TRATTAMENTI CON INDUTTORI DI RESISTENZA PER IL CONTROLLO DEL LEGNO NERO DELLA VITE

G. ROMANAZZI[1], S. MUROLO[1], A. MASCIULLI[1], M. SANTINI[1], D. D'ASCENZO[2]
[1] Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali, Università Politecnica delle Marche - Via Brecce Bianche, 60131 Ancona
[2] ARSSA Servizio Fitosanitario Regionale, Regione Abruzzo
Via Nazionale, 38, 65010 Villanova (PE)
g.romanazzi@univpm.it

RIASSUNTO

Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficacia di trattamenti in campo con induttori di resistenza per promuovere la remissione dei sintomi, o recovery, in viti infette da Legno nero. Cinque formulati commerciali (Chito Plant, Aliette, Kendal, Bion ed Olivis), noti come promotori delle difese della pianta, sono stati distribuiti sulla vegetazione di piante della cv Chardonnay infette da Legno nero. I trattamenti sono stati effettuati a cadenza settimanale nel periodo primaverile - estivo del 2007 e 2008. Tutti i trattamenti hanno incrementato il numero di piante recovered rispetto al testimone non trattato. I migliori risultati sono stati ottenuti con Kendal, Olivis e Bion. Le piante recovered, sottoposte ad analisi molecolari, non sono risultate infette da fitoplasmi.
Parole chiave: elicitori, fitoplasmi, recovery, *Vitis vinifera*

SUMMARY

APPLICATIONS OF RESISTANCE INDUCERS FOR THE CONTROL OF GRAPEVINE BOIS NOIR

The aim of the present study was to evaluate the effectiveness of field treatments with resistance inducers to promote recovery in Bois noir (BN) infected grapevines. Five commercial products (Chito Plant, Aliette, Kendal, Bion, and Olivis) described as plant defence promoters were sprayed on the canopy of BN-infected grapevines of cv. Chardonnay. Treatments consisted of weekly sprays in spring-summer 2007 and 2008. All treatments increased the number of recovered plants with respect to the control. The best results were obtained with Kendal, Olivis and Bion. Molecular analysis of leaf vein extracts from recovered plants failed to detect the phytoplasma.
Keywords: elicitors, phytoplasma, recovery, *Vitis vinifera*

INTRODUZIONE

I fitoplasmi sono agenti fitopatogeni unicellulari pleomorfi, sprovvisti di parete cellulare, appartenenti alla classe *Mollicutes*, capaci di colonizzare il floema delle piante ospiti e di essere trasmessi da insetti vettori (Lee *et al*., 2000). Tra i fitoplasmi che infettano la vite, quello associato al gruppo dello stolbur, agente di Legno Nero (LN), sebbene sia considerato meno epidemico dell'agente di Flavescenza dorata, è il più diffuso ed economicamente importante, per le ingenti perdite di produzione registrate, nella maggior parte delle aree viticole della penisola in generale e dell'Italia centrale in particolare (Romanazzi *et al*., 2007). A differenza di altri agenti di malattia che interessano la vite, finora non sono disponibili informazioni sull'efficacia di prodotti fitosanitari attivi in campo contro le principali malattie da fitoplasmi (Romanazzi *et al*., 2009b). Le piante infette, comunque, possono andare incontro alla remissione dei sintomi di malattia, o recovery (Osler *et al*., 1993), grazie alla quale recuperano la produttività e un comportamento simile alle piante sane. In vite, tale fenomeno,

osservato con incidenza diversa a seconda della varietà e dell'areale di indagine (Osler *et al*., 1993; Garau *et al*., 2007; Romanazzi *et al*., 2007; Mazio *et al*., 2008), sembra essere associato alla produzione di elevati livelli di H_2O_2, rilevata nelle foglie di piante recovered di "Prosecco" (Musetti *et al*., 2007). Il fenomeno naturale ha una frequenza casuale ma può essere favorevolmente influenzato da stress biotici, come trapianto (Osler *et al*., 1993), estirpazione controllata e strattonamento (Romanazzi e Murolo, 2008) o attraverso pratiche agronomiche come potatura e capitozzatura (Borgo e Angelini, 2002; Zorloni *et al*., 2002). Una strategia innovativa per il controllo dei giallumi della vite potrebbe consistere nel trattamento delle piante infette con elicitori, che possono indurre o potenziare le difese della pianta (Romanazzi *et al*., 2009a). Numerose sostanze, naturali o di sintesi, sono note per la capacità di indurre resistenza ad un ampio range di patogeni (Vallad e Goodman, 2004), alcune delle quali sono registrate in Italia su vite.

