

GUERZONI M. ELISABETTA*, MARCHETTI ROSA**, LAMBERTINI PAOLO*

* Dipartimento Protezione e Valorizzazione Agroalimentare. Sezione Microbiologica - Università di Bologna

** Centro Ricerche Viticole ed Enologiche. Sezione Microbiologica - Università di Bologna

STUDIO DEI LIEVITI ASSOCIATI AL MARCIUME ACIDO DELLA VITE. INTERAZIONI COI PRODOTTI ANTIFUNGINI

INTRODUZIONE

Il quadro complessivo delle informazioni concernenti il marciume acido (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) induce a considerare questa affezione della vite come atipica rispetto alle più comuni malattie fungine. I suoi caratteri più peculiari sono una dinamica di tipo esplosivo e agenti eziologici primari o secondari inusuali come i lieviti (1, 2, 3, 4, 7). Primi tentativi di individuarne secondo procedure convenzionali gli agenti e la dinamica (3,4,7) ci hanno indotto a ritenere che solo un approccio il più possibile interdisciplinare possa consentire di individuare il ruolo che le diverse variabili quali microflora, caratteri dell'ospite, condizioni pedoclimatiche e trattamenti antiparassitari giocano nella rete di interazioni che caratterizzano, forse più di tutte le altre malattie della vite, il marciume acido.

Le uniche specie di lievito cui viene riconosciuto un ruolo primario nella patogenesi delle piante sono *Nematospora caryli* e *Itersonilia pastinacea* e *I. perplexans* (8,9). Tuttavia non è possibile escludere che organismi originariamente non patogeni, anche in virtù del loro basso livello d'inoculo, possano per effetto di mutate condizioni e in particolare per la soppressione di competitori, emergere come potenziali patogeni. Una delle più plausibili cause di modificazione dell'equilibrio tra i gruppi microbici colonizzanti la superficie aerea delle piante è l'impiego, peraltro inevitabile, di antiparassitari, generalmente ad azione non specifica. Abbiamo considerato pertanto l'azione esercitata "in vitro" da parte dei prodotti antibotritici più frequentemente usati in questi ultimi trenta anni su individui appar

tenenti alle specie di lievito che un'analisi comparata dei risultati ottenuti in tre anni di ricerca indica come più frequentemente associabili al marciume acido della vite.

MATERIALI E METODI

Gli isolamenti sono stati effettuati in località italiane diverse su vitigni di uva da tavola (Perlette, Delight, Thompson seedless, Fiesta) e da vino (Barbera, Sangiovese, Nebbiolo, Dolcetto, Albana, Trebbiano, Montuni).

Le tecniche di isolamento e identificazione dei ceppi di lievito e le procedure seguite per gli inoculi artificiali in campo alla fioritura, nonché le condizioni dell'analisi gascromatografica dello spazio di testa sono state descritte precedentemente (7).

Influenza dei fungicidi sui lieviti: è stata valutata in piastra su Sabouraud (DIFCO) agarizzato come raggio (in mm) dell'alone di inibizione prodotto da 20 µg di principio attivo in dimetilsolfossido depositato al centro su carta da filtro.

RISULTATI

Specie di lievito più frequentemente associate al marciume acido.

I rilievi sono stati effettuati in località diverse durante le vendemmie 1980, 1981, 1982 e 1983 su uve in fase di avanzata maturazione sane e affette da marciume acido. Complessivamente sono stati effettuati su uve ammalate 234 isolamenti, dai quali sono state ottenute 497 culture pure di lievito.

La popolazione presente negli acini attaccati dalla malattia è mediamente dell'ordine di $1-5 \times 10^6$ cellule/g di campione. La Tab. 1, che riporta il numero di isolati, appartenenti alle specie riscontrate sui campioni affetti da marciume acido nelle diverse annate, dà una misura della frequenza dei diversi tipi microbici. Precisiamo che da ogni campione, per ogni specie microbica rappresentata, si è considerato un solo ceppo. Alcune di queste specie, quali *Metschnikowia pulcherrima* e *Kloeckera apiculata*, sono da considerare residenti dei vigneti e spesso presenti anche nelle uve sane (10,11). Occorre tuttavia ricordare che il rapporto quantitativo tra la po-

polazione blastomicetica praticamente quiescente sulle uve sane e quella a livelli di sviluppo esponenziale degli acini infetti è di 1/1000. Inoltre sono del tutto assenti nelle uve ammalate specie di lievito e specie cosiddette "yeast-like" più frequentemente riportate nel vigneto, come *Aureobasidium pullulans*; *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* spp. (10,11).

