



G. Carella¹

F. Burrioni²
A. Ciofini³
L. Ghelardini¹
R. Perria³
W.A. Petrucci³
P. Storchi³
L. Mugnai¹

IMPIEGO DI MICRORGANISMI NELLA DISINFEZIONE E PROTEZIONE DI BARBATELLE BIO DAI PATOGENI DEL LEGNO

Uno dei principali problemi in viticoltura è l'uso dei pesticidi chimici per contrastare le malattie. Il progetto Life Green Grapes mira alla riduzione dei fungicidi utilizzati nell'intero ciclo produttivo



Life Green Grapes è un progetto dimostrativo che coinvolge sia gli istituti di ricerca che le aziende agricole. Il progetto affronta temi che riguardano l'intera filiera vitivinicola: da un lato riguarda la produzione di uva da vino e da tavola, dall'altro la produzione di barbatelle.

Nei campi sperimentali dedicati alla produzione di uva sia da vino (in Toscana - Italia) che da tavola (in Puglia - Italia e a Cipro), le strategie attuate mirano a ridurre la quantità di fungicidi applicati per controllare le principali malattie fogliari nel vigneto, combinando il monitoraggio in campo, l'uso corretto del DSS e la stimolazione delle risposte di difesa della pianta, opzioni di gestione ben riconosciute come pilastri di una strategia di controllo delle malattie a basso impatto. Le potenzialità e i limiti dell'integrazione di questi approcci sono state indagate applicando 5 diversi protocolli di gestione nei vigneti, mentre nel vivaio il progetto ha individuato alcune delle fasi cruciali della produzione delle

barbatelle, nelle quali è possibile intervenire per ridurre la presenza di patogeni. L'obiettivo finale era quello di produrre piante con la capacità di essere produttive senza soffrire per un eccessivo stress post-trapianto e in grado di acquisire un'adeguata longevità.

In questa cornice uno degli scopi del progetto è stato quello di valutare l'effetto positivo dei microrganismi applicati alle radici nelle diverse fasi del processo produttivo: sia attraverso l'immersione delle radici delle piantine in una soluzione acquosa del prodotto sia attraverso la fertirrigazione.

Materiali e metodi

Presso il vivaio "Vivaio Moroni", partner del progetto, sono state allestite prove dimostrative in condizioni commerciali. Il materiale di propagazione è stato trattato seguendo tre diversi protocolli applicativi, che hanno previsto l'utilizzo di prodotti naturali ad attività antimicrobica

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali, Alimentari e Forestali, Università degli Studi di Firenze, Florence, Italy

² Studio Associato Agronimivigna, Firenze, Italy

³ Council for Agricultural Research and Economics (CREA), Research centre for Viticulture and Enology, Arezzo, Italy.

Email: giuseppe.carella@unifi.it



Fasi di lavoro	Tesi 1: Biologico	Tesi 2: Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	Tesi 3: <i>Trichoderma sp.</i>
Forzatura in segatura (circa un mese)	Estratto di propoli	Estratto di propoli + Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	Estratto di propoli + <i>Trichoderma sp.</i>
Prima della piantumazione (idratazione)	4-5-giorni in acqua	4-5 giorni in acqua + Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	4-5 giorni in acqua + <i>Trichoderma sp.</i>
Radicazione in barbatellaio (dopo 15 giorni dalla piantumazione)	/	Fertirrigazione (Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>)	Fertirrigazione (<i>Trichoderma sp.</i>)

Tab. 1 - Protocollo applicativo utilizzato nelle differenti fasi di produzione delle barbatelle (prova 1)



Fasi di lavoro	Tesi 1: Biologico	Tesi 2: Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>					Tesi 3: <i>Trichoderma sp.</i>
Prima del confezionamento	Estratto di propoli	Prodotto 1 Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	Estratto di propoli	Estratto di propoli	Estratto di propoli	Estratto di propoli	Estratto di propoli + <i>Trichoderma sp.</i>
Conservazione in cella frigorifera (circa 1 mese)	VM1	VM2A	VM2B	VM2C	VM2D	VM2E	VM3
Applicazione alle radici (inzaffardatura)	/	/	Prodotto A Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	Prodotto A Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	Prodotto B Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	Prodotto B Micorrize + <i>Trichoderma sp.</i>	/
			Prima della consegna	Prima della piantu- mazione	Prima della consegna	Prima della piantu- mazione	

Tab. 2 - Protocollo applicativo per la valutazione del momento più opportuno per effettuare il trattamento (prova 2)

disinfettante, e l'utilizzo di microrganismi, quali *Trichoderma sp.* e funghi micorrizici.

