

Il chitosano per il controllo di botrite e marciume acido

Uno specifico chitosano di origine fungina è in grado di prevenire lo sviluppo di queste due fitopatologie, salvaguardando al contempo la biodiversità del vigneto

Davide Mosetti - Consulente agronomico

Tiziana Nardi, Alessandro Romano - CREA - Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia, Conegliano (TV)

Javier Tellez Quemada, Fabrizio Battista - Lallemand Oenology

Botrite e marciumi secondari, come il marciume acido, possono avere forti ripercussioni sulla qualità delle uve e quindi del vino, oltre a causare importanti perdite quantitative. Il controllo di queste due crittogame della vite risulta condizionato sia dai tempi di carenza dei prodotti disponibili sul mercato, sia dal limitato numero di soluzioni ammesse in biologico.

Tempi di intervento: i momenti cruciali

Un lavoro di ricerca pubblicato nel 2020 da González-Domínguez *et al.* ha analizzato e sintetizzato i risultati di 116 studi sull'efficacia di diverse strategie di difesa per il controllo della botrite. In particolare, gli Autori hanno analizzato i migliori momenti di intervento, ovvero quelli che favoriscono una maggiore efficacia dei trattamenti. Più nel dettaglio, lo studio ha dimostrato l'importanza dell'intervento a fine fioritura per un efficace controllo di questo patogeno. In questa fase il fungo può svilupparsi a



Infezione mista da botrite e marciume acido

Gabriele Posenato

carico degli organi florali, che sono poi fonte di inoculo per le infezioni successive. Il secondo momento di intervento di cruciale importanza è la pre-chiusura del grappolo, fondamentale per limitare le spore del fungo al suo interno prima che questo si chiuda.

Il momento di intervento in una strategia preventiva assume un'importanza strategica quando si vogliono utilizzare strumenti naturali e a basso impatto ambientale.

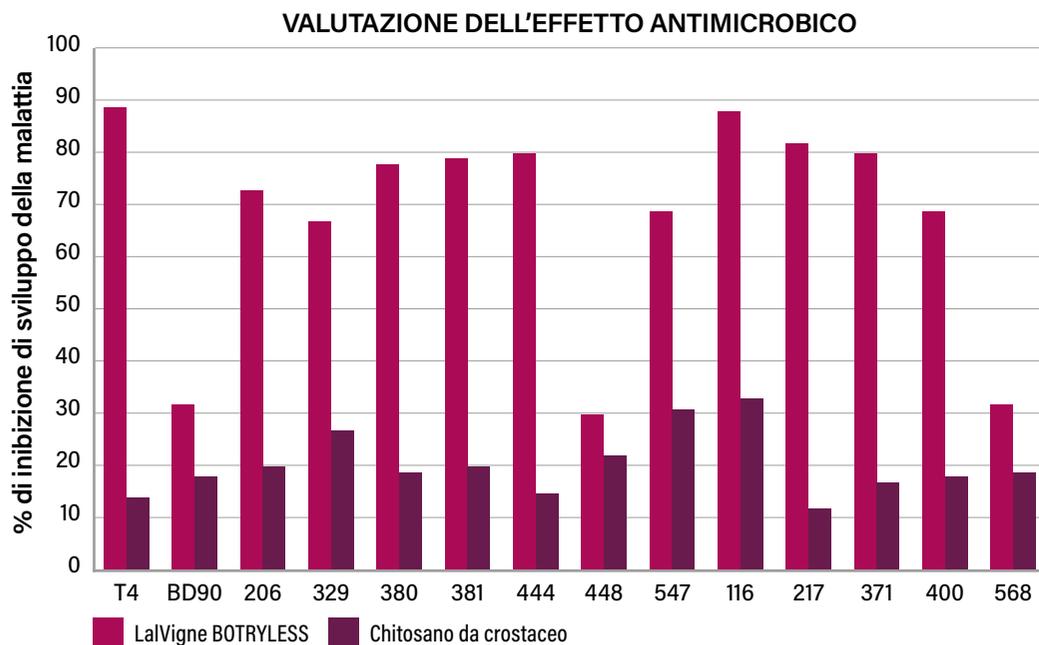
Quando insorge anche il marciume acido

Il marciume acido, legato allo sviluppo di batteri acetici (*Acetobacter spp.* e *Gluconobacter spp.* e altre) e