Considerata l'importanza che la vite ricopre nell'economia italiana, dal momento che non esistono prodotti chimici sperimentati in campo per il controllo dei giallumi, si è ritenuto opportuno verificare la risposta delle piante affette da tali avversità a trattamenti settimanali con induttori di resistenza.

MATERIALI E METODI

Principi attivi e formulati utilizzati

Cinque prodotti commerciali sono stati applicati in campo per valutarne l'efficacia nell'indurre la remissione dei sintomi in piante affette da LN. In particolare, sono stati testati formulati a base di chitosano (Chito Plant, ChiPro GmbH, Brema, Germania), Fosetyl-Al (Aliette, Bayer Crop Science, Monheim, Germania), due miscele di glutatione ed oligosaccharine (Kendal, Valagro, Atessa, Italia ed Olivis, Agrisystem, Lamezia Terme, Italia) ed acibenzolar-S-metile (Bion, Syngenta Crop Protection, Basilea, Svizzera).

I trattamenti sono stati eseguiti con una irroratrice a spalla mod. Honda GX 25, a cadenza settimanale, da inizio maggio fino a fine luglio del 2007 e 2008. La vegetazione è stata bagnata con un volume corrispondente a 10 hl/ha, eseguendo le irrorazioni nelle prime ore della mattina. In tabella 1 vengono riassunte le principali caratteristiche dei formulati utilizzati e le dosi (kg/ha) somministrate durante la prova.

Tabella 1. Principali caratteristiche dei formulati utilizzati nelle prove in campo

Prodotto commerciale	Principio attivo	Intervallo di sicurezza (giorni)	Dose (kg/ha o L/ha)	Intervallo di applicazione (giorni) suggerito in etichetta	Registrato su vite
Aliette	fosetyl-Al	40	2,5-3,0	21	SI
Kendal	glutatione + oligosaccarine	-	2,5-4,0	5-10	SI*
Chito Plant	chitosano	-	0,05-5,0	n.d.**	SI*
Bion	acibenzolar-S-methyl	-	0,15-0,2	7-14	NO
Olivis	glutatione + oligosaccarine	-	3,0-4,0	7-10	SI*

* Prodotto registrato come promotore delle difese della pianta. **Dato non disponibile

Campo sperimentale

Il campo sperimentale dell'azienda vitivinicola Ferretti, di circa 0,4 ha, ubicato nel comune di Atri (TE) (444 m s.l.m.), fa parte di un appezzamento di 4 ha coltivato a Chardonnay e Montepulciano, di circa venti anni di età, allevato a tendone, con sesto di impianto di 2,5 × 2,5 m e dotato di un sistema di irrigazione a goccia. Sopralluoghi effettuati nell'estate 2006 avevano consentito di rilevare circa il 30% delle piante infette da LN, che segnate su una mappa bidimensionale, sono state ripartite nelle diverse tesi al momento dell'allestimento della prova di campo iniziata nel 2007, secondo un blocco randomizzato, e proseguita nel 2008. Durante la prova biennale, il vigneto è stato sottoposto ai comuni trattamenti per il controllo delle principali malattie fungine e, nessun principio attivo utilizzato in queste prove era stato distribuito in precedenza.

Rilievi dei sintomi di giallumi

Nel campo sperimentale sono stati effettuati rilievi sintomatologici in due periodi della stagione vegetativa. In particolare, un primo rilievo è stato effettuato all'inizio di luglio, quando i sintomi cominciano a manifestarsi soprattutto su una varietà suscettibile come Chardonnay. Un ulteriore rilievo è stato posizionato agli inizi di settembre, quando l'espressione sintomatologica è particolarmente evidente. I dati espressi come percentuale di piante recovered sono stati sottoposti ad analisi della varianza secondo il disegno sperimentale di blocco randomizzato (Anova 2) e le medie separate mediante il test di Duncan.