Trattamenti

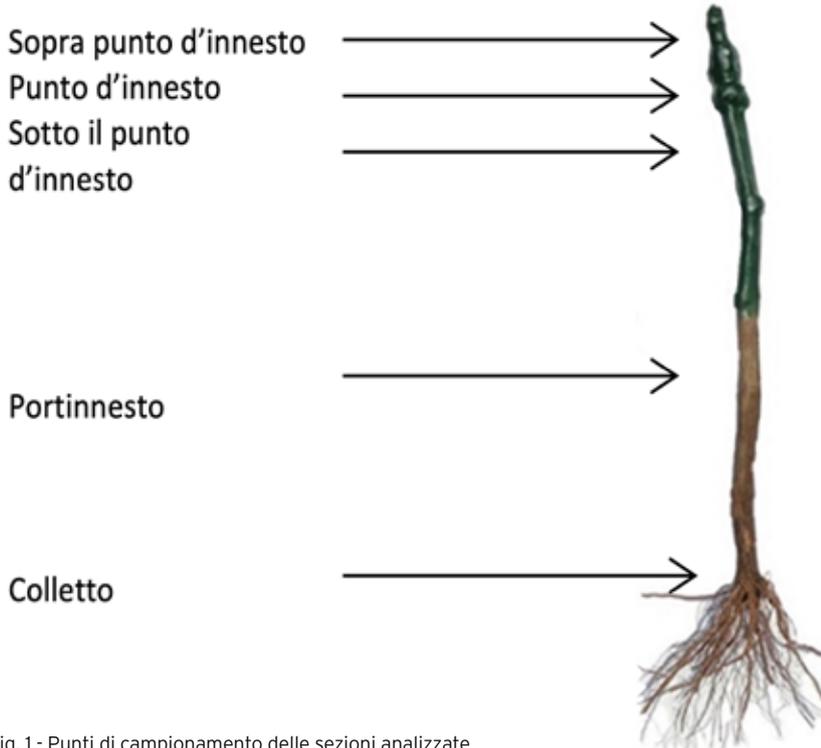
1^a prova. Nella sperimentazione in vivaio sono stati applicati tre trattamenti: 1) il protocollo standard applicato dall'azienda (Metodo biologico) comprendente la propoli come disinfettante naturale; e due prodotti commerciali: 2) Prodotto A, contenente spore e micelio di un consorzio di microrganismi inclusi funghi micorrizici arbuscolari del genere *Glomus* (*G. mosseae*, *G. viscosum*, *G. coronatum*), *Rhizophagus sp.*, *G. caldonium*) e funghi saprofiti del genere

Trichoderma (*Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*); 3) Prodotto B contenente diverse specie di funghi saprofiti appartenenti al genere *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. gamsii*). **2^a prova.** Per il trattamento radicale sono stati applicati due prodotti (con l'ausilio di bentonite per migliorare l'adesività) e confrontati: (1) Prodotto A (come 1^a prova), e (2) Prodotto C contenente diverse specie di funghi micorrizici arbuscolari del genere *Glomus* (*G. mosseae* e *G. intraradices*) e *Trichoderma atroviride*.

Disegno sperimentale

Le prove effettuate sono state finalizzate a 1) valutare l'effetto dei prodotti

a base di microrganismi applicati durante il processo di vivaio sulla microflora fungina presente nel legno delle talee radicate, e 2) valutare il momento più adatto per l'applicazione per migliorare l'attecchimento. L'effetto dei trattamenti sulla colonizzazione del legno della microflora fungina (1^a prova) è stato esaminato confrontando tre diversi protocolli: gestione aziendale Bio (il protocollo standard applicato dall'azienda), Prodotto A e Prodotto B. I prodotti utilizzati sono stati applicati nelle fasi di: a) forzatura in segatura, b) idratazione, c) in fertirrigazione 15 giorni dopo il trapianto (Tabella 1). Per valutare il momento più opportu-



no per il trattamento delle radici (2ª prova), sono stati applicati due prodotti, Prodotto A e Prodotto C, in diverse fasi del processo produttivo: 1) prima della conservazione in cella frigorifera a 4°C; 2) durante la fase di confezionamento prima della consegna; 3) appena prima della piantumazione (Tab. 2).
Analisi della microflora fungina del legno e dell'apparato radicale

Dopo l'estirpazione, le barbatelle sono state portate presso il laboratorio del dipartimento DAGR (Università di Firenze), dove sono state effettuate le analisi.

