatto risulta essere interessante, sebbene non paragonabile allo standard chimico di riferimento.
Parole chiave: muffa grigia, prodotti ecocompatibili, agenti di controllo biologico

SUMMARY

EFFICACY EVALUATION OF LOW-RISK FUNGICIDES FOR THE CONTROL OF *BOTRYTIS CINEREA* ON GRAPEVINE IN EMILIA-ROMAGNA

The purpose of this study, carried out in a Trebbiano Romagnolo vineyard located in Faenza (RA) in 2016 and 2017, was the evaluation of the different eco-friendly products to control grey mold on grapevine. The tested products, selected from "low-risk" characteristics, act directly on the fungus or as natural antagonists; *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Pythium oligandrum, Trichoderma gamsii + Trichoderma harzianum, Reynoutria sachalinensis* extracts, eugenol-geraniol-thitholum extracts, cerevisane and K bicarbonate were compared with the activity of a reference chemical standard (a.i. cyprodinil + fludioxonil). The results show that in the presence of severe infections no product guarantees good control of the disease; however, in the short term the performance of these low-risk products is interesting, though not comparable to the chemical reference standards.
Keywords: grey mold, low-risk plant protection products, Biological Control Agents (BCAs)

INTRODUZIONE

La botrite o muffa grigia, causata dall'agente patogeno *Botrytis cinerea*, è insieme a peronospora (*Plasmopara viticola*) e oidio (*Erysiphe necator*) tra le principali malattie della vite potendo provocare, in particolare nel periodo immediatamente precedente la vendemmia, danni importanti alla produzione (Elmer e Michailides, 2007). È un marciume che colpisce tipicamente i grappoli in maturazione, sebbene meno frequentemente possa infettare anche foglie, giovani tralci e infiorescenze. Favorito da un andamento stagionale piovoso, il patogeno generalmente penetra passivamente attraverso microferite nella buccia degli acini, ma può presentare anche una penetrazione attiva.

La prevenzione agronomica è alla base di una buona difesa antibotritica (Vercesi e Sancassani, 2008), in particolare riducendo la vigoria delle piante, apportando un'equilibrata concimazione e irrigazione e garantendo una buona aerazione della chioma (con potatura verde e sfogliature). Comunque, in particolare nei casi di alto rischio e in condizioni ambientali predisponenti, è necessario intervenire anche chimicamente. Le strategie di lotta sono basate generalmente su 3 interventi mirati in determinate fasi fenologiche: in pre-chiusura grappolo (BBCH 77), ad invaiatura (BBCH 81-83) e in pre-raccolta (BBCH 88-89). In pre-chiusura grappolo un'applicazione fungicida è realizzata per colpire i conidi presenti tra gli acini, prima che diventino irraggiungibili con l'ingrossamento degli acini; il secondo trattamento è solitamente mirato a proteggere il grappolo all'inizio della fase di maturazione (gli acini diventano infatti più sensibili da invaiatura in avanti) e l'ultimo trattamento precedente la vendemmia è finalizzato a proteggere il raccolto dalle infezioni di fine estate-autunno, spesso favorite dalle perturbazioni atmosferiche tipiche di questo periodo stagionale. Non è stata, invece, sufficientemente investigata l'efficacia di un eventuale intervento nella fase fiorale, in particolare con antagonisti microbici, con lo scopo di impedire l'insediamento del patogeno sui residui fiorali (caliptre e stami) che possono rappresentare un buon substrato per il fungo.

Il controllo chimico può essere interessato da fenomeni di resistenza dei ceppi del patogeno alle varie classi di fungicidi impiegate (Leroux, 2007) e in ogni caso in agricoltura biologica non è percorribile. Pertanto, obiettivo del presente studio è stata la valutazione di prodotti alternativi ai convenzionali fungicidi di sintesi per poter controllare efficacemente tale avversità. Tali prodotti hanno modalità di azione diverse: dagli antagonisti microbici come *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* (Priest et al., 1987; Ladurner et al., 2012*)*, *Trichoderma gamsii* + *Trichoderma harzianum*, *Pythium oligandrum,* agli estratti vegetali agenti come elicitori, come quelli derivanti da *Reynoutria sachalinensis* (Ortugno et al., 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (Pujos et al., 2014a; Pujos et al., 2014b), estratti di eugenolo-geraniolo-timolo (Querzola et al., 2016), fino a veri e propri prodotti di copertura come il bicarbonato di K (Di Martino et al., 2014). A tale riguardo anche le indicazioni comunitarie promuovono soluzioni a minor impatto ambientale, sia per il profilo tossicologico che eco-tossicologico dei formulati impiegati (Schilder et al., 2002). Infine, per agevolare i processi autorizzativi e l'immissione in commercio di questo tipo di formulati, recentemente l'OEPP/EPPO ha rilasciato un documento guida per i prodotti considerati a basso impatto (EPPO, 2017).