lieviti apiculati (*Kloeckera apiculata*, *Saccharomycopsis vini*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida spp.*), si manifesta normalmente in seguito a microlesioni dell'acino, che risultano avere conseguenze più importanti con il progredire della maturazione ovvero quando il contenuto zuccherino è maggiore. Oltre alle piogge, tra i fattori predisponenti vi sono anche compattezza del grappolo e buccia sottile, nonché danni da insetti come tignoletta e *Drosophila suzukii*.

Anche la presenza di danni da oidio è strettamente correlata all'insorgenza di problemi legati al marciume acido e numerose pubblicazioni rilevano una proporziona-

Grafico 1 - Risultati di un test effettuato dall'Università di Salamanca (Spagna) sull'effetto di LalVigne BOTRYLESS a confronto con un chitosano da crostaceo nell'inibire la crescita di diversi isolati di *Botrytis*. Test eseguiti su piastre Petri con mezzo di coltura MEA. Dati espressi come percentuale di inibizione della proliferazione del fungo rispetto alla piastra non trattata



Gabriele Posenato

Botrite su Pinot grigio

lità diretta anche con la presenza di botrite, sia come agente scatenante sia in conseguenza del fatto che entrambe le infezioni hanno le stesse cause predisponenti.

Chitosano da *Aspergillus niger*: caratteristiche ed efficacia

Per entrambe le fitopatie, marciume acido e botrite, la difesa si estende spesso sino al periodo pre-vendemmiale, per cui è molto forte la ricerca di soluzioni naturali prive di residualità e di interferenze sulla fermentazione alcolica.

Nel 2022 il chitosano da *Aspergillus niger* (CAS n. 9012-76-4) è stato autorizzato come sostanza di base ammessa in biologico e senza tempi di carenza, secondo il reg. CE 1107/2009, per il controllo di malattie fungine e batteriche. Lallemand Oenology, specializzata in soluzioni microbiche, ha messo a punto un chitosano specifico dal basso peso molecolare che ne favorisce effi-

cazia e rapidità d'azione, LalVigne BOTRYLESS (LB). Dal punto di vista operativo, questo formulato non dà problemi di fitotossicità e risulta compatibile con i principali prodotti fitosanitari. L'utilizzo anche in fasi fenologiche avanzate non interferisce con la fermentazione alcolica. Il controllo nei confronti di botrite e marciume acido esercitato da questo chitosano specifico si basa sulla sinergia di tre caratteristiche fondamentali:

- azione antimicrobica;
- effetto elicitorio;
- creazione di un bio-film protettivo.

Per queste sue caratteristiche e per la sua stabilità produttiva, assicurata da una biosintesi microbiologica controllata in tutte le sue fasi, LB risulta avere performance e caratteristiche molto diverse da quelle del chitosano cloridrato estratto dagli scarti di lavorazione di diversi crostacei. A conferma di ciò, anche il Legislatore europeo ha identificato il chitosano cloridrato di origine

animale con un CAS differente, ovvero 70694-72-3.

In una prova condotta analizzando lo sviluppo su piastra di diversi isolati di botrite, le percentuali di inibizione riscontrate per LB sono state nella maggior parte dei casi superiori al 70%, mentre il chitosano cloridrato da crostaceo utilizzato al medesimo dosaggio non è mai andato oltre il 30% di inibizione (Grafico 1). L'effetto fungicida diretto è solo uno dei meccanismi di funzionamento con cui LB agisce per contrastare la proliferazione di botrite.