Dopo un primo lavaggio con acqua, il campione è stato disinfettato per immersione in ipoclorito di sodio al 4% per 2 minuti, quindi scortecciato e immerso per un minuto nella stessa soluzione disinfettante al fine di eliminare inquinanti o microrganismi presenti sulla superficie esterna del campione.

Fig. 1 - Punti di campionamento delle sezioni analizzate

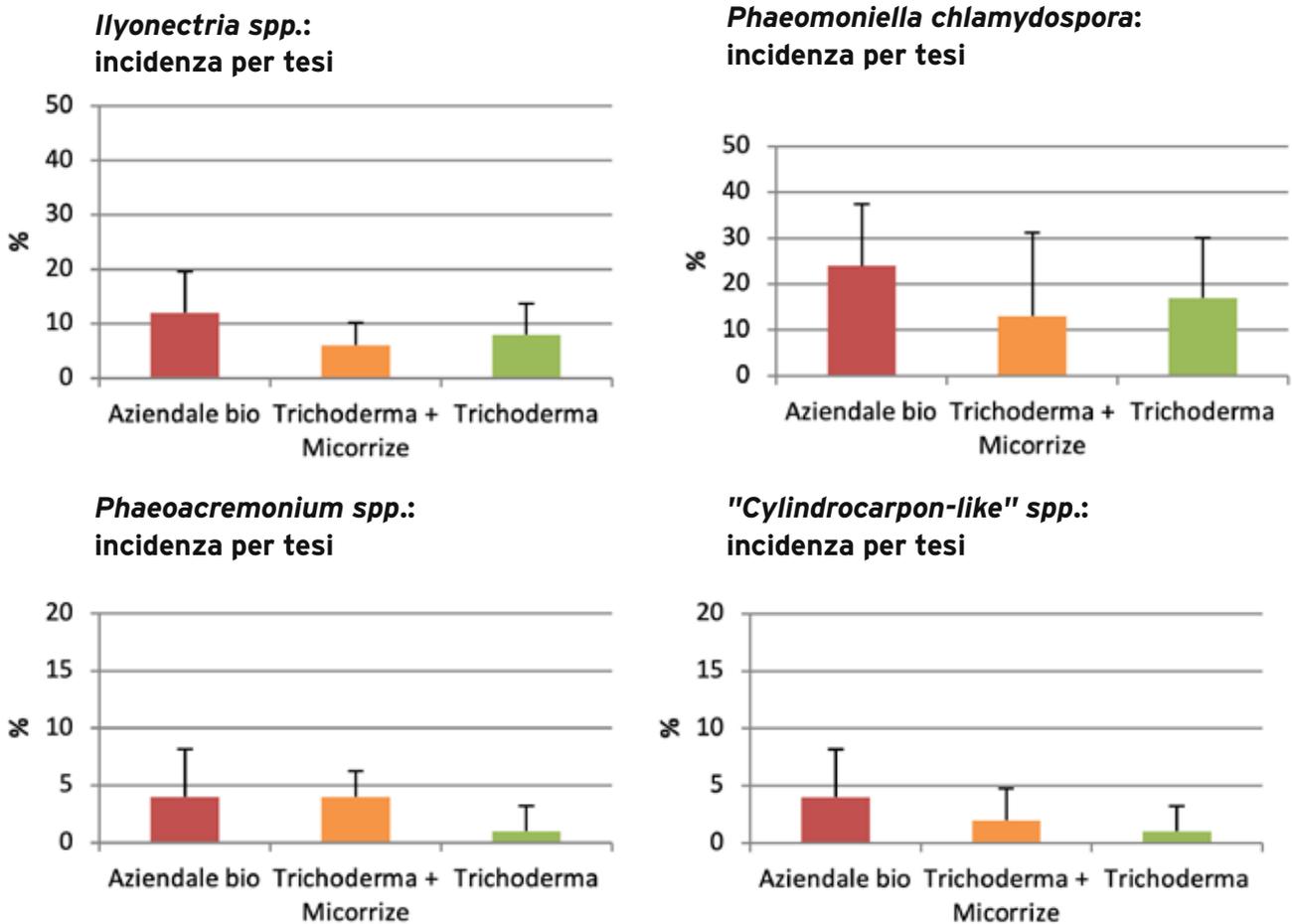


Fig. 2 - Microflora fungina del legno a seguito dei trattamenti con il