

UNIVERSITA' DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA
Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-forestali

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE VITICOLE ED
ENOLOGICHE

CONTROLLO BIOLOGICO DI *Botrytis cinerea* SU VITE
cv. GLERA

Relatore
Prof. Roberto Causin

Correlatore
Dr. Marco Stefenatti

Laureando
Martino Tormena
n. matr. 578774

Anno Accademico
2010 – 2011

INDICE

RIASSUNTO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUZIONE	8
1.1 LOTTA GUIDATA	12
1.2 LOTTA INTEGRATA	14
1.3 LOTTA BIOLOGICA	14
1.3.1 Meccanismi d'azione che intervengono nel biocontrollo	16
1.3.1.1 <i>Antibiosi</i>	16
1.3.1.2 <i>Competizione per lo spazio e per i nutrienti</i>	18
1.3.1.3 <i>Parassitismo</i>	19
1.3.1.4 <i>Induzione della resistenza della pianta ospite</i>	20
1.3.1.5 <i>Ipovirulenza</i>	25
1.4 GLI AGENTI DI BIOCONTROLLO	27
1.5 LA MUFFA GRIGIA DELLA BOTRITE	29
1.5.1 Epidemiologia	30
1.5.2 Marciumi secondari	32
1.6 CONTROLLO DELLA BOTRITE	34
1.6.1 Controllo chimico della muffa grigia	35
1.6.2 Controllo biologico della muffa grigia	38
1.6.2.1 <i>Il genere Trichoderma</i>	39
1.6.2.2 <i>Bacillus spp.</i>	41
1.6.3 Altri antagonisti con un possibile effetto antagonista sulla botrite.....	43
1.6.3.1 <i>Acremonium spp.</i>	43
1.6.3.2 <i>Coniothyrium spp.</i>	45
2. MATERIALI E METODI	47
2.1 COLTURE DI MICRORGANISMI.....	47
2.2 PROVA DI ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	48
2.3 PROVA DI CAMPO	49

2.3.1	Preparazione degli inoculi utilizzati nella prova di campo.....	50
2.3.2	Trattamento.....	51
2.3.3	Determinazione della malattia	52
2.3.4	Quantificazione dell'inoculo presente in campo	53
2.4	DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBITRICE (CMI).....	55
2.4.1	Prodotti fitosanitari utilizzati	55
2.4.2	Determinazione della CMI	57
3.	RISULTATI	59
3.1	PROVA DI ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	59
3.2	PROVA DI CAMPO	60
3.2.1	Andamento climatico.....	60
3.2.2	Determinazione della malattia	60
3.2.3	Quantificazione dell'inoculo	62
3.3	DETERMINAZIONE DELLA CMI	67
4.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	76
	BIBLIOGRAFIA	85
	ALLEGATO	113

RIASSUNTO

L'uso di agenti di biocontrollo rappresenta una delle possibili alternative all'impiego dei prodotti di sintesi nel controllo dei patogeni della vite.

Già da tempo è stata riconosciuta l'efficacia di alcuni microrganismi nel controllo *Botrytis cinerea* in vigneto, tant'è che sono disponibili in commercio in Italia due prodotti fitosanitari antibotritici a base di *Trichoderma harzianum* T39 e *Bacillus subtilis*; manca però della letteratura specifica riguardante la loro applicazione nella zona di Conegliano-Valdobbiadene sulla cultivar Glera.

Quindi sono state eseguite prove di lotta contro *B.cinerea* *in vitro* ed in campo, utilizzando microrganismi già disponibili sottoforma di prodotti commerciali ed altri non ancora in vendita ma di cui può essere considerato un possibile effetto antagonista: *Trichoderma viride* ceppo TV1, *Bacillus subtilis* ceppo QST-713, *Coniothyrium minitans* ceppo K1 e 5 ceppi di *Acremonium zeae*.

Nell'ottica di un possibile loro impiego combinato alla tradizionale lotta chimica, è stata studiata la loro compatibilità con tre fungicidi di largo impiego: Flowbrix Blu, Ridomil Gold e Forum MZ.

I risultati delle prove di antagonismo hanno evidenziato una buona efficacia di *T.viride* e *B.subtilis* come agenti di biocontrollo nei confronti della muffa grigia. Lo studio di integrabilità ha dimostrato, però, che esistono incompatibilità importanti con alcuni prodotti fitosanitari e ciò deve essere tenuto in considerazione quando si voglia integrare lotta chimica con lotta biologica effettuata con i BCA saggiati.

ABSTRACT

Biological control of *Botrytis cinerea* on grape cv. Glera

The use of biocontrol agents represents one of the alternative possibilities to the use of synthetic products in the control of pathogens of the *Vitis vinifera*.

The efficacy of certain microorganisms in controlling *Botrytis cinerea* in vineyards has been well recognised for some time, so much so that there are two antibotritic based on *Trichoderma harzianum* T39 e *Bacillus subtilis* products for sale in Italy; however there is missing literature regards there use in the Conegliano-Valdobbiadene region.

Then, tests were carried out to control *B.cinerea in vitro* and in field, using microorganisms already available as commercial products and others not yet on sale but which may be considered a possible antagonistic effec: *Trichoderma viride* TV1 strain, *Bacillus subtilis* QST-713 strain, *Coniothyrium minitans* K1 strain and 5 *Acremonium zeae* strains.

Inlight of their possible use in combination with the traditional chemical application, studies of their compatibility have been made with three widely used fungicides Flowbrix Blu, Ridomil Gold and Forum MZ.

The results from the antagonism *in vitro* and in field have proved the good efficacy of *T.viride* e *B.subtilis* it the use against grey mould. The effect of fungicides study has however evidenced an incompatibility with certain phytosanitary products and this needs to be taken into consideration when integrating the chemical application and biological application against BCA tested.

1. INTRODUZIONE

Fino dagli albori dell'agricoltura, la produttività delle colture è stata minacciata dagli insetti fitofagi, dalle malattie provocate da funghi, batteri e virus e dalle erbe infestanti. Gli agricoltori hanno da sempre cercato, quindi, di ridurre le perdite e di ottenere raccolti più sani. Il mezzo più comune, a partire dagli anni Trenta fino ad oggi, per rispondere a questi problemi, è stato l'uso di prodotti fitosanitari.

I prodotti fitosanitari (denominati anche agrofarmaci, fitofarmaci o prodotti per la protezione delle piante), secondo quanto riportato dall'art. 2 del DL 17/3/95 n.194, comprendono le sostanze attive destinate a proteggere i vegetali o i prodotti vegetali dagli organismi nocivi o a prevenirne effetti, favorire o regolare i processi vitali dei vegetali, conservare i prodotti vegetali, eliminare le piante indesiderate, eliminare parti di vegetali e frenare o evitare un loro indesiderato accrescimento.

Nella agricoltura moderna essi hanno assunto un ruolo di notevole importanza ed hanno permesso di ottenere un sensibile incremento nelle rese delle principali colture.

Nel 2009, la quantità degli agrofarmaci distribuiti in Italia per uso agricolo è stata pari a 147,5 mila tonnellate (ISTAT, 2009). Fra i principi attivi (Tab.1), i fungicidi rappresentano il 63,1 per cento del totale, gli insetticidi e gli acaricidi il 10,6 per cento, gli erbicidi il 10,7 per cento, i prodotti vari il 15,1 per cento e i biologici solo lo 0,5 per cento.

Ripartizioni geografiche	Fungicidi	Insetticidi e acaricidi	Erbicidi	Vari	Biologici	Totale
Nord	20.143.396	4.343.043	5.319.275	4.196.510	126.049	34.128.273
Centro	5.431.787	428.734	865.814	1.532.077	74.549	8.332.961
Mezzogiorno	21.234.859	3.113.478	1.780.944	5.439.354	141.894	31.710.529
ITALIA	46.810.042	7.885.255	7.966.033	11.167.941	342.492	74.171.763

Tabella 1. Principi attivi contenuti nei prodotti fitosanitari, per categoria (in chilogrammi). Dettaglio per ripartizione geografica – Fonte: Istat, (2009).

Il numero di formulati chimici sul mercato è elevatissimo. Questi includono una grande varietà di sostanze attive, che differiscono fra di loro per principio attivo, per meccanismo d'azione, per il diverso assorbimento nell'organismo, per meccanismo di trasformazione biologica e per il destino ambientale.

Gli effetti sulla salute dell'uomo e dell'ambiente possono essere diversi, soprattutto se l'impatto è calcolato sulle esposizioni di medio e lungo periodo. Oltre ai sintomi più immediati, infatti, derivanti dal contatto diretto e accidentale con queste sostanze, come mal di testa, vertigini, nausea, irritazione agli occhi, al naso e alla gola, le esposizioni più lunghe possono provocare disagi cronici e la letteratura in materia evidenzia anche la possibilità di danni al sistema nervoso centrale, al sistema endocrino, ormonale (O'Malley, 1997; Kamel e Hoppin, 2004; Salvi *et al.*, 2003; Alavanja *et al.*, 2004). Oltre a ciò alcuni pesticidi sono stati già da tempo classificati come probabili o possibili cancerogeni.

Le aziende ad indirizzo viticolo sono il 30% delle aziende agricole italiane, 1.7 milioni (ISTAT 2005), ma occupano solo il 4 % della superficie agricola utilizzata (SAU) nazionale, consumando l'1.9% della quantità di principi attivi impiegati nell'agricoltura italiana. Sebbene sia una coltura in cui si impiega una bassa quantità di fitofarmaci, la viticoltura è un'attività che interagisce molto con la popolazione. Nelle zone storiche di produzione spesso i vigneti sono situati nelle aree limitrofe ai paesi o addirittura nei centri urbani. Quindi, oltre all'esposizione diretta, per chi usa i pesticidi durante le operazioni agricole, l'esposizione indiretta per chi vive o frequenta l'ambiente circostante a quello in cui vengono impiegati, non è da sottovalutare.

Ne deriva quindi la necessità di affrontare il tema dell'uso sostenibile dei pesticidi in agricoltura, in base al principio di precauzione per preservare la salute umana, in particolare quella dei bambini, ma anche per tutelare il benessere animale e i delicati equilibri degli ecosistemi e dell'ambiente.

I primi dibattiti politici sugli effetti inquinanti dell'utilizzo dei pesticidi risalgono all'inizio degli anni 60'. Questo avvenne grazie alla pubblicazione del libro "*primavera silenziosa*" (silent spring) ad opera della biologa Rachel Carson che descrisse i danni irreversibili del DDT e dei pesticidi in genere sia sull'ambiente che

sugli esseri umani. Il 1962 (anno di pubblicazione del libro) rappresenta l'inizio di un processo che porterà alla presa di coscienza che l'uso indiscriminato dei prodotti fitosanitari è da limitare fortemente e contemporaneamente segna la nascita del movimento ambientalista.

Da allora si sviluppa la sensibilità sull'argomento, nell'opinione pubblica e tra i ricercatori. Crescono le conoscenze sugli effetti negativi provocati dai principi attivi dei prodotti fitosanitari. Seguono provvedimenti di legge che servono a contenerne i danni. Nel 1972 il DDT venne vietato per l'uso agricolo negli USA. In Italia è stato proibito nel 1978, con la direttiva 79/117/CEE del 1978 in cui la Comunità europea ha presentato l'elenco delle sostanze attive che non possono essere commercializzate o utilizzate. Successivamente questo elenco è stato ampliato da una serie di Direttive Comunitarie fino al Reg. CE 850/2004. Contemporaneamente è andato evolvendosi un corpo di leggi volto a regolamentare in modo via via sempre più attento la produzione e l'uso dei prodotti fitosanitari e che culmina con la direttiva 91/414 CEE, recepita in Italia dal DL n.194 del 17/3/1995.

Il 25 gennaio 2010 è stato presentato un disegno di legge volto a riordinare il settore degli agrofarmaci, armonizzando la legislazione esistente con le nuove normative comunitarie, tra cui il Regolamento CE n° 1107/2009 (relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CE e 91/414/CE) e la Direttiva 2009/128 (che definisce il quadro entro cui deve realizzarsi l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi). In particolare, questa direttiva, incentrata sulla necessità di trovare un ambito di utilizzo di fitofarmaci più rispettoso della salute dell'uomo e della salvaguardia dell'ambiente, impone a partire dal 2014 alcuni obblighi in relazione ai criteri generali della difesa integrata.

Nello specifico, impone un monitoraggio dei dati metereologici e delle avversità delle colture, l'elaborazione dei dati di monitoraggio per i servizi di preavviso ed avvertimento, il coordinamento dell'assistenza tecnica ed il controllo sui criteri obbligatori: in sostanza, quegli obblighi che costituiscono la base del processo di produzione integrata.

Con l'entrata in vigore di tale legge, anche i viticoltori meno sensibili alla questione ambientale, dovranno sottostare a parecchie limitazioni sulle modalità dei trattamenti e dovranno adattarsi ad una minor scelta di principi attivi.

Gli studi eseguiti dagli anni 60' in poi hanno consentito quindi una progressione del quadro normativo riguardante i prodotti fitosanitari, portando a considerare a livello di UE dapprima la tossicità acuta, successivamente anche quella cronica ed ora, con la direttiva 128/2009, anche l'inquinamento ambientale.

Il rischio tossicologico a cui si è esposti utilizzando un determinato principio attivo viene valutato con una procedura definita in sede comunitaria e si divide in 4 fasi:

- identificazione del pericolo (inteso come la potenziale pericolosità di una sostanza senza considerare se e a che livelli la popolazione è esposta);
- identificazione della relazione tra la dose e l'effetto. Da studi di tossicità ripetuta si risale al NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), cioè la dose più alta alla quale non si sono osservati effetti considerati avversi e il LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) cioè il livello più basso di dose che produce effetto tossico;
- valutazione dell'esposizione stimando la concentrazione della sostanza attiva negli alimenti, nei vari comparti ambientali ed in ambienti lavorativi;
- determinazione del rischio, utilizzando come valori di riferimento: l'ADI (Acceptable Daily Intake) per il rischio cronico, cioè la dose di fitofarmaco alla quale la popolazione generale potrebbe essere esposta senza alcun rischio apprezzabile di effetti dannosi durante tutto l'arco della vita; e l'ARfD (Acute Reference Dose) per il rischio acuto, cioè la stima della dose di fitofarmaco che può essere ingerita durante 24 ore o meno senza rischio apprezzabile per la salute umana.

Nonostante questa sensibilità crescente degli enti di ricerca, delle varie amministrazioni e dell'opinione pubblica nei confronti dei rischi legati all'utilizzo dei prodotti fitosanitari in agricoltura, il loro impiego rappresenta ancora il pilastro di tutta la difesa.

Però lo sviluppo della resistenza verso i pesticidi assieme alla preoccupazione sugli effetti deleteri dei fitofarmaci sull'ambiente e sulla salute umana hanno dato un forte impulso alla ricerca che si è orientata verso lo sviluppo di nuove tecniche e mezzi di difesa per la protezione delle piante più rispettosi della salute dell'uomo e dell'ambiente. Incominciano così a farsi strada nel mondo agricolo tecniche alternative al tradizionale uso incondizionato dei fitofarmaci, come la lotta guidata, la lotta integrata e la lotta biologica.

1.1 LOTTA GUIDATA

La lotta guidata è un'evoluzione del concetto di lotta a calendario. Nasce con l'introduzione di una comparazione tra costi e benefici del trattamento chimico che si concretizza nel concetto di soglia d'intervento. La lotta a calendario, infatti, è svincolata dalla presenza o meno del fitofago o del patogeno da controllare: il trattamento chimico, eseguito a scopo preventivo, mira a impedire sul nascere gli attacchi parassitari a prescindere che ne sia stata accertata o meno la necessità. Questo criterio esula del tutto da ogni considerazione economica: il trattamento si esegue anche quando non è necessario perché per giustificarlo è sufficiente la suscettibilità della coltura ad un eventuale danno di qualsiasi entità. Questo va ovviamente a scapito dell'ambiente, nel quale vengono immesse quantità non necessarie di fitofarmaci. L'applicazione del concetto di soglia d'intervento introduce un criterio economico nella valutazione della necessità dell'intervento fitoiatrico.

Il trattamento chimico comporta dei costi variabili, rappresentati dalle spese vive per l'acquisto del fitofarmaco, per il consumo di carburante, per la manutenzione delle macchine impiegate e dai costi impliciti o espliciti della distribuzione (lavoro, amministrazione). Tali costi, classificati in "costi diretti" vanno comparati con il danno effettivamente causato alla produzione agricola dall'avversità specifica in assenza del trattamento: se il costo totale del trattamento è superiore al danno economico l'intervento si rivela inutile e sconveniente.

Ai costi diretti, nel bilancio totale della difesa vanno sommati anche quelli indiretti però di difficile individuazione e valutazione. I componenti dei costi non diretti

sono, ad esempio, i danni biologici subiti (e le spese da sostenere per prevenirli) dagli operatori agricoli e, più a monte dai lavoratori dell'industria che produce fitofarmaci; il cosiddetto "impatto ambientale" (effetti negativi sull'ambiente, sulla qualità delle acque, sulle componenti naturali degli ecosistemi); rischi per la salute dei consumatori che si alimentano con derrate trattate; costo dell'organizzazione pubblica necessaria per vigilare sulla produzione, commercio e impiego dei fitofarmaci.

In generale, il costo sociale dell'inquinamento viene scomposto in tre voci elementari (collettivo, pubblico e privato) (Fig.1). Poiché molte di queste mal si presentano ad una definizione puntuale e "monetizzazione", spesso finiscono per sfuggire ad ogni valutazione e non figurano adeguatamente nei bilanci di tipo costo-beneficio, i quali pertanto soffrono spesso di sottostime.

Le vittime dei costi indiretti sono diverse, dall'agricoltore stesso al consumatore, alla società in senso lato. A puro titolo di esempio, si consideri che negli USA, la voce relativa alla ospedalizzazione e al pagamento delle giornate di lavoro perse per intossicazioni legate all'impiego dei fitofarmaci è stimata in tre miliardi di dollari all'anno (Lorenzini, 2001).

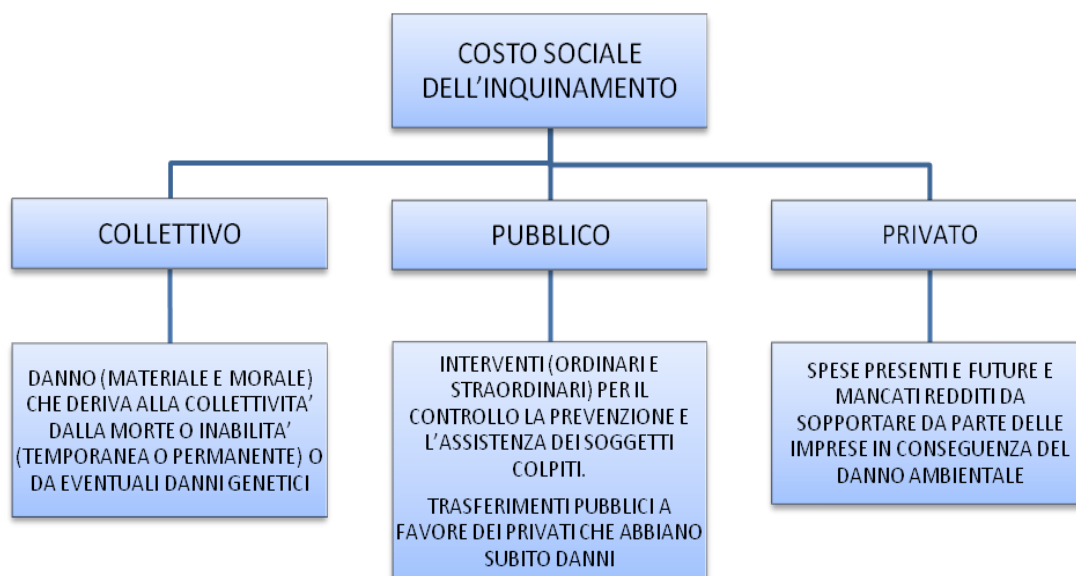


Figura 1 Componenti elementari del cosiddetto "costo sociale" dell'inquinamento ambientale, con riferimento ai fitofarmaci. Valutazioni di questo tipo sfuggono spesso alla percezione e non vengono incluse nelle analisi costo/beneficio. (Tratto da: Lorenzini, 2001).

1.2 LOTTA INTEGRATA

Secondo la FAO (1968), con il termine lotta integrata si intende “il sistema di regolazione delle popolazioni delle specie dannose (o fitofagi) che utilizza tutte le tecniche e mezzi adatti a mantenerle ad un livello a cui non causano danni economici”. La lotta integrata è

un concetto più ampio, che mantiene saldi i criteri delle soglie di intervento della lotta guidata ed in più introduce il concetto di lotta “non chimica”, dando priorità ai fattori naturali di limitazione. La lotta integrata è, quindi, un sistema di controllo degli organismi dannosi che, senza escludere i prodotti fitosanitari chimici, utilizza anche tutti gli altri fattori e le tecniche disponibili (interventi agronomici, mezzi fisici e meccanici, mezzi biologici e biotecnologici) per mantenere le popolazioni degli organismi nocivi al di sotto di densità che comportino danno economico, dando la priorità ai fattori naturali.

1.3 LOTTA BIOLOGICA

Per *lotta biologica* o *biocontrollo* si intende qualsiasi azione che porti alla diminuzione dell'inoculo di un patogeno o della sua attività produttrice malattia, realizzata per mezzo di uno o più organismi, o loro parti e costituenti, inclusa la pianta ospite ma escludendo l'uomo (da Baker, 1987, modificato)

Fra i vari mezzi di difesa della lotta biologica, particolare attenzione è rivolta ai “biocontrol agents” (BCA), noti comunemente in Italia con il termine impropriamente tradotto “agenti di biocontrollo”. Essi sono dei microrganismi viventi o vitali naturalmente esistenti nell'ambiente, usati per controllare la popolazione di un organismo non desiderato entro una determinata soglia in modo tale che la densità di popolazione del parassita non possa provocare danni alla coltura (Chalet *et al.*, 2002).