Diagnosi dei principali agenti causali dei giallumi della vite

Da alcune delle piante che, alla fine dei trattamenti, presentavano sintomi o si presentavano asintomatiche, sono state prelevate dieci foglie, da cui è stata effettuata l'estrazione del DNA totale utilizzando il kit commerciale DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania). Per l'amplificazione genica (PCR diretta), è stata utilizzata la coppia di iniziatori universali fP1/rP7 (Schneider *et al.*, 1995), seguita da una nested PCR utilizzando le coppie di primer gruppo specifiche R16(I)F1/R1, R16(III)F2/R1 e R16(V)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994). I campioni amplificati con gli iniziatori gruppo specifici R16(I)F1/R1 sono stati poi digeriti con l'enzima di restrizione *Mse*I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), incubando la miscela di reazione a 37 °C per una notte. I frammenti ottenuti sono stati separati su gel di poliacrilammide al 5% in TAE 1× e visualizzati mediante colorazione in una soluzione di bromuro di etidio.

RISULTATI

Nella prova sperimentale condotta nel 2007, tutti i trattamenti sono risultati efficaci nell'aumentare il numero di piante recovered rispetto al testimone. In particolare, Bion, Olivis, Kendal e Aliette hanno determinato una migliore risposta delle piante trattate, facendo registrare percentuali di piante recovered significativamente più elevati ($P \leq 0,05$) rispetto al controllo non trattato (tabella 2). Pur avendo registrato un'elevata percentuale di piante recovered anche nel testimone non trattato, tutti i formulati utilizzati hanno determinato un'incremento dell'incidenza percentuale delle piante risanate rispetto al testimone variabile tra il 29,6% del Chito Plant e il 112% del Bion.

La capacità del trattamento con Kendal, Bion ed Olivis nell'indurre la remissione dei sintomi è stata confermata anche nell'annata 2008, quando è stato, inoltre, possibile registrare una naturale remissione dei sintomi in piante non trattate pari a circa il 20% (tabella 2).

Le indagini biomolecolari condotte sul materiale vegetale prelevato da piante sintomatiche hanno permesso di accertare infezioni da fitoplasmi riconducibili allo stolbur, o '*Candidatus*

Phytoplasma solani'. Dalle piante sane e recovered non è invece stato ottenuto nessun amplicone.

Tabella 2. Percentuale di piante recovered nel campo sperimentale di Atri (TE) nel biennio di sperimentazione 2007-2008

Trattamento	2007		2008	
	Piante recovered (%)	Recovery rispetto al testimone (%)	Piante recovered (%)	Recovery rispetto al testimone (%)
Aliette	65,7 ab*	75,2	28,6 bc	23,8
Kendal	71,4 a	90,4	57,1 a	147,2
Chito Plant	48,6 bc	29,6	31,2 bc	35,1
Bion	79,5 a	112,0	53,3 ab	130,7
Olivis	74,5 a	98,6	50,0 ab	116,5
Testimone	37,5 c	-	23,1 c	-

* I valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente differenti per P≤0,05, secondo il test di Duncan

DISCUSSIONE

Il LN, presente in tutte le aree viticole dell'Europa, può causare seri danni sia a livello quantitativo che qualitativo, soprattutto su varietà suscettibili quali Chardonnay (Borgo e Angelini, 2002; Romanazzi *et al*., 2007). L'impossibilità di coltivare i fitoplasmi *in vitro* ha reso particolarmente difficoltosa la ricerca di principi attivi efficaci per il loro controllo. Considerando tali aspetti, una delle poche opportunità consiste nel promuovere le resistenze endogene della pianta (Romanazzi *et al*., 2009b). Questa strategia è stata tentata in Emilia-Romagna da Mazio *et al*. (2008), utilizzando diversi fertilizzanti organici distribuiti sul suolo e sulla vegetazione in quattro diversi periodi della stagione vegetativa su piante di Lambrusco salamino e Ancellotta che mostravano sintomi di giallume. La percentuale di piante recovered è risultata influenzata da condizioni metereologiche e dalla cultivar, mentre non sono state riscontrate differenze tra piante trattate con i diversi induttori ed il controllo. In Sardegna, due applicazioni di Kendal su piante di Chardonnay e Vermentino affette da LN non hanno consentito di registrare alcun effetto significativo sui parametri sia qualitativi che quantitativi delle piante (Garau *et al*., 2007). Alla luce di queste sperimentazioni, si è pensato di intensificare il calendario dei trattamenti (7-13 applicazioni/anno) cercando di amplificare l'effetto recovery su una delle varietà più suscettibili alla malattia come Chardonnay. I risultati migliori, riscontrati in due annate differenti (2007 e 2008) sono stati ottenuti con l'uso di Kendal, Bion ed Olivis.