Prodotto A e il Prodotto B. L'incidenza dei patogeni fungini rilevati (infezioni naturali) tendeva (sebbene l'effetto fosse statisticamente non significativo) ad essere inferiore rispetto al trattamento Gestione biologica aziendale (controllo). Per *Phaeoacremonium spp.* l'unica riduzione di incidenza è stata osservata nel trattamento "Trichoderma"

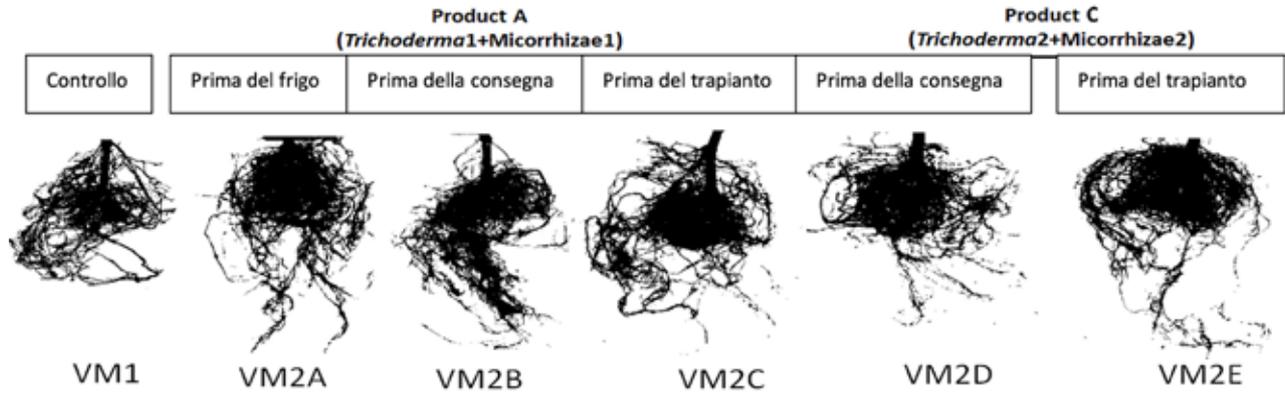
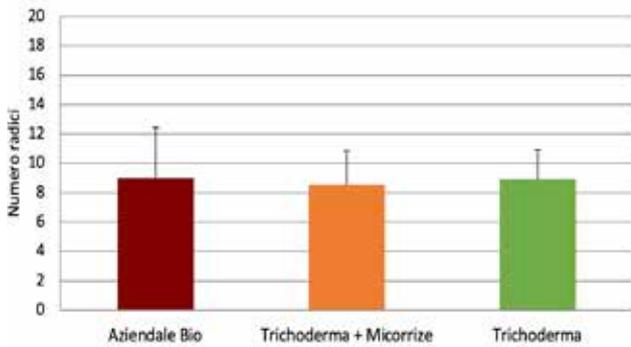
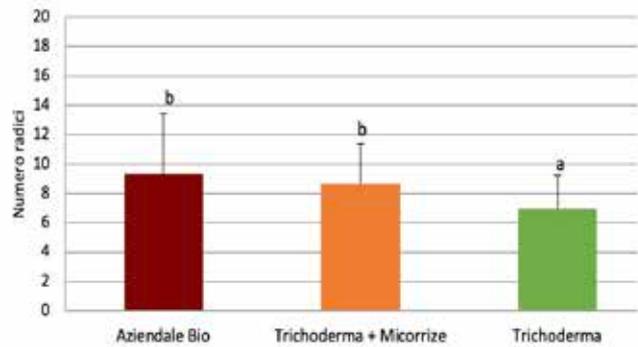