Grazie al loro basso impatto ambientale e all'assenza di residui chimici nel prodotto finale, gli agenti di biocontrollo sono uno dei mezzi più promettenti per il futuro nella difesa delle piante contro patogeni e parassiti, rappresentando una valida

alternativa all'uso dei fitofarmaci tradizionali, con notevoli benefici per il consumatore, l'agricoltore e l'ambiente (Pritts, 2000).

Tali agenti, possedendo una tossicità irrilevante per l'uomo, possono quindi contribuire a ridurre il rischio di intossicazioni acute o croniche per i lavoratori che effettuano i trattamenti in campo. Un ulteriore beneficio per l'agricoltore è costituito dal fatto che generalmente è possibile compiere trattamenti prossimi alla raccolta. Tali agenti hanno, inoltre, un minor impatto sull'ambiente, sulla fertilità del terreno e sulle falde acquifere (Hokkanen e Lynch, 1995).

La possibilità d'impiego di microrganismi per il controllo di patogeni inizia con gli studi di William Roberts, il quale nel 1874 dimostrò l'azione antagonista tra colture liquide di *Penicillium glaucum* e dei batteri. Però le prime conoscenze sui meccanismi d'azione del biocontrollo risalgono al 1987 grazie a Baker che descrisse l'ecologia e la fisiologia del micoparassitismo.

Sebbene sia da più di vent'anni che ricercatori si interessano all'argomento non è stato ancora esaustivamente chiarito a causa delle difficoltà incontrate durante gli studi delle complesse interazioni tra piante-patogeno-antagonista-altri microorganismi presenti. Comunque una buona conoscenza delle modalità di azione è essenziale per sviluppare un metodo di controllo adeguato (Spadaro e Gullino, 2004).

1.3.1 MECCANISMI D'AZIONE CHE INTERVENGONO NEL BIOCONTROLLO

1.3.1.1 *Antibiosi*

L'antibiosi è definita come l'inibizione o la distruzione del microorganismo con metaboliti specifici ed aspecifici, agenti litici o enzimi prodotti da un altro microorganismo (Irtwange, 2006). Gli antibiotici sono sostanze volatili o non volatili prodotte da microorganismi (Madigan e Martinko, 2006). I meccanismi tramite cui questo tipo di antagonismo si manifesta sono:

- Emissione nel substrato di molecole organiche.

Gli antibiotici e le batteriocine sono composti organici a basso peso molecolare che a concentrazioni limitate hanno effetti deleteri sulla crescita e sull'attività dei patogeni. E' noto, da molti anni, che la capacità di essudare metaboliti secondari con capacità antibiotica è una caratteristica molto comune tra i microorganismi (Tronsmo e Raa, 1977).

Nel 1979 si conoscevano circa 3000 molecole con capacità antibiotiche, e si stima che ogni anno ne vengono scoperte 50-100 (Rose, 1979). Molte di queste sono prodotte da microorganismi presenti nel terreno. La produzione di antibiotici è l'unico meccanismo di cui si può stabilire l'importanza relativa poiché tramite l'applicazione di tecniche genetiche è possibile selezionare ceppi incapaci di produrli e quindi stabilirne l'efficacia (Fravel, 1988). Anche alcuni composti volatili come ad esempio etanolo, isobutanolo, acido isobutirrico possono avere effetti antibiotici (Fravel, 1988). I composti ad azione litica svolgono un ruolo fondamentale nei meccanismi di micoparassitismo e possono manifestare caratteristiche propriamente "antibiotiche". Quando la loro presenza nel substrato è limitata, infatti, possono avere effetti fungistatici salvo poi diventare fungicidi all'aumentare della concentrazione. L'antibiosi può anche essere il risultato secondario di reazioni enzimatiche extracellulari ad esempio *Talaromyces spp.* immette nel suolo l'enzima chiamato glucosio ossidasi che tra gli altri prodotti di

reazione da origine a perossido di idrogeno che uccide i microsclerozi di *V.dahliae* (Kim *et al.*, 1988).

Determinati microorganismi iniziano a produrre antibiotici quando sono disponibili abbondanti quantità di carbonio nel substrato, mentre altri iniziano a produrre antibiotici quando diminuisce la disponibilità di substrato (Irtwange, 2006). Tra le numerose sostanze antibiotiche che vengono prodotte da funghi e batteri alcune sono direttamente coinvolte nei meccanismi di controllo delle malattie delle piante. Ad esempio la gliovirina e la gliotossina prodotte da *Trichoderma spp* (Vinale, 2007), oppure i vari lipopeptidi prodotti dal *Bacillus spp.*, (Ongena e Jacques, 2007) attivi contro differenti patogeni, tra cui *B.cinerea*.

- Proteasi e immobilizzazione degli enzimi.

Alcuni agenti di controllo biologico hanno la capacità di produrre molecole con attività proteolitica che inattivano gli enzimi che agiscono nel processo di patogenesi. Questa modalità di biocontrollo è stata dimostrata in diversi lavori nei quali si è notato che il limitato sviluppo della malattia sembra dovuto alla presenza di proteine che diminuiscono l'attività degli enzimi del patogeno (Elad, 2000) e provocano di conseguenza l'accumulo di oligogalatturonani di dimensioni maggiori che possono stimolare più facilmente l'attivazione della resistenza indotta nella pianta (Zimand *et al.*, 1996). Tra i vari esempi in cui è stata mostrata l'attività proteolitica dei BCA, si ricorda che è da tempo nota l'attività anti-proteica di *Trichoderma viride* coinvolta nel biocontrollo di *Sclerotium rolfsii* (Rodriguez-Kabana *et al.*, 1978); così come è stato scoperto che, in presenza di *Trichoderma harzianum* l'attività degli enzimi cutinolitici e pectinolitici secreti da *B.cinerea* è ridotta (Kapat *et al.*, 1998) e che l'attività proteolitica di *Trichoderma harzianum* aumenta quando c'è azoto organico nel mezzo (Kapat *et al.*, 1996). L'azione proteolitica è presente anche nei batteri, come dimostra il fatto che le endoproteasi di *Bacillus megaterium* possono inattivare gli enzimi extracellulari di *Rhizoctonia solani* (Bertagnolli *et al.*, 1996).

1.3.1.2 *Competizione per i nutrienti e per lo spazio*

Nutrienti o spazio sono solitamente presi inegualmente dai vari microorganismi perché questi hanno differenti meccanismi di captazione dei nutrienti. Questo significa che il microorganismo che riesce ad ottenere la maggior parte dei nutrienti disponibili si accresce, mentre l'altro avendo insufficienti nutrienti rimane in uno stato di latenza o muore. Infatti tutti i patogeni sia esogeni che endogeni necessitano di energia per poter germinare e attuare il processo infettivo e questa proviene, oltre che dalle proprie riserve endogene, anche dalla disponibilità nell'ambiente esterno di sostanza organica, essudati radicali, residui del filloplano, tessuti della pianta danneggiati (Baker, 1987).

Questo fenomeno è particolarmente importante nelle aree rappresentate dai siti privilegiati di infezione dove la diminuzione di energia disponibile provoca un calo nella vigoria e nella estensione del micelio del patogeno e di conseguenza del potenziale di inoculo.

La competizione per i nutrienti è il meccanismo più efficace con il quale la microflora previene le infezioni nella fillosfera dove le risorse sono particolarmente ridotte (Blackman, 1975), ma anche nel suolo che viene considerato un ambiente oligotrofico (Lockwood, 1992). Di solito i microorganismi competono per i carboidrati, l'azoto, l'ossigeno e per i micronutrienti come il ferro (Spadaro e Gullino, 2004). La competizione per il ferro in *Pseudomonas* spp. è stata molto studiata ed è stato dimostrato il ruolo di un sideroforo prodotto da diversi ceppi, nel controllo di diverse specie di *Pythium* e *Fusarium* (Loper, 1987; Elad e Backer, 1985). I composti siderofori presentano una elevata affinità per il Fe³⁺, lo chelano, rendendolo indisponibile per gli altri organismi, tra cui alcuni patogeni, limitandone così la crescita e lo sviluppo.

La competizione spaziale, rispetto a quella trofica, viene di solito ritenuta di minor importanza e quindi fino ad ora è stata poco studiata ma, secondo Elad (1996), questo meccanismo di antagonismo è molto diffuso. I microrganismi presenti sulla superficie dell'ospite, prima dell'arrivo delle strutture di infezione del patogeno, possono cambiarne le caratteristiche fisiche interferendo con l'adesione del patogeno al suo ospite (Bunster *et al.*, 1989). La presenza di micelio di BCA (biological

control agents) nelle zone preferenziali di inoculo come ad esempio ferite e apici radicali (micorrize) può fungere da barriera fisica poiché impedisce il contatto diretto tra i propaguli del patogeno e la pianta ospite, ma anche chimica tramite l'emissione di composti con azione inibente (Rose,1979; Fravel, 1988; Elad, 2000).

1.3.1.3 Parassitismo

Antagonista e patogeno possono interagire anche tramite parassitismo diretto. Questo accade quando la nutrizione di un organismo deriva da un organismo vivente di un'altra specie, per tutta o parte della sua vita. Il termine *micoparassitismo* è usato in riferimento al fenomeno in cui un fungo ne parassitizza un altro (Fig.2), mentre col termine *iperparassitismo* si identifica il microorganismo che parassitizza un altro parassita. In generale, i parassiti comprendenti i micoparassiti si dividono in necrotrofi e biotrofi. I primi ottengono i loro nutrienti da cellule morte dell'ospite, dopo averlo ucciso, invece i biotrofi non uccidono l'ospite. Per esempio, il parassitismo di *Trichoderma* è un fenomeno di tipo necrotrofico in quanto conduce alla distruzione e morte del fungo ospite. In questo processo partecipano attivamente enzimi litici, quali chitinasi, glucanasi e proteasi, capaci di degradare la parete cellulare consentendo, quindi, la completa colonizzazione del fungo ospite (Haran *et al.*, 1996; Elad e Kapat, 1999; Ait-Lahsen *et al.*, 2001).

La natura e la coordinazione spazio temporale degli eventi coinvolti nel processo di micoparassitismo, sono cruciali per il risultato di questa interazione. Il micoparassitismo è un processo complesso che coinvolge una precisa sequenza di eventi quali il riconoscimento a distanza, una crescita chemio-tattica verso l'ospite, l'instaurazione di un'interazione fisica compatibile tra i due organismi, la formazione di strutture specializzate (tipo appressori) la penetrazione, la colonizzazione dell'ospite ed infine l'evasione.

Lo sfruttamento del fenomeno del micoparassitismo è particolarmente importante quando si vogliono realizzare interventi di controllo biologico basati sulla riduzione della densità di inoculo di patogeni. Alcuni di questi agenti di malattia producono delle strutture di resistenza chiamate sclerozi. I quali presentano una spessa parete

chiamata cortex e all'interno dei tessuti ricchi di nutrienti immagazzinati denominati medulla. Queste strutture sono molto resistenti all'invasione dei microrganismi per tutto il tempo in cui permangono metabolicamente attive ma è stato dimostrato che innumerevoli agenti di controllo biologico sono in grado di parassitizzarle.

Il parassitismo appare come meccanismo molto diffuso ed esempi possono essere evidenziati in quasi tutti i gruppi fungini (Papavizas e Lumsden, 1980), tuttavia si può osservare come tale fenomeno, *in vitro* ed in condizioni ottimali, si manifesti con una certa facilità mentre sembra improponibile che in condizioni di pieno campo esso si riveli come fattore di grande importanza (Fravel, 1988; Papavizas e Lumsden, 1980; Elad, 1996).

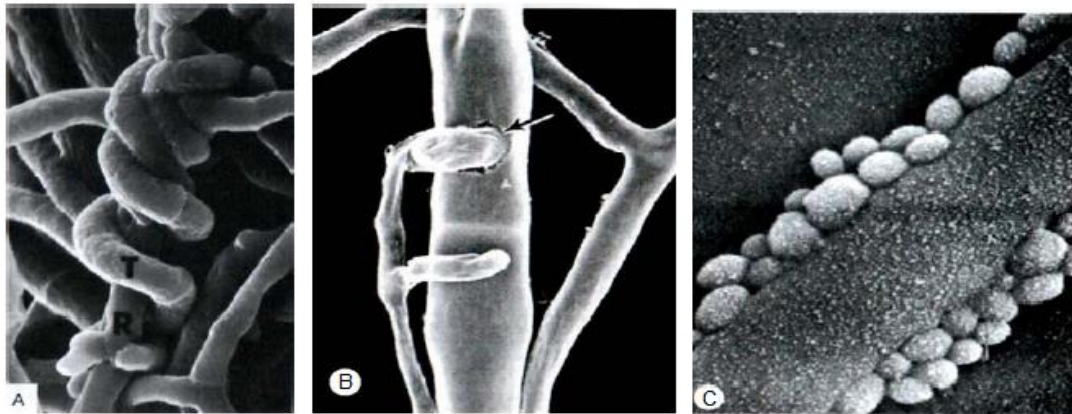


Figura 2 Immagini al microscopio elettronico di alcuni esempi di micoparassitismo. (A) Ifa di *Trichoderma harzianum* (T) avvolta su *Rhizoctonia solani* (R), fenomeno chiamato coiling; (B) ifa di una specie non patogena di *Pythium* che penetra un'ifa di *Phytophthora*; (C) il lievito *Pichia guilliermondii* su ifa di *Botrytis cinerea*. Foto da Agrois, (1998).

1.3.1.4 Induzione della resistenza della pianta ospite

Gli aspetti di base e applicativi della resistenza indotta nelle piante, fenomeno descritto per la prima volta all'inizio del XX secolo, sono stati ampiamente studiati negli ultimi trent'anni.

Secondo l'American Phytopathological Society (APS) la resistenza di una pianta ospite ad una data malattia è la capacità della pianta di annullare o comunque ridurre l'attività di un patogeno. La tolleranza è invece intesa come la capacità della pianta

di sopportare l'azione o l'invasione di un patogeno senza o quasi reazione, come dimostrato dall'assenza più o meno completa di sintomi e danno.

I meccanismi di resistenza delle piante non sono basati su un sistema circolatorio, per cui, ogni cellula possiede proprie capacità di difesa preformate (pre-infezionali) o inducibili (post-infezionali), fondamentalmente di tipo meccanico e di tipo biochimico, cui va aggiunta una componente di resistenza non costitutiva, ovvero non ereditaria, che viene comunemente indicata col nome di "predisposizione", determinata da fattori quali la temperatura, la luce, il contenuto idrico della pianta e del terreno, la nutrizione minerale, etc..

La resistenza di tipo pre-infezionale è data dalla presenza di strutture e metaboliti capaci di ostacolare la penetrazione del patogeno e la successiva colonizzazione dei tessuti dell'ospite. Ai fini di tale resistenza possono svolgere un ruolo di primaria importanza alcuni fattori:

- meccanici, quali lo spessore della cuticola e delle pareti cellulari, la presenza di tessuti sclerenchimatici e di strati suberizzati e lignificati, il contenuto in cera, la fuoriuscita di essudati, la presenza di tricomi e la struttura degli stomi.
- biochimici, sostanze sintetizzate precedentemente al tentativo di infezione. Tra questi composti ritroviamo fenoli (acido caffeico, acido clorogenico, catecolo), glucosidi (saponine, glucosidi fenolici e cianogenici), lattoni insaturi, composti solforati, glucosinolati, accomunati dal fatto di essere prodotti del metabolismo secondario.

Tali composti risultano tossici nei confronti dei patogeni, ma potrebbero rivelarsi dannosi per la pianta stessa ed è per questo che nelle cellule si trovano normalmente compartimentalizzati sotto forma di composti inattivi. Questi ultimi, in seguito all'attacco del patogeno, vengono liberati e sono sottoposti a degradazione da parte di enzimi specifici e trasformati, così, in prodotti capaci di esercitare l'azione fungitossica

Nel caso della resistenza indotta vanno considerati i meccanismi di difesa che si instaurano nella pianta in seguito al riconoscimento del patogeno, con i quali la pianta tenta di bloccare la progressione del patogeno.

I sistemi di resistenza attivati della pianta possono essere localizzati oppure sistemici.

La risposta di ipersensibilità (RH) è di tipo localizzato e determina, nel sito di inoculo, la concentrazione di molecole che hanno come effetto la morte programmata delle cellule e portano come risultato macroscopico la necrosi della zona interessata. Tra queste molecole ci sono specie di ossigeno reattive (ROS) come lo ione superossido, il radicale ossigeno e l'acqua ossigenata.

Altri esempi di difese indotte localizzate non portano alla morte delle cellule ma al rafforzamento delle pareti cellulari, alla formazione di papille di callosio e alla deposizione di gomme.

Si assiste anche all'accumulo di metaboliti come l'acido benzoico, acido salicilico, acido jasmonico, etilene, fenoli (attivati nella loro forma ossidata) e fitoalessine (Vinale, 2004). Tali composti non solo portano all'attivazione dei meccanismi di difesa nel sito d'inoculo ma inducono anche una risposta di resistenza sistemica. Questi composti, infatti, sono segnali mobili ed inducono nelle restanti parti della pianta la sintesi di proteine correlate con il riconoscimento del patogeno.

Le risposte di resistenza sistemica che possono essere attivate dalla pianta sono la resistenza sistemica acquisita (SAR) o la resistenza sistemica indotta (ISR). A seguito di molti studi soprattutto nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*, sono state descritte come fenomeni distinti, sulla base degli induttori che le generano e delle vie metaboliche ad esse associate (Van Loon *et al.*, 1998 e Walters e Heil, 2007) (Fig.3).

SAR e ISR hanno un ampio spettro d'azione che si esplica nei confronti di virus, batteri, fitoplasmi, funghi e stress abiotici.

La SAR è l'ampliamento a livello sistemico delle contromisure utilizzate nella risposta di resistenza localizzata. L'attivazione avviene attraverso l'infezione di un patogeno o con il trattamento di vari agenti.

Nelle piante in possesso della resistenza ad un patogeno, il gene (gene R) codifica la rilevazione degli elicitori del patogeno, molecole segnale specifiche codificate dai geni avirulenti (*Avr*). Successivamente al riconoscimento degli elicitori specifici da parte dei recettori, cresce il livello di acido salicilico (AS) localmente e sistemicamente e si attiva un gruppo di geni codificanti le proteine della patogenesi

(Pathogenesis Related proteins o PR proteins) (Van Loon, 1997). L'attivazione dei geni PR e quindi della SAR dipendono dalla trasduzione del segnale di AS e questo richiede la funzione della proteina regolatrice NPR1 (Shah *et al.*,1997).

Due analoghi funzionali dell'acido salicilico, l'acido isonicotinico (INA) e il benzotidiazolo (BTN o acibenzolar-S-methyl) sono noti induttori di resistenza acquisita in numerose combinazioni pianta-patogeno (Buonaurio *et al.*, 2002; Irti e Faoro, 2003). Numerosi composti inorganici (come sali di fosforo, silicio, etc.), zuccheri e vitamine, come la riboflavina, possono agire come attivatori delle difese delle piante. Un altro induttore di resistenza, l'acido ammino-butirrico (BABA), è efficace contro numerosi patogeni, tra cui diversi agenti causali di peronospora e, a differenza di molti induttori chimici, mostra qualche effetto curativo (Siluè *et al.*, 2002). E' nota e ampiamente sperimentata anche l'attività del chitosano per la protezione da diverse malattie fungine (Molloy *et al.*, 2004;Bautista-Banos *et al.*, 2006), come pure quelle della laminarina, glucano derivato da alghe brune, da tempo commercializzata in Francia (Iodus 40, Stahler Suisse SA), per il contenimento dell'oidio su graminacee, ma in grado di attivare anche le difese della vite da *B.cinerea* e *Plasmopara viticola* (Aziz *et al.*, 2003).

L'ISR è indotta dal riconoscimento della pianta delle cellule o della parete cellulare dell'agente scatenante sia esso un patogeno o un agente di controllo biologico (Elad, 1996).

Numerose attività di ricerca hanno per oggetto l'impiego di batteri in grado di provocare ISR nella pianta. Spesso si tratta di procarioti appartenenti al genere *Pseudomans* e *Bacillus*, inoltre molti di loro sono rizobatteri promotori della crescita (Plant Growth Prmoting Rhizobacteria o PGPR) (Zaccardelli *et al.*, 2005,2007; Akram *et al.*,2008).

Tale resistenza si manifesta attraverso l'attivazione di una via metabolica dipendente da etilene e acido jasmonico e non associata all'espressione di geni PR.

Sebbene anche l'ISR porti allo sviluppo di un sistema di controllo simile alla SAR, le piante hanno dimostrato di rispondere più velocemente e con maggior intensità agli attacchi dei patogeni se precedentemente esposte a PGPR (Benhamou *et al.*, 2000).

Nonostante l'intensa attività di ricerca di quest'ultimi anni, molti aspetti della resistenza indotta rimangono ancora da chiarire. La ricerca applicativa, attraverso lo studio degli effetti di fattori climatici, edafici e delle pratiche colturali sull'espressione della resistenza potrà, ad esempio, permettere di spiegare la variabile efficacia degli induttori chimici di SAR osservata in pieno campo, un aspetto che rappresenta uno dei principali ostacoli allo sfruttamento nella pratica della resistenza indotta.