Sulla base delle sue caratteristiche intrinseche e delle numerose sperimentazioni eseguite, si è definita la più opportuna strategia di utilizzo di LB, in via preventiva, in grado di assicurare buoni livelli di efficacia per il controllo di botrite. Tale strategia prevede l'esecuzione di tre applicazioni, ciascuna alla dose di 100 g/hL, in corrispondenza delle fasi di fine fioritura, pre-chiusura grappolo e inizio invaiatura.

Grafico 2 - Valutazione dell'efficacia dell'utilizzo di LaVigne BOTRYLESS nel controllo di botrite, rilievi eseguiti alla data di vendemmia. Nella tesi trattata sono stati eseguiti 3 trattamenti: a fine fioritura, in pre-chiusura grappoli e a inizio invaiatura. Lettere diverse indicano differenze significative tra le tesi per $p < 0.05$ (t-test)

- Incidenza (% di grappoli colpiti)
- Severità (% di acini colpiti per grappolo)

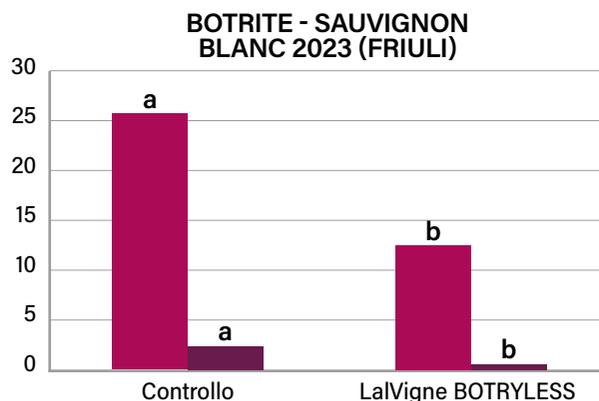


Grafico 3 - Valutazione dell'efficacia dell'utilizzo di LaVigne BOTRYLESS nel controllo di marciume acido, rilievi eseguiti alla data di vendemmia. Nella tesi preventiva sono stati eseguiti tre trattamenti (pre-chiusura grappolo e inizio invaiatura a 300 g/ha + trattamento a fine invaiatura a 600 g/ha). Nella tesi curativa è stato eseguito un singolo trattamento a fine invaiatura a 600 g/ha. Lettere diverse indicano differenze significative tra le tesi per $p < 0.05$ (t-test)

- Incidenza (% di grappoli colpiti)
- Severità (% di acini colpiti per grappolo)

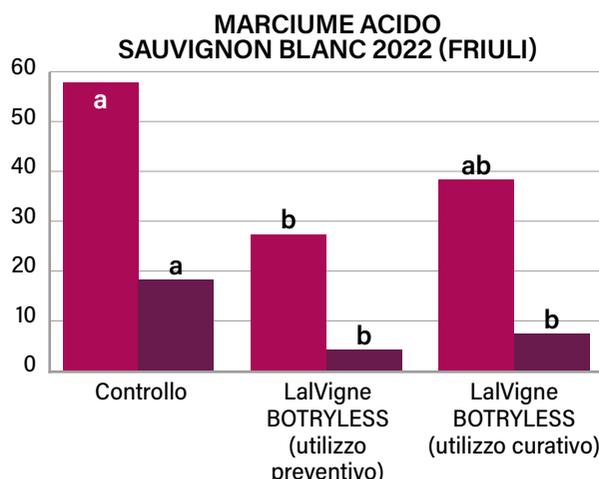
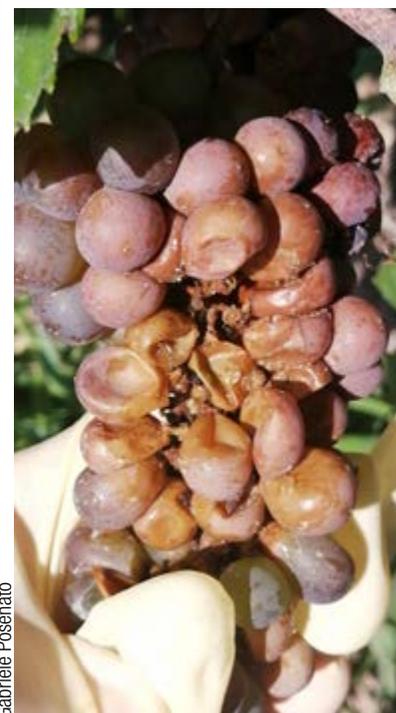
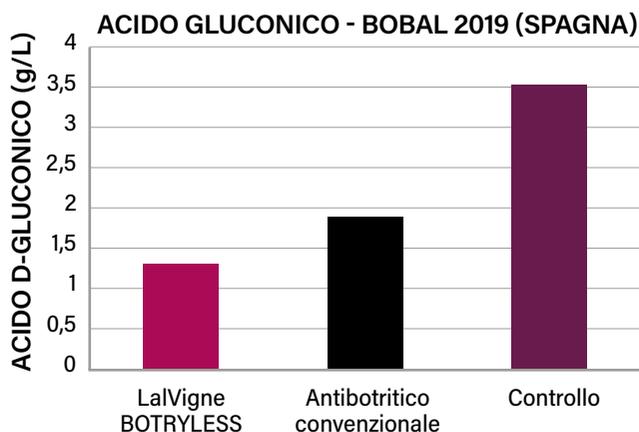