Fig. 3 - La massa radicolare nell'area prossimale è risultata maggiore in tutti i trattamenti rispetto al controllo

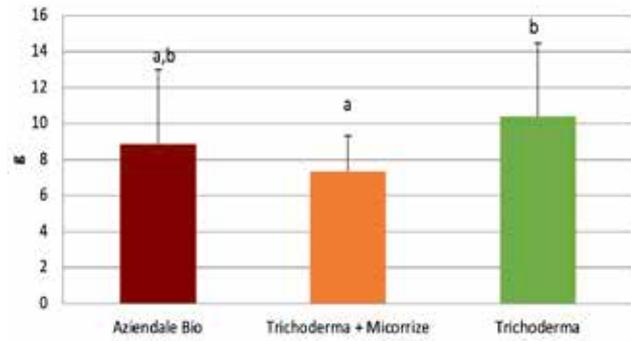
Numero radici primarie per barbatella



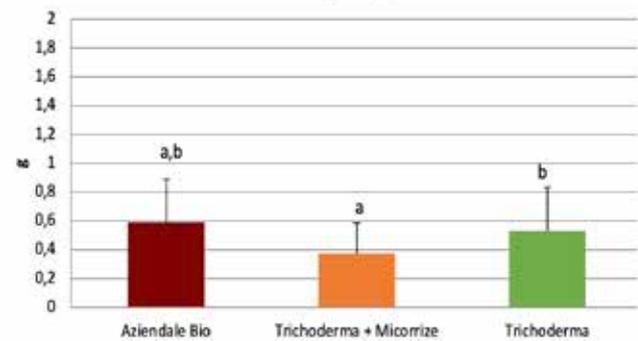
Numero radici capillari per barbatella



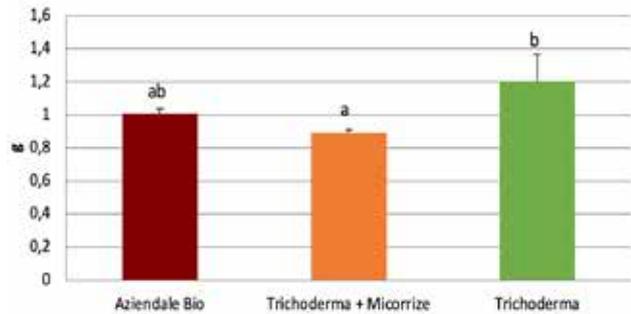
Peso secco radici primarie per barbatella



Peso secco radici capillari per barbatella



Peso secco medio singola radice primaria



Peso secco medio singola radice capillare

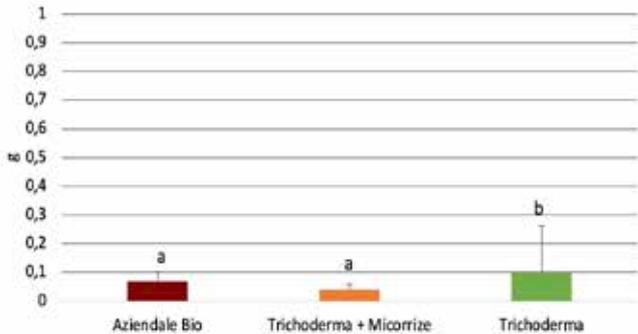


Fig. 4 - Effetti dell'applicazione del trattamento (significativo secondo ANOVA univariata) sull'apparato radicale (peso e numero di radici). Il trattamento con Gestione Biologica Aziendale e Prodotto C ha mostrato un peso secco delle radici primarie e capillari per barbatella e per singola radice significativamente più elevato rispetto al trattamento con Prodotto A. Il trattamento con Prodotto A ha aumentato significativamente il numero totale di radici capillari. Le medie seguite dalla stessa lettera nelle barre non sono significativamente differenti (test di Duncan P <0.05)

Sono state analizzate trenta barbatelle per tesi. Da 5 punti (Fig. 1) sono state prelevate cinque sezioni di circa 2 mm di spessore (Fig. 1): sopra il punto di innesto, nel punto di innesto, sotto il punto di innesto, dal portainnesto, dal colletto.