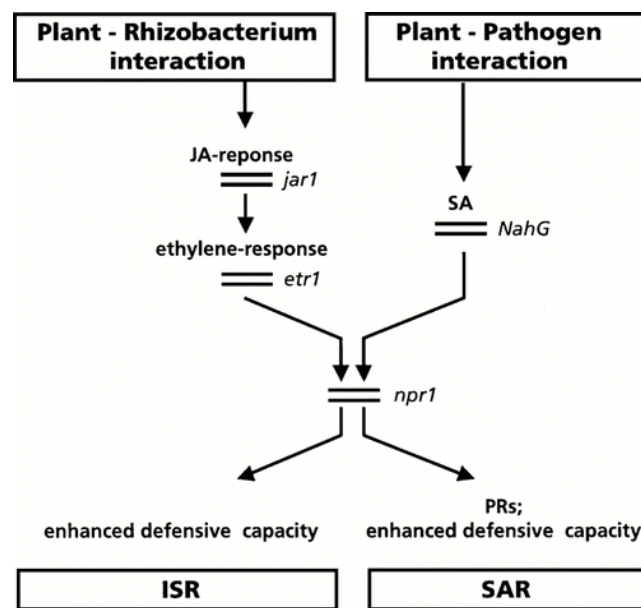


Figura 3. Vie di trasduzione del segnale che porta alla resistenza sistemica indotta dai patogeni (SAR) e la resistenza sistemica indotta mediata dai rizobatteri (ISR) in *Arabidopsis thaliana*. Da: Van Loon et al., (1998)

1.3.1.5 Ipovirulenza

E' stato dimostrato che la presenza di un'entità virale nella cellula modifica il fenotipo del patogeno alterando lo sviluppo e la morfologia delle colonie, in particolare varia la pigmentazione e si riducono la crescita miceliare e la sporulazione. Oltre a ciò, può avvenire una diminuzione della sintesi enzimatica di laccasi e cutinasi o di metaboliti come l'ossalato. (Anagnostakis, 1982; Elliston, 1985; Havar e Anagnostakis, 1983; Rigling *et al.*, 1989). Tutti i virus associati al fenomeno dell'ipovirulenza sono costituiti da RNA a doppio filamento (dsRNA) o a singolo filamento (ssRNA) ed appartengono a varie famiglie (Nuss, 2005) (Fig.4). Tuttavia, i virus appartenenti alla famiglia *Hypoviridae* sono quelli che rivestono un ruolo primario nella lotta biologica in quanto sono in grado di interferire profondamente nella fisiologia del patogeno (Milgroom e Cortesi, 2004).

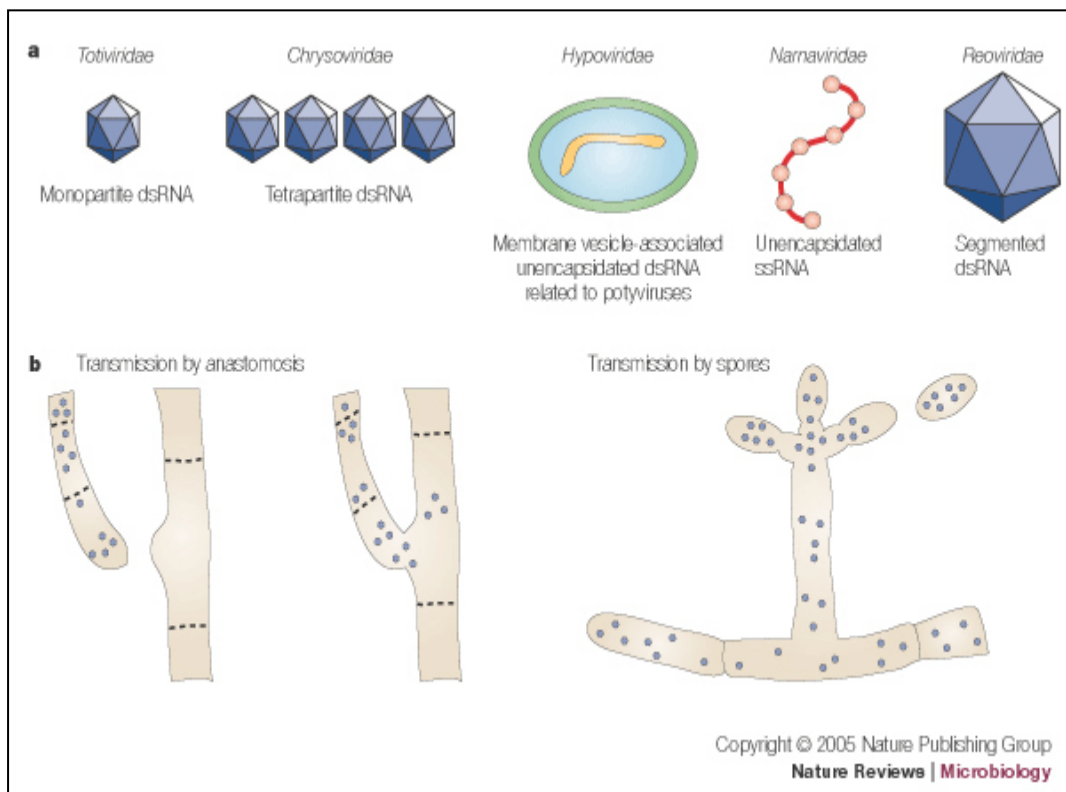


Figura 4. a. Famiglie di micovirus che sono associate all'ipovirulenza dei patogeni : tassonomia e struttura. b. La trasmissione avviene principalmente per via intracellulare che consiste nello scambio di citoplasma durante l'anastomosi (fusione delle ife) o durante la sporulazione. Tratto da Nuss, 2005.

L'ipovirulenza, e dunque l'RNA, oltre a diffondersi con la diffusione dei ceppi ipovirulenti, può essere trasmessa attraverso le anastomosi tra ife di micelio ipovirulento e virulento, purchè questi siano tra loro vegetativamente compatibili (Nuss, 2005)

Il caso più eclatante di ipovirulenza, che ha indotto i ricercatori ai successivi studi su questo fenomeno, riguarda *Cryphonectria parasitica*, agente causale del cancro del castagno. Dopo la fase iniziale di forte espansione della malattia e di grave mortalità, l'espressione della virulenza della malattia è lentamente regredita consentendo la ripresa dei castagneti.

Successive analisi molecolari hanno evidenziato che tale regressione della malattia è stata causata dal prevalere dello sviluppo dei ceppi aventi il dsRNA citoplasmatico rispetto a quelli che ne erano esenti.. Oltre a *C. parasitica*, è stata rilevata la presenza di dsRNA o ssRNA nel genoma di altri funghi patogeni (Tab.2)

FUNGO	FAMIGLIA VIRUS	REFERENZE
<i>Cryphonectria parasitica</i>	<i>Reoviridae</i> , <i>Narnaviridae</i> (genus <i>Mitovirus</i>), <i>Hypoviridae</i>	Hillman <i>et al.</i> , 1992; Suzuki <i>et al.</i> , 2004; Linder-Basso <i>et al.</i> , 2005;
<i>Diaporthe perijuncta</i>	ssRNA in classificato correlato ai tombusvirus	Preising <i>et al.</i> , 2000; Moleleki <i>et al.</i> , 2003
<i>Slerotinia homoeocarpa</i>	<i>Narnaviridae</i> (genus <i>Mitovirus</i>)	Deng <i>et al.</i> , 2003
<i>Ophiostoma ulmi</i>	<i>Narnaviridae</i> (genus <i>Mitovirus</i>)	Hong <i>et al.</i> , 1999
<i>Rhizoctonia solani</i>	inclassificato	Charlton <i>et al.</i> , 2009
<i>Helminthosporium victoriae</i>	<i>Totiviridae</i> , <i>Chrysoviridae</i>	Soldelvila <i>et al.</i> , 2000
<i>Fusarium graminearum</i>	inclassificato	Chu <i>et al.</i> , 2002
<i>Rosellinia necatrix</i>	<i>Reoviridae</i>	Sasaki <i>et al.</i> , 2006
<i>Botrytis cinerea</i>	Inclassificato	Castro <i>et al.</i> , 2003; Howitt <i>et al.</i> , 2006; Wu <i>et al.</i> , 2007

Tabella 2 . Elenco di patogeni in cui è stata osservata l'ipovirulenza ed è stato identificato l'RNA ss o ds nel loro genoma. Tratto da: Nuss, 2005 (modificato).

1.4 GLI AGENTI DI BIOCONTROLLO

Il mercato mondiale dei pesticidi corrisponde a circa 22 miliardi di euro e di questo solamente meno dell'1% è costituito dai biopesticidi (220 milioni di euro). Tra questi si includono i principi attivi non di sintesi, come agrofarmaci a base di microrganismi, insetti ed acari predatori, agro farmaci di origine naturale e feromoni. La maggior parte della quota dei microrganismi è costituita dal *Bacillus thuringiensis*.

Lo sviluppo commerciale di un microrganismo antagonista è costituito da diversi stadi ed in particolare dalla sua individuazione, dallo studio del meccanismo d'azione che esso pone in atto per controllare la malattia, dalle sue esigenze ecologiche e biologiche per garantirne lo sviluppo e l'ottenimento dell'effetto desiderato, dalla valutazione della sua compatibilità con i fungicidi esistenti e dalla sua efficacia in condizioni di campo. Oltre a ciò deve essere considerata anche la possibilità di sviluppo della sua produzione su ampia scala e di formulazione in modo adeguato ai correnti mezzi e tecniche di distribuzione nonché l'ottenimento di un'adeguata shelf-life del prodotto. Vanno poi definite le sue caratteristiche tossicologiche ed eco tossicologiche e sviluppati marketing, brevetto e distribuzione. Le preparazioni a base di organismi antagonisti si rivolgono a mercati relativamente piccoli e, sia i costi di sviluppo, sia quelli richiesti dalle prove per la registrazione del prodotto sono spesso il fattore limitante principale nel processo che porta alla loro commercializzazione. In particolare l'attuale legislazione, che accomuna i microrganismi naturali con gli agrofarmaci di sintesi, rappresenta uno dei fattori di maggiore ostacolo nel processo di registrazione.

Per quanto riguarda la vite, studi sul biocontrollo hanno permesso di selezionare alcuni antagonisti efficaci nella lotta biologica contro le malattie fungine (Elad *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1998; e Harman *et al.*, 1996) ed in Italia sono in commercio da tempo alcuni prodotti a base di microrganismi; tra cui ricordiamo il Trichodex® (Intrachem Bio Italia S.p.a) a base di *Trichoderma harzianum* T39 (selezionato in Israele da Elad *et al.* nel 1994), il Serenade® contenente *Bacillus subtilis* QST-713 messo a punto in California dagli scienziati dell'AgraQuest nel 2000) e l'AQ10® a base di *Ampelomyces quisqualis* (Intrachem Bio Italia S.p.a).

I biofungicidi hanno un'efficacia più limitata rispetto ai fungicidi chimici, ma se usati correttamente, riescono comunque a garantire risultati soddisfacenti. Benché questi prodotti siano una piccola percentuale del mercato, esiste lo spazio per un loro maggiore sviluppo, soprattutto viste le nuove richieste del consumatore che è sempre più attento alla sua salute e alla salvaguardia ambientale.

In viticoltura, in funzione di una riduzione del consumo di pesticidi, l'impiego di BCA può essere considerato nel controllo di malattie endemiche, delle quali si può tollerare una presenza, purchè esse rimangano sotto una soglia di danno accettabile. Tra queste malattie, una delle più importanti è senza dubbio la muffa grigia ma, sebbene non con il medesimo interesse, possono essere considerati i marciumi secondari del grappolo e tra essi sostenuti da funghi produttori di micotossine.

1.5 LA MUFFA GRIGIA DELLA VITE

La muffa grigia della vite è causata da un fungo ascomicete, *Botrytis cinerea* (Pers.:Fr.), che può attaccare almeno 235 specie di piante (Jarvis,1977; Agrois,1988) causando gravi danni in pre e post-raccolta (Fig. 5). Per questo motivo è spesso descritto come polifago ed ubiquitario. *B.cinerea* possiede un comportamento necrotrofo (letteralmente “che si nutre di sostanza morta”), cioè non necessita di tessuti vivi della pianta per sopravvivere.



Figura 5. Muffa grigia su grappolo di cv. Glera al momento della vendemmia

In vigneto questo patogeno è molto temuto perché provoca una perdita quantitativa e qualitativa della produzione. In particolare, grazie alla sua forte attività idrolasica ed ossidasica (Aleu e Collado, 2001), dovuta alla produzione dell'enzima *laccasi*, si determina una diminuzione del grado zuccherino e dell'acidità dell'acino a cui si accompagna un aumento del contenuto di acido gluconico e glicerolo (Perez *et al.* , 1999), la degradazione della componente fenolica (Aleu e Collado, 2001) e dei terpeni della buccia (Bock *et al.*,1988; Brunerie *et al.*, 1987; Aleu e Collado, 2001) con alterazione del profilo polisaccaridico (Pielken *et al.*, 1989) e proteico (Cilindre *et a.l.*, 2006). Tutti queste trasformazioni provocano difficoltà nel processo di vinificazione e un deperimento delle caratteristiche organolettiche del vino finito.

1.5.1 EPIDEMOLOGIA

La muffa grigia, è un'importante malattia nei climi temperati in tutto il mondo (Jacometti *et al.*, 2009). Il successo dei metodi per il controllo del fungo, dipende da un'intima conoscenza dell'ecologia e l'epidemiologia della malattia (Elmer & Michailides, 2004; Holz *et al.*, 2004). Il patogeno sopravvive all'inverno saprofiticamente, nei tessuti necrotizzati di un gran numero di specie di piante. All'interno dei vigneti sverna come sclerozio sui tralci dell'anno precedente o come micelio, protetto negli strati interni di corteccia, nelle gemme dormienti, nei grappoli mummificati (Flower *et al.*, 1999; Elmer & Michailides, 2004) e in residui vegetali nel terreno del vigneto (Seyb, 2004). Lo sclerozio è comunemente considerato come la più importante struttura coinvolta nello svernamento della *B.cinerea* (Holz *et al.*, 2004). Lo sclerozio può sopravvivere a condizioni ambientali avverse, può produrre l'apotecio (*Botryotinia fuckeliana*, De Bary) dopo il processo sessuale e possiede una considerevole capacità nel produrre anche conidi (Coley- Smith, 1980). In primavera, gli sclerozi rimasti sui tralci dopo la potatura o presenti sui sarmenti caduti a terra, sviluppano il micelio (Costacurta *et al.*, 2004). Da esso si originano un gran numero di conidi che vengono dispersi dal vento e dell'acqua fino a giungere sulla vite (Pearson e Goheen, 1988). Vi è una stretta correlazione tra le piogge e la produzione di conidi (Costacurta *et al.*, 2004). Queste spore possono viaggiare per lunghe distanze, ma nei vigneti, il 95% di esse viaggia a meno di 1 m dalla fonte, generalmente il suolo (Seyb, 2004). Come appena riferito, viene segnalata la possibilità che si formino gli apoteci della forma sessuata *Botryotinia fuckeliana*, ma la loro presenza è sporadica (Beever & Weeds, 2004), per tale motivo le asco spore non rivestono il ruolo principale nella diffusione delle infezioni.

Lahlali *et al.*, (2007) asseriscono che le condizioni ambientali ottimali di crescita, si verificano ad una temperatura compresa tra i 18 e i 23 °C, tuttavia il patogeno è attivo anche a temperature basse, dato che si verificano germinazioni di conidi e crescite di micelio già a 0°C (Gindro e Pezet, 2001). Il processo di infezione necessita di acqua o di un'umidità relativa maggiore del 93 % (Williamson *et al.*, 1995). L'umidità aiuta il patogeno ad ottenere i nutrienti presenti sulla pianta ospite

(Blackman, 1980), favorendo la sintesi di una serie di metaboliti, tra cui enzimi ad azione litica che ne facilitano la penetrazione e la colonizzazione dei tessuti dell'ospite (Kars e Van Kan, 2004).

I tessuti più vulnerabili ad inizio stagione sono i fiori ed i giovani tessuti verdi dei germogli e foglie (Nair *et al.*, 1995). In allegazione, le difese fisico-chimiche dell'ospite limitano la diffusione di infezioni e l'agente patogeno entra in una fase di quiescenza o latenza nel tessuto ospite. I tessuti fiorali senescenti quali fiori abortiti, frutticini abortiti e calipre sono facilmente colonizzabili da *B.cinerea* (Keller *et al.*, 2003) e sono spesso fonte di infezioni secondarie (Seyb, 2004). Questi tessuti possono diventare un'importante fonte di inoculo con il progredire dello sviluppo del grappolo (Seyb, 2004), in particolare in post-invaiatura quando l'umidità interna del grappolo e la concentrazione di zucchero nelle bacche aumentano (Elmer e Michailides 2004), mentre le difese dell'ospite vanno diminuendo (Holz *et al.*, 2003). Prolungati periodi di pioggia durante il periodo di fine stagione incoraggiano lo sviluppo e la proliferazione del patogeno, causando perdite di raccolto sostanziali. (Elmer e Reglinski, 2006).

Nel vigneto ed in varie piante ospiti, *B.cinerea*, è considerata un complesso di specie simpatriche (Martinez *et al.*, 2003 e Giraud *et al.*, 1999) che costituiscono una popolazione dinamica. Un gruppo di ceppi (*transposa*) contengono gli elementi trasponibili *Boty* e *Flipper*, gli altri (*vacuma*) no (Giraud *et al.*, 1997). Questi due ceppi presentano dei comportamenti differenti. Gli isolati di *transposa* presentano elevata virulenza sugli acini ed un basso tasso di crescita in substrati con nutrienti facilmente disponibili; mentre i *vacuma* si sviluppano maggiormente in substrati ricchi di nutrienti (maggior *r-strategy*), in foglie ed altri tessuti piuttosto che sugli acini; questo dimostra che i ceppi *transposa* sono prevalentemente parassiti mentre i *vacuma* si comportano soprattutto come dei saprofiti (Martinez *et al.*, 2003 e Giraud *et al* 1999). Dalla successione temporale traspare che i *vacuma* sono presenti maggiormente in fioritura e diminuiscono progressivamente fino alla maturazione, quando i *transposa* sono prevalenti.

Studi sulla resistenza ai prodotti fitosanitari (Giraud, 1999) hanno evidenziato che i *vacuma* presentano resistenza unicamente alla fenhexamide mentre i *transposa*

hanno una resistenza multipla, dimostrando una elevata frequenza di resistenza per il vinclozolin.

Questi due ceppi sono i costituenti di due gruppi genetici. Il Gruppo I, che comprende solo ceppi *vacuma*, presente in prevalenza in fioritura e con una elevata resistenza alla fenhexamide e il Gruppo II composto sia da ceppi *vacuma* che *transposa*, con diversa prevalenza tra i due a seconda della fase fenologica della vite, e una maggior resistenza ai dicarbossimidi.

Il gruppo I gioca un minor ruolo nel processo epidemiologico, mentre è il Gruppo II, alternando le abilità saprofitarie alle patogene, essendo in grado di spostare la propria attività trofica dai tessuti morti a quelli vivi (corrispondente ad un maggior sviluppo dei ceppi *transposa* rispetto i *vacuma*), ad essere il principale responsabile della malattia (Martinez *et al.*, 2005)

1.5.2 MARCIUMI SECONDARI

Spesso lo sviluppo nel grappolo di muffa grigia è accompagnato dalla presenza di altre patologie. Gli agenti causali di questi marciumi secondari sono funghi opportunisti, debolmente o affatto patogeni, appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Rhizopus* (Hellman 2004). Tra questi funghi *Aspergillus carbonarius* assume particolare importanza poiché esso è stato identificato come il maggior produttore di ocratossina A (OTA) (Cabanès *et al.*, 2002; Abarca *et al.*, 2003; Hocking *et al.*, 2007). Gli effetti dannosi di questa tossina sono classificati in: neurotossici, immunodepressivi, cancerogeni, genotossici e teratogeni (De Liguoro, 2010; JARC, 1993).

A. carbonarius vive come saprofita nello strato superficiale del terreno. Da qui, in condizioni ambientali favorevoli, le sue spore vengono trasportate per via anemofila sulle bucce danneggiate degli acini, dove inizia a svilupparsi (Leong *et al.*, 2006). Le lesioni utilizzate per infettare gli acini sono causate da parassiti e malattie, ed anche fattori abiotici come la grandine (Clouvel *et al.*, 2007).

Le condizioni di crescita ottimali, osservate da Belli *et al.*, (2005) sono una temperatura compresa tra i 25 e i 30 °C e un'attività dell'acqua (a_w) di 0.95-0.98,

che corrisponde a quella del grappolo in invaiatura (Clouvel *et al.*, 2008). Ma la maggior produzione di OTA avviene a 20 °C (Belli *et al.*, 2005).

La Commissione Europea ha pubblicato il Reg. CE n. 123/2005 che stabilisce a 2,0 µg/Kg il livello massimo tollerabile di OTA in vino, mosti e succo d'uva.

Dalla letteratura emerge che è più frequente trovare alti livelli di OTA nei vini dolci e nei vini speciali, a seguire i vini rossi e poi i vini bianchi (Pietri *et al.*, 2001, Belli *et al.*, 2005 e Soufleros *et al.*, 2003). Inoltre si è visto che la latitudine della zona di produzione ha un'incidenza sul contenuto della tossina: i vini settentrionali sono risultati positivi al rilevamento di OTA con una frequenza minore rispetto ai vini meridionali (Pietri *et al.*, 2001).

Come dimostrano Valero *et al.* (2008), un'eccezione alla regola la fanno i vini nobili, cioè quei vini dolci ottenuti tramite lo sviluppo di *B.cinerea* nell'acino, che porta ad una parziale disidratazione e ad una modificazione dei precursori aromatici. Sebbene fin'ora si fosse sempre detto che lo sviluppo dei marciumi secondari fosse correlato a quello della muffa grigia, nel caso di cui si è appena riferito si è visto, invece, che si può anche instaurare un rapporto di antagonismo tra *B.cinerea* e gli altri agenti di marciume del grappolo.

