

## EFFICACIA DI NUOVE ALTERNATIVE AL RAME IN VITICOLTURA BIOLOGICA NEI CONFRONTI DI *PLASMOPARA VITICOLA*

S. DAGOSTIN<sup>(1)</sup>, A. FERRARI<sup>(1)</sup>, C. GESSLER<sup>(1,2)</sup>, I. PERTOT<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> SafeCrop Centre, Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Via E. Mach 1, 38010  
S. Michele all'Adige (TN), Italia silvia.dagostin@iasma.it

<sup>(2)</sup> Institute of integrative Biology: ecology, evolution and infectious diseases, Swiss Federal  
Institute of Technology, Universitätstrasse 2, CH-8092 Zürich, Svizzera

### RIASSUNTO

Durante il 2005 si è effettuata una sperimentazione in serra ed in vigneto volta all'identificazione di nuove alternative al rame efficaci nei confronti della peronospora della vite ed applicabili in agricoltura biologica. La sperimentazione è parte di un più ampio progetto europeo (REPCO). Lo scopo del progetto REPCO è di valutare l'attività antiperonosporica ed anticchiolatura di prodotti naturali, induttori di resistenza e nuovi agenti di biocontrollo da potersi applicare in sostituzione dei fungicidi rameici. Sette nuovi prodotti sono stati valutati in condizioni controllate, su infezioni artificiali di *Plasmopara viticola*. In seguito i prodotti risultati più promettenti nei test in serra sono stati valutati in campo, in presenza di infezioni naturali. Tra essi, quelli con presunto meccanismo d'azione riconducibile ad induzione di resistenza sembrano essere promettenti al fine di ottenere una sostituzione, almeno di parte, degli interventi con fungicidi rameici, mentre nuovi formulati, come il gluconato di rame, potrebbero contribuire a ridurre i dosaggi.

**Parole chiave:** vite, peronospora, rame, induzione di resistenza, agricoltura biologica

### SUMMARY

#### NEW ALTERNATIVES TO COPPER AGAINST *PLASMOPARA VITICOLA* IN ORGANIC VITICULTURE

In 2005 greenhouse and field trials were performed in order to identify new alternatives to copper for grapevine downy mildew control in organic farming. This research is part of a wider European Project (REPCO). The aim of the project is to evaluate the efficacy against downy mildew and scab of pome fruits of natural products, resistance inducers and new biocontrol agents in order to replace copper fungicides. Seven compounds were tested under controlled conditions with *Plasmopara viticola* artificial infections. The most promising ones were, then, evaluated in conditions of natural infections. The resistance inducers seem to be a good alternative to replace at least some copper treatments. The new formulation of copper gluconate seems to be useful in the reduction of copper dosages.

**Keywords:** grapevine, downy mildew, copper, resistance inducers, organic agriculture

### INTRODUZIONE

La peronospora, causata dall'oomicete *Plasmopara viticola* (Berk.&Curt.) Berl.& de Toni, è una delle più gravi malattie della vite a livello mondiale. La malattia colpisce foglie e grappoli e può causare elevate perdite di produzione a livello quantitativo e qualitativo. Attualmente la difesa biologica nei confronti della peronospora si basa quasi esclusivamente sull'uso di fungicidi a base di rame. Il loro continuo uso causa però un accumulo del metallo nel terreno, che può essere dannoso nei confronti degli organismi in esso presenti. Questo fenomeno è di conseguenza incompatibile con i principi su cui si basa l'agricoltura biologica. Al fine di ridurre i danni causati dall'uso di composti a base di rame l'Unione Europea, con il

Regolamento (CE) n. 473/2002, che modifica gli allegati I, II e IV del Regolamento n. 2092/91, ha limitato notevolmente l'impiego del rame in agricoltura biologica.

Nel 2003 l'Unione Europea ha finanziato il progetto REPCO ([www.rep-co.nl](http://www.rep-co.nl)), a cui partecipano 12 Istituti di ricerca e piccole medie imprese europee, che ha l'obiettivo di contribuire all'eliminazione dei fungicidi a base di rame nell'agricoltura biologica, studiando e sviluppando prodotti a base biologica, induttori di resistenza, nuovi agenti di biocontrollo e nuovi sistemi di gestione integrata per il contenimento della peronospora della vite e della ticchiolatura del melo.