Ogni sezione è stata suddivisa in 5 frammenti che sono stati posizionati su piastre Petri (90 mm diam.) contenenti MEA. Le piastre sono state incubate a 25 °C per 4 settimane; sono state ottenute colture pure dai funghi sviluppati ed è stata effettuata l'identificazione morfologica di questi.

Per la valutazione dell'apparato radicale sono state analizzate 30 barbatelle per ciascuna tesi. Le radici sono state lavate con acqua e asciugate all'aria. Successivamente sono state contate e pesate le radici primarie e capillari. Il peso secco delle radici è stato valutato dopo essiccazione in stufa per 72 ore a 50 °C.

Risultati

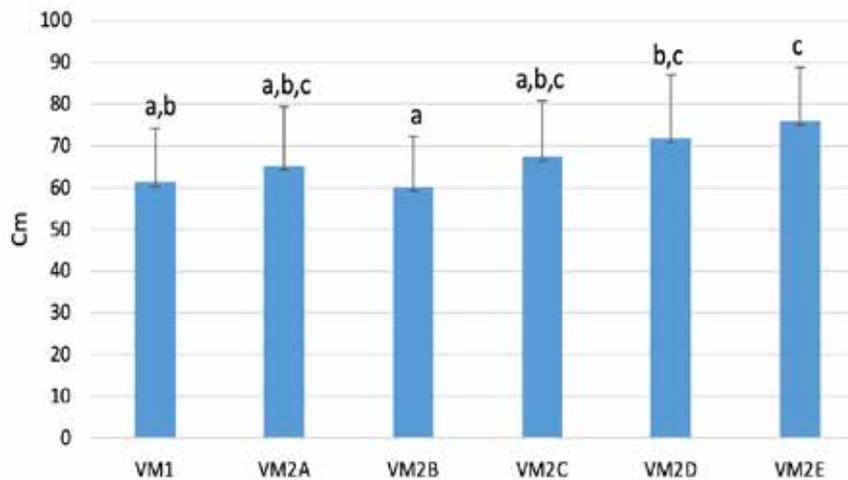
1ª prova. I trattamenti applicati durante le fasi di lavorazione in vivaio, tendono a ridurre la colonizzazione dei patogeni del legno nelle tesi trattate con solo *Trichoderma* (Prodotto A) o *Trichoderma* + Micorrize (Prodotto B). Nonostante l'effetto fosse statisticamente non significativo, il numero di patogeni tendeva a diminuire nelle tesi trattate rispetto al controllo. Questa tendenza è stata osservata per specie di "*Cylindrocarpon like*" spp., *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch), *Phaeoacremonium* spp. e *Ilyonectria* spp. come già riportato da altri Autori (Carro-Huerta 2020) (Fig. 2).

2ª prova. Dal confronto visivo tra gli apparati radicali, è risultata evidente una maggiore massa di radici nell'area prossimale in tutti i campioni trattati con *Trichoderma* e micorrize (Prodotto A e Prodotto C) rispetto al controllo non trattato (Fig. 3).

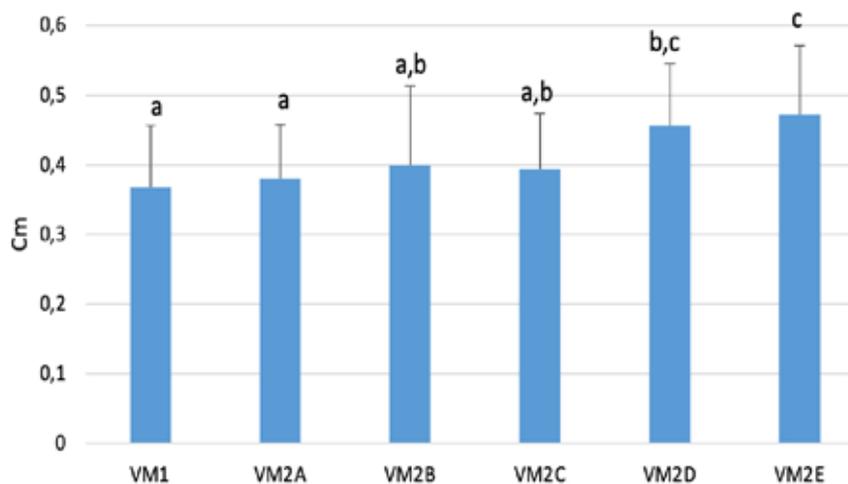
In particolare, i migliori risultati sono stati ottenuti dall'applicazione del Prodotto C quando il trattamento è stato eseguito sia nella fase prima del confezionamento che nella fase prima del trapianto.

