

ATTIVITÀ SU PATOGENI DEL LEGNO ED EFFETTI SULLA PRODUZIONE DI BARBATELLE DI VITE TRATTATE CON UN FORMULATO A BASE DI *TRICHODERMA*

E. G. METRUCCIO¹, A. BENIGNO², F. OSTI¹, G. CARELLA², M. NOCENTINI²,
L. MUGNAI², S. DI MARCO¹

¹ Istituto per la BioEconomia, CNR, via P. Gobetti, 101 - 40129 Bologna

² DAGRI - Sez. Patologia vegetale e Entomologia - Università degli Studi di Firenze
P. le delle Cascine, 28 - 50144 Firenze
fabio.osti@ibe.cnr.it

RIASSUNTO

Le malattie del legno costituiscono uno dei principali problemi della viticoltura. La loro presenza in vigneti sempre più giovani e il reperimento di patogeni del legno in vivaio hanno ulteriormente stimolato la ricerca di mezzi atti a migliorare lo stato sanitario e la qualità del materiale vivaistico. Il presente lavoro ha inteso verificare l'attività e gli effetti sulla produzione da parte di un formulato a base di *Trichoderma atroviride* SC1, applicato per immersione o per innaffiatura, in determinate fasi di produzione delle barbatelle. In prove biennali è stato rilevato l'effetto dei trattamenti sulla percentuale di piante morte in forzatura, morte in campo, certificabili e vive non certificabili. Si è determinata, inoltre, la presenza di patogeni del legno e del *Trichoderma* nelle piante al termine del processo produttivo. I trattamenti condotti nelle diverse fasi del processo produttivo hanno mostrato diversa efficacia nel contenimento dei patogeni e/o nel miglioramento della produzione. In particolare, il trattamento in idratazione ha ridotto l'incidenza dei patogeni nelle barbatelle e il trattamento al callo ha ridotto le perdite in campo e aumentato le piante certificabili.

Parole chiave: vivaio viticolo, malattie del legno, lotta biologica, Vintec

SUMMARY

ACTIVITY ON WOOD PATHOGENS AND EFFECTS ON NURSERY MATERIAL TREATED WITH A *TRICHODERMA* BASED FORMULATION

Wood diseases are one of the main problems of viticulture. Their increasing incidence in young vineyards and the presence of pathogens in nurseries have further stimulated studies to set up means to improve the health status as well as the quality of the nursery material. This work aimed to verify the activity and the effects on grafted plants production of a formulation based on *Trichoderma atroviride* SC1, applied in the nursery process. Two-year trials showed the effect of the treatments on the nursery material as number of dead plants after callusing, dead plants in nursery field, and as number of certifiable plants or of plants alive but not certifiable. The presence of wood pathogens and *Trichoderma* was also assessed on certifiable graftlings. The treatments carried out in the various stages of the production process showed different levels of activity in containing pathogens incidence and/or in improving production.

Keywords: grapevine nursery, grapevine trunk disease, eco-compatible control strategies, biological control, Vintec

INTRODUZIONE

Le malattie della vite causate da patogeni del legno (*Grapevine Trunk Diseases*, GTD), soprattutto quelle del complesso Esca, sono fonte di grande preoccupazione in pressoché tutti gli areali di coltura. Le infezioni si originano prevalentemente in vigneto e progrediscono durante l'intera vita produttiva dell'impianto, causando danni alla produzione e morte della

pianta (Claverie et al., 2020). La presenza del mal dell'esca in vigneti sempre più giovani e soprattutto la presenza di patogeni associati al mal dell'esca emersa in numerosi studi condotti in vivaio durante le diverse fasi del processo produttivo (Gramaje e Armengol, 2011) hanno stimolato la ricerca di nuovi strumenti e strategie atte a ridurre le occasioni di infezioni in vivaio per migliorare le caratteristiche fitosanitarie e la qualità delle barbatelle (Gramaje e Di Marco, 2015; Waite et al., 2018).