MATERIALI E METODI

Due prove di pieno campo sono state svolte nel biennio 2016-2017 in un'azienda viticola sita in pianura a Faenza (RA), su vitigno Trebbiano Romagnolo, impiantato nel 2012 e allevato a cordone libero, sesto di impianto 3 m x 1,5 m, con irrigazione a goccia, lavorazione del suolo interfilare e tra le piante. Tale vigneto è stato scelto in quanto presentava le condizioni predisponenti per buoni attacchi di botrite, in particolare grazie al buon rigoglio vegetativo delle piante (dovuto alla specifica gestione agronomica, in particolare irrigazione, lavorazione del suolo e concimazioni aziendali), presupposto indispensabile per realizzare una prova di efficacia. Le due prove, realizzate sullo stesso impianto, hanno però preso in considerazione appezzamenti differenti.

Il disegno sperimentale adottato è il classico a blocchi completi randomizzati (RCB) con 4 ripetizioni per tesi e parcelle di 5 piante (22,5 m^2 per replica, 90 m^2 per tesi). Le tesi in prova sono riportate in tabella 1, così come le epoche di intervento. Le applicazioni sperimentali sono state realizzate con nebulizzatore spalleggiato Stihl modello SR420 (ugello 2 mm),

distribuendo un volume d'acqua simulato di 1100 L/ha e avendo cura di raggiungere e non superare il limite del gocciolamento.

Tabella 1. Tesi in prova nel 2016 e 2017

Anno		Tesi / Formulato commerciale (f.c.)	Principio attivo (concentrazione)	Dose f.c. (g o mL/ha)	Epoca intervento(*)
2016	2017				
X	X	Testimone Non Trattato	-	-	-
X	X	Switch	Cyprodinil (37,5%) + fludioxonil (25%)	800	B, C
X	X	Serenade Aso	*Bacillus subtilis* ceppo QST 713 (13,96 g/L, 1 × 10^{12} CFU/kg)	8000	A, B, C, D
X		Amylo X	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ceppo D 747 (25%, 5x10^{10} CFU/g)	2000	A, B, C, D
X		Karma	Bicarbonato di potassio (85 %)	5000	A, B, C, D
X		Romeo	Cerevisane, frazione inerte di un ceppo non modificato geneticamente del lievito *Saccharomyces cerevisiae* (92,4%)	250	A, B, C, D
X	X	3Logy	Eugenolo (33,00 g/L) + geraniolo (66,00 g/L) + timolo (66,00 g/L)	4000	A, B, C, D
X		Sakalia	Estratto ricavato da *Reynoutria sachalinensis* (20%)	2500	A, B, C, D
	X	Polyversum	*Pythium oligandrum* ceppo m1 (17,50%)	300	A, B, C, D
	X	Remedier	*Trichoderma gamsii* icc 080 (2,00%), *Trichoderma harzianum* icc 012 (2,00%)	1000	A, B, C, D

(*) Epoche intervento: A = fine fioritura-allegagione (BBCH 69-71), B = pre-chiusura grappolo (BBCH 77), C = invaiatura (BBCH 81-83) e D = pre-raccolta (BBCH 88-89).