Da studi in vitro su SNM a 20° C (l'optimum di *A.carbonarius* per la produzione di OTA), risulta che la botrite ha un tasso di crescita massimo di 20 mm al giorno, contro i 7,5 mm giornalieri di *A.carbonarius*. Questo dato testimonia che *B. cinerea*, sviluppandosi più velocemente, contrasta lo sviluppo del fungo tossigeno. In più Abrunhosa *et al.* (2002) hanno osservato che *B.cinerea* è capace di degradare più dell'80% dell'OTA prodotta. Quindi in caso di grappoli colonizzati da aspergilli neri, la tossina può essere degradata, con conseguente prevenzione della contaminazione dei vini nobili. Naturalmente questo effetto benefico della muffa grigia avviene solo in determinate aree geografiche come la Gironde e la Doudogne in Francia, dove si producono i vini Souternes e Monbazillac. In tutte le restanti aree geografiche la muffa grigia rimane una malattia da contrastare e il contenuto di OTA un fattore correlato.

1.6 CONTROLLO DELLA BOTRITE

Per ottenere un buon successo nella difesa contro la muffa grigia occorre adottare diverse misure di prevenzione della malattia. Il contenimento della vegetazione rappresenta il primo intervento in grado di ridurre i danni da botrite sul grappolo (Prosperi, 2008). La scelta del tipo d'impianto deve essere fatta in modo tale da riservare le posizioni più ventilate e asciutte alle varietà più sensibili, mentre nelle condizioni opposte potranno essere piantati i vitigni più rustici. Nei diversi vitigni europei coltivati in Italia sono da preferire i cloni a grappoli spargoli con acini a buccia spessa e resistente (Vail e Marois, 1991). Tra i portainnesti vanno scelti quelli che imprimono alla pianta una vigoria limitata (Keller *et al.*, 2001). I filari devono essere orientati secondo la direzione del vento dominante in modo da favorire la ventilazione all'interno della chioma (Thomas *et al.*, 1988).

Una maggiore penetrazione della luce solare nella chioma aumenta l'esposizione ai raggi ultravioletti, che stimola la produzione di fitoalessine (Langcake 1981), composti inibitori di *B. cinerea* e di altri agenti patogeni (Daniel e Purkayastha 1995; Jeandet *et al.*, 2002). Tra le forme di allevamento occorre adottare quella di minore espansione al fine di poter ridurre l'affastellamento della vegetazione e, di conseguenza, le infezioni di muffa grigia (English *et al.*, 1988). I sesti d'impianto saranno una conseguenza della scelta del vitigno europeo e americano e delle condizioni pedoclimatiche e saranno scelti in modo da migliorare il microclima del vigneto in modo da favorire l'arieggiamento e l'insolazione ed evitare ristagni di umidità.

Le diverse tecniche colturali come la concimazione, le potature secche e verdi, l'irrigazione (Elmer & Michailides, 2004) devono essere applicate in modo da garantire uno sviluppo equilibrato della pianta, cercando di contenere la vigoria e migliorando il microclima del grappolo (English *et al.*, 1990).

1.6.1 CONTROLLO CHIMICO DELLA MUFFA GRIGIA

Le epoche di intervento possono essere determinate con il criterio fenologico (Costacurta *et al.*, 2004) o con il criterio climatico (Broome *et al.*, 1995 e Nair e Allen, 1992) o da una loro integrazione. Il criterio fenologico prevede quattro trattamenti: “A”, verso la fine della fioritura, per bloccare le infezioni sui residui delle infiorescenze; “B”, alla pre-chiusura del grappolo (quando gli acini tendono a serrarsi fra loro) onde raggiungerne anche le parti interne e coprire con l’anticrittogamico il rachide e gli acini e stroncare eventuali infezioni sui residui dei fiori ancora presenti; “C”, all’invaiaatura; “D”, 2-4 settimane prima della vendemmia. Il criterio climatico, o “regola dei due 15” prevede di intervenire, dopo l’allegagione, ogni qualvolta si abbia un periodo di bagnatura di almeno 15 h, con temperature medie di 15-20 °C. Questo è un modello empirico derivato dall’interazione delle caratteristiche ambientali di temperatura e durata di alta U.R. (Fig. 6).

I due metodi, possono integrarsi. Si è osservato che il trattamento “C” può essere dilazionato fino al verificarsi delle condizioni minime per la possibile realizzazione dell’infezione (Shtienberg e Elad, 1996). Esso deve però esser eseguito tempestivamente appena verificatesi tali condizioni. In assenza di piogge il trattamento “C” potrà slittare verso “D” ed essere effettuato 15-20 giorni prima di quest’ultimo, realizzando una copertura completa nel periodo più critico.

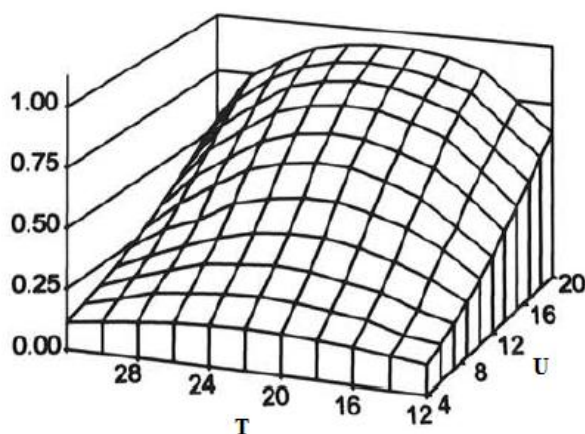


Figura 6. Effetto della temperatura (T) in °C e della durata dell’umidità (U) in ore, sulla porzione di acini infettati da *B.cinerea*. Tratto da: Broome *et al.*, (1995)

Oppure, in annate particolarmente asciutte, potrà essere omesso. Anche i trattamenti “A” e “B” possono essere ridotti ad uno solo, da eseguire dopo la fine della fioritura, ma tassativamente prima della chiusura del grappolo.

Diverse famiglie di composti sintetici sono disponibili per il controllo della *B.cinerea*. I dicarbossimidi chlozolate, iprodione, procymidone e vinclozolin inibiscono la sintesi dei lipidi e delle membrane. In commercio da 25 anni, sono stati la classe più usata come fungicidi specifici contro la muffa grigia (Gabriolotto *et al.*, 2008). Del vinclozolin ne è stato vietato l’uso per ragioni tossicologiche. L’uso ripetuto di questa classe di fungicidi ha portato allo sviluppo di ceppi resistenti ai dicarbossimidi (Leroux *et al.*, 2002 e Giraud *et al.*, 1999). Da metà degli anni novanta, sono entrati nel mercato dei nuovi composti con un’eccellente azione contro la botrite: le anilinoipirimidine ciprodinil, pirimetanil e mepanipirim, il fenilpirrolo fludioxonil, l’idrossianilide fenexamide, carbosamide boscalid e il pyraclostrobin appartenente alla classe delle strobilurine.

L’attività antifungina della anilinoipirimidine consiste nell’inibizione della biosintesi della metionina a livello dell’enzima cistatione β - liasi e il blocco della secrezione degli enzimi idrolitici coinvolti nel processo d’infezione (Rosslénbroich e Stuebler, 2000). La resistenza incrociata di questa classe è già stata dimostrata da vari autori (Leroux *et al.*, 1999; Hilber e Hilber-Bodmer, 1998; Latorre *et al.*, 2002; Moyano *et al.*, 2004) ed essendo monogenica, la selezione di ceppi resistenti è molto frequente (Hilber e Hilber-Bodmer, 1998). Maggior efficacia nel controllo di questo patogeno è stata permessa dall’entrata in commercio di un prodotto ottenuto dalla miscela dell’anilinoipirimidina ciprodinil e del fenilpirrolo fludioxonil (Switch®, Syngenta Crop Protection S.p.a.). Considerato da più autori il prodotto più efficace per il controllo dei funghi tossigeni *Aspergillus* spp (Belli *et al.*, 2007 e Tjamos *et al.*, 2004) . I fenilpirroli sono dei derivati dell’antibiotico *pirrolnitrina*, che è prodotta da qualche specie di *Pseudomonas* (Rosslénbroich e Stuebler, 2000). Il sito di attacco di questa classe di fungicidi è la protein-chinasi, coinvolta nella regolazione della biosintesi del glicerolo ciò comporta un eccesso di glicerolo che porta al blocco dell’osmoregolazione cellulare (Rosslénbroich e Stuebler, 2000). Sebbene la resistenza nei confronti di questo prodotto fitosanitario sia stata rilevata, i ceppi

resistenti hanno dimostrato una fitness penalizzata; in particolare si è vista una riduzione della loro attività saprofitaria (Ziogas e Kalamarakis, 2001).

L'idrossianilide fenexamide, in grado di diminuire la sintesi dell'ergosterolo, inibendo l'enzima 3-cheto reduttasi coinvolto nella demetilazione C-4 (fa parte della 3^a classe degli IBS), è considerato un ottimo antibotritico, sebbene Fillinger *et al.* (2008) abbiano isolato dei ceppi di *B.cinerea* resistenti a vari livelli di fenexamide in Francia ed in Germania. Boscalid ed il pyroclostrobin sono gli ultimi arrivati tra gli antibotritici. Intervengono a livello della catena respiratoria. Il primo, il carbosside, blocca l'enzima succinato ubiquinone reduttasi (SDHI) (Gabriolotto *et al.*, 2008). Il secondo, un QoI, interviene a livello del complesso dei citocromi bc₁. Sebbene siano stati ancora poco utilizzati, Bardas *et al.* (2010), hanno già trovato degli isolati che dimostrano resistenza a questi nuovi fungicidi.

Anche se la lotta chimica contro la *B.cinerea* dispone di numerose famiglie di fungicidi, con molteplici modalità d'azione, fenotipi resistenti sono selezionati sempre più frequentemente (Leroch *et al.*, 2010). Il maggiore meccanismo di resistenza è la modifica della proteina bersaglio con conseguente riduzione del legame col fitofarmaco (Kretschmer *et al.*, 2009). Le popolazioni aventi resistenza multipla ai fitofarmaci aumentano il rischio di muffa grigia e ostacolano l'efficacia delle attuali strategie di gestione della resistenza ai fungicidi, spingendo il viticoltore ad adottare tutti i sistemi possibili per evitare o rallentare l'inefficacia dei trattamenti; tra le misure che è possibile adottare a tale scopo, si segnalano l'alternanza dei principi attivi, la limitazione degli interventi ai soli trattamenti necessari, oppure l'integrazione o la totale sostituzione dei prodotti sistemici con microorganismi antagonisti.

Fortunatamente è difficile trovare residui di prodotti fitosanitari nel vino finito, perché il processo di vinificazione porta ad un loro notevole abbattimento, sia da parte dei lieviti che ne degradano una porzione durante la fermentazione e ne asportano un'altra parte, per adsorbimento, a fine fermentazione (Cabras e Angioni, 2000), sia per allontanamento durante le chiarifiche (Cabras *et al.*, 1997). Però la presenza di residui di fitofarmaci nel vino può influenzare la successione dei lieviti in una fermentazione spontanea, rallentando la cinetica fermentativa (Cus e Raspor, 2008; Calhella, 2005). Inoltre può diminuire la qualità sensoriale del vino,

con un aumento dell'acidità volatile, anche in fermentazioni condotte da ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* inoculati (Garcia, 2004) e abbassare l'attività di degradazione dell'acido malico durante la fermentazione malolattica da parte di *Leuconostoc oeni* e *Lactobacillus plantarum* (Cabras *et al.*, 1999).

I descritti fenomeni di resistenza e gli effetti negativi sul vino di cui si è appena parlato possono essere minimizzati eseguendo una difesa più attenta che limiti l'uso di prodotti fitosanitari di sintesi, utilizzando, tra l'altro, anche gli agenti di controllo biologico.

1.6.2 CONTROLLO BIOLOGICO DELLA MUFFA GRIGIA

Il comportamento di *B.cinerea* sulla superficie della pianta nella fase antecedente alla penetrazione e la disponibilità di tessuto necrotico nella coltura, come sorgente d'inoculo e di energia condizionano le strategie di controllo biologico. *B.cinerea* è estremamente suscettibile alla competizione, perché, per la sua germinazione, crescita del tubetto germinativo ed infezione, dipende da un supplemento esogeno di sostanze nutritive di cui deve avere disponibilità in prossimità del sito d'infezione.

Sulla superficie della pianta, i conidi di *B.cinerea* sono sensibili alla presenza di sostanze antibiotiche od enzimi litici prodotti dai microrganismi che ne possono inibire la germinazione e/o danneggiare il tubetto germinativo. La riduzione della malattia può essere basata sulla riduzione della capacità saprofitaria del patogeno, della disseminazione dei conidi e dell'espressione della virulenza o sulla resistenza indotta nella pianta ospite. La resistenza indotta potrebbe essere efficace contro le infezioni dopo che il fungo è penetrato nei tessuti dove, altrimenti, non può essere più raggiunto dai metaboliti dei microrganismi antagonisti.

Come già anticipato sono disponibili in commercio in Italia due prodotti fitosanitari antibotritici a base di microrganismi: il Trichodex® a base di *Trichoderma harzianum* T39, selezionato in Israele da Elad *et al.* nel 1994 e il Serenade® contenente *Bacillus subtilis* QST-713, messo a punto in California dagli scienziati dell'AgraQuest nel 2000. Qui di seguito verranno descritti i generi *Trichoderma* e *Bacillus*, per evidenziare le loro caratteristiche e le modalità con cui essi realizzano il controllo di funghi patogeni.

1.6.2.1 Il genere *Trichoderma*

Nessun altro genere fungino ha ricevuto tanta attenzione quanto il *Trichoderma* (Fig. 7), per il biocontrollo dei patogeni della piante. I funghi del genere *Trichoderma* svolgono un'efficace azione antagonista nei confronti di molti patogeni fungini e per questo vengono ampiamente utilizzati come mezzo di lotta biologica (Elad, 2000). I funghi appartenenti al genere *Trichoderma* sono largamente distribuiti in tutte le aree geografiche. Quasi tutti i terreni temperati e tropicali ne contengono 10^1 - 10^3 propaguli per grammo (Harman *et al.*, 2004). Al genere *Trichoderma* appartengono funghi filamentosi saprofiti, inclusi nel gruppo dei Deuteromiceti e generalmente non associati, con uno stato sessuale. In quest'ultimi anni, però, è cresciuto il numero di specie di *Trichoderma* di cui si sono individuati i teleomorfi nel genere *Hypocrea*, tramite investigazioni molecolari. Tuttavia, nonostante questi significativi progressi, la tassonomia di *Trichoderma* è ancora piuttosto incompleta, e la distinzione del genere *Trichoderma* resta problematica (Kubicek e Harman, 1998). Sino ad oggi sono state identificate 89 specie di *Trichoderma* (Samuels, 2005) e sono state individuate sei specie antagonistiche: *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. polysporum* e *T. pseudokoningii*

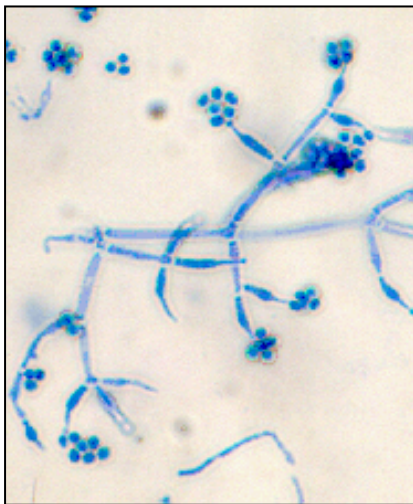


Figura 7. *T. harzianum* al microscopio ottico. Da: www.mycology.adelaide.edu.au

Le diverse specie e ceppi di *Trichoderma* antagonisti sono capaci di esprimere quasi tutti i diversi meccanismi di azione che stanno alla base del controllo biologico.

In particolare, essi sono in grado di esercitare:

- Forte competizione, dovuta a diversi fattori come la capacità di trarre carbonio e azoto da molti substrati, alcuni dei quali non utilizzabili da altri funghi, la rapidità di sviluppo, l'adattabilità termica, (buona crescita tra i 6 e i 35°C, con optimum tra i 25 e i 30 °C), la forte attività saprofitaria e l'elevata produzione di conidi.
- Antibiosi; dovuta alla produzione di sostanze come la gliovirina e la gliotossina (Vinale, 2007), e altri metaboliti tossici che inibiscono in modo significativo lo sviluppo di molti patogeni come quelli appartenenti ai generi *Fusarium* (Monn *et al.*, 1988), *Rhizoctonia*, *Pythium* (Howell e Stipanovic, 1983; Wilson *et al.*, 1988). Oltre a ciò, come già asserito, è stata rilevata l'attività di trattenere gli enzimi di *B.cinerea* da parte di *T.Harzianum* T39 (Elad, 2000)
- Micoparassitismo, articolato in fasi successive: inizialmente le ife del *Trichoderma* hanno un accrescimento chemiotropico verso quelle del patogeno, per effetto, molto probabilmente, di essudati prodotti da quest'ultimo; poi avviene il contatto ifale tra i due funghi, mediato da meccanismi di riconoscimento specifici, molto spesso l'antagonista sviluppa degli appressori che gli permettono di aderire meglio all'ifa del patogeno; infine le ife del *Trichoderma* si avvolgono attorno a quelle dell'ospite e ne determinano la morte (fig.2 A, pag 11). Avvenuto il contatto ifale, l'antagonista produce degli enzimi litici (CWDEs: cell wall degrading enzymes), tra cui glucanasi, chitinasi e cellulasi (Haran *et al.*, 1996; Elad e Kapat, 1999; Ait-Lahsen *et al.*, 2001), che lisano le pareti dell'ospite e formano fori di penetrazione, permettendo al micelio di penetrare all'interno delle ife del patogeno (Inbar *et al.*, 1996).
- L'induzione di resistenza nella pianta ospite è un'altra importante caratteristica di questi funghi antagonisti. La capacità di *T.harzianum* di indurre resistenza sistemica è particolarmente degna di nota nel controllo dei patogeni del mais (Harman *et al.*, 2004), ma anche nel controllo della *B.cinerea* su *Vitis vinifera* (Barka *et al.*, 2000; De Meyer *et al.*, 1998).

1.6.2.2 *Bacillus* spp.

Il genere *Bacillus* fa parte dei batteri Gram-positivi, ha forma di bastoncino, è caratterizzato da un basso GC (Ludwing *et al.*, 2008) e appartiene al phylum *Firmicutes*. Sono state descritte più di 100 specie di *Bacillus* (Madigan e Martinko, 2006). Presente ovunque in natura, il *Bacillo* include specie patogene e non. Diversi *Bacillus* producono antibiotici e alcuni ceppi, soprattutto di *B.subtilis*, *B. cereus* e *B. amyloliquefacens* (Kloepper *et al.* 2004), sono noti per il loro utilizzo contro i patogeni della piante, tra cui *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Leptosphaeria maculans* e *Verticillium longisporum* (Danielsson *et al.* 2007).

Grande successo ha avuto il *Bacillus subtilis* ceppo QST-713, distribuito con il nome commerciale Serenade ®, tant'è che è stato saggiato in 30 piante diverse ed in 20 differenti nazioni (Marrone, 2002). In natura *Bacillus subtilis* compete con altri microrganismi secernendo all'esterno della cellula alcune sostanze contenute nel citoplasma. Si tratta di un meccanismo che si è evoluto in modo da proteggere la nicchia ecologica del batterio inibendo lo sviluppo di potenziali competitori, sottraendo loro le fonti nutritive o anche eliminando i competitori direttamente e utilizzandoli come fonti di nutrimento. Il microorganismo può bloccare la germinazione di spore, agire contro il tubo germinativo e la crescita del micelio e inibire l'insediamento del patogeno sulla foglia producendo una zona di inibizione che riduce la crescita del patogeno stesso. *B.subtilis* ha una media del 4-5% del suo genoma dedicata alla sintesi di antibiotici e ha il potenziale di produrre più di due dozzine di composti antimicrobici strutturalmente diversi (Stein, 2005). Tra queste molecole appaiono particolarmente interessanti lipopeptidi ciclici (LP) appartenenti alle famiglie della *surfactina*, *iturina* e *fengicina* (o *plipastatina*) di cui sono stati ben documentati gli usi potenziali nel campo della biotecnologia e biofarmaceutica per le loro proprietà tensioattive (Ongena e Jacques, 2007). In specifiche nicchie ecologiche, i diversi gruppi di LP possono conferire un vantaggio per i ceppi di *Bacillus* che li producono (Mukherjee e Das, 2005) e quindi rappresentano un elemento che contribuisce in maniera importante all'espressione del loro antagonismo.

La produzione di *iturina* sembra essere limitata al *B.subtilis* (Bonmatin *et al.*, 2003) e *B.amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004). *Surfactina* o varianti strettamente correlate, come *lichenisina* sono state isolate da *B.coagulans* (Huszcza, e Burczyk, 2006), *B.pumilus* e *B.licheniformis* (Peypoux *et al.*, 1999), e la produzione *fengicina* (Fig.8) è stata identificata in *B.cereus* e *B.subtilis* (Tsuge *et al.*, 1999) oltre a *B.thuringiensis* (Kim *et al.*, 2004) e *B.amyloliquefaciens* (Koumoutsi *et al.*, 2004). *B.subtilis* è stato il primo biofungicida a cui è stato riconosciuto un ampio spettro d'azione; esso svolge unicamente un'azione preventiva e può essere applicato sia da solo, sia alternato con fungicidi convenzionali. Ha un'azione multi sito quindi riduce le probabilità di sviluppo delle resistenze. I recenti progressi hanno dimostrato che i *Bacilli* possono agire non solo come antagonisti o killer dalla crescita dei fitopatogeni ma anche come stimolatori delle difese rafforzando la potenziale resistenza dell'ospite (Kloepper *et al.* 2004).