La presente sperimentazione, parte del citato progetto, ha l'obiettivo di valutare l'efficacia antiperonosporica di alcuni composti alternativi, effettuando prove preliminari in condizioni controllate in serra con infezioni artificiali e, successivamente, in campo in presenza di infezioni naturali del patogeno. In particolare l'attenzione è stata posta su tre sistemi di difesa dal patogeno. Il primo si basa sul potenziamento delle difese della pianta. L'induzione di resistenza generalmente si attua a livello sistemico (systemic acquired resistance, SAR), in quanto i meccanismi di difesa della pianta non vengono potenziati solo nelle prime parti colpite del patogeno, ma anche in altri tessuti lontani dal luogo dell'infezione. Tuttavia esiste un secondo tipo di induzione di resistenza che avviene localmente per cui solo alcuni tessuti divengono più resistenti in seguito a infezione (localized acquired resistance, LAR). I meccanismi SAR e LAR sono comunque simili e sono in grado di difendere la pianta da numerosi tipi di patogeni (Kothari e Patel, 2004). Il secondo propone l'uso di molecole anfipatiche con una struttura costituita da un gruppo funzionale idrofilo e uno idrofobo. L'azione di queste molecole può essere ricondotta all'interazione molecole-membrane cellulari in quanto le membrane cellulari a composizione fosfolipidica permettono l'intercalazione di molecole polari-apolari con conseguente perdita di integrità di membrana e lisi della stessa (Stanghellini e Miller, 1997). Infine il terzo approccio prevede lo studio di nuove formulazioni in grado di potenziare l'assorbimento e l'azione del principio attivo (rame), che quindi consentano una riduzione delle quantità applicate. Molecole come aminoacidi, peptidi o zuccheri a cui il rame viene chelato, vengono captate dai sistemi di trasporto presenti sulle membrane cellulari del patogeno, aumentando così l'assorbimento del principio attivo e conseguentemente la sua attività. Questi formulati, tuttavia, presentano spesso problemi di accumulo anche nelle cellule vegetali con conseguente fitotossicità.

## MATERIALI E METODI

### **Prove in condizioni controllate in serra**

Al fine di comparare con maggior precisione l'attività fungicida nei confronti di *P. viticola* e valutare i modi e tempi d'applicazione dei prodotti sono state effettuate delle prove in serra in condizioni controllate. Sono state utilizzate barbatelle innestate di cv Pinot grigio, coltivate in vaso all'esterno e portate in serra al momento della ripresa vegetativa. Ogni tesi era costituita da cinque piante, aventi ciascuna due germogli con quattro foglie sviluppate. L'inoculazione artificiale è stata effettuata utilizzando una sospensione acquosa di sporangi di *P. viticola* alla concentrazione di  $10^6$  sporangi/ml. La sospensione di sporangi e i prodotti in esame sono stati applicati sulle foglie tramite una pistola ad aria compressa, in volumi tali da ottenere un'omogenea e completa copertura. Al termine del periodo di incubazione per ogni pianta sono state valutate la percentuale di superficie fogliare colpita da infezione (gravità) e la percentuale totale di foglie colpite (diffusione). I prodotti valutati sono riportati in tabella 1. Acylbenzolar-s-methyl (Bion 50 WG), pur non essendo applicabile in agricoltura biologica è stato inserito come referente per l'induzione di resistenza.

Le applicazioni sono state eseguite tenendo conto del meccanismo d'azione dei prodotti e di conoscenze già acquisite dalle aziende produttrici. Estratti alcolici di piante (Elot-Vis® forte) e derivati dalla lignina (Phytovital) sono stati applicati due volte: 3 giorni e 6 ore prima dell'inoculazione. Per chitosano (Chitoplant) e acylbenzolar-s methyl sono stati valutati gli effetti ottenibili mediante applicazioni ripetute tre volte (7, 4 giorni e 6 ore prima dell'inoculo), due volte (4 giorni e 6 ore prima dell'inoculo) e poco prima dell'inoculazione (6 ore prima). Per quanto riguarda il chitosano, è stata valutata l'efficacia di una sua associazione con idrossido di rame (Kocide 2000) a basse dosi (0,4 g/l). Idrossido di rame 1,33 g/l e acqua sono stati usati come referente e controllo non trattato. I prodotti restanti sono stati applicati 6 ore prima dell'inoculazione.