Le analisi effettuate sui parametri di crescita hanno mostrato differenze statisticamente significative tra con-

Lunghezza germoglio dominante



Diametro germoglio dominante



Lunghezza germoglio dominante

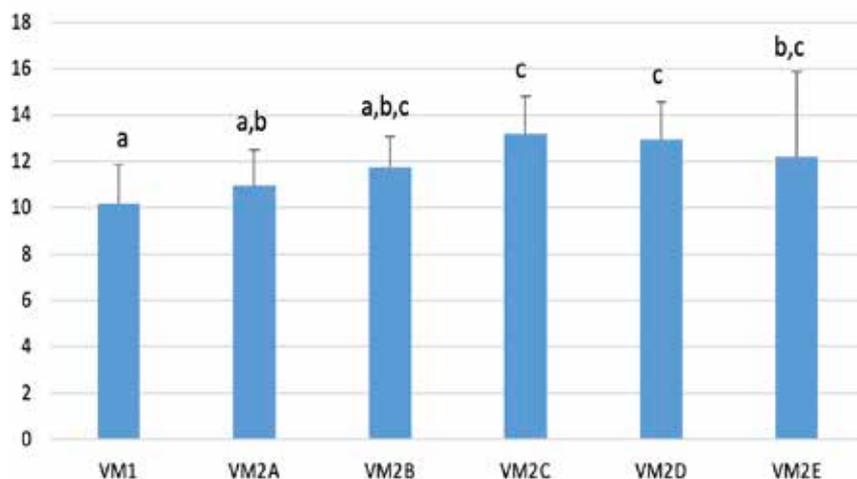


Fig. 5 - Parametri di crescita misurati sulle barbatelle trattate e coltivate in vaso. L'analisi statistica One way ANOVA ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i trattamenti. Le medie seguite dalla stessa lettera nelle barre non sono significativamente differenti (test di Duncan P <0,05)

trollo e trattamenti. Il peso dell'apparato radicale, sia delle radici primarie che dei capillari, è notevolmente aumentato nel trattamento "Solo *Trichoderma*". L'aumento di peso ha interessato sia l'apparato radicale per singola pianta che per singola radice. Il numero di radici primarie per singola pianta non variava in modo significativo tra i trattamenti. Il numero di radici capillari variava significativamente tra i trattamenti e, il numero più alto di radici capillari è stato registrato nel trattamento di controllo (gestione biologica aziendale) e in quello in cui sono state applicate le micorrize (Fig. 4).

La differenza tra queste due tesi non è risultata statisticamente significativa, ma lo è stata rispetto alla tesi trattata con solo *Trichoderma*.

Inoltre, sono stati analizzati i parametri di crescita di barbatelle radicate in vaso (Fig. 5). L'ANOVA univariata ha mostrato differenze statisticamente significative tra le tesi per i parametri di crescita. Il trattamento con il Prodotto C ha aumentato i valori dei parametri di crescita in entrambi i momenti di applicazione, cioè alla consegna (VM2D) o al trapianto, con un effetto leggermente maggiore quando applicato al momento della piantumazione (VM2E).

Discussione e conclusioni

I risultati di questo studio dimostrativo hanno evidenziato una riduzione della colonizzazione dei patogeni fungini del legno, confermando i risultati precedenti (Berbegal *et al.*, 2020; María del Pilar Martínez-Diz *et al.*, 2021), e sul miglioramento della qualità dell'apparato radicale mostrando migliori performance dei parametri di crescita, come recentemente riportato da Tsvetko *et al.* (2017).