Molti studi hanno dimostrato che il Bion può indurre con successo resistenza a vari patogeni, aumentando il contenuto di proteine patogenesi-relative (PR) in molte specie di pianta (Vallad e Goodman, 2004). Inoltre, il Bion è stato utilizzato anche per il controllo di '*Ca*. Phytoplasma asteris' su crisantemo (D'Amelio *et al*., 2007) e del fitoplasma della malattia "X" delle drupacee (X disease) (Bressan e Purcell, 2005). Kendal ed Olivis si basano su una miscela di glutatione ed oligosaccarine. In *Phaseolus vulgaris*, un trattamento con glutatione ha provocato una trascrizione massiccia dei geni della difesa che codificano i precursori per la

biosintesi di lignina e fitoalessine e di geni che codificano per l'inspessimento delle pareti cellulari (Wingate *et al*., 1988).

Il Chito Plant, a base di chitosano, è un biopolimero naturale con proprietà antimicrobiche e svolge azione di elicitore di resistenza della pianta contro funghi, batteri e virus (Kulikov *et al*., 2006; Romanazzi *et al*., 2009c). Nella nostra prova il Chito Plant e l'Aliette nel 2008 hanno favorito il fenomeno del recovery, seppur in misura minore rispetto ad Olivis e Kendal. Anche D'Amelio *et al*. (2007) hanno osservato una riduzione ed un ritardo nella comparsa dei sintomi su crisantemi infetti da '*Ca*. Phytoplasma asteris' trattati con chitosano. Su *Catharanthus roseus* infetta da fitoplasmi, i trattamenti con Aliette sono risultati efficaci nel contenimento dei sintomi di malattia (Chiesa *et al*., 2007).

Diversi sono i fattori che possono influire sull'intensità del fenomeno del recovery: suscettibilità varietale (Romanazzi *et al*., 2007), combinazioni di varietà e portainnesti (Romanazzi e Murolo, 2008) e condizioni climatiche. In particolare, nel 2007 nella provincia di Teramo, si è verificata un'annata particolarmente calda e siccitosa, caratterizzata da mancanza quasi completa di pioggia tra giugno e settembre. Pertanto, l'incidenza relativamente alta di remissione naturale dei sintomi (37,5%) può essere attribuita a condizioni climatiche stressanti che hanno caratterizzato l'area durante il periodo estivo. Una correlazione significativa tra recovery naturale e temperature alte è stata riportata in una sperimentazione di quattro anni attuata in due vigneti di Chardonnay colpiti da LN in provincia di Pistoia e Siena (Braccini e Nasca, 2008).

I dati ottenuti dalla presente sperimentazione hanno permesso di verificare la possibilità di una riduzione del numero di piante con sintomi di LN a seguito del trattamento in campo di viti sintomatiche con induttori di resistenza. Ad ogni modo, non tutti i prodotti utilizzati sono registrati per l'utilizzo su vite. Inoltre, un formulato utilizzato ha un periodo di carenza che con il calendario di trattamenti adottato non consente di rispettarlo, in quanto Chardonnay in Italia centrale viene raccolto a metà agosto. Resta da valutare la collocazione dei promotori di difese della pianta, che riportano questa attività come collaterale. Ad ogni modo, ulteriori prove sono necessarie per confermare l'efficacia su ampia scala dei trattamenti e valutarne l'integrabilità con le tecniche colturali adottate.

Ringraziamenti

Il lavoro è stato condotto nell'ambito dei progetti "Varenne" finanziato dalla Fondazione Cariverona (Bando 2007) e MIUR PRIN 2005074429_002. Si ringraziano Sergio Barbone, Rita Di Giovanni e Federico Patrizio per la collaborazione alle prove di campo.