Tabella 1 - Nome del prodotto commerciale, principio attivo, caratteristiche o tipologia di attività e dosaggio dei prodotti valutati in serra.

Prodotto commerciale	Principio attivo	Tipologia	Dose/l
Elot-Vis® forte	Estratti alcolici di piante	Induttore di resistenza	5 ml
Phyto vital	Derivati della lignina	Induttore di resistenza	50 ml
ChitoPlant	Chitosano	Induttore di resistenza	0,5 g
Bion® 50 WG	Acylbenzolar-s methyl	Induttore di resistenza	1 g
Zonix® Rhamnolipid	Biosurfactante	Molecole anfipatiche	0,4 ml
Tecnobiol	Sali di potassio degli acidi grassi	Molecole anfipatiche	10 ml
Labicuper	Gluconato di rame	Chelato di rame	3 ml
Kocide	Idrossido di rame	rame	1,33 g

### Prove in campo

Le prove sono state eseguite presso il corpo aziendale ad indirizzo viticolo dell'Istituto Agrario di San Michele all'Adige "Navesel", ubicato a Rovereto (TN). Il vigneto sperimentale allevato a pergola semplice è costituito da cv Cabernet Sauvignon, innestata su Kober 5BB. Il disegno sperimentale utilizzato è stato a blocchi completamente randomizzati, con quattro ripetizioni per ogni tesi. I prodotti saggiati (tabella 2) sono stati sciolti in acqua ed applicati con un volume pari a 12 hl/ha, utilizzando un atomizzatore a quattro concentrazioni. I trattamenti si sono effettuati con cadenza settimanale. Il primo e l'ultimo trattamento di copertura sono stati effettuati con idrossido di rame su tutte le tesi trattate. Tutte le operazioni sono state svolte seguendo le linee guida EPPO (2004).

Tabella 2 - Nome del prodotto commerciale, principio attivo, caratteristiche o tipologia di attività e dosaggio dei prodotti valutati in campo nel 2005 a Rovereto. Sono stati applicati 12 hl/ha

Nome	Principio attivo	Tipo	Dose/hl
Elot-Vis® forte	Estratti alcolici di piante	Induttore di resistenza	500 ml
ChitoPlant	Chitosano	Induttore di resistenza	50 g
Bion® 50 WG	Acylbenzolar-s methyl	Induttore di resistenza	100 g
Zonix® Rhamnolipid	Biosurfactante	Molecole anfipatiche	40 ml
Tecnobiol	Acidi grassi	Molecole anfipatiche	1 l
Labicuper	Gluconato di rame (8% Cu <sup>2+</sup> )	Chelato di rame	300 ml
Kocide	Idrossido di rame	rame	75-175 g

Nella prova si sono considerati due diversi tipi di strategie di intervento. Nella prima sono stati messi a confronto sali di potassio degli acidi grassi e gluconato di rame con idrossido di rame (CI), applicando i prodotti durante l'intero corso della stagione. La seconda strategia, applicata per i rimanenti prodotti, prevedeva un'integrazione con trattamenti di copertura con idrossido di rame durante il periodo di fioritura (tre trattamenti). Di conseguenza per il referente (idrossido di rame) è stato necessario utilizzare una strategia diversa che prevedeva solamente i cinque trattamenti con rame idrossido (CII) corrispondenti al periodo di utilizzo dei prodotti in esame. Per entrambe le strategie è stato mantenuto un unico testimone non trattato.

I rilievi sono stati effettuati settimanalmente a partire dalla comparsa dei primi sintomi di peronospora sul testimone non trattato (maggio 2005). Ad ogni controllo, sono stati esaminati 50 foglie e 50 grappoli per ogni ripetizione, determinando la percentuale di superficie fogliare o di grappolo colpita da infezione (gravità), la percentuale di foglie o di grappoli colpiti (diffusione).