I risultati, riportati in tabella, indicano che si possono individuare alcuni gruppi microbici quali costantemente presenti nei campioni infetti; si tratta di *Pichia membranaefaciens*, *Kloeckera* spp., *Metschnikowia pulcherrima*, *Endomycopella* spp. e *Candida steatolytica*. Il rapporto numerico tra le specie presenti nei singoli campioni al momento del prelievo potrebbe essere un artefatto derivante, in un mezzo ricco ma selettivo come un acino d'uva, da uno sviluppo preferenziale di talune specie, non necessariamente tuttavia agenti primari della malattia. La tabella mette in evidenza tuttavia una discreta uniformità nella composizione complessiva delle specie presenti sulle uve ammalate in zone, vitigni e annate diverse.

Verifica del ruolo giocato dai lieviti nell'insorgere della malattia

Come riportato da Marchetti et al. (7) abbiamo verificato nel 1982 e 1983 su 96 piante appartenenti a vitigni di uve da tavola la capacità delle specie più frequentemente isolate da marciume acido di indurre i sintomi della malattia "in vivo" per nebulizzazione al momento della fioritura. I risultati hanno mostrato che i diversi vitigni presentano una sensibilità differenziata alla malattia e che in generale l'inoculazione con ceppi di *Candida steatolytica* e *Endomycopella vini* ha comportato rispetto alle altre specie saggiate un aumento significativo dell'incidenza della malattia.

E' stata inoltre sperimentata un'altra metodologia di verifica del ruolo dei lieviti, basata sull'uso del profilo gascromatografico dei componenti volatili dello spazio di testa in equilibrio con la coltura quale "impronta" della specie di lievito (7). Tale tecnica, ancora propositiva, è stata applicata all'individuazione dell'agente o degli agenti eziologici del marciume acido, per confronto dei profili GLC dei grappoli a infezione naturale con quelli di colture pure, su mosto sterile, di numerose specie di lievito. I 40 grappoli analizzati, appartenenti a vitigni diversi e provenien-

ti da diverse località, hanno presentato lo stesso profilo GLC (fig. 1).

In figura vengono riportati, per confronto, il profilo tipico di un grappolo affetto da *B. cinerea* e i profili modello delle uniche specie di lievito, tra le numerose considerate, caratterizzate da un'impronta analoga a quella dei grappoli a infezione naturale: *Kloeckera apiculata* e *Metschnikowia pulcherrima*. Dal punto di vista quantitativo, sia nei campioni ad infezione naturale che nelle colture pure di *Kloeckera apiculata* e *Metschnikowia pulcherrima*, abbiamo osservato un rapporto costante tra le aree dei diversi picchi. Particolarmente il rapporto tra i due componenti volatili principali, corrispondenti all'etanolo e al segnalatore chimico e olfattivo della malattia, acetato di etile, è in media 0,16 con un σ/\bar{X} di 10,2%. Nei campioni a infezione naturale l'area totale del profilo, corrispondente all'insieme di tutti i costituenti volatili, è direttamente proporzionale alla superficie infetta.

Tenendo conto dei risultati degli isolamenti e delle inoculazioni artificiali in campo possiamo ipotizzare che, se queste due specie sono in grado di caratterizzare chimicamente la malattia, metabolizzando gli zuccheri dell'acino, la dinamica dell'insediamento dei lieviti nell'acino prevede probabilmente fasi che possono avere come protagonisti altre specie di lievito dotate di capacità litiche (7).

Sensibilità dei lieviti isolati ai prodotti antibotritici.