In ciascuna prova sono stati realizzati due rilievi osservando 50 grappoli nella parte centrale di ciascuna parcella e valutando incidenza e severità della malattia. L'incidenza è stata espressa come percentuale di grappoli sintomatici rispetto al totale degli osservati, mentre la severità percentuale è stata stimata visivamente attribuendo a ciascun grappolo una classe di attacco in base alla superficie danneggiata; le classi di danno adottate sono: 0 = assenza di sintomi; 1 = 0,1÷5% di superficie sintomatica; 2 = 6÷15% di superficie sintomatica, 3 = 16÷40% di superficie sintomatica; 4 = 41÷70% di superficie sintomatica; 5 = 71÷100% di superficie sintomatica. Infine, nel 2016 dalle parcelle del testimone non trattato è stato raccolto un campione di uva sana per analizzare il grado zuccherino, pH e acidità totale e

quindi determinare il grado di maturazione delle uve, così da poter correlare lo sviluppo della malattia con la suscettibilità del grappolo.

Per quanto riguarda l'analisi statistica, i dati sono stati elaborati mediante Analisi della Varianza (Anova) e successivo test di Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$) per la separazione delle medie, trasformando tutte le percentuali con arcoseno della radice quadrata percentuale. Si è inoltre calcolato il grado d'azione percentuale (Abbott) rispetto al testimone non trattato.

L'andamento meteo è stato registrato durante il periodo di prova ed è riportato in figura 1 e figura 2, rispettivamente per la stagione 2016 e 2017.

Figura 1. Andamento meteorologico registrato nel 2016 (stazione di Reda di Faenza, RA, a circa 8 km di distanza dal sito di prova); le frecce indicano i trattamenti sperimentali

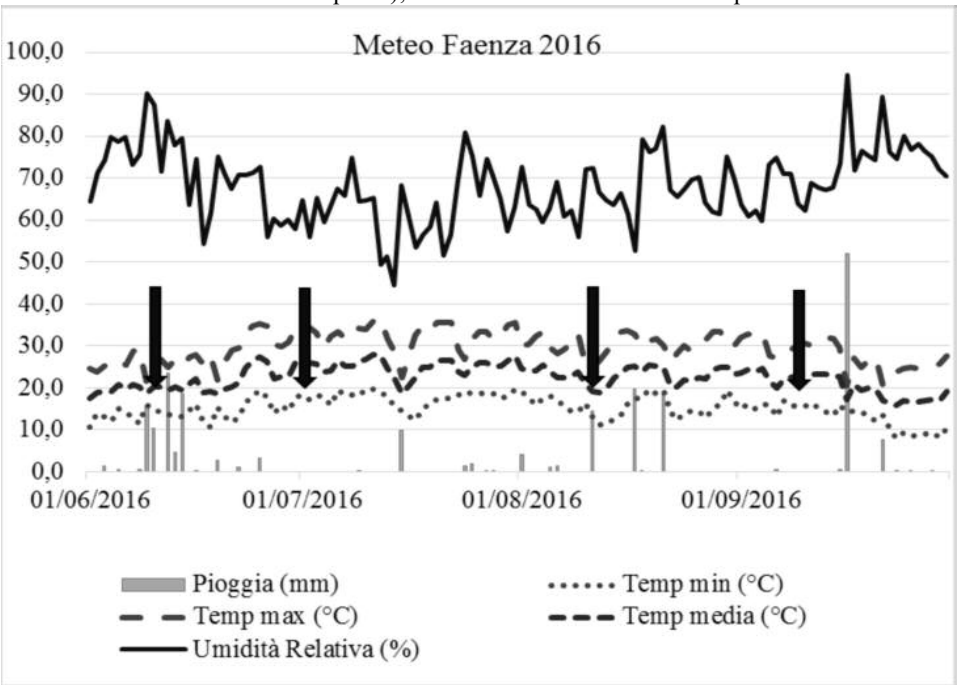
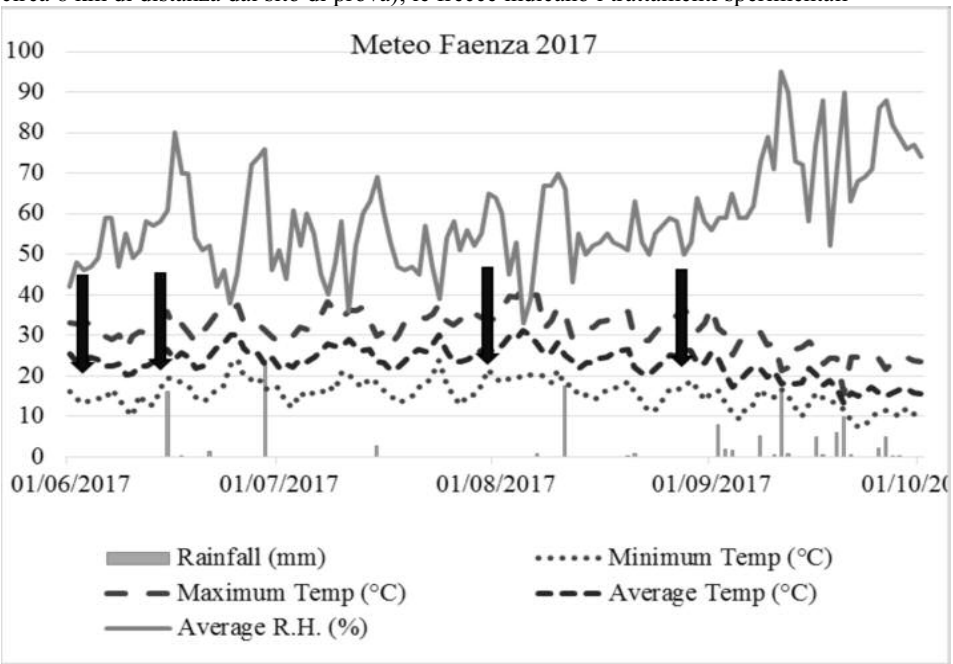