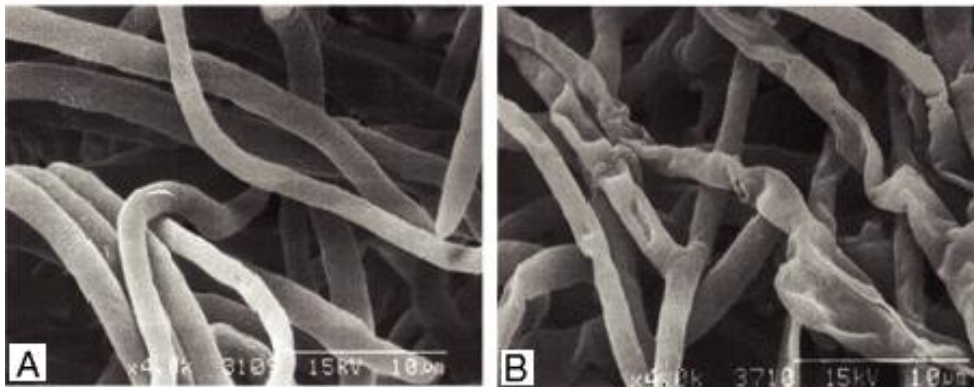


Figura 8. Scansione al microscopio elettronico di ife fungine prima (A) e dopo 12 h (B) dal trattamento con *fengicina* di *B. thuringiensis*. Tratto da Kim *et al.*, (2004)

1.6.3 ALTRI FUNGHI CON UN POSSIBILE EFFETTO ANTAGONISTA SULLA BOTRITE

Oltre ai due generi precedentemente descritti, di cui è già consolidata la possibilità d'uso come antagonisti naturali di molteplici microrganismi, sono stati presi in considerazione in questo saggio anche i generi *Acremonium* e *Coniothyrium*. Sebbene, in letteratura non ci siano lavori che testimoniano il loro possibile utilizzo nel controllo di *B.cinerea*, l'antagonismo che hanno dimostrato verso generi fungini permette di ipotizzare un loro impiego anche per il controllo di questo patogeno.

1.6.3.1 *Acremonium* spp.

Il genere *Acremonium* raggruppa circa 100 specie, di cui molte sono saprofiti, comunemente isolate da materiale organico morto o dal suolo. Lo stato sessuale dell'*Acremonium* non è ben definito; da alcuni viene inserito tra il gruppo dei funghi , phylum dei *Deuteriomyceti*, altri preferiscono collocarlo nel phylum *Ascomycota*, in quanto le sue proprietà strutturali sono simili a quelle riscontrate in questo gruppo. *Acremonium zeae*, anche riportato come *Acremonium* sp., *Acremonium strictum*, *Cephalosporium* sp. o *Cephalosporium acremonium* è il principale antagonista di *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* nel mais, responsabili del marciume del seme e della spiga nonché produttori di aflatoxina e fumonisine, rispettivamente (Wicklow et al., 2005). In particolare il ceppo NRRL 13540 è stato descritto da vari studi come un ottimo antagonista di *A.flavus* e *F. verticillioides* (Wicklow et al., 2005). L'antagonismo di *Acremonium* riguarda principalmente il meccanismo di antibiosi, infatti produce una buona quantità di antibiotici: soprattutto la *pirrocidina* A e B (Wicklow e Poling, 2009).

Sebbene la pirrocidina B abbia dimostrato una bassa attività nel controllo dei patogeni, la pirrocidina A risulta molto efficace, non solo contro *A.flavus* e *F.verticillioides*, ma anche contro *Fusarium graminearum*, *Nigrospora oryzae*, *Stenocarpella (Diplodia) maydis*, *Clavibacter michiganense* subsp. *Nebraskense*, *Rhizoctonia zeae* (Poling et al., 2008). Su vite non c'è stato molto interesse per l'utilizzo di funghi del genere *Acremonium* come agenti di lotta biologica; Zahavi et

al. in Israele nel 2000 hanno condotto una prova di biocontrollo di *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus stolonifer* con *Acremonium cephalosporium* B11, ottenendo risultati poco soddisfacenti. Burruano *et al.*, nel 2003, hanno rilevato in alcune varietà siciliane un *Acremonium* endofita con un possibile antagonismo contro la *Plasmopara viticola*; nel controllo della *B.cinerea* Janisiewicz e Martinsburg nel 1990 hanno avuto risultati soddisfacenti con *Acremonium breve* NRRL 18307 su mela in post-raccolta. La competizione per i nutrienti e per lo spazio non è un caratteristica rappresentativa per il genere *Acremonium* perché il fungo ha un tasso di crescita non elevato: 3,15 mm giornalieri su PDA a 25 ° C (Peixin He *et al.*, 2005), rispetto i 15,4 mm giornalieri di *Trichoderma harzianum* su PDA a 26 °C (Sautour *et al.*, 2002). Per quanto riguarda il meccanismo di induzione di resistenza sistemica, solo Kasselaki *et al.*, nel 2006 hanno dimostrato che il controllo dell'oidio del pomodoro (*Leveillula taurica*) avviene anche tramite ISR, utilizzando spore morte di *Acremonium alternatum*. La prevalenza di studi sull'antibiosi di *Acremonium* fa presumere che questa sia il principale meccanismo di biocontrollo. Sono necessari futuri studi per conoscere meglio gli eventuali altri meccanismi che questo fungo potrebbe utilizzare nell'ambito del controllo biologico.

1.6.3.2 *Coniothyrium spp.*

Al genere *Coniothyrium* appartengono funghi ubiquitari del phylum *Ascomycota*. Campbell nel 1947 ha isolato per primo il fungo *Coniothyrium minitans* (ora riclassificato in *Paraconiothyrium minitans* da Verkley *et al.*, 2004) dallo sclerozio di *Sclerotinia sclerotium* ed immediatamente è stato riconosciuto il suo potenziale nel controllo biologico. È un importante microorganismo utilizzato per il controllo di alcuni ascomiceti tra cui: *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotium*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Sclerotium cepivorum* nelle colture orto-floro-frutticole (nome commerciale Contains - Intrachem Bio Italia S.p.a). Ci sono numerosi fenotipi, che differiscono in morfologia della colonia e in numerose caratteristiche biologiche ma la capacità di parassitizzare lo sclerozio è la caratteristica chiave (Whipps *et al.*, 2007). L'ecologia di questo fungo è stata gradualmente rivelata. Da tempo si conosce la capacità di sopravvivere nel terreno per diversi anni dopo la sua applicazione (Huang & Erickson, 2002) ma non può crescere facilmente in un terreno naturale utilizzando la sostanza organica ivi presente come normalmente un saprofita (Williams, 1996); conseguentemente è visto quasi come un micoparassita obbligato. *Coniothyrium minitans* non presenta alcuna capacità di infettare piante sane, neanche sui tessuti tagliati (Gerlagh *et al.*, 1996) anche se può crescere su foglie, petali ed altri tessuti precolonizzati (Li *et al.*, 2003a). Tuttavia può essere disperso da spruzzi d'acqua, direttamente, come aerosol (Williams *et al.*, 1998).

Tra i meccanismi d'azione che esso mette in atto è stata osservata l'interazione ifa-ifa tra *C.minitans* e numerosi altri funghi (Li *et al.*, 2002) ma, come già riferito, l'attacco del micelio su uno sclerozio è il fenomeno più comune (Whipps *et al.*, 2007). La degradazione della parete cellulare e il collasso del pseudo-tessuto scleroziale è associato alla produzione degli enzimi litici *chitinasi* e *glucanasi*. Giczey *et al.*, (2001) hanno dimostrato un incremento del gene *cmg1* (induttore della produzione di β -1,3 *glucanasi*), durante l'infezioni di uno sclerozio.

L'antibiosi è un meccanismo che da poco si conosce in *C.minitans*. McQuilken *et al.* (2003) scoprirono che *C.minitans* produce quattro metaboliti inibitori della crescita fungina strettamente correlati tra loro. Il principale metabolita si identifica

come *macrosphele* A e si è dimostrato molto efficace contro *S.sclerotiorum* riducendone la crescita dal 65 al 74%.

Sebbene *B.cinerea* presenti alcune analogie con il genere *Sclerotinia* spp., appartenendo alla stessa famiglia delle *Sclerotiniaceae* (Willetts, 1997), non è stato finora rilevato alcun antagonismo di rilievo da parte di *C.minitans* nei confronti di questo patogeno; si ha notizia solo di un solo possibile uso contro la muffa grigia del pomodoro (Gerald et al., 1996) dove è stato osservato un rallentamento del processo di marcescenza in seguito ai trattamenti con l'antagonista.

L'uso di agenti nel biocontrollo della *B.cinerea* in vigneto è già stato descritto da vari autori (O'Neill et al., 1996, Herman et al., 1996; Elmer e Reglinski, 2006), però manca della letteratura specifica riguardante i prodotti disponibili sul mercato e la loro applicazione nella zona di Conegliano-Valdobbiadene sulla cultivar Glera.

Quindi sono state eseguite prove di lotta contro *B.cinerea* in vitro ed in campo, utilizzando microorganismi già disponibili sottoforma di prodotti commerciali ed altri non ancora in vendita ma di cui può essere considerato un possibile effetto antagonista, ciò per verificarne l'efficacia come agenti di biocontrollo e l'integrabilità con alcuni dei prodotti fitosanitari chimici normalmente usati nella difesa della vite.

2. MATERIALI E METODI

2.1 COLTURE DI MICROORGANISMI

Il ceppo di *B.cinerea* utilizzato nella prova è stato isolato da un campione di uva proveniente da un vigneto sperimentale della Facoltà di Agraria di Padova situato nei pressi di Agripolis (Legnaro, PD). Per l'isolamento sono stati prelevati alcuni grappoli di Merlot in fase di pre-chiusura, questi sono stati posti in camera umida ed incubati per 6 giorni a $25\pm 1^\circ\text{C}$ per favorire l'evasione di *B.cinerea* e la comparsa delle sue strutture riproduttive (fig.9). Piccole porzioni di micelio sono state trasferite sotto cappa a flusso laminare sterile in Petri da 9 cm sul substrato agarizzato PDA (Potato Dextrose Agar) addizionato di 50 ppm di *streptomicina* per impedire la crescita di batteri. Successivamente le piastre sono state incubate al buio in un termostato a $23\pm 1^\circ\text{C}$ per favorire lo sviluppo delle colonie, da cui è stato possibile, con diverse riprese, ottenere il fungo in purezza.



Figura 9. Grappolo con sviluppo di muffa dopo l'incubazione in camera umida.

Sono stati inseriti nella prova 8 microorganismi antagonisti fra cui 5 ceppi *Acremonium zeae* conservati nella micoteca della Sez. di Patologia Vegetale del Dip. TeSAF: *A.zeae* NRRL 6415, NRRL 13540, NRRL 34559, NRRL 34560 e NRRL 34554. *Trichoderma viride* ceppo TV1, anch'esso presente in micoteca; un prodotto commerciale denominato Serenade® (Intrachem Bio) a base di *Bacillus subtilis* e un

secondo formulato, il Contans® wg (della Intrachem Bio), contenente *Coniothyrium minutans* ceppo K1, impiegato come prodotto commerciale per le prove in campo da cui, mediante semina e ripetute purificazioni su PDA, è stato tratto l'isolato utilizzato per le prove *in vitro*.

2.2 PROVA DI ANTAGONISMO *IN VITRO*

L'azione antagonistica esercitata dai funghi presi in esame su *B.cinerea*, è stata valutata con il metodo della doppia coltura, utilizzata da Badalyan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003b e Campanile *et al.*, 2007. Con l'ausilio di un foratappi sono stati prelevati dei dischetti con diametro di 6 mm dai margini di colonie di antagonisti e patogeni in attivo accrescimento su PDA. Il dischetto di antagonista e quello di Botrite sono stati posizionati ai lati opposti (6 cm di distanza) di una capsula Petri da 9 cm contenente PDA + streptomicina (Fig. 10). Per la prova di antagonismo di *B.subtilis* contro la *B.cinerea* sono state utilizzate piastre senza streptomicina per non

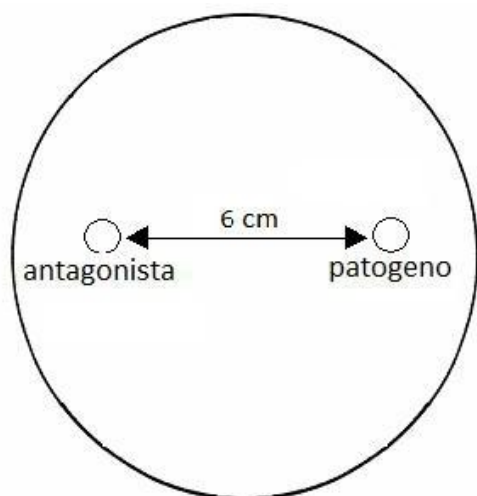


Figura 10. Schema di collocazione dei dischetti di micelio (\varnothing 6 mm) dell'antagonista e del patogeno.

ostacolare lo sviluppo di *B.subtilis*, inoculato come sospensione acquosa del formulato commerciale. In questo caso, nelle piastre è stato tolto un dischetto di PDA da 6 mm nella posizione in cui andava collocato l'antagonista per creare un pozzetto dove inserire la sospensione con il *B.subtilis*. Per ogni combinazione antagonista/patogeno, così come per il relativo controllo (inoculato con il solo dischetto di *B.cinerea*) si sono prodotte 10 ripetizioni.

Le piastre sono state incubate a 25 ° C (± 1) al buio per il numero di giorni necessari affinché le colonie di *B.cinerea* del testimone raggiungessero il bordo più distante della capsula.

Si è poi proceduto a misurare l'area occupata dalla Botrite a cospetto dei diversi antagonisti utilizzando un'apposita tavoletta grafica e relativo software di elaborazione dell'immagine (image J, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) . I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) e le medie comparate con il test di Duncan verificando la significatività per $P = 0,05$. I dati sono stati elaborati statisticamente utilizzando il programma XLSTAT – 2009 (Addinsoft, USA)

2.3 PROVA DI CAMPO

La prova è stata realizzata nell'anno 2009 a San Pietro di Feletto (TV) in un vigneto situato in collina con esposizione ad Ovest e orientamento dei filari Est-Ovest. Nel vigneto si è praticato il diserbo localizzato sulla fila lasciando le interfile inerbite. Il terreno si presentava argilloso, dotato di una elevata quantità di ferro e con pH sub-acido compreso tra 6-6,5. Tutte le operazioni sono state eseguite meccanicamente tranne la potatura e la vendemmia. Le piante (*Vitis vinifera* cv Glera ISV-ESAV 19 innestata su 420 A) erano coetanee al decimo anno di età ed allevate a doppio capovolto con sesto d'impianto di 3 x 1,2 m. In questo vigneto ogni anno vengono apportate mediamente 50 unità/ha di azoto e 150 unità/ha di potassio tramite uno spargi concime.

In un filare di circa 200 metri di lunghezza posto nella zona centrale del vigneto, sono state selezionate 3 piante per ogni prova e per il testimone (trattato con solo *B.cinerea*). La disposizione delle piante era, come schematizzato nella figura 11, distanti almeno 25 metri dalla testa del filare e 5 metri le une dalle altre per evitare effetti di deriva.

In ogni pianta sono stati individuati 10 grappoli scelti in modo da rappresentare tutta la fascia produttiva della chioma.

Le piante oggetto di prova sono state distribuite in modo completamente randomizzato lungo il filare. Operando in questo modo sono state allestite le tesi elencate in calce alla fig. 11.

Le piante destinate alla prova non sono state trattate con alcun prodotto fitosanitario per il resto della stagione vegetativa per consentire lo sviluppo adeguato dei microorganismi della prova.

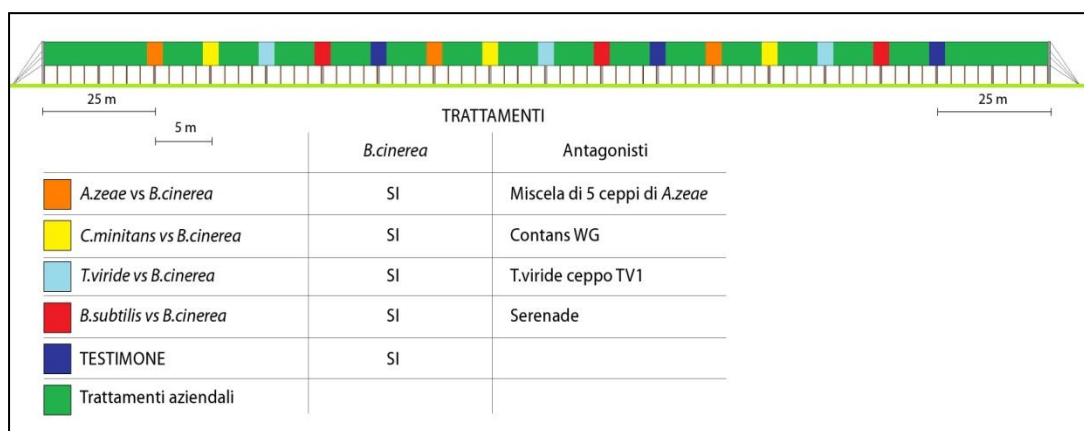


Figura 11. Schema della disposizione delle piante per la prova di antagonismo in campo.

2.3.1 PREPARAZIONE DEGLI INOCULI UTILIZZATI NELLA PROVA DI CAMPO

Per tutti gli antagonisti da saggiare si è deciso di produrre una sospensione acquosa da applicare al grappolo in modo da simulare il più possibile i trattamenti che normalmente vengono eseguiti in vigneto. Per quanto riguarda i prodotti commerciali, Serenade® e Contans® WG, si sono rispettate le indicazioni riportate in etichetta.

Per l'ottenimento dell'inoculo necessario all'effettuazione del saggio di pieno campo per ciascuno degli altri funghi in prova, gli isolati di *Acremonium* e il ceppo TV1 di *T.viride* sono stati allevati in Petri da 9 cm contenenti PDA + *streptomicina* ed incubati in termostato a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ al buio per 20 giorni.

Trascorso tale tempo dalle colture pure in piastra si sono dovute ottenere delle sospensioni di conidi operando come segue. Sotto cappa sterile a flusso laminare, si sono versati 5 ml di acqua sterile su ogni piastra, agitando l'acqua per qualche secondo in modo da staccare la maggior parte dei conidi dalle ife e cercando comunque di non asportare tanto micelio per evitare intasamenti dello spruzzino in fase di trattamento, tramite conta con cella di Thoma sono state determinate le CFU (Colony forming units) su ml della sospensione.

Con le modalità appena descritte è stata prodotta anche la sospensione di *B.cinerea* da utilizzare come inoculo del patogeno. Successivamente le sospensioni sono state diluite in modo da avere durante il trattamento una concentrazione di minimo 10^6 CFU/ml per gli antagonisti e 10^4 CFU/ml per *B.cinerea* (Tab.3). Per *A.zaeae*, è stata ottenuta una sospensione conidica contenente un miscuglio in parti uguali dei 5 ceppi presi in considerazione.

MICROORGAISMI	CFU iniziali*	CFU finali**	DILUIZIONI	PER 1 L
<i>A. zaeae</i>	$2,5 \times 10^8$ /ml	1×10^6 /ml	250	4 ml/996 ml
<i>T. viride</i>	$8,9 \times 10^7$ /ml	1×10^6 /ml	89	11 ml / 989 ml
<i>C. minitans</i>	1×10^9 /gr	1×10^6 /ml	1000	18,86 gr/981 ml
<i>B. subtilis</i>	$5,13 \times 10^{10}$ /gr	1×10^6 /ml	51300	0,02 gr/ 1000 ml
<i>B. cinerea</i>	1×10^6 /ml	1×10^4 /ml	100	10 ml/990 ml

Tabella 3. Diluizioni eseguite per ottenere la concentrazione di antagonista desiderata al trattamento.

* CFU ottenute da conta in cella di Thoma della sospensione conidica iniziale (CFU/ml) o dal prodotto commerciale (CFU/gr)

** CFU nella sospensione usata per il trattamento

2.3.2 TRATTAMENTO

Per le epoche di trattamento è stato considerato il metodo basato sulle fasi fenologiche come descritto nel paragrafo 1.6.1. Sebbene il metodo preveda 4 trattamenti, si è deciso di limitarsi ai 3 trattamenti eseguiti nelle tre fasi ritenute più significative ossia in pre-chiusura del grappolo, in fase di invaiatura e 2 settimane prima della vendemmia, rispettivamente come riportato in tab. 4.

Ad ogni trattamento l'antagonista è stato inoculato 2 giorni prima della Botrite, durante le ore più fresche della giornata. Il trattamento è stato eseguito utilizzando spruzzatori con serbatoio da 1,5 litri.

EPOCA	OPERAZIONI	GIORNO		MESE	FASE FENOLOGICA
A	1° Trattamento con antagonisti	3	/	7	PRE-CHIUSURA
	1° Trattamnto con Botrite	4	/	7	
	Campionamento A 1	7	/	7	
	Campionamento A 2	14	/	7	
B	2° Trattamento con antagonisti	24	/	8	INVAIATURA
	2° Trattamento con Botrite	25	/	8	
	Campionamento B 1	28	/	8	
	Campionamento B 2	4	/	9	
C	3° Trattamento con antagonisti	25	/	9	2 SETT. PRIMA DELLA VENDEMMIA
	3° Trattamento con Botrite	26	/	9	
	Campionamento C 1	29	/	9	
	Campionamento C 2	6	/	10	

Tabella 4. Calendario dei giorni in cui sono stati eseguiti i trattamenti ed i successivi campionamenti nella prova in campo

2.3.3 DETERMINAZIONE DELLA MALATTIA

I rilievi sono stati eseguiti controllando il livello percentuale di infezione sui grappoli di ogni tesi in tre diverse fasi fenologiche: alla chiusura del grappolo e all'invaatura e prima della vendemmia. Dai dati raccolti si è determinato l'indice di infezione (I %), calcolato utilizzando sei classi di infezione (0-5) (tab. 5) con la formula di Townsend-Heuberger (1943).

$$I \% = \frac{\sum(n \cdot v)}{5 \cdot N} \cdot 100$$

Dove:

I = indice di infezione in %

n = frequenza (n. grappoli per ciascuna classe di danno)

v = classe di danno (valore numerico da 0 a 5)

N = n. di grappoli per ciascun campione

Danno %	CLASSE (v)	n° grappoli (n)
0	0	
1-5	1	
6-15	2	
16-25	3	
26-50	4	
51-75	5	
	$\sum(n \cdot v) =$	

Tabella 5. Classificazione del danno presente nei grappoli

In seguito tale indice è stato sottoposto, previa trasformazione angolare, all'analisi della varianza e alla separazione delle medie con il test di Duncan (P=0,05).