L'apparente "novità" della malattia e il ruolo giocato dai lieviti, per lo meno nella sua fase esplosiva e nella produzione dei suoi marcatori chimici, può suggerire che l'inusuale proliferazione di alcune specie di lievito possa derivare da una modificazione degli equilibri microbici del vigneto. In questa ipotesi abbiamo valutato "in vitro" l'azione inibitrice degli antibotritici più usati in questi ultimi anni su 80 ceppi isolati da uve sane e ammalate. Non abbiamo osservato, se non per quanto riguarda alcune specie riportate più avanti, differenze quantitative nella sensibilità tra i ceppi isolati da uve sane e ceppi isolati da uve infette. I risultati di inibizione "in vitro" riportati in Tab. 2, che fa riferimento solo alle specie provenienti da uve infette, presi nel loro insieme possono essere rap-

presentati con maggiore evidenza nella Fig. 2. Considerando i diversi prodotti anche in rapporto alla data indicativa del loro inserimento in agricoltura e tenendo conto di una vasta letteratura relativa per lo meno ai lieviti fermentativi possiamo configurare tre periodi, caratterizzati da una diversa incidenza dei principi attivi sui lieviti. Prima dell'introduzione dei prodotti ftalimidici come il Folpet, i derivati rameici e lo zolfo inibivano limitatamente i lieviti in generale. Il secondo periodo è caratterizzato da una diffusione di prodotti dotati di un'aspecifica attività inibitoria nei confronti dei lieviti, con conseguente riduzione generalizzata della popolazione blastomicetica del vigneto. L'introduzione del Benomyl prima e, a partire dalla seconda metà degli anni '70, dei derivati delle di carbossimidi cicliche, prive di azione tossica nei confronti delle specie di lievito considerate in questa sperimentazione, ha probabilmente comportato un aumento generalizzato delle specie capaci di colonizzare il vigneto.

Si discostano in parte da questo quadro alcune specie la cui sensibilità nei confronti dei prodotti antibotritici considerati si discosta dalla media: *Endomycesella vini* e *Endomycesella crataegensis*, frequenti nelle uve infette, sono fortemente inibite anche dallo zolfo, ma non dalla Vinclozolina e dal Procimidone. Tali specie, una volta classificate come *Endomyces* spp., non sono infatti segnalate come frequenti nei vigneti. *Candida steatolytica* e *Pichia membranaefaciens*, anch'esse molto frequenti nei campioni affetti da marciume acido, non sono al contrario sensibili al Folpet, attivo su tutti i lieviti "residenti" del vigneto.

CONCLUSIONI

La meccanica della diffusione e dell'esplosione della malattia, anche in rapporto al vitigno e all'ambiente, costituisce ancora un problema non risolto. Possiamo tuttavia definire alcuni punti:

- 1) i metaboliti che caratterizzano la malattia in senso chimico e olfattivo sono legati all'attività di lieviti quali *Kloeckera apiculata* e *Metschnikowia pulcherrima*, ma potenzialmente anche da altri;
- 2) tali lieviti non sono dotati di attività litiche capaci di favorirne la penetrazione nell'acino dall'esterno, ma possono essere coadiuvati dall'in-

Figura 2

Sensibilità media delle specie saggiate ai diversi antifungini La sensibilità è espressa come percentuale media di superficie inibita rispetto alla inoculata.