I dati di gravità e diffusione della malattia raccolti in serra ed in campo sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica ed elaborati statisticamente tramite l'analisi della varianza e test HSD di Tukey, utilizzando il programma Statistica® (Statsoft).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **Prove in condizioni controllate in serra**

Dalle tre prove effettuate in serra, durante l'anno 2005 si nota che gli induttori di resistenza costituiti da estratti alcolici di piante, derivati dalla lignina e acylbenzolar-S-methyl sembrano in grado di garantire un buon contenimento della gravità della malattia (tabella 3). In particolare, solo l'efficacia di acylbenzolar-S-methyl applicato una volta (6 ore prima dell'infezione) non è statisticamente diversa dal testimone non trattato mentre, l'applicazione ripetuta tre volte (7, 4 giorni e 6 ore prima dell'infezione) è in grado di controllare la malattia in modo più soddisfacente rimarcando così che l'induzione di resistenza non avviene in maniera immediata. Al contrario, chiosano non ha dato nessun risultato positivo, né considerando diversi tempi di applicazione né considerando una sua eventuale associazione con prodotti a base di rame. I sali di potassio degli acidi grassi ed il biosurfactante Zonix, pur basandosi su molecole simili, hanno dato risultati diversi. Il primo sembra garantire un controllo della malattia addirittura migliore del rame, mentre la gravità di infezione su piante trattate con il secondo non si discosta molto da quella del testimone. Anche la nuova formulazione a base di gluconato di rame mostra un buon contenimento della malattia.

### **Prove di campo**

Le infezioni di peronospora durante l'anno 2005 sono state tardive e non gravi, con un massimo di grappoli colpiti pari al 45% (tabella 4). Considerando la gravità su foglia (AUDPC) tra gli induttori di resistenza, solo acylbenzolar-S-methyl ha permesso una significativa riduzione delle infezioni. Tale effetto però non si riscontra su grappolo. Analogamente a quanto avvenuto in serra, anche in campo il gluconato di rame garantisce risultati comparabili, se non migliori, rispetto a quelli del rame idrossido, almeno in termini di gravità su foglie. Con tale prodotto la quantità di rame ione utilizzata durante tutta la stagione è stata pari a circa 5 kg. La quantità di rame metallo applicata nei trattamenti effettuati con idrossido (Kocide 2000, Du Pont™) non è mai inferiore ai 600 g Cu/ha, mentre quella applicata con il gluconato di rame è di 288 g Cu/ha. A differenza di quanto si è riscontrato con i peptidati, con l'uso di gluconato di rame non si sono registrati danni di fitotossicità. Seppur in modo minore rispetto ai prodotti rameici, anche i sali di potassio degli acidi grassi hanno permesso una riduzione della malattia sia su foglia che su grappolo, rispetto al testimone non

trattato. Tutti gli altri prodotti non hanno dimostrato una sufficiente efficacia, tale quindi da poterli utilizzare in sostituzione dei fungicidi rameici in condizioni naturali in campo. Al momento della raccolta (2 settembre 2005) i rilievi mostrano che per la maggior parte dei prodotti, eccetto l'idrossido di rame (CI e CII) e i sali di potassio degli acidi grassi, la percentuale di grappoli infetti non differisce statisticamente da quello del testimone. Va comunque sottolineato che la diffusione sui grappoli nel testimone non trattato era piuttosto bassa.

Tabella 3 - Prove effettuate in serra: efficacia di nuovi prodotti nei confronti di *P. viticola* su piante in vaso (cv Pinot grigio). Le inoculazioni artificiali sono state effettuate con una sospensione di sporangi del patogeno. I prodotti sono stati applicati sei ore prima dell'infezione, tranne dove diversamente specificato.