2.3.4 QUANTIFICAZIONE DELL'INOCULO PRESENTE IN CAMPO

Per interpretare correttamente i risultati dei rilievi sullo sviluppo della malattia nel grappolo, è stato seguito il tenore dei vari BCA e del patogeno.

Per riuscire a distinguere ed a quantificare ogni antagonista e la Botrite, sono state eseguite delle diluizioni seriali in ragione di dieci.

Al 3° giorno e al 10° giorno dal trattamento sono state raccolte porzioni di diversi grappoli, in modo da avere almeno 150 grammi per campione rappresentativi di tutte le piante di ciascuna tesi. Ogni campione è poi stato omogeneizzato. Sotto cappa sterile, la prima sospensione (S1) è stata ricavata unendo 50 ml di campione a 450 ml di acqua sterile.

Dopo aggiunta di sospensivante (Tween 20®, Bresciani s.r.l, Milano) ed opportuna agitazione con una pipetta automatica sono stati prelevati 0,5 ml poi seminati e distribuiti con apposito rastrellino di vetro sterile su capsula Petri da 9 cm precedentemente riempita con PDA e streptomina (ad eccezione delle Petri destinate alla determinazione della carica di *Bacillus subtilis* che sono state preparate senza antibiotico). Successivamente 50 ml della S1 sono stati trasferiti in una seconda beuta contenente 450 ml di acqua sterile, ottenendo così la S2. Tale

procedura è stata ripetuta fino all'ottenimento delle piastre seminate con la sospensione S7, come descritto dallo schema nella figura 12.

Per ogni diluizione sono state prodotte 5 ripetizioni. Le piastre poi sono state poste in termostato a 25 ° C (±1) per 5-7 giorni, fino alla comparsa delle colonie di cui si è fatta la caratterizzazione per via morfologica.

Si è potuto risalire al titolo di CFU di ogni campione di partenza elaborando i dati statisticamente tramite la tecnica dell'MPN (Most Probabile Number) in base alla formula di Thomas (Wyshak e Dentre, 1972):

$$MPN = \frac{P}{\sqrt{NT}}$$

P = totale piastre fertili

N = g totali di campione in piastre sterili

T = sommatoria g di campione in tutti le piastre

In seguito è stata verificata la significatività delle differenze con il test di Duncan per P = 0,05.

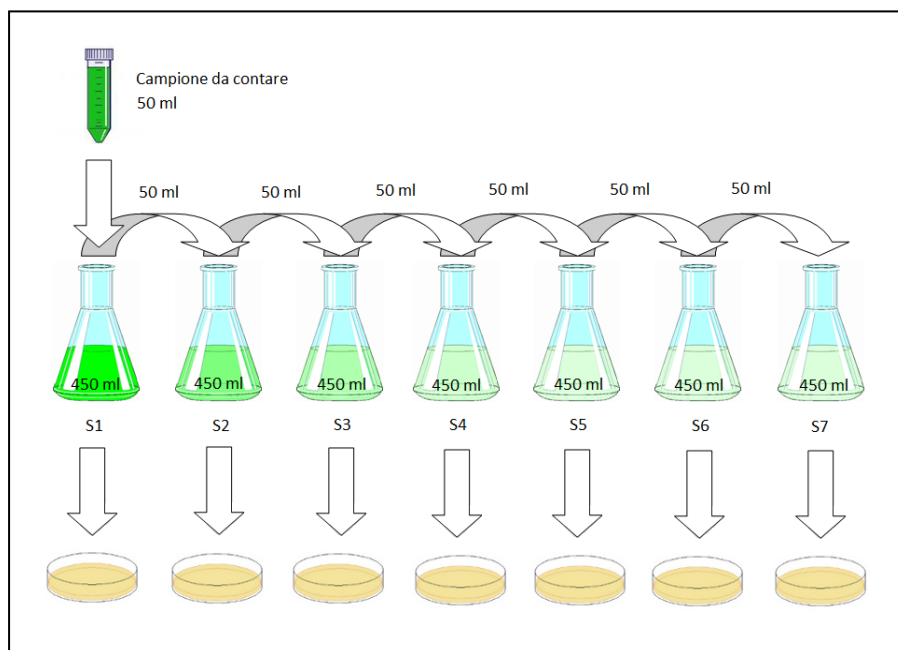


Figura 12. Procedura di diluizioni seriali in ragione di 10 eseguita partendo da 50 ml di campione

2.4 DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBITRICE (CMI).

Nell'ottica di utilizzo degli antagonisti fungini in una strategia di lotta integrata diventa essenziale conoscere gli effetti che i prodotti fitosanitari ad azione fungicida hanno nei loro confronti.

La CMI è definita come la più bassa concentrazione di fitofarmaco che inibisce apprezzabilmente la crescita del microorganismo (Andrews, 2002). Per ogni fitofarmaco, più bassa è la CMI rilevata e maggior effetto ha nei confronti di quel microorganismo, che pertanto ne viene fortemente inibito.

2.4.1 PRODOTTI FITOSANITARI UTILIZZATI

Per questa prova sono stati saggiati tre prodotti impiegati usualmente nel vigneto della prova. Il Ridomil Gold® combi, IL Forum® MZ wg e il Flobrix® Blu.

- RIDOMIL GOLD® COMBI

Fungicida distribuito da Syngenta Crop Protection S.p.a. a base di Metalaxil-M per il 4,85% e Folpet per il 40 %.

Nella vite è indicato per la lotta alla *Plasmopara viticola* (Peronospora). Il Folpet è una tioftalimmide che esplica un'azione multi sito. Nella pianta non penetra nei tessuti vegetali quindi ha un'azione protettiva di contatto.

Il metalaxil-M è invece una fenilamide del gruppo delle acilalanine la cui attività consiste nell'inibire l'attività dell'RNA polimerasi I. E' un fungicida sistemico, quindi nella pianta entra nell'interno dello spessore della lamina fogliare e poi viene traslocato con il flusso linfatico. Il prodotto, così composto viene commercializzato in granuli idrodispersibili. Le indicazioni di sicurezza lo classificano irritante (Xi) e pericoloso per l'ambiente (N) con un intervallo di sicurezza nella vite di 28 giorni.

- FORUM® MZ WG

Distribuito da BASF S.p.a. entra anch'esso tra gli antiperonosporici utilizzabili nella vite. È composto da mancozeb per il 60 % e dimetomorf per il 9%. Il mancozeb appartiene alla classe dei ditiocarbammati. È un fungicida ad ampio spettro d'azione che agisce per contatto fogliare. È un composto chimico a struttura polimerica, in cui lo ione zinco è chimicamente legato alla molecola dell'etilenbisditiocarbammato di manganese, per mezzo di un legame di coordinazione che risulta estremamente stabile. È completamente diverso, sia chimicamente che biologicamente da altri ditiocarbammati in quanto contiene 3 componenti ionici: zinco, manganese ed etilenbisditiocarbammato. È caratterizzato sia da un'elevata azione biologica, sia da una lunga persistenza sulle foglie.

Il dimetomorf ha attività sistemica. È un'ammina dell'acido cinnamico ed inibisce la biosintesi dei fosfolipidi e la loro deposizione nella membrana cellulare. Come il prodotto precedente, viene commercializzato sotto forma di granuli idrodispersibili. Le indicazioni di sicurezza lo classificano irritante (Xi) e pericoloso per l'ambiente (N) con un intervallo di sicurezza nella vite di 28 giorni.

- FLOWBRIX® BLU

È un fungicida a base di rame metallo sotto forma di ossicloruro tetra rameico (380 g/l). Il rame agisce sotto forma di ione Cu^{++} . Ha un'azione batteriostatica, è molto efficace contro gli oomiceti, poco contro l'Oidio ed ha degli effetti blandi sulle altre malattie, riconducibili all'ispessimento della cuticola per la fitotossicità che ha verso la pianta. Il rame interagisce con le proteine, denaturandole e con gli ioni presenti disturbando il metabolismo cellulare. Può portare alla perdita di funzionalità della cellula attaccando gli enzimi, soprattutto quelli respiratori del ciclo di Krebs. Il Flowbrix Blu viene commercializzato sotto forma di sospensione concentrata. Le indicazioni di sicurezza lo classificano pericoloso per l'ambiente (N), infatti è poco solubile nel terreno dove si accumula. L'intervallo di sicurezza nella vite è di 20 giorni.

2.4.2 DETERMINAZIONE DELLA CMI

La CMI è stata determinata seguendo il protocollo già impiegato da Aguin *et al.* (2006), nello studio di alcuni fungicidi contro *Armillaria mellea* e di Muhammad e Saleem (2007) nello studio della tolleranza ai fungicidi di alcuni ceppi di *Trichoderma*. La procedura seguita consiste nell'avvelenare il terreno di coltura a dosi differenti di fitofarmaco e monitorare la crescita del microorganismo. I prodotti fitosanitari sono stati addizionati alle concentrazioni di 62.5, 125, 250, 500, 1000 ppm a PDA mantenuto liquido a 40 °C (per non decomporre la molecola di principio attivo) ed il tutto è stato versato in capsule Petri da 9 cm (fig. 13). Il substrato così prodotto è stato inoculato al centro con un tondello di micelio di 6 mm di diametro prelevato dal margine di colonie in attivo accrescimento dei funghi antagonisti saggiati nella prova in campo, allevati su PDA per 15 giorni a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e al buio. Alle colonie di *T.viride*, precedentemente all'operazione di inoculo è stato asportato il micelio aereo bagnando la superficie della colonia con dell'acqua sterile e successivamente raschiando il micelio, per evitare la dispersione di conidi in altre aree del terreno di coltura rispetto a quella in cui sarebbe stato depositato il tondino di micelio.

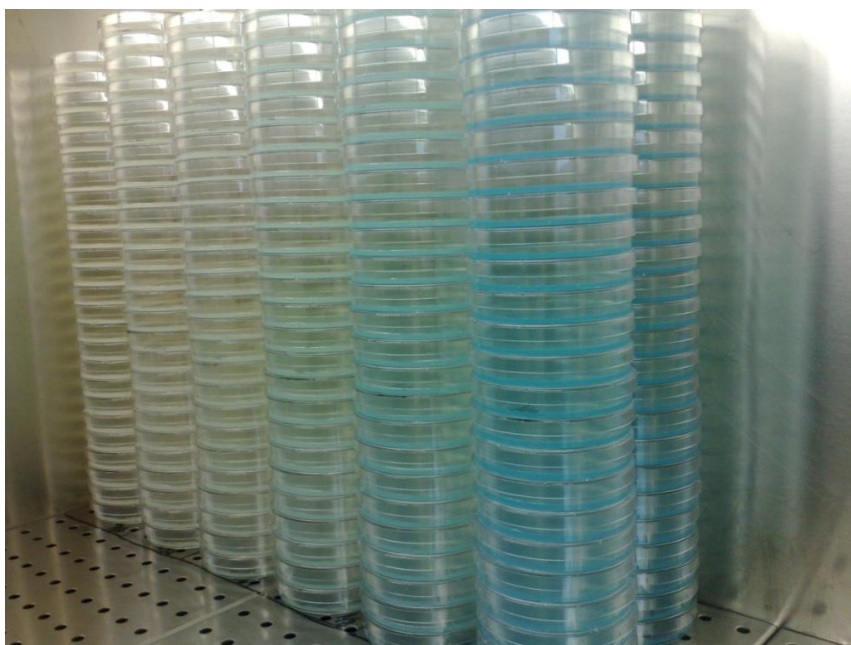


Figura 13. Piastre Petri ottenute miscelando PDA e Flowbix Blu. Si notino il diverso colore di ogni pila, dovuto alla diversa concentrazione di prodotto fitofarmaco.

Le capsule così ottenute sono state incubate al buio con un ciclo di crescita giorno-notte con $17 \pm 1^\circ\text{C}$ di minima e $24 \pm 1^\circ\text{C}$ di massima. Nel caso in cui al termine dell'incubazione non fosse rilevabile alcun accrescimento del micelio nemmeno nel terreno di coltura a titolo di 62,5 ppm è stata ripetuta la prova con terreni a concentrazione di prodotto fitosanitario di: 0.95, 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25 ppm.

Per ogni concentrazione e per il testimone, rappresentato da capsule contenenti solo PDA, sono state allestite 7 replicazioni. Le piastre sono state controllate giornalmente; a riempimento delle stesse da parte del fungo nel testimone si è proceduto nel rilevare le aree di micelio sviluppatosi sui substrati addizionati dei diversi prodotti fitosanitari e ad elaborare statisticamente i dati ottenuti, come riportato precedentemente nella prova di antagonismo in vitro.

Con le medie delle aree rapportate alle rispettive concentrazioni di prodotto fitosanitario sono state costruite le curve di mortalità (Fig. da 20 a 40). Tramite l'equazione della curva è stato possibile determinare la CMI di ogni antagonista per ogni uno dei prodotti fitosanitari impiegati, ponendo come minimo effetto apprezzabile una riduzione della crescita fungina pari al 20% rispetto al testimone.

Per quanto riguarda *B.subtilis*, è stato escluso da tale prova perché i prodotti impiegati, essendo dei fungicidi, si presume che non abbiano effetto su tale BCA, solo al rame è riconosciuta un'attività batteriostatica che però è già conosciuta in *B.subtilis* (Weed, 1962; Yoon *et al.*, 2007).

3. RISULTATI

3.1 PROVA DI ANTAGONISMO *IN VITRO*

Gli 8 antagonisti saggiati hanno dimostrato una differente capacità antagonistica nei confronti di *B.cinerea*. A seguito dell'osservazione delle capsule Petri si sono potuti distinguere i diversi meccanismi con cui avviene l'antagonismo.

In particolare *B.subtilis* ha inibito il patogeno producendo bloccandone l'accrescimento a distanza.

T.viride ha mostrato una spiccata attività antagonistica, mediata da meccanismi diversi: a) inibizione a distanza; b) competizione per lo spazio; c) micoparassitizzazione delle ife del patogeno.

Sulla base della riduzione dello sviluppo di *B.cinerea* nelle prove in coltura duale *T.viride* e *B.subtilis* si sono rivelati gli agenti di biocontrollo maggiormente competitivi.

Le altre specie saggiate hanno evidenziato solamente la capacità di contenere lo sviluppo del patogeno a distanza, ma rispetto alla prova con *B.subtilis*, tale effetto risulta limitato (fig 14).

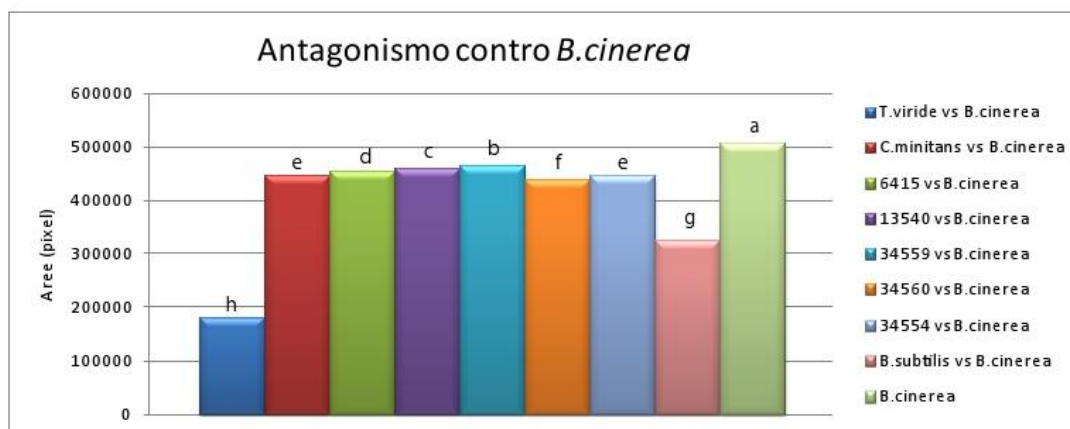


Figura 14. Confronto dello sviluppo di *B.cinerea* a cospetto dei vari antagonisti saggiati. I valori contrassegnati dalla medesima lettera, non sono diversi per $P=0,05$ al test di Duncan

3.2 PROVA DI CAMPO

3.2.1 ANDAMENTO CLIMATICO

L'andamento climatico durante i tre mesi di sperimentazione in campo è stato rilevato presso la stazione metereologica di San Pietro di Feletto (allegato 1).

L'analisi dei dati metereologici relativi all'estate 2009 e il loro confronto con la media storica (23,9 °C) mostra che le temperature minime e massime registrate sono state mediamente al di sopra del dato storico, mentre i valori di precipitazione stagionale sono stati complessivamente inferiori alla media.

Si rivela, inoltre, che in coincidenza con il primo trattamento si è verificato una pioggia di 22,2 mm, mentre agli interventi successivi non ha mai fatto seguito alcun evento piovoso.

3.2.2 DETERMINAZIONE DELLA MALATTIA

Dai risultati riportati in tabella 6 e dalla figura 15, si nota che in pre-chiusura grappolo in tutte le tesi, anche in quella trattata con il solo patogeno, non si è verificato alcun sviluppo di muffa grigia.

I rilievi successivi dimostrano invece che la malattia è progredita.

All'invasatura e in vendemmia, il testimone è stato caratterizzato da una forte e crescente incidenza della malattia che, ad esclusione del trattamento con *C.minitans*, è risultata significativamente maggiore di quella riscontrata nelle altre tesi

In queste ultime, la muffa grigia è comparsa all'invasatura, con valori tra loro non statisticamente diversi, solo nelle piante trattate con *A.zae* e *C.minitans*.

Nelle tesi con *B.subtilis* e *T.viride* non si è registrato sviluppo di malattia ad eccezione dell'ultimo campionamento in cui, però, i due antagonisti hanno ridotto l'incidenza della muffa grigia del 98% e del 79% , rispettivamente. Nelle viti trattate con *C.minitans* , invece, l'incidenza di malattia al momento della vendemmia è stata statisticamente non diversa di quella rilevata nel testimone.

TESI	INDICE DI INFEZIONE (I %)		
	PRE-CHIUSURA	INVAIATURA	VENDEMMIA
<i>B.cinerea</i> (T)	0 a	42,6 a	74 a
<i>T.viride</i> vs <i>B.cinerea</i>	0 a	0 c	1,33 c
<i>A.zeae</i> vs <i>B.cinerea</i>	0 a	13,33 b	20,66 b
<i>B.subtilis</i> vs <i>B.cinerea</i>	0 a	0 c	15,33 b
<i>C.minitans</i> vs <i>B.cinerea</i>	0 a	21,33 b	53,33 a

Tabella 6. Indice di infezione % di muffa grigia nella prova di campo

I dati, divisi in colonne, contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono statisticamente fra loro al test di Duncan (P=0,05)

Per rendere più facilmente interpretabile la tabella 6, dai dati in essa contenuti è stato ricavato il grafico in figura 15.

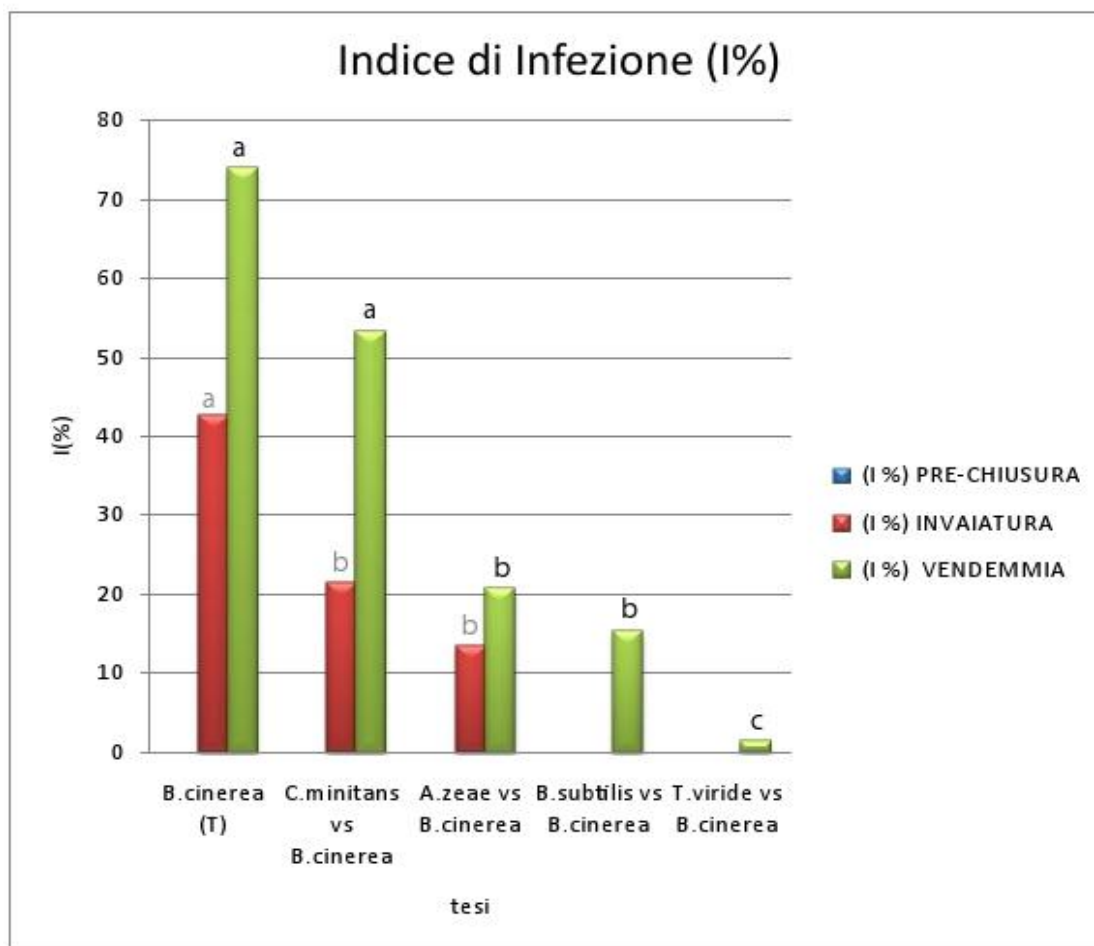


Figura 15. Indice di Infezione nei rilevamenti effettuati durante la prova di campo. I dati del rilevamento in pre-chiusura mancano perché non è stata rilevata alcuna incidenza di malattia.