Grafico 4 - Effetto di diverse strategie per il controllo di botrite sulla concentrazione di acido gluconico. Nelle tesi trattate è stato eseguito un singolo trattamento all'invaiatura: LaVigne BOTRYLESS a 300 g/ha e un antibotritico convenzionale di riferimento per il mercato al dosaggio di etichetta. Analisi eseguita da Excell Iberica alla vendemmia



Gabriele Posenato

Marciume acido su Pinot grigio

riscontrata alcuna infezione di botrite. Al contrario, a chiusura grappolo ha iniziato a essere osservabile un'infezione di marciume acido, dal decorso molto rapido e virulento. In questa situazione si è deciso di eseguire il terzo trattamento a un dosaggio maggiore (600 g/ha) sia nel controllo (strategia curativa) che nella tesi già trattata con due applicazioni preventive (Grafico 3). In questo caso è risultato evidente come il trattamento preventivo sia stato in grado di ridurre in maniera significativa l'incidenza dell'infezione. L'approccio curativo, con un singolo intervento, è riuscito a contenere il proliferare dell'infezione, consentendo di arrivare alla vendemmia con un numero più contenuto di acini colpiti rispetto al controllo.

Oltre ai parametri di incidenza e severità, in una prova condotta in Spagna su Bobal nel 2019 è stato analizzato il contenuto di acido gluconico. Sono state confrontate con il con-

I test di efficacia in pieno campo

In numerose annate, su diverse varietà e in areali con elevata pressione di malattia, i test di efficacia hanno sempre confermato quanto osservato in laboratorio.

Nel 2023, annata con elevata pressione, in una prova condotta in Friuli su Sauvignon blanc è stata va-

lutata l'efficacia della strategia preventiva, applicando trattamenti eseguiti con le tempistiche e i dosaggi sopra riportati. L'utilizzo di LB ha consentito di ridurre incidenza e severità dell'infezione da botrite (Grafico 2).

Nel medesimo vigneto la prova era stata condotta anche nel 2022, annata nella quale tuttavia non si è

Grafico 5 - Abbondanza relativa della popolazione fungina quantificata con analisi metagenomica prima dell'esecuzione del trattamento (T0) e dopo quattro giorni (T4) dal trattamento con LalVigne BOTRYLESS rispetto al controllo