La possibilità di utilizzare specie di *Trichoderma* in vivaio nei confronti di patogeni del legno della vite è stata sperimentata in diverse realtà vivaistiche mondiali. I lavori hanno evidenziato la capacità dei diversi ceppi di *Trichoderma* utilizzati di contenere le infezioni e hanno permesso di ipotizzare diversi meccanismi d'azione ascrivibili all'agente di biocontrollo (Di Marco et al., 2004; Fourie e Halleen, 2004; 2006; Di Marco e Osti, 2007; Gramaje e Armengol, 2011; Halleen e Fourie, 2016; Mondello et al., 2018; Van Jaarsveld, 2021).

L'utilizzo di *Trichoderma atroviride* SC1 (Vintec®, Belchim Crop Protection) in vivaio ha consentito di contenere infezioni di *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium minimum* (syn. *aleophilum*) inoculati artificialmente e di altri patogeni del legno (Pertot et al., 2016; Berbegal et al., 2020).

Il presente lavoro riporta una sintesi dei risultati ottenuti in vivaio commerciale, sull'attività di *Trichoderma atroviride* SC1 nei confronti di patogeni del legno naturalmente presenti in barbatelle di vite trattate durante alcune predefinite fasi del processo produttivo e sugli effetti dei trattamenti sulla produzione delle barbatelle.

MATERIALI E METODI

Trattamenti durante il processo di produzione delle barbatelle

Le prove sono state condotte in vivaio commerciale. Si è operato con *Trichoderma atroviride* SC1 (Vintec) a 200 g/L di formulato. Sono state confrontate le seguenti tesi: Vi, idratazione (circa 24 ore) delle talee portinnesto in sospensione acquosa di *Trichoderma*, prima dell'innesto; Vc, immersione della base della barbatella (1 ora) in sospensione acquosa di *Trichoderma*, subito prima del trapianto + un'applicazione di rinforzo per annaffiatura in campo a 21 giorni dal trapianto; V2, combinazione degli interventi Vi e Vc; E, idratazione in sospensione acquosa di tiofanato metile (Enovit Metil FL®, Sipcam) alla dose di 2,5 mL/L di formulato; T, testimone non trattato. Tiofanato metile è stato utilizzato come riferimento chimico essendo stato tra i fungicidi più impiegati in diversi contesti vivaistici (Gramaje e Di Marco, 2015).

Perdite in post forzatura e in campo di vivaio e barbatelle vive e certificabili

Si è operato su barbatelle di Trebbiano Romagnolo clone TR8T innestato su SO4 (2016) e K5BB (2017). Sono state utilizzate 800 (2016) e circa 2500 (2017) piante innestate per tesi. Dopo l'idratazione le talee sono state innestate, immerse in paraffina e collocate in forzatura per 10-12 giorni in cassoni contenenti segatura-truciolare di pino. All'uscita della forzatura sono state determinate, per ciascuna tesi, le piante morte. Dopo un periodo di adattamento di circa 7 giorni, le barbatelle sono state trapiantate in vivaio a 5-6 cm sul filare e 70-75 cm tra i filari. Alla raccolta sono state determinate le perdite in campo e le barbatelle di prima scelta secondo la Direttiva UE 2005/43. Sono state valutate anche le altre piante vive che, almeno

per un parametro, non rientravano nei requisiti previsti da tale direttiva ma potevano essere recuperate nella stagione successiva.

Isolamento del *Trichoderma* e dei patogeni del legno

Nel 2016 al momento della raccolta sono state prelevate 30 barbatelle di prima scelta per ciascuna tesi al fine di analizzare la presenza del *Trichoderma* e di patogeni del legno. Le piante sono state pulite in acqua e disinfettate esternamente per immersione in ipoclorito di sodio al 4% per 2 min. In seguito è stata rimossa la corteccia. Le barbatelle decorticate sono state disinfettate con alcool denaturato e sottoposte a fiammatura esterna.

Per ogni barbatella sono state prelevate rondelle di circa 2 mm di spessore a diverse altezze. Da ogni rondella sono stati ottenuti 6 frammenti di legno che sono stati collocati in piastra su substrato agarizzato (agar Malto) a 25°C. Nei giorni successivi e attraverso trasferimenti in altre piastre, è stata determinata la percentuale di frammenti colonizzati da *Trichoderma* o da patogeni del legno, quali specie di *Botryosphaericeae*, *Acremonium* spp., *Phaeoacremonium* spp., *Ilyonectria* spp. e specie di *Diatrypeae*. I microrganismi sono stati identificati mediante riconoscimento della morfologia della colonia e della presenza di fruttificazioni e di conidi.