Figura 2. Andamento meteorologico registrato nel 2017 (stazione di Reda di Faenza, RA, a circa 8 km di distanza dal sito di prova); le frecce indicano i trattamenti sperimentali



RISULTATI

I risultati della prova condotta nel 2016 sono riportati in tabella 2, mentre i risultati della prova 2017 sono riportati in tabella 3.

Nel 2016 le importanti precipitazioni registrate a metà settembre nel sito di prova (vedi figura 1) hanno favorito lo scoppio epidemico della malattia: infatti, prima di tali eventi piovosi, la presenza in campo di botrite era sporadica e poco rilevante. Al primo rilievo (20/9), nel testimone non trattato la pressione infettiva di *B. cinerea* era già alta, anche se con una bassa severità; nell'arco di una settimana (secondo rilievo del 26/9) l'incidenza della malattia è più che raddoppiata (con la quasi totalità dei grappoli sintomatici nel testimone non trattato) e la severità è decuplicata rispetto al rilievo precedente. In queste condizioni e considerando che l'ultimo intervento fungicida con i prodotti ecocompatibili era stato eseguito a inizio mese (2/9, mentre per lo standard chimico l'ultima applicazione risaliva al mese precedente, l'8/8), tutti i formulati impiegati hanno mostrato notevoli difficoltà a contenere il patogeno. L'elaborazione statistica non mette in luce differenze significative tra le tesi, sebbene si possano leggere degli andamenti in termini numerici; nel primo rilievo Karma e 3Logy, così come Switch, si scostano numericamente dal testimone non trattato (con un'incidenza di circa la metà rispetto al controllo), mentre nel secondo rilievo nessun prodotto (standard chimico incluso) è stato in grado di contenere l'incidenza, mentre 3Logy e Switch permettono di ridurre la severità dell'attacco (in termini esclusivamente numerici) con un grado d'azione comunque modesto. I parametri qualitativi delle uve analizzate nel 2016 confermano l'elevata sensibilità dei grappoli in tale periodo; infatti già al 20/9 i grappoli si trovavano nella fase di maturazione commerciale (mediamente 19,3°Brix, pH = 3,2, 5,9 g/L di acidità totale). La

scelta aziendale di ritardare la vendemmia al 26/9 (mediamente 19,8°Brix, pH = 3,3, 6,0 g/L di acidità totale) ha permesso al patogeno di esplodere in intensità e gravità, grazie anche alle piogge registrate nei giorni precedenti i rilievi (52 mm il 16/9), che hanno portato al rigonfiamento e conseguente spacco degli acini, nei quali la botrite ha trovato le migliori condizioni di crescita. In tale situazione la difesa fungicida è quasi sempre insufficiente e bisognerebbe scegliere tecnicamente di anticipare la raccolta.