I valori, divisi per campionamento, aventi lo stesso simbolo non sono diversi per P=0,05 al test di Duncan

3.2.3 QUANTIFICAZIONE DELL'INOCULO

Dalla quantificazione dell'inoculo presente nei diversi campioni alle diverse epoche d'intervento è emerso che *B.cinerea* non si è sviluppata nelle tesi trattate con *T.viride* e *B.subtilis* mentre nelle altre prove è stata rilevata una presenza a diversi livelli patogeno. Ciò è visibile nelle fig. 16,17,18 che sono state prodotte dai dati ottenuti dalla MPN, ma suddivisi per epoca d'intervento in modo da facilitarne la comprensione.

Nella tesi con *A.zaeae* lo sviluppo dell'antagonista ha limitato la carica del patogeno portandolo a valori significativamente inferiori rispetto al testimone.

Nella tesi trattata con *C.minitans* non è mai stata rilevata la presenza dell'antagonista, mentre si è notato un maggiore sviluppo di *B.cinerea* rispetto alle altre tesi e nei rilievi effettuati alle epoche B1, B2 e C2, per questa tesi, è stato registrato un numero di CFU/g di *B.cinerea* statisticamente non diverso dal testimone.

Ad ogni rilevamento, la presenza di *B.cinerea* è stata accompagnata dalla comparsa di altri funghi appartenenti ai generi *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria* e *Fusarium*.

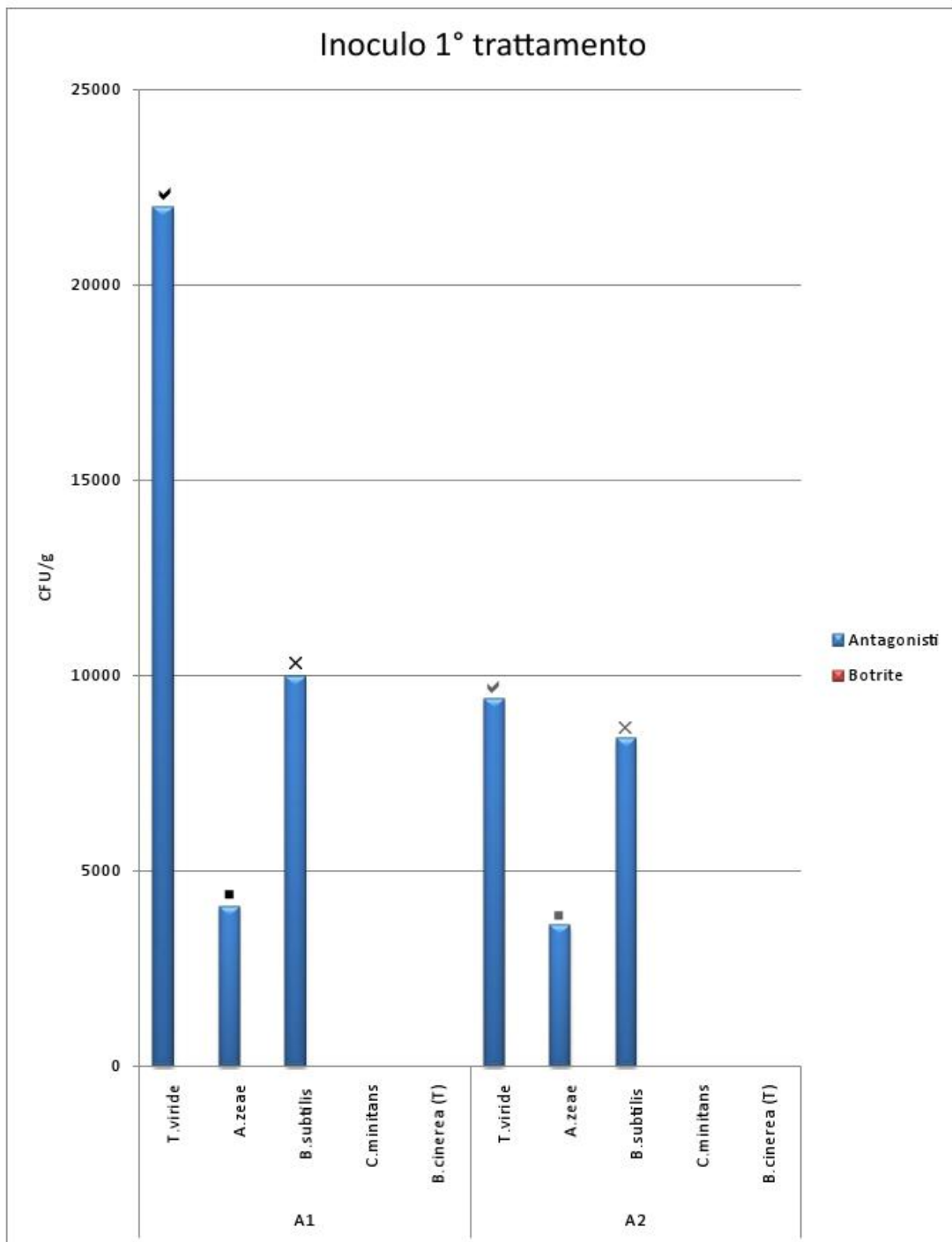


Figura 16. Grafico relativo all'inoculo in CFU/g dopo il 1° trattamento. Al terzo giorno (A1) e al decimo giorno (A2). I valori, divisi in A1 e A2 aventi lo stesso simbolo non sono diversi per $P=0,05$ al test di Duncan

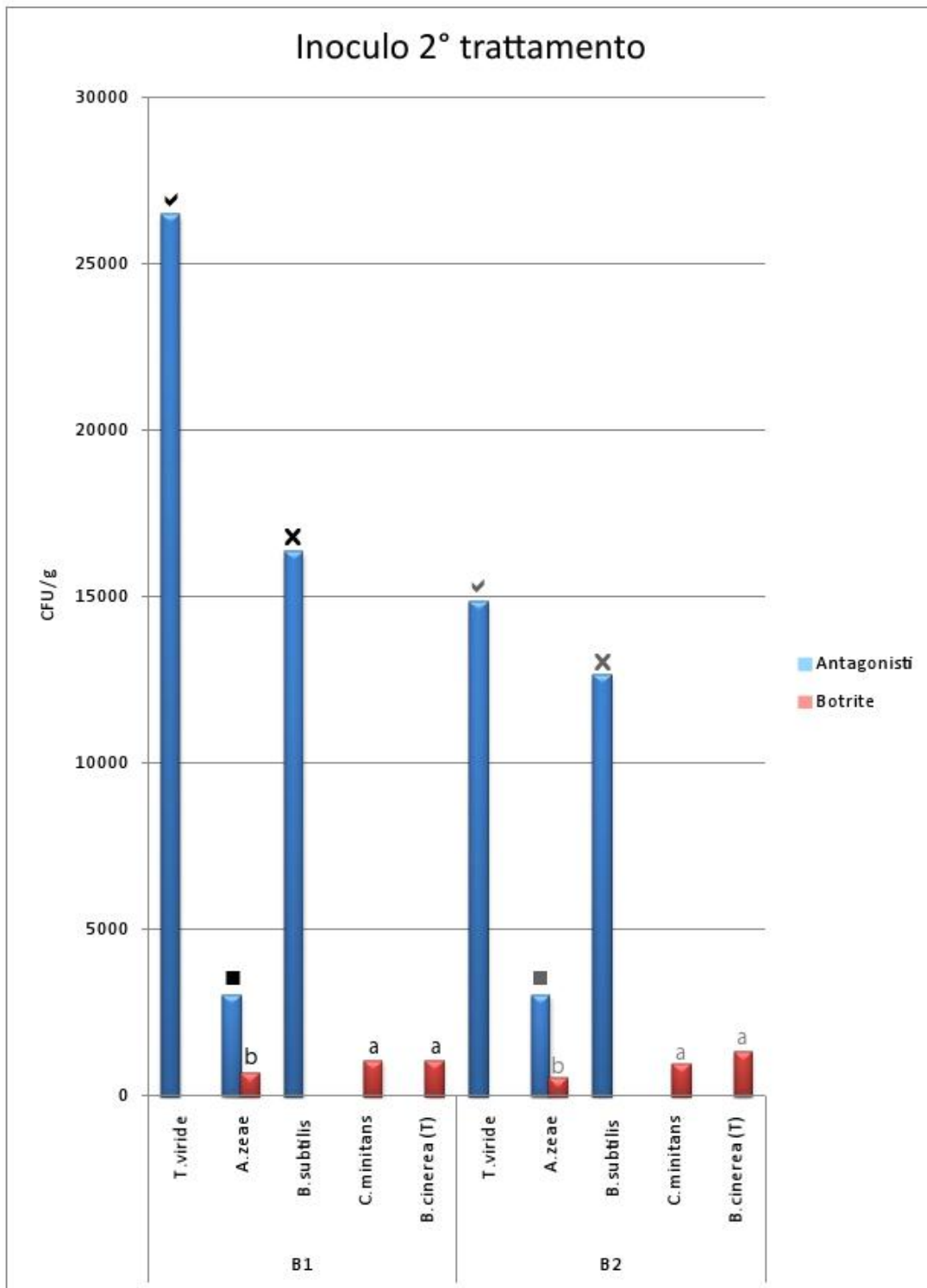


Figura 17. Grafico relativo all'inoculo in CFU/g dopo il 2° trattamento. Al terzo giorno (B1) e al decimo giorno (B2). I valori, divisi in A1 e A2 aventi lo stesso simbolo/lettera non sono diversi per $P=0,05$ al test di Duncan

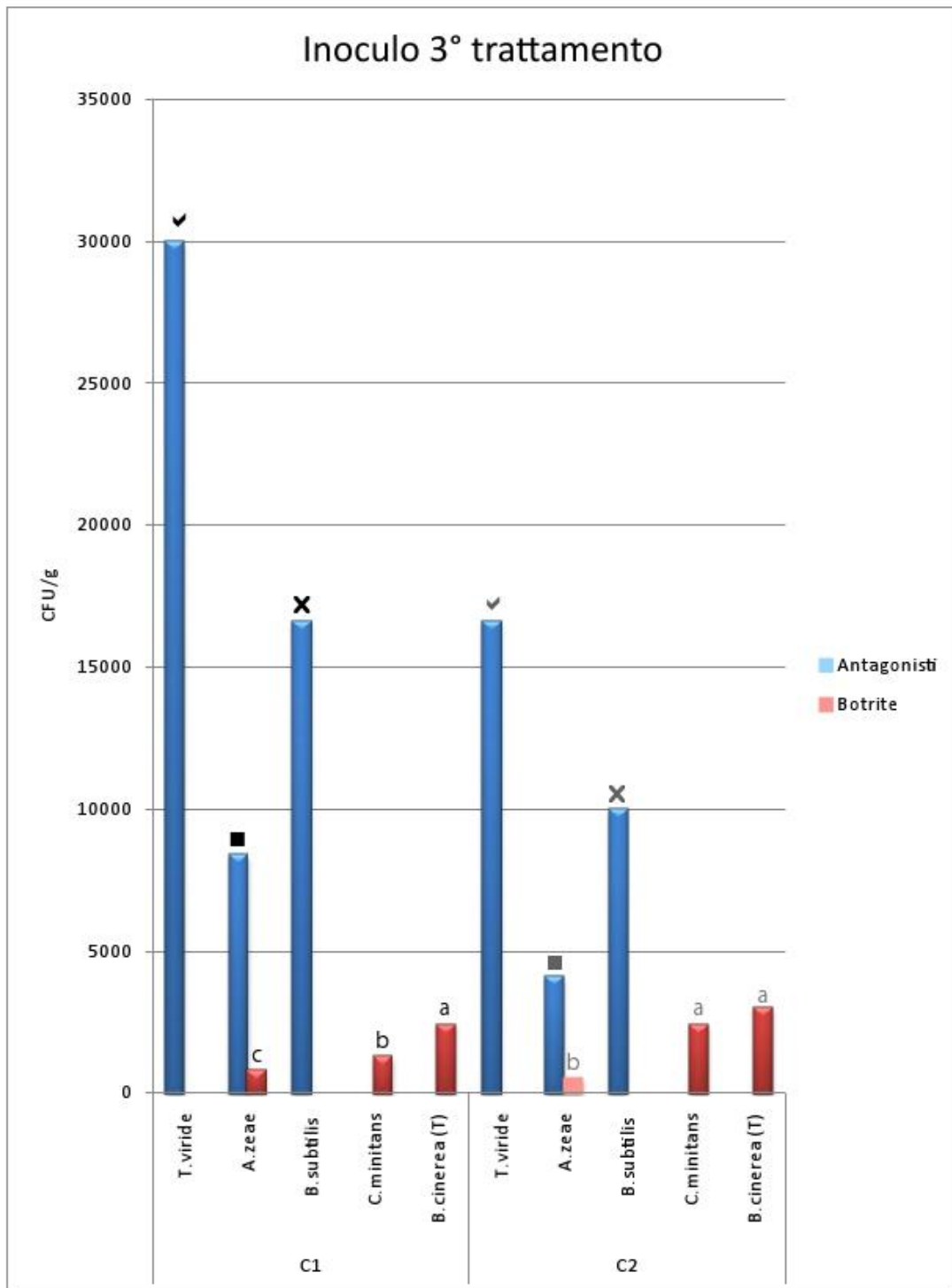


Figura 18. Grafico relativo all'inoculo in CFU/g dopo il 3° trattamento. Al terzo giorno (C1) e al decimo giorno (C2). I valori, divisi in A1 e A2 aventi lo stesso simbolo/lettera non sono diversi per $P=0,05$ al test di Duncan

Per rendere più facilmente interpretabile la cinetica delle popolazioni dei diversi antagonisti e di *B.cinerea* nell'arco dell'intera durata della prova di campo è stato costruito il grafico in figura 19 raggruppando i dati dei grafici in figura 16,17 e 18.

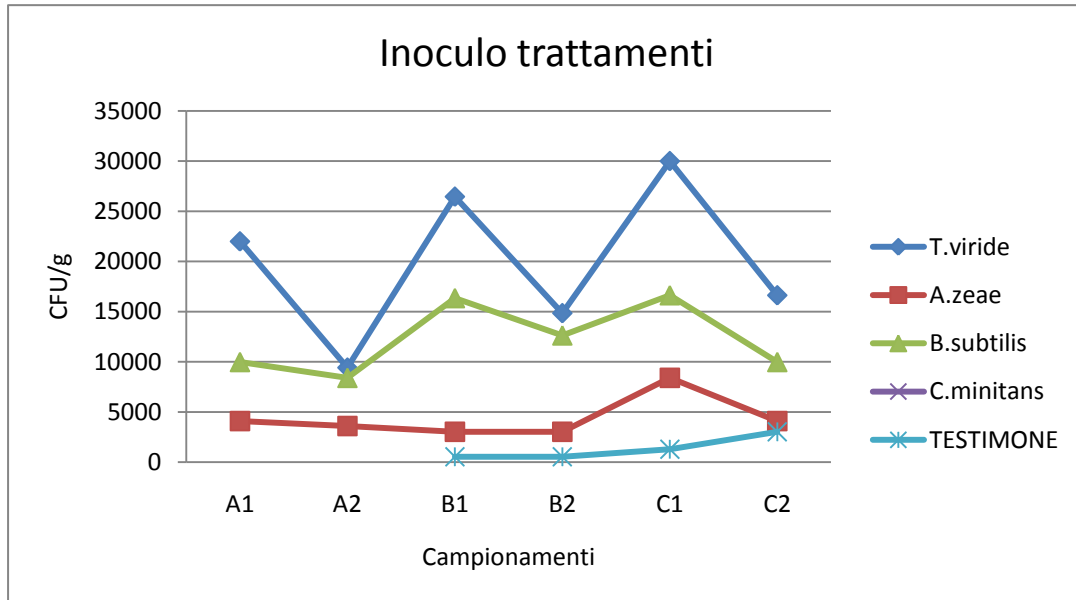


Figura 19. Densità d'inoculo di ciascun antagonista e di *B.cinerea* rilevate ai diversi campionamenti : A1 campione preso dopo 3 giorni dal primo trattamento; A2 campione preso dopo 10 giorni dal primo trattamento; B1 campione preso dopo 3 giorni dal secondo trattamento; B2 campione preso dopo 10 giorni dal secondo trattamento; C1 campione preso dopo 3 giorni dal terzo trattamento; C2 campione preso dopo 10 giorni dal terzo trattamento.

Per ogni epoca di trattamento e per ciascun BCA, nel secondo rilievo si osserva una diminuzione dell'inoculo.

La tesi con *T.viride* ha registrato il tenore di CFU/g più elevato; mentre la presenza di *B.subtilis* nel grappolo è risultata con valori intermedi in tutti i campionamenti, *A.zee* è sempre rimasto su concentrazioni più basse rispetto agli altri antagonisti, tanto da approssimarsi al livello di *B.cinerea* nell'ultimo campionamento (C2).

Nonostante ciò *T.viride* aumenta la sua presenza mentre *B.subtilis* e *A.zee* tendono a diminuire in prossimità della vendemmia, manifestando minori variazioni tra il primo ed il secondo rilievo a ciascuna epoca di trattamento.

Come già riportato *C.minitans* si è sempre mantenuto al di sotto della soglia di quantificazione e la popolazione di *B.cinerea* è andata crescendo nel tempo.

3.3 DETERMINAZIONE DELLA CMI

Qui di seguito vengono riportati i grafici delle curve di mortalità di ogni tesi.

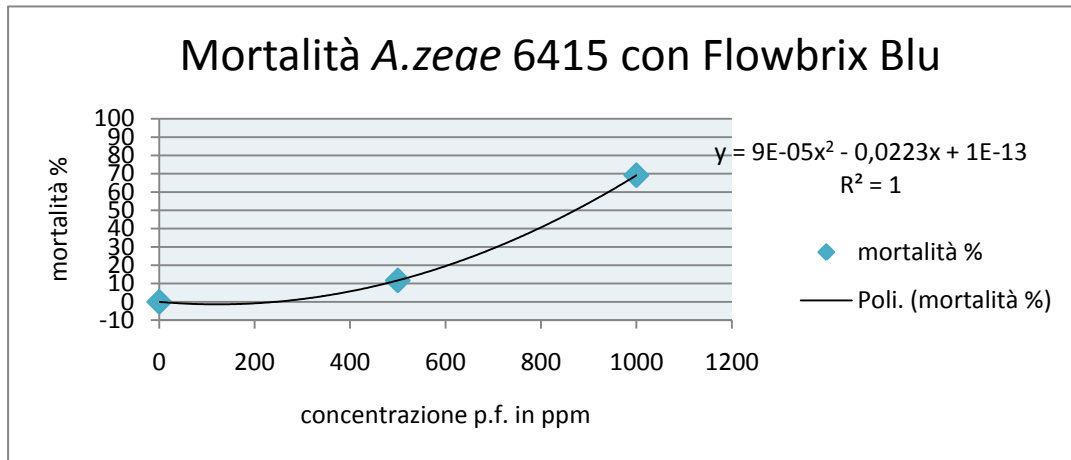


Figura 20. Grafico della mortalità di *A.zeae* 6415 rispetto al Flowbrix Blu.

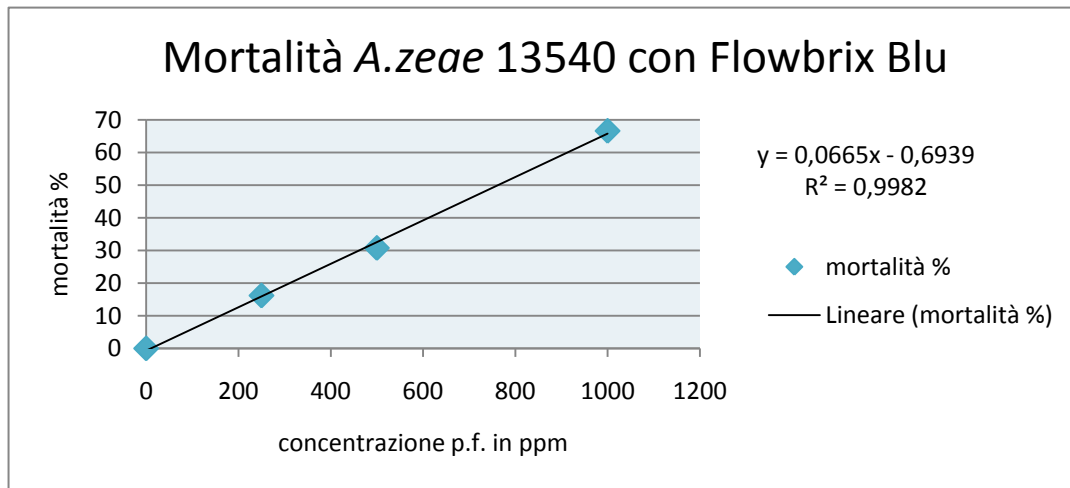


Figura 21. Grafico della mortalità di *A.zeae* 34554 rispetto al Flowbrix Blu.