È noto che l'interazione tra l'apparato radicale e i microrganismi applicati stimola l'attività delle radici, e quindi migliora l'assorbimento di acqua e nutrienti, rendendo di conseguenza, le barbatelle più resistenti agli stress biotici e abiotici (Gramaje & Armengol, 2011). Con queste prove dimostrative nell'ambito del progetto Life Green Grapes abbiamo voluto dimostrare che l'intera filiera produttiva può av-

vantaggiarsi ed essere migliorata con approcci rispettosi dell'ambiente a partire dalle primissime fasi di produzione delle piante in vivaio. Le prove, effettuate in condizioni commerciali, hanno mostrato l'efficacia di prodotti contenenti microrganismi benefici e, la rilevanza del tempo di applicazione nel determinare l'efficacia finale del trattamento.

Si è registrato un trend di riduzione dell'incidenza dei funghi patogeni del legno confermando i risultati recentemente ottenuti da altri ricercatori (Carro-Huerga *et al.*, 2020; Urbez Torres *et al.*, 2020; Pintos *et al.*, 2018). Inoltre l'applicazione di microrganismi ha prodotto effetti positivi sul peso secco delle radici sia capillari che primarie e un aumento della massa radicale nella zona prossimale, come osservato da Luciani *et al.*, (2019). Effetti positivi sono stati ottenuti anche sulla crescita degli organi epigei: lunghezza del germoglio dominante, diametro del germoglio dominante, numero di internodi del germoglio dominante nelle barbatelle trattate rispetto al controllo.

Per la valutazione degli effetti sullo sviluppo dell'apparato radicale, i prodotti sono stati applicati in diverse fasi prima della messa a dimora, al fine di favorire la radicazione e di conseguenza ridurre lo stress da trapianto. Attualmente, l'applicazione di prodotti a base di microrganismi è la soluzione più promettente disponibile per la disinfezione del materiale vegetale e dovrebbe diventare una procedura di routine nella gestione ottimizzata della produzione vivaistica, visti i numerosi effetti benefici che produce sulla qualità e sullo stato fitosanitario del prodotto finale e visti anche i pochissimi prodotti fitosanitari disponibili per l'attività vivaistica.

Questi benefici, sul lungo periodo, influenzeranno l'intera vita produttiva del vigneto e molto probabilmente la sua stessa longevità.

L'applicazione dei microrganismi tratta la pratica dell'inzaffardatura, prima della conservazione del materiale in cella frigorifera ha mostrato effetti positivi sulle barbatelle. Questo è un vantaggio sia per il vivaista che può aumentare il valore del materiale, sia per il viticoltore che eviterebbe di

effettuare il trattamento, con conseguente riduzione dei costi di impianto.

Bibliografia

- Berbegal, M., Ramón-Albalat, A., León, M., & Armengol, 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.
- Carro-Huerga, G., Compant, S., Gorder, M., Cardoza, R. E., Schmöll, M., Gutiérrez, S., & Casquero, P. A. (2020). Colonization of *Vitis vinifera* L. By the Endophyte *Trichoderma* sp. Strain T154: Biocontrol Activity Against *Phaeoacremonium minimum*. *Frontiers in plant science*, 11, 1170.
- 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.
- Luciani e., E., Frioni, T., Tombesi, S., Farinelli, D., Gardi, T., Ricci, A., & Palliotti, A. (2019). Effects of a new arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus iranicum*) on grapevine development. In *BIO Web of Conferences* (Vol. 13, p. 04018). EDP Sciences
- María del Pilar Martínez-Diz, M., Díaz-Losada, E., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Maldonado-González, M. M., Ojeda, S., ... & Gramaje, D. (2021). Field evaluation of biocontrol agents against black-foot and Petri diseases of grapevine. *Pest Management Science*, 77(2), 697-708.
- Pintos, C., Redondo, V., Costas, D., Aguin, O., & Mansilla, P. (2018). Fungi associated with grapevine trunk diseases in nursery-produced *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(3), 407-424.
- Tsvetkov, I., Georgieva, L., Tsvetkova, D., Michailova, V., & Georgiev, D. (2017). Benefits of the mycorrhizal fungi *Glomus* spp. For grapevine nutrient uptake, biocontrol and microbial ecology. *J Mt Agric Balk*, 20(1), 227-250.
- Úrbez-torres, J. R., Tomaselli, E., Pollard-Flamand, J., Boulé, J., Gerin, D., & Pollastro, S. (2020). Characterization of *Trichoderma* isolates from southern Italy, and their potential biocontrol activity against grapevine trunk disease fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(3), 425-439. ■