Analisi statistica

Per ogni tesi e parametro valutato (piante morte in forzatura, morte in campo, certificabili, vive non certificabili) è stata calcolata la media delle percentuali ottenute nei 2 anni. Per ogni tesi, ogni media è stata confrontata statisticamente con la corrispettiva del testimone mediante il test del Chi quadro ($P = 0,05$).

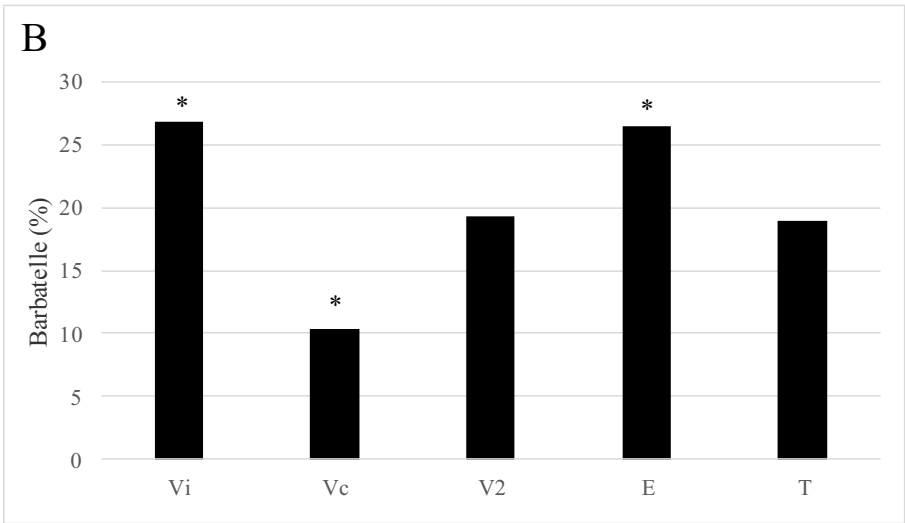
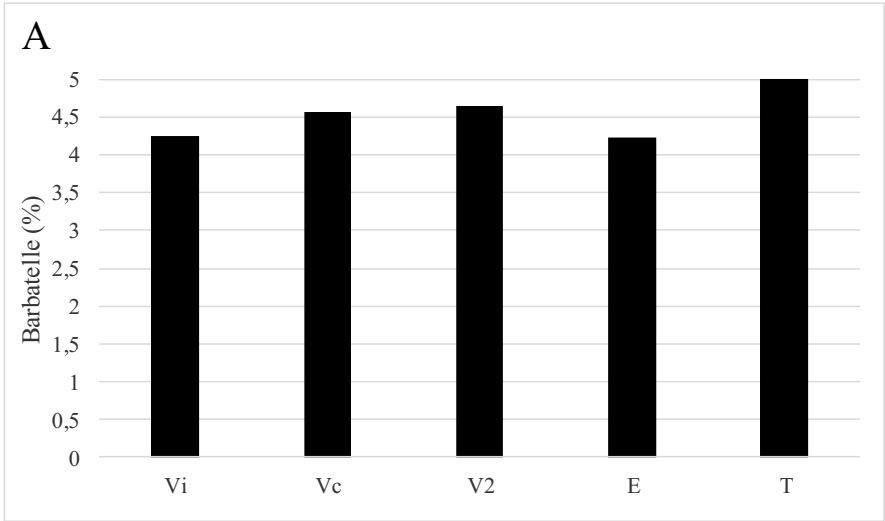
Per quanto riguarda la colonizzazione dei frammenti da parte di *Trichoderma* e dell'insieme dei patogeni del legno è stata eseguita un'analisi della varianza ANOVA con 30 repliche, ciascuna costituita da una barbatella, per trattamento. Le differenze significative tra le medie sono state determinate utilizzando il test di significatività post-hoc di Tukey HSD con $P = 0,05$. È stato utilizzato software SPSS versione 27.