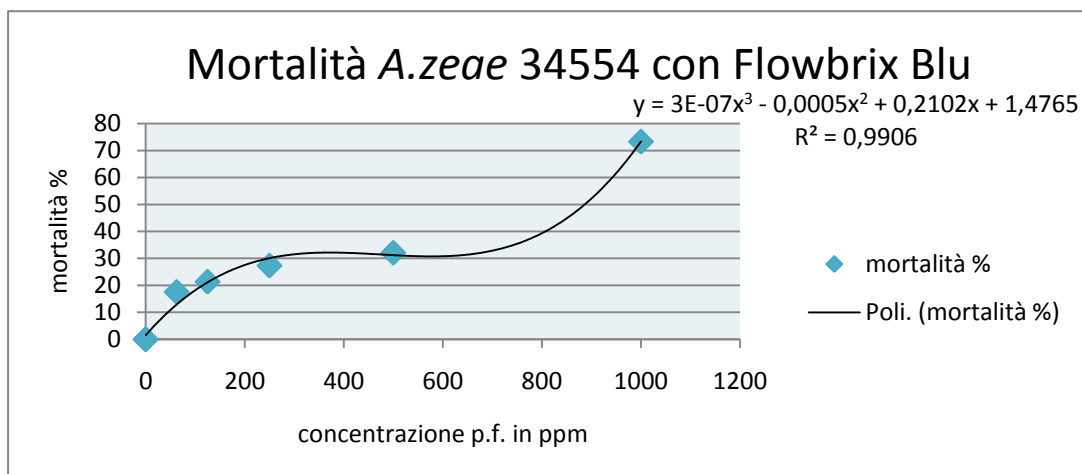


Figura 22. Grafico della mortalità di *A.zeae* 13540 rispetto al Flowbrix Blu.

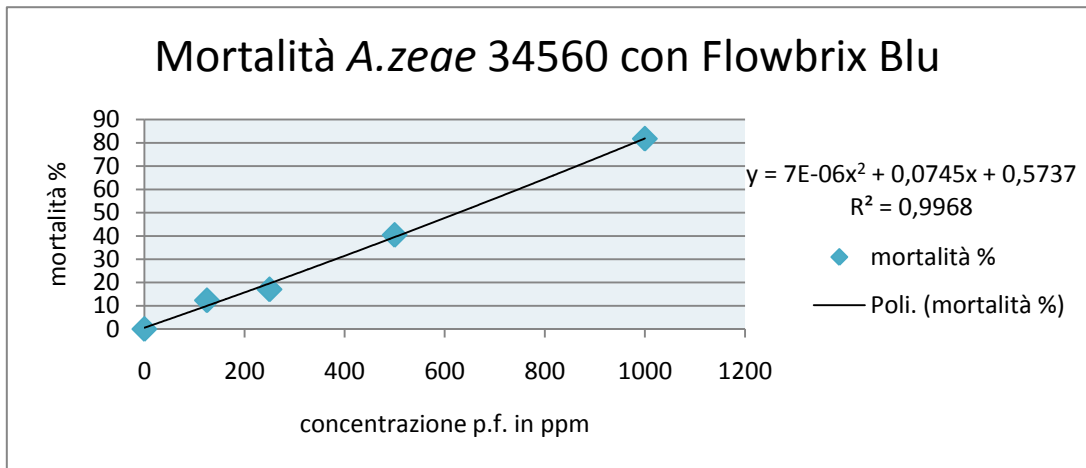


Figura 23. Grafico della mortalità di *A.zeae* 34560 rispetto al Flowbrix Blu.

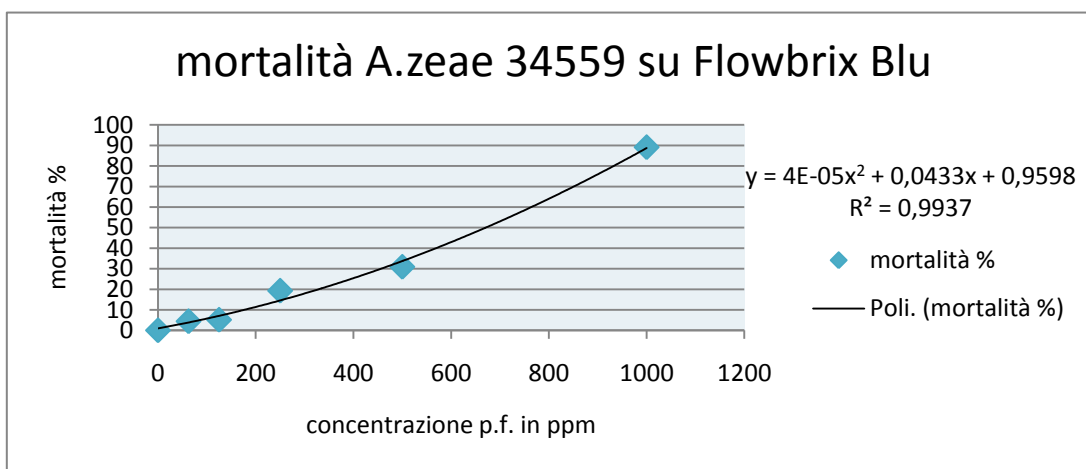


Figura 24. Grafico della mortalità di *A.zeae* 34559 rispetto al Flowbrix Blu.

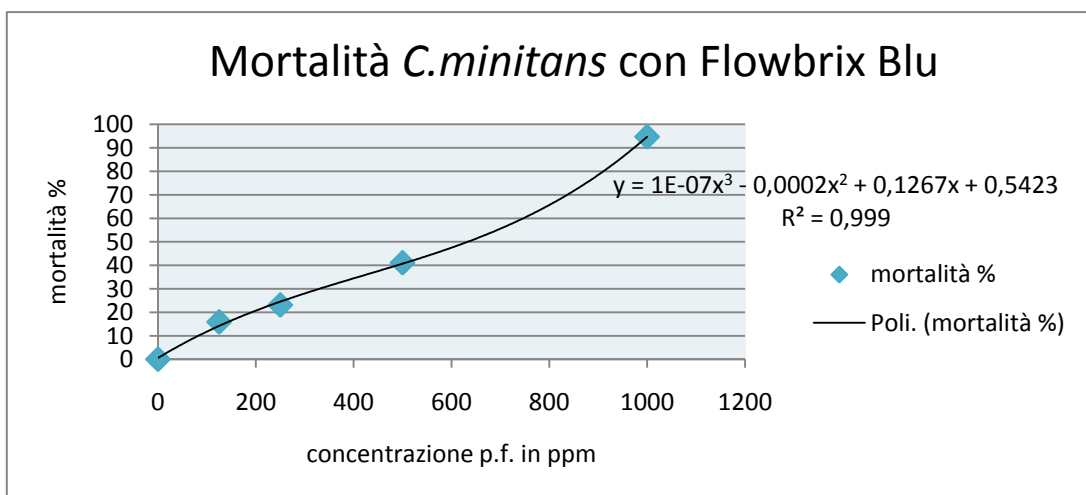


Figura 25. Grafico della mortalità di *C.minitans* rispetto al Flowbrix Blu.

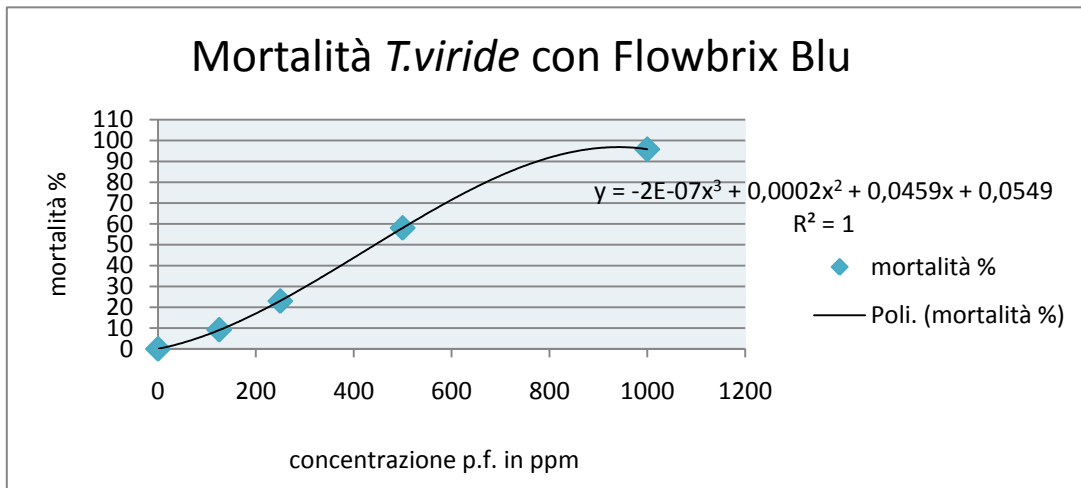


Figura 26. Grafico della mortalità di *T.viride* rispetto al Flowbrix Blu.

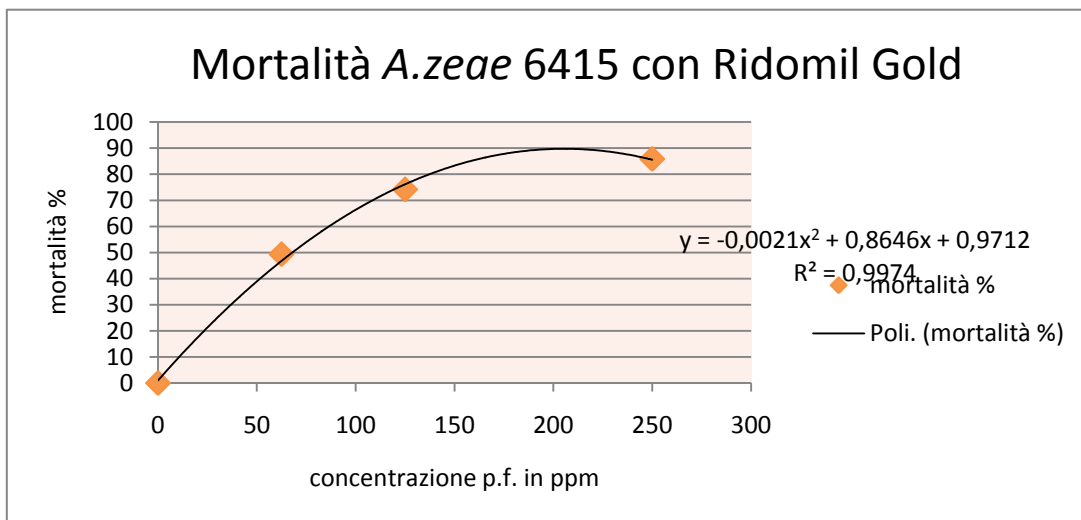


Figura 27. Grafico della mortalità di *A.zeae* 6415 rispetto al Ridomil Gold.

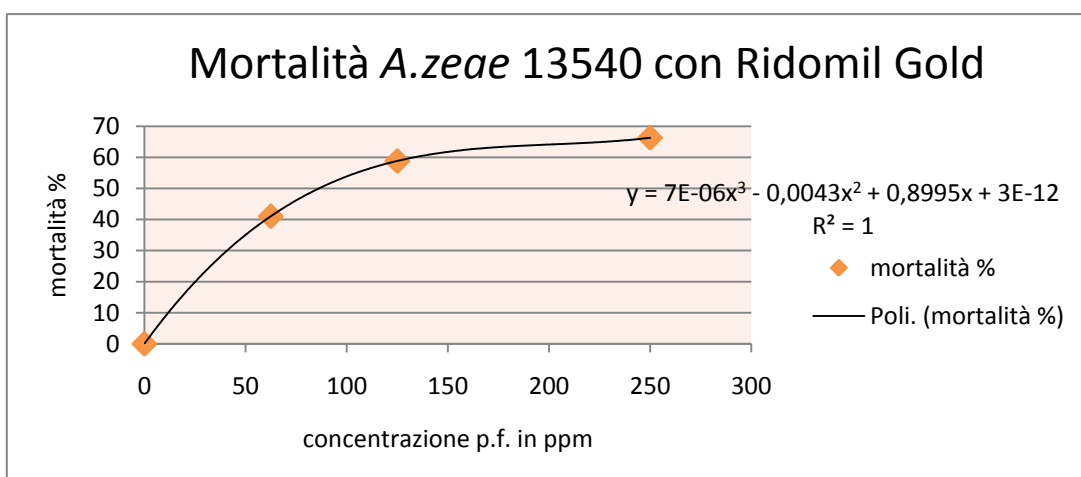


Figura 28. Grafico della mortalità di *A.zeae* 13540 rispetto al Ridomil Gold.

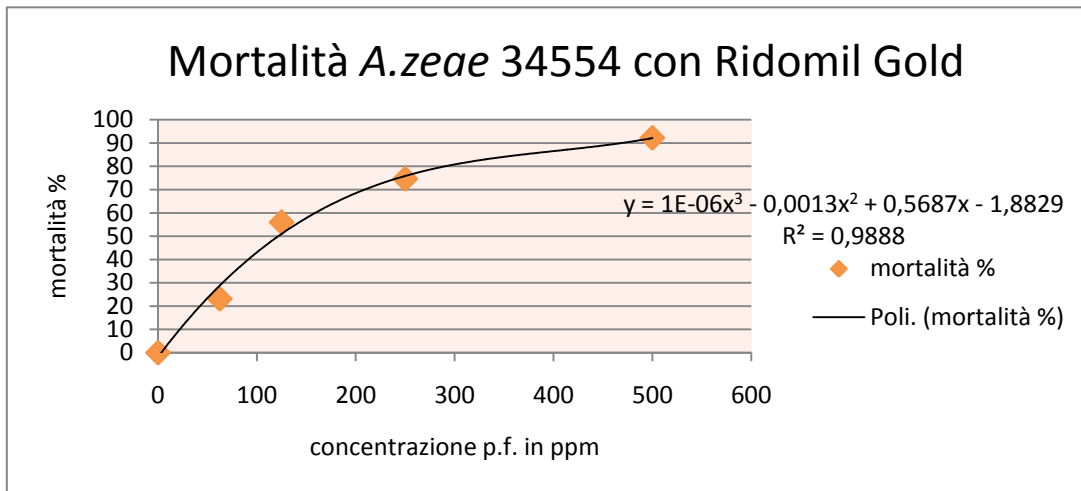


Figura 29. Grafico della mortalità di *A.zeae* 34554 rispetto al Ridomil Gold.

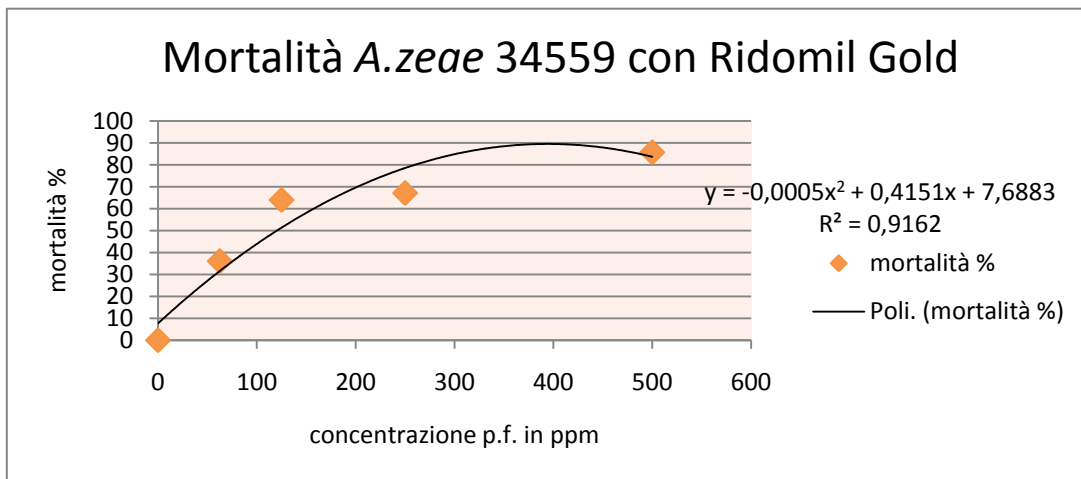


Figura 30. Grafico della mortalità di *A.zeae* 34559 rispetto al Ridomil Gold.

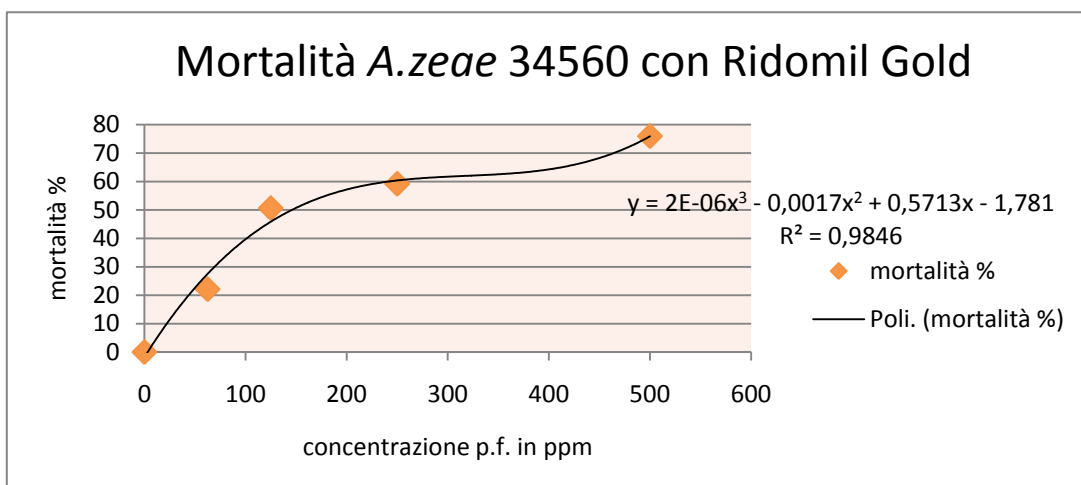


Figura 31. Grafico della mortalità di *A.zeae* 34560 rispetto al Ridomil Gold

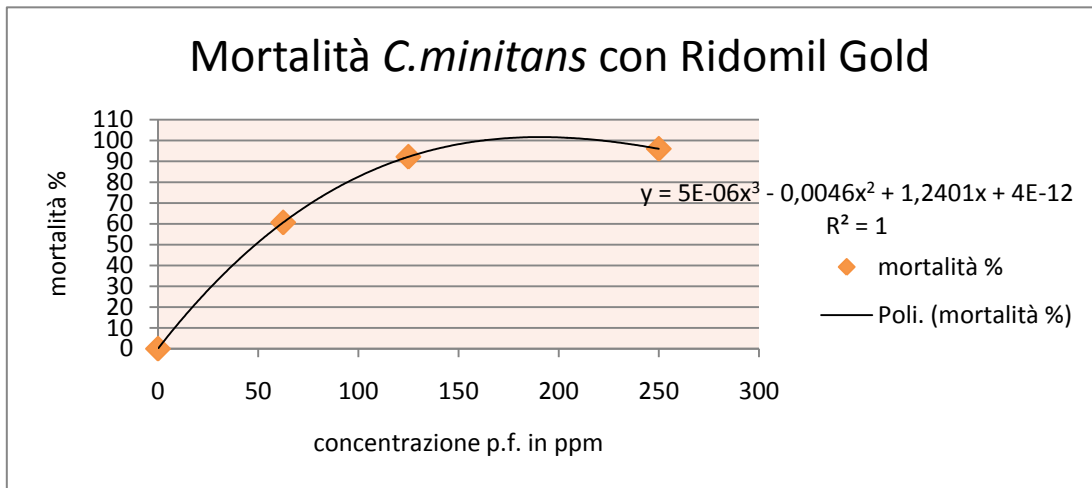


Figura 32. Grafico della mortalità di *C.minitans* rispetto al Ridomil Gold

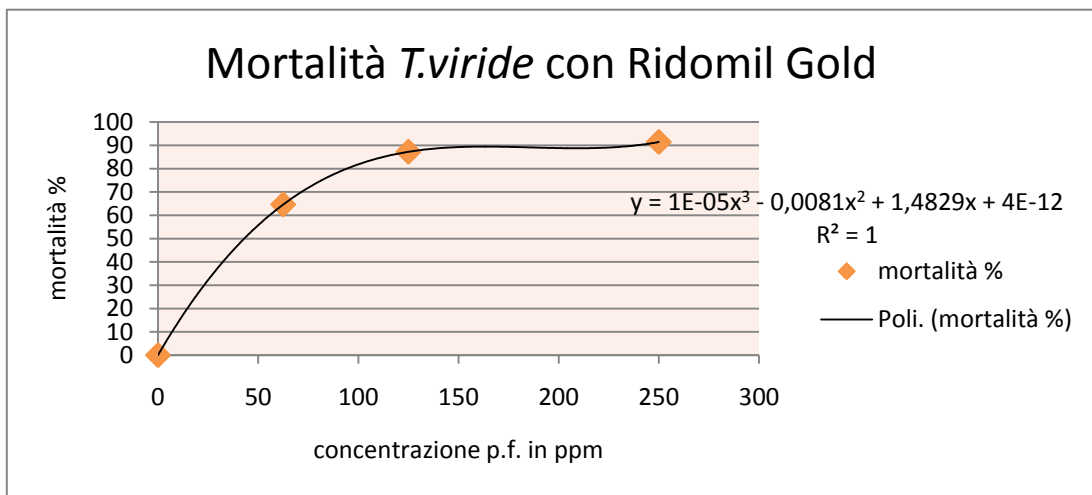


Figura 33. Grafico della mortalità di *T.viride* rispetto al Ridomil Gold