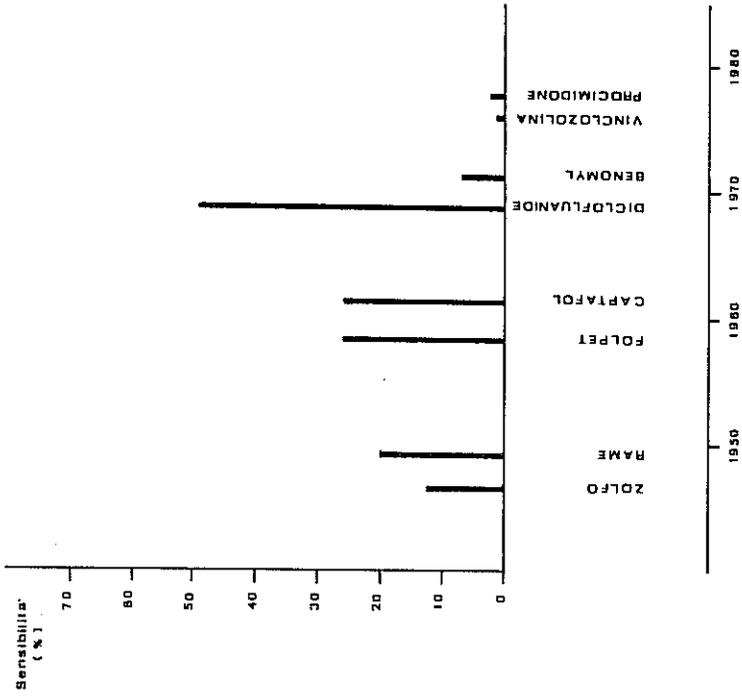
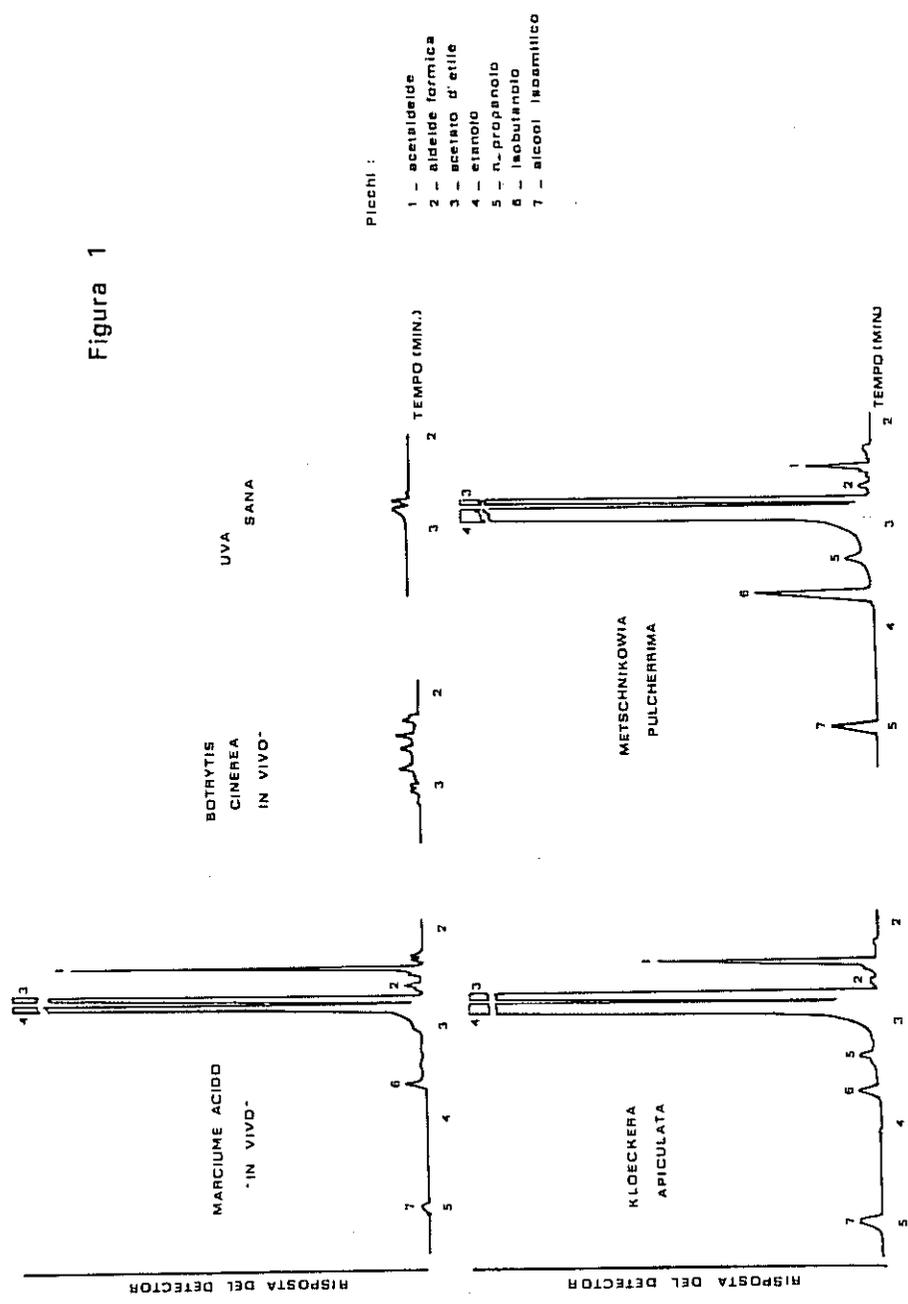


Figura 1



tervento di altre specie dotate di attività pectolitiche e lipolitiche quali, ad esempio, *Endomycopsisella* spp. e *Candida* spp. (7);

3) le prove di induzione della malattia "in vivo" alla fioritura hanno dato consistenza alla possibilità di un intrappolamento dei lieviti all'interno del frutto. Le condizioni favorevoli verificantesi in fase di maturazione avanzata quali ad esempio aumento degli enzimi pectolitici costitutivi del frutto, innalzamento del pH e aumento degli zuccheri potrebbero consentirne lo sviluppo;

4) quest'ultima possibilità non esclude che la presenza di precedenti lesioni derivanti da agenti meccanici o da patogeni possa favorire lo sviluppo secondario dei lieviti.

Questa ipotesi, non in contraddizione con le precedenti, è suffragata da lavori sperimentali (1,2,6) relativi alla possibilità di controllare indirettamente la malattia tramite un maggiore controllo chimico di altri patogeni, e in particolare di *Botrytis cinerea*.

A sua volta la possibilità che la difesa dalla *Botrytis cinerea* possa in qualche misura ridurre l'insorgenza del marciume acido non è in contraddizione con il fatto che il più efficace controllo chimico della *B. cinerea* verificatosi in questi ultimi anni abbia eliminato un forte competitore dei lieviti che, insensibili ai prodotti di più recente introduzione, possono aumentare numericamente e modificare forse il loro ruolo nella composita microflora del vigneto.

RIASSUNTO

Si è considerata l'azione esercitata in vitro da parte dei prodotti antibiotici più frequentemente usati in questi ultimi trenta anni su individui appartenenti alle specie di lievito che un'analisi comparata di risultati ottenuti in tre anni di ricerca ha indicato come più frequentemente associabili al marciume acido della vite.

Si tratta prevalentemente di specie appartenenti ai generi *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Candida*, *Endomycopsisella*. Queste specie, inibite drasticamente dai prodotti usati fino alla seconda metà degli anni '70, non sono inibite, come del resto i lieviti fermentativi, dall'ultima generazione dei prodotti antibiotici.

SUMMARY - STUDY ON YEASTS ASSOCIATED TO THE SOUR ROT OF THE GRAPE. INTERACTIONS WITH FUNGICIDES.

The sensibility against the most used fungicides of the yeast species associabile, on the basis of a comparative analysis of the three years results, to the sour rot of the grape has been considered.

The most frequent species isolated are belonging to genera *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Candida*, *Endomycesella*. These species, strongly inhibited by the products used until the second half of the 70's are not inhibited, as the alcoholic yeasts, by the new generation products.

BIBLIOGRAFIA

1. BISIACH M., MINERVINI G., SALOMONE M.C. (1981). Ricerche sperimentali sul marciume acido del grappolo e sui suoi rapporti con la muffa grigia. *Not. Mal. Piante*, 102, 61-79.
2. BISIACH M., MINERVINI G., SALOMONE M.C. (1982). Recherches expérimentales sur la pourriture acide de la grappe et sur ses rapports avec la pourriture grise. *Bull. OEPP.*, 12, 5-28.
3. GUERZONI M.E. e MARCHETTI R. (1982). Microflora associata al marciume acido della vite e modificazioni indotte dalla malattia sulla composizione delle uve e dei mosti. *La difesa delle piante*, 4, 231-246.
4. GUERZONI M.E., INTRIERI C., MARCHETTI R., GIUDICI P. (1982). Contribution à la connaissance d'une nouvelle maladie de la grappe: la pourriture acide. Symposium International sur le Raisin de Table et le Raisin sec. 5-11 settembre, Hérahkion (Grecia).
5. ZIRONI R., RIPONI C., FERRARINI R., AMATI A. (1983). Effetti del "Marciume acido" sui costituenti delle uve e sulle caratteristiche dei mosti e dei vini. *Vignevini*, 10, 39-46.
6. MORANDO A., NEBIOLO P., BOSTICARDO V., GRASSO C. (1983). Prove di lotta contro il "Marciume acido" del grappolo. *Vignevini*, 10, 51-55.
7. MARCHETTI R. e GUERZONI M.E. (1984). Recherche sur l'etiologie d'une nouvelle maladie de la grappe; la pourriture acide. In corso di stampa su *Vitis*.
8. CHANNON A.G. (1963). *Ann. Appl. Biol.*, 51, 1-15; cit. da Last e Price (1969).
9. GANDY D.G.G. (1954). *Trans. Br. mycol. Soc.*, 49, 499-507; cit. da Last e Price (1969).
10. KUNKEE R.E., AMERINE M.A. (1969). Yeasts in wine-making. In: *The yeasts*, 3, pag. 5. Ed. da Rose A.H. e Harrison J.S., Academic Press.
11. DAVEMPORT R.R. (1976). Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. In: *Microbiology of aerial plant surface*, ed. da Dickinson C.M. e Preece T.F., Academic Press.
12. LAST F.T. e PRICE D. (1969). Yeasts associated with living plants and their environs. In: *The yeasts*, 1, p. 183, ed. da Rose A.H. e Harrison J.S., Academic Press.

TABELLA 1 - Numero di ceppi appartenenti a specie diverse isolati in alcune località italiane da uve affette da marciume acido.

SPECIE	1980		1981		1982		1983		Numero isolati					
	01 trepò Pavese	01 trepò Pavese	Tebano	Argelato	Argelato	Forlì	Tebano	Catanzaro						
<i>Pichia membranaefaciens</i>	12	9	15	15	12	17	13	3	3	99				
<i>Kloeckera</i> spp.	20	24			10	2	15	7	5	10	2	15	10	120
<i>Metschnikowia pulcherr.</i>		2		1	1	5	7	3	3	2			14	38
<i>Endomycopsella</i> spp.			10	1	5		8	1	13				9	47
<i>Candida steatolytica</i>	5	2	10	15									2	34
<i>Candida krusei</i>	13	13	1											27
<i>Candida</i> spp.			15	13	10	10	4	1				2	1	56
<i>Brettanomyces</i> spp.								1	2	15	1	20	19	58
<i>Issatchenkia</i> spp.					5									5
<i>Saccharomyces ludwigii</i>							2							2
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.							5							5
Altri			1	5										6
TOTALE ISOLATI														497

TABELLA 2 - Raggio d'inibizione medio (mm) prodotto su Sabouraud agarizzato da diversi fungicidi (20 µg al punto di applicazione).

SPECIE	Numero ceppi	FUNGICIDI									
		Zolfo	Rame ossicloruro	Folpet	Tiofanate Metile	Maneb	Thiram	Diclofuanide	Benomyl	Vinclozolina	Proclimidone
<i>Endomycopsella</i> spp.	5	16	13	22	2	25	25	i.t.*	7	1	2
<i>Issatchenkia</i> spp.	5	6	5	11	0	16	22	18	1	2	0
<i>Kloeckera</i> spp.	6	3	13	12	1	20	30	22	3	0	1
<i>Metschnikowia pulcherr.</i>	5	1	5	12	0	23	21	15	2	0	3
<i>Candida steatolytica</i>	4	1	4	2	0	20	17	5	2	0	1
<i>Pichia membranaefaciens</i>	6	1	12	5	0	20	13	19	1	0	0
<i>Brettanomyces</i> spp.	6	10	7	14	0	12	27	23	4	0	0

* = inibizione totale.