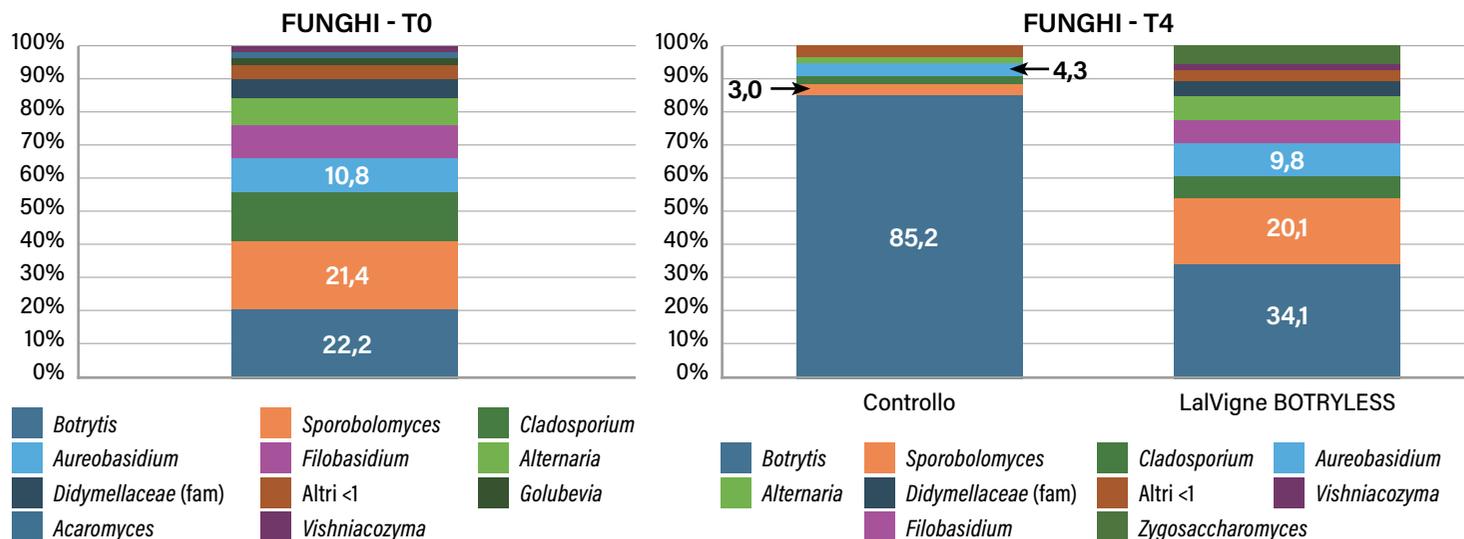
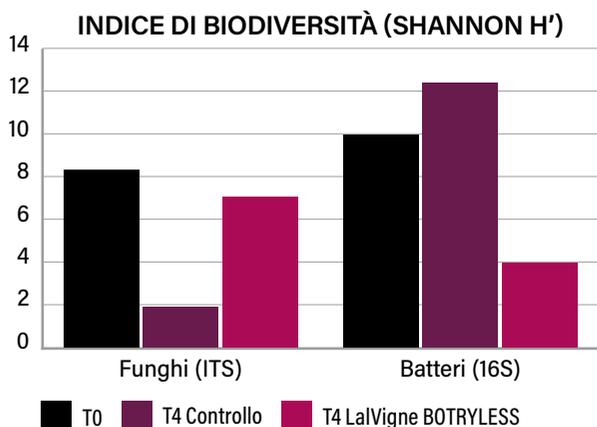


Grafico 6 - Indice di biodiversità Shannon (H'). Indica la biodiversità microbica rilevata nelle diverse tesi nei diversi momenti di campionamento



trollo non trattato due tesi, una con LB a 300 g/ha e una con un antibiotritico convenzionale di riferimento al dosaggio di etichetta. In entrambi i casi è stato eseguito un singolo intervento a inizio invaiatura, alla comparsa dei primi sintomi. L'incidenza di botrite alla raccolta è risultata del 43,5% nel controllo contro il 18,9% dell'antibiotritico di riferimento e l'11% di LB. Alcontempo si è osservato un sensibile contenimento del contenuto di