Prova	Tesi	Dose/l	Foglie	
			Gravità <sup>a</sup> %	Diffusione <sup>a</sup> %
1	Estratti alcolici di piante	5 ml	2,6 a	47,4 a
	Derivati della lignina	50 ml	23,2 cd	88,0 b
	Biosurfactante	0,4 ml	54,3 de	96,8 b
	Gluconato di rame	3 ml	9,78 a	60,1 a
	Acidi grassi	10 ml	9,84 ab	81,7 b
	Idrossido di rame (37,5% Cu <sup>2+</sup> )	1,33 g	15,4 bc	98,0 b
	Testimone	nt	71,6 e	98,0 b
2	Chitosano; -7,-4 gg, -6 h*	0,5 g	57,0 d	80,3 b
	Chitosano; -4 gg, -6 h*	0,5 g	15,1 bcd	44,6 ab
	Chitosano; -6 h*	0,5 g	29,7 bcd	40,0 ab
	Chitosano + Idr. rame; -7,-4 gg,-6 h*	0,5 g+0,4 g	45,8 d	77,9 b
	Chitosano + Idr. rame; -4 gg,-6 h*	0,5 g+0,4 g	36,8 d	70,0 b
	Chitosano + Idr. rame; -6 h*	0,5 g+0,4 g	41,3 cd	55,7 ab
	Acylbenzolar-s methyl; -7,-4 gg, -6	1 g	10,3 ab	46,7 ab
	Acylbenzolar-s methyl; -4 gg, -6 h*	1 g	7,2 abc	38,3 ab
	Acylbenzolar-s methyl; -6 h*	1 g	16,3 bcd	76,7 b
	Acidi grassi	10 ml	0,8 a	4,0 a
	Idrossido di rame	0,4 g	8,5 ab	23,3 ab
	Testimone	nt	48,7 d	84,3 b
3	Gluconato di rame	3 ml	12,0 a	55,9 a
	Biosurfactante	0,4 ml	47,6 ab	79,8 a
	Idrossido di rame	1,33 g	14,3 a	73,1 a
	Testimone	nt	53,4 b	65,0 a

\*inoculo effettuato al tempo 0. nt= trattato con acqua <sup>a</sup>Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente per P=0,05 secondo il test di Tukey.

Tabella 4 - Prove in campo effettuate a Rovereto (TN) nel 2005: efficacia di nuovi prodotti nei confronti di *P. viticola* su cv Cabernet Sauvignon.

Strategia	Tesi	Dose/hl	Foglie		Grappoli Diffusione <sup>a</sup> % Rilievo del 02/09/05
			Gravità <sup>a</sup> % Rilievo del 14/09/05	Gravità <sup>a</sup> AUDPC Rilievi dal 01/08/05 al 14/09/05	
1	Estratti alcolici di piante	500 ml	24,1 c	355,0 ab	19,5 ab
	Biosurfactante	40 ml	23,6 c	352,0 ab	14,5 ab
	Acylbenzolar-S-methyl	100 g	7,0 a	159,4 a	24,5 ab
	Chitosano	100 g	33,6 d	464,6 b	26,0 ab
	Idrossido di rame CII	75-175 g	12,4 b	242,7 a	10,0 a
	Testimone	nt	59,3 e	1021,0 b	45,0 b
2	Gluconato di rame	300 ml	5,7 a	137,2 a	21,0 ab
	Acidi grassi	1000ml	21,2 c	409,2 ab	11,5 a
	Idrossido di rame CI	75-175 g	12,4 b	217,7 a	13,5 a
	Testimone	nt	59,3 d	1021,0 b	45,0 b

nt= trattato con acqua; <sup>a</sup>Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente per P=0,05 secondo il test di Tukey.

### CONCLUSIONI

Dei tre diversi meccanismi d'azione presi in considerazione, solo due (induzione di resistenza e nuove formulazioni rameiche) sembrano essere promettenti per ridurre l'apporto di rame nell'ambiente. Tuttavia, ad eccezione di acylbenzolar-S-methyl (Bion), gli induttori di resistenza, quando impiegati in condizioni di campo, non hanno confermato i livelli di efficacia ottenuti in condizioni controllate, dando luogo a risultati poco soddisfacenti. L'azione del prodotto a base di acidi grassi saggiato nelle prove (Tecnobiol), seppur ancora non comparabile con dei trattamenti a base di rame, sembra un'alternativa promettente. Ulteriori studi saranno necessari per migliorarne l'impiego.

### LAVORI CITATI

- EPP/OEPP, 2004. Guidelines for efficacy evaluation of plant protection products, Vol.2 Fungicides & Bactericides, OEPP/EPP, Francia 2004, 47-49
- Kothari I.L., Patel M., 2004. Plant immunization. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42, 244-252
- Stanghellini M.E, Miller R.M., 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant disease*, 81 (1), 4-12

Le attività sperimentali sono state finanziate dal progetto SafeCrop, finanziato dal Fondo per la Ricerca della Provincia Autonoma di Trento (serra) e dal progetto europeo REPCO, Sesto Programma Quadro, contratto N. SSPE-CT-2003 501452