Tabella 2. Risultati della prova realizzata nel 2016

Tesi	Data delle applicazioni	Rilievo del 20/9		Rilievo del 26/9	
		Incidenza (%)	Severità (%)	Incidenza (%)	Severità (%)
Testimone n. t.	-	44,5	4,13	97,5 a[(1)]	41,91 a
Switch	24/6, 8/8	19,0 (57,3)[(2)]	0,95 (77,1)	80,5 a (17,4)	20,67 a (50,7)
Serenade Aso	15/6, 24/6, 8/8, 2/9	32,5 (27,0)	2,29 (44,6)	97,0 a (0,5)	44,72 a (0)
Amylo X	15/6, 24/6, 8/8, 2/9	25,5 (42,7)	2,24 (45,9)	95,0 a (2,6)	37,45 a (10,7)
Karma	15/6, 24/6, 8/8, 2/9	21,5 (51,7)	1,26 (69,5)	95,5 a (2,1)	26,37 a (37,1)
Romeo	15/6, 24/6, 8/8, 2/9	31,5 (29,2)	2,84 (31,3)	92,5 a (5,1)	34,90 a (16,7)
3Logy	15/6, 24/6, 8/8, 2/9	19,0 (57,3)	1,52 (63,2)	83,0 a (14,9)	20,40 a (51,3)
Sakalia	15/6, 24/6, 8/8, 2/9	26,5 (40,4)	3,48 (15,9)	94,5 a (3,1)	35,73 a (14,7)

(1) A lettere differenti corrisponde una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0,05$), Test SNK.
(2) Grado d'azione percentuale calcolato secondo Abbott

Anche nel 2017 le piogge di settembre (vedi figura 2) hanno portato ad un grave attacco di *B. cinerea*. Il rilievo del 13/9 mostra un testimone non trattato con circa 1/3 dei grappoli colpiti e una gravità della malattia contenuta; a soli 5 gg di distanza (18/9) la botrite è però visibile in quasi la totalità dei grappoli del testimone, con una severità importante. Al primo rilievo tutti i prodotti si differenziano statisticamente dal testimone non trattato, con un'efficacia oscillante tra il 60 e il 70% in termini di incidenza; al rilievo successivo solo il riferimento chimico (Switch) è statisticamente differente dal testimone, mentre i prodotti ecocompatibili si collocano in posizione intermedia. Rispetto alla stagione precedente, in questo caso l'integrità degli acini ha rallentato lo sviluppo dei sintomi anche al secondo rilievo, dove comunque l'incidenza registrata è molto importante per tutte le tesi in prova. Va comunque evidenziato il generale rapido decorso della malattia, che nell'arco di pochi giorni è in grado di portare a gravi danni economici; al verificarsi di queste condizioni favorevoli allo sviluppo del patogeno è opportuno anticipare la vendemmia per limitare le perdite.

Tabella 3. Risultati della prova realizzata nel 2017

Tesi	Data delle applicazioni	Rilievo del 13/9		Rilievo del 18/9	
		Incidenza (%)	Severità (%)	Incidenza (%)	Severità (%)
Testimone n. t.	-	29,0 a[(1)]	2,53 a	97,5 a	36,99 a
Switch	15/6, 1/8	8,5 b (70,7)	0,70 b (72,3)	59,5 b (39,0)	8,30 b (77,6)
Serenade Aso	5/6, 15/6, 1/8, 30/8	11,0 b (62,1)[(2)]	0,39 b (84,7)	90,0 a (7,7)	21,18 ab (42,8)
3Logy	5/6, 15/6, 1/8, 30/8	12,5 b (56,9)	0,80 b (68,3)	89,5 a (8,2)	22,38 ab (39,5)
Polyversum	5/6, 15/6, 1/8, 30/8	8,5 b (70,7)	0,61 b (75,7)	93,5 a (4,1)	19,43 ab (47,5)
Remedier	5/6, 15/6, 1/8, 30/8	11,5 b (60,3)	0,78 b (69,3)	91,0 a (6,7)	20,55 ab (44,4)

(1) A lettere differenti corrisponde una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0,05$), Test SNK.
(2) Grado d'azione percentuale calcolato secondo Abbott.