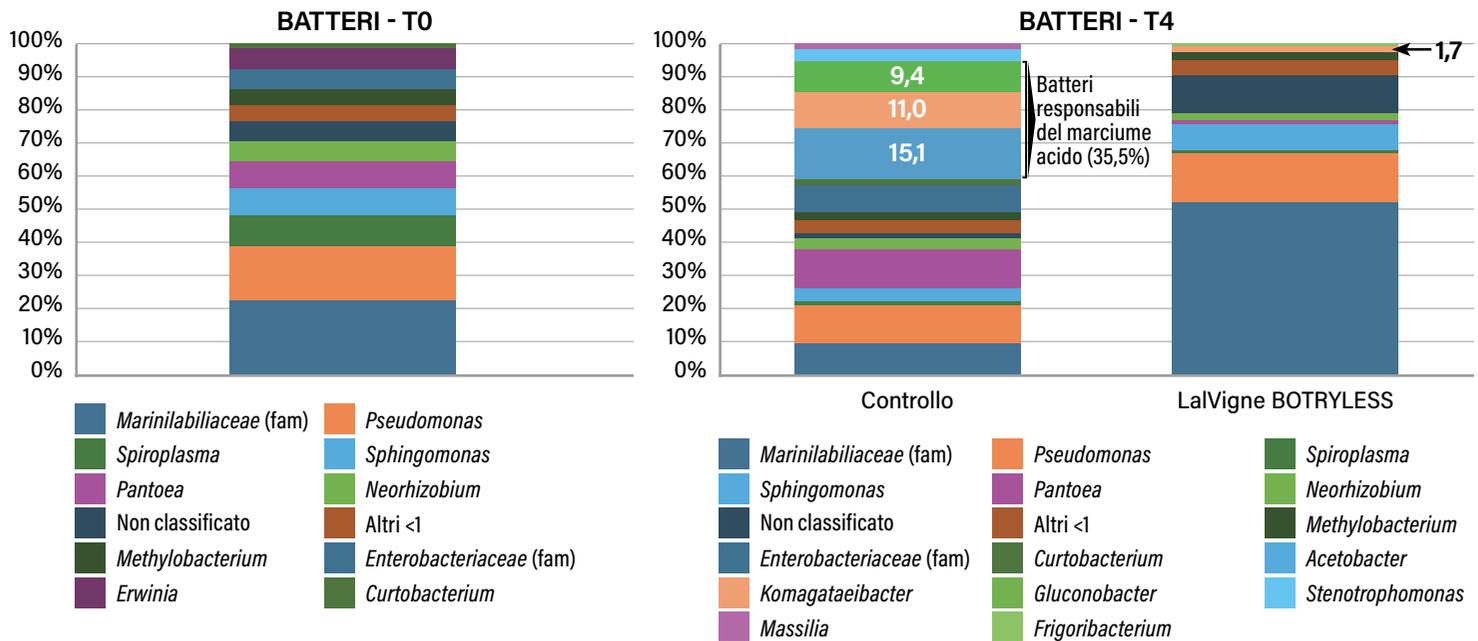
acido gluconico nel mosto (Grafico 4), con notevoli ripercussioni positive sulla vinificazione e sulla qualità dei vini.

L'impatto sulla biodiversità microbica del grappolo

In una prova condotta dal CREA-VE nel 2023 è stato valutato l'effetto di un singolo trattamento con LB sia su botrite e batteri associati al marciume acido, sia su tutta la popolazione microbica presente sul grappolo. Per eseguire questo monitoraggio è stata utilizzata l'innovativa tecnica della metagenomica (vedere box). La prova è stata condotta in zona Piave su Pinot grigio, dove è stato eseguito un singolo intervento con LB alla concertazione di 100g/hL a 5 giorni dalla raccolta. Il monitoraggio è stato eseguito, prima di eseguire il trattamento (T0) e quattro giorni dopo l'applicazione del chitosano specifico (T4). L'analisi dei dati relativi alla popolazione fungina (Grafico 5) ha evidenziato come *Botrytis* sia aumentata significativamente (dal 21% a T0 all'85% a T4) nelle piante non