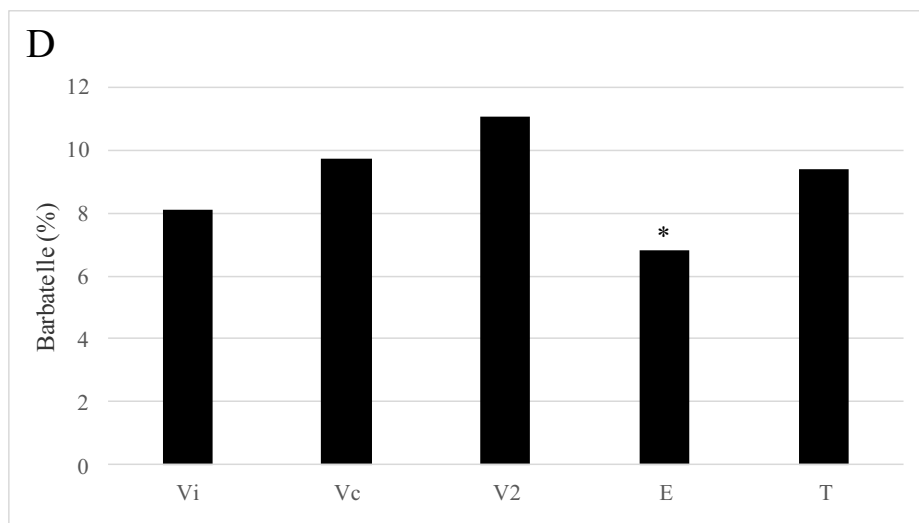
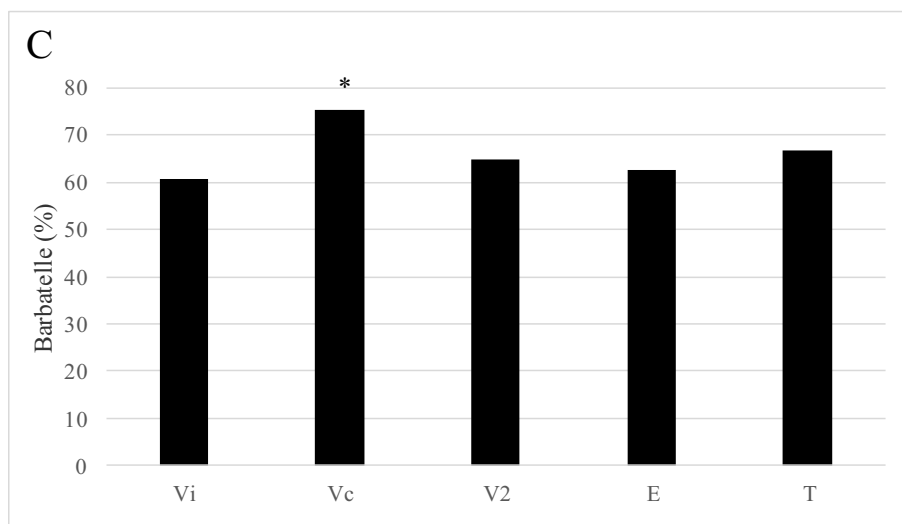
RISULTATI

I risultati degli effetti dei trattamenti sulla produzione delle barbatelle, media dei due anni di prove, sono riassunti nella figura 1.

Le perdite di piante in post-forzatura registrate nei diversi trattamenti non hanno differito statisticamente dal testimone (figura 1A). La percentuale di perdite in campo verificate al termine della stagione vegetativa rispetto al testimone, sono state significativamente inferiori in Vc e superiori in Vi ed E (figura 1B). Le piante certificabili sono state statisticamente superiori al testimone per la sola tesi Vc (figura 1C), mentre per le piante vive non certificabili E ha mostrato percentuali statisticamente inferiori e V2 tendenzialmente superiori al testimone (figura 1D).