CONCLUSIONI

In conclusione, dal presente studio emerge che, in presenza di gravi attacchi di botrite, causati da piogge in prossimità della raccolta e aggravati da lesioni sugli acini, nessun prodotto (incluso il referente chimico) è in grado di contenere i danni da muffa grigia su grappolo e l'unica azione tecnica percorribile è anticipare la vendemmia. Invece, in presenza di normali condizioni predisponenti le infezioni botritiche, anche i prodotti ecocompatibili potrebbero fornire risultati interessanti (come mostrato dal primo rilievo del 2017), sebbene non paragonabili ai fungicidi di sintesi. Una migliore strategia è ipotizzabile integrando gli interventi chimici con i prodotti biologici, o nel caso di una difesa solo con prodotti biologici, prestando attenzione al loro posizionamento in funzione delle piogge potenzialmente infettanti, data la loro non elevata persistenza, in particolare in prossimità della raccolta. Nell'ottica di una difesa biologica non sarebbe da escludere il posizionamento di tali prodotti fin dalla fase fiorale per ridurre il potenziale di inoculo del patogeno, che si svilupperebbe sui residui fiorali. In riferimento a questo aspetto sono necessari ulteriori studi per ottimizzare al meglio l'impiego di questi prodotti.

Ringraziamenti
Questi studi sono stati finanziati dalla Regione Emilia Romagna nell'ambito del PSR 2014-2020 Op. 16.1.01 - GO PEI-Agri - FA 4B, Pr. *"Viticoltura sostenibile"* (Applicazione di tecniche e metodologie sostenibili per la difesa, l'irrigazione e la nutrizione in viticoltura) con il coordinamento del CRPV.

LAVORI CITATI

Di Martino. A., Amadei M., Medico E., Arbizzani A., 2014. Bicarbonato di potassio (Karma e Armicarb): nuovo fungicida per il controllo di oidio e botrite. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2014, 2, 31-40.

Elmer P.A.G., Michailides T.J., 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Orchard and Vine Crops. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) Botrytis: Biology, Pathology and Control. Springer, Dordrecht.

EPPO 2017. PP 1/296 (1) Principles of efficacy evaluation for low-risk plant protection products. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2017) 0 (0), 1–8.

Ladurner E., Benuzzi M., Fiorentini F., Lucchi A. 2012. AMYLO-X®, nuovo fungicida/battericida a base di *Bacillus amyloliquefaciens* ceppo D747 ad ampio spettro di azione. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2012, 2, 229-236.

Leroux P., 2007. Chemical Control of Botrytis and its Resistance to Chemical Fungicides. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. (eds) *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Springer, Dordrecht.

Ortugno C., Galeazzi M., Rubboli V., Valente M., Gualco A. 2014. Sakalia, nuovo estratto botanico per il controllo biologico di oidio e altri patogeni su colture arboree e orticole. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2014, 2, 41-50.

Priest F. G., Goodfellow M., Shute L. A., Berkeley R. C. W., 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. Nov. nom. Rev. International Journal of Systematic Bacteriology, 37, 69-71.

Pujos P., Martin A., Farabullini F., Pizzi M. 2014a. Romeo, biofungicida a base di cerevisane per il controllo delle principali malattie della vite e di altre colture: aspetti generali. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2014, 2, 51-56.

Pujos P., Martin A., Farabullini F., Pizzi M. 2014b. Risultati dell'attività sperimentale condotta in Italia su vite con il biofungicida ROMEO, a base di cerevisane. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2014, 2, 255-260.

Querzola P., Bellotto D., Abbiati C., Capriotti M., Serratore V., Noacco A., Romanini M., Guastamacchia F., Capella A., Ruiz M. 2016. 3LOGY® nuovo fungicida a base di di terpeni per la protezione della vite da Botrytis cinerea. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2016, 2, 141-146.

Schilder A., Gillet J., Sysak R., Wise J., 2002. Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes. Proceedings of 10th international conference on cultivation technique and phytopathologic problems in organic fruit growing and viticulture. Foko, 163-7

Vercesi A., Sancassani G. P., 2008. Nella lotta alla botrite della vite è fondamentale la prevenzione. Supplemento a *L'Informatore Agrario* n° 26/2008, pp 4-5.