trattate (Controllo) dopo quattro giorni dall'inizio della prova (T0). Questa sua abbondanza influenza negativamente lo sviluppo di altri microrganismi e limita la biodiversità fungina del grappolo. L'utilizzo di LB ha ridotto significativamente l'incidenza di *Botrytis* (34%), confermando un effetto fungistatico specifico. Alcontempo, alcuni generi noti come agenti di biocontrollo delle malattie fungine, come *Aureobasidium* e *Sporobolomyces*, mostrano un incremento, approfittando della ridotta prevalenza di botrite nelle uve trattate. Il trattamento con LB consente pertanto una maggiore biodiversità (Grafico 6). Per quanto riguarda la popolazione batterica, il trattamento è riuscito a controllare *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Komagataeibacter*, generi legati al marciume acido, che dopo quattro giorni dal trattamento sono risultati il 35,5% della popolazione nel Controllo contro l'1,7% nel trattato con LB (Grafico 7). In questo caso specifico, l'indice di biodiversità batterica è aumentato nel Controllo a causa dell'elevata eterogeneità dei batteri coinvolti nel marciume acido.

Grafico 7 - Abbondanza relativa della popolazione batterica quantificata con analisi metagenomica prima dell'esecuzione del trattamento (T0) e dopo quattro giorni (T4) dal trattamento con LalVigne BOTRYLESS rispetto al controllo



L'effetto del trattamento sulla biodiversità complessiva, che si può stimare con l'indice di Shannon (H') riportato nel Grafico 6, è diverso per le due comunità, fungina e batterica. Questo è verosimilmente dovuto alla diversa situazione iniziale: nel caso di lieviti e funghi, la forte preponderanza della Botrytis nel T0 e soprattutto nel controllo ha

limitato lo sviluppo di altri generi, di conseguenza il chitosano, contrastandola, ha permesso un aumento della biodiversità. Nel caso dei batteri, la comunità microbica iniziale (T0) e dopo 4 giorni (Controllo) è invece piuttosto variegata, come si vede dall'elevato indice H'. Di conseguenza in questo caso l'effetto del trattamento, che ha impatto su di-

versi generi (tra cui in particolare i tre appartenenti alle Acetobacteraceae sopra descritti), riduce la biodiversità complessiva.

La risposta a esigenze concrete

La ricerca di soluzioni naturali e ammesse in viticoltura biologica per il controllo di marciumi e botrite, senza tempi di carenza e interferenze sulla fermentazione alcolica, rappresenta da sempre un'importante esigenza per il mondo produttivo. Un nuovo chitosano di origine fungina, che presenta tutte le caratteristiche sopramenzionate, è stato testato per valutarne l'efficacia nei confronti di queste crittogame. Questo chitosano specifico si è dimostrato altamente efficace nei confronti dei batteri responsabili del marciume acido e di *Botrytis cinerea*, come desunto dagli esiti positivi di prove eseguite in pieno campo su varietà e areali problematici.

La Bibliografia è disponibile su richiesta alla Redazione.

LA METAGENOMICA

La metagenomica rappresenta un approccio recente per lo studio di intere comunità microbiche direttamente nel loro ambiente naturale ovvero, nel caso dei vigneti, il suolo, l'uva, la corteccia, la superficie delle foglie, le radici. Infatti, soltanto l'1% circa della popolazione microbica è in grado di crescere se coltivata in laboratorio. Con la metagenomica, invece, è possibile estrarre e sequenziare il DNA di tutte le specie presenti in un campione e non solo di quelle coltivabili. Esistono diverse tecniche di analisi *metagenomica*, tra cui quella utilizzata in questo studio (16S e ITS-NGS, detta anche metabarcoding microbico), che consiste nel sequenziare una specifica regione di un particolare gene che codifica per l'RNA ribosomale di batteri e funghi rispettivamente. Questo approccio permette una veloce identificazione delle specie presenti in comunità microbiche di un dato ambiente, permettendo di studiarne la composizione e la struttura. L'analisi dei complessi dati che si ottengono mediante il sequenziamento di nuova generazione dei campioni analizzati viene effettuata con specifiche analisi bioinformatiche e statistiche.