LAVORI CITATI

Borgo M., Angelini E., 2002. Diffusione della Flavescenza dorata della vite in Italia e relazioni con vitigni, pratiche agronomiche, e materiali di propagazione. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 1, 35-50.

Braccini P., Nasca M., 2008. Influence of some environmental factors on the phenomenon of recovery in Bois noir affected vines. *Petria*, 18, 363-365.

Bressan A., Purcell A.H., 2005. Effect of benzothiadiazole on transmission of X-disease phytoplasma by the vector *Colladonus montanus* to *Arabidopsis thaliana*, a new experimental host plant. *Plant Disease*, 89, 1121-1124.

Chiesa S., Prati S., Assante G., Maffi D., Bianco P.A., 2007. Activity of synthetic and natural compounds for phytoplasma control. *Bulletin of Insectology*, 60, 313-314.

D'Amelio R., Massa N., Gamalero E., D'Agostino, Sampò S., Berta G., Faoro F., Iriti M., Bosco D., Marzachì C., 2007. Preliminary results on the evaluation of the effects of

elicitors of plant resistance on chrysanthemum yellows phytoplasma infection. *Bulletin of Insectology*, 60, 317-318.

Garau R., Sechi A., Prota V.A., Moro G., 2007. Productive parameters in Chardonnay and Vermentino grapevines infected with "bios noir" and recovered in Sardinia. *Bulletin of Insectology*, 60, 233-234.

Kulikov S.N., Chikov S.N., Il'ina A.V., Lopatin S.A., Varlamov V.P., 2006. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 200-203.

Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen D.E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic molicutes. *Annual Review Microbiology*, 54, 221-255.

Lee I.-M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E., 1994. Use of mycoplasmalike organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84, 559-566.

Mazio P., Montermini A., Brignoli P., 2008. Preliminary trials to test the effectiveness of biological promoters for the control of grapevine yellows symptoms. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 593-600.

Musetti R., Marabottini R., Badiani M., Martini M., Sanità di Toppi L., Borselli S., Borgo M., Osler R., 2007. On the role of H_2O_2 in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera*, cv Prosecco) from Flavescence dorée disease. *Functional Plant Biology*, 34, 750-758.

Osler R., Carraro L., Loi N., Refatti E., 1993. Symptom expression and disease occurrence of a yellows disease of grapevine in Northeastern Italy. *Plant Disease*, 77, 496-498.

Romanazzi G., Prota V.A., Casati P., Murolo S., Silletti M.R., Di Giovanni R., Landi L., Zorloni A., D'Ascenzo D., Virgili S., Garau R., Savino V., Bianco P.A., 2007. Incidenza del recovery in viti infette da fitoplasmi in diverse condizioni climatiche e varietali italiane e tentativi di comprensione ed induzione del fenomeno. *Atti Convegno Nazionale* "Nuove possibilità di lotta contro le fitoplasmosi della vite e dei fruttiferi basate su recovery, resistenze indotte e antagonisti" - Ancona, 17-18 settembre, 9-11.

Romanazzi G., Murolo S., 2008. Partial uprooting and pulling to induce recovery in Bois noir infected grapevines. *Journal of Phytopathology*, 156, 747-750.

Romanazzi G., D'Ascenzo D., Murolo S., 2009a. Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine Bois noir. *Journal of Plant Pathology*, 91, 677-682.

Romanazzi G., Musetti R., Marzachì C., Casati P., 2009b. Induction of resistance for the control of phytoplasma diseases. *Petria*, 19, 113-129.

Romanazzi G., Mlikota Gabler F., Margosan D.A., Mackey B.E., Smilanick J.L., 2009c. Effect of acid used to dissolve chitosan on its film forming properties and its ability to control postharvest gray mold of table grapes. *Phytopathology*, 99, 1028-1036.

Schneider B., Seemuller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology* S. Razin e J.G. Tully eds., Academic Press, New York, 2, 369-390.

Vallad G.E., Goodman R.M., 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44, 1920-1934.

Wingate V.P.M., Lawton M.A., Lamb C.J., 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defence genes. *Plant Physiology*, 87, 206-210.

Zorloni A., Scattini G., Bianco P.A., Belli G., 2002. Possible reduction of grapevine Flavescence dorée by a careful winter pruning. *Petria*, 12, 407-408.