Figura 1. Medie di due anni di sperimentazione sugli effetti dei trattamenti sulla produzione di barbatelle. A) perdite al termine della forzatura; B) perdite in campo; C) piante certificabili; D) piante vive non certificabili

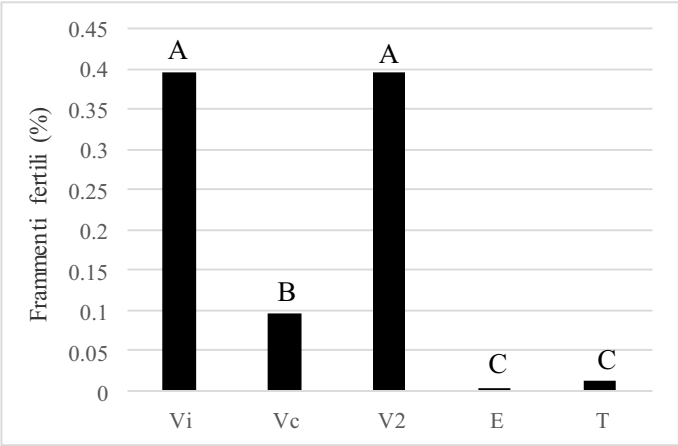




Per ogni parametro, gli istogrammi contrassegnati da asterisco differiscono significativamente dal testimone, secondo il test del Chi-quadro, per $P=0,05$

Trichoderma è stato isolato in modo significativamente superiore in Vi e V2 rispetto a Vc, a sua volta statisticamente superiore a quanto rilevato in E e nel testimone (figura 2).

Figura 2. Percentuale di frammenti fertili per *Trichoderma* ottenuti da barbatelle certificabili nella stagione vegetativa 2016

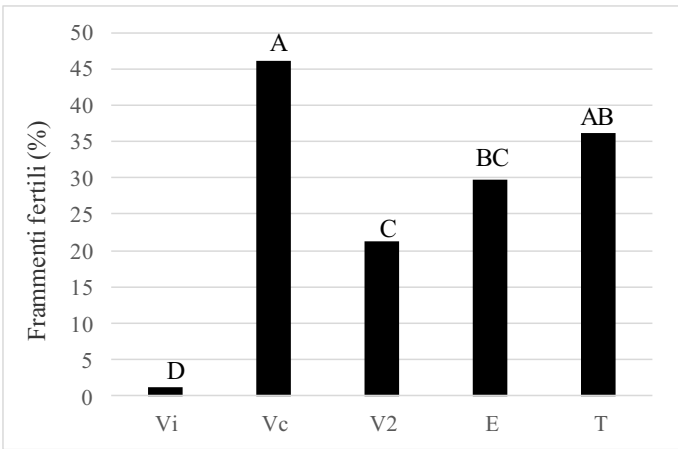


Istogrammi contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente secondo il testo di Tukey HSD per $P=0,05$

I risultati dell'efficacia dei trattamenti nei confronti dell'insieme dei patogeni del legno, sono riassunti nella figura 3.

Vi ha mostrato un'attività superiore e statisticamente significativa ($P=0,05$) rispetto a tutte le tesi, nel contenere in maniera quasi completa i patogeni del legno. Un'ottima attività, significativamente distinta da T e Vc è stata riscontrata anche per V2. Le altre tesi non hanno differito statisticamente dal testimone.

Figura 3. Percentuale di frammenti fertili per patogeni del legno isolati da barbatelle certificabili nella stagione vegetativa 2016



Istogrammi contrassegnati da lettere uguali non differiscono statisticamente secondo il testo di Tukey HSD per $P=0,05$

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano l'efficacia del formulato a base di *Trichoderma atroviride* SC1 nel contenere l'incidenza di patogeni associati alle malattie del legno della vite (Berbegal et al., 2020; Pertot et al., 2016) e nell'esercitare effetti sui parametri produttivi analizzati.

Questo lavoro evidenzia come il trattamento effettuato all'idratazione consenta un contenimento dei patogeni pressoché completo ma, al tempo stesso, provochi una riduzione delle piante vegetanti in campo di vivaio, pur con una buona percentuale di piante certificabili. L'efficacia contro i patogeni del trattamento in idratazione è verosimilmente legata sia a una tempistica che prevede la protezione della pianta fin dalle prime fasi di produzione, sia all'elevata capacità di colonizzazione del *Trichoderma* accertata in quel tipo di applicazione, peraltro riscontrata anche nella combinazione dei trattamenti (Pertot et al., 2016).

La maggior percentuale di viti vegetanti in campo e certificabili è stata rilevata nella tesi che prevedeva l'intervento al callo radicale e in vivaio. In questa tesi il *Trichoderma* è stato reisolato nelle barbatelle in percentuali basse, ma può aver esercitato un effetto positivo sulla pianta, verosimilmente interagendo con la rizosfera da simbionte (Harman et al., 2004). Per contro, questo tipo di trattamento, effettuato in una fase avanzata del processo produttivo e su un'area limitata della barbatella, si è mostrato inefficace nel contenimento dei patogeni.

La combinazione dei vari trattamenti ha evidenziato un'attività più che buona nei confronti dei patogeni, senza esercitare effetti rilevanti sui parametri produttivi analizzati.

Tale comportamento diversificato è coerente con le caratteristiche del *Trichoderma*.

È noto, infatti, che *Trichoderma* agisce attraverso più modalità d'azione e non è escluso che queste ultime siano espresse in maniera diversificata in funzione delle condizioni della pianta e dei patogeni al momento dell'applicazione (Vinale et al., 2008). I risultati ottenuti in questo lavoro, infatti, suggeriscono che nei diversi momenti di applicazione, *Trichoderma* abbia esercitato la propria azione attraverso diverse modalità. L'ipotesi è in linea con quanto evidenziato in studi simili condotti con specie e ceppi diversi di *Trichoderma* (Di Marco et al., 2004; Di Marco e Osti, 2007).

CONCLUSIONI

In conclusione, i dati ottenuti suggeriscono l'utilità dell'uso di *Trichoderma* in vivaio durante il processo di produzione delle barbatelle. In particolare, il vivaio potrebbe orientare i trattamenti a un miglioramento della produzione, a un contenimento dei patogeni o a un utile compromesso tra le due finalità rappresentato dalla combinazione dei trattamenti in base alla qualità e alla possibile condizione fitosanitaria del materiale su cui ci si trova a operare.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la Dott.ssa Alice Delbianco, il Dott. Gianluca Mordenti per la fattiva collaborazione all'esecuzione della ricerca e i vivaisti Guido e Vittorio Dalmonte per aver gentilmente fornito il materiale vivaistico e ospitato le prove. Gli autori ringraziano la società Belchim Crop Protection Italia per il supporto alla sperimentazione.

LAVORI CITATI

Berbegal Martinez M., Ramón-Albalat A. León Santana M., Armengol Fortí J., 2020. Evaluation of long-term protection from nursery to vineyard provided by *Trichoderma atroviride* SC1 against fungal grapevine trunk pathogens. *Pest Management Science*, 76, 3, 967-977

- Claverie M., Notaro M., Fontaine F., Wery J., 2020. Current knowledge on Grapevine Trunk Diseases with complex etiology: a systemic approach. *Phytopathologia Mediterranea* 59, 29-53
- Di Marco S., Osti F. Cesari A., 2004. Experiments on the control of Esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 1, 108–115
- Di Marco S., Osti F., 2007. Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*, 46, 73–83
- Fourie P.H., Halleen F., 2004. Proactive control of Petri Disease of Grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease*, 88, 11, 1241-1245
- Fourie P.H., Halleen F., 2006. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk diseases pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 4, 255-265
- Gramaje D., Armengol J., 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*, 95, 9, 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*, 51, 2, 313-324
- Halleen F., Fourie P.H., 2016. An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 37, 2, 104-114
- Harman G., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56
- Mondello V., Songy A., Battiston E., Pinto C., Coppin C., Trotel-Aziz P., Clément C., Mugnai L., Fontaine F., 2018. Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*, 102, 7, 1189-1217
- Pertot I., Prodorutti D., Colombini A., Pasini L., 2016. *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. *BioControl*, 61, 3, 257-267
- Van Jaarsveld VJ., Halleen F., Bester M., Pierron R., Stempien E., Mostert L., 2021. Investigation of *Trichoderma* species colonization of nursery grapevines for improved management of black foot disease. *Pest Management Science*, 77, 397-405
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M., 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1, 1-10
- Waite H., 2018. Grapevine propagation: advances in nursery-vineyard management and healthy and disease-resistant plants. *Wine & Viticulture Journal*, 33, 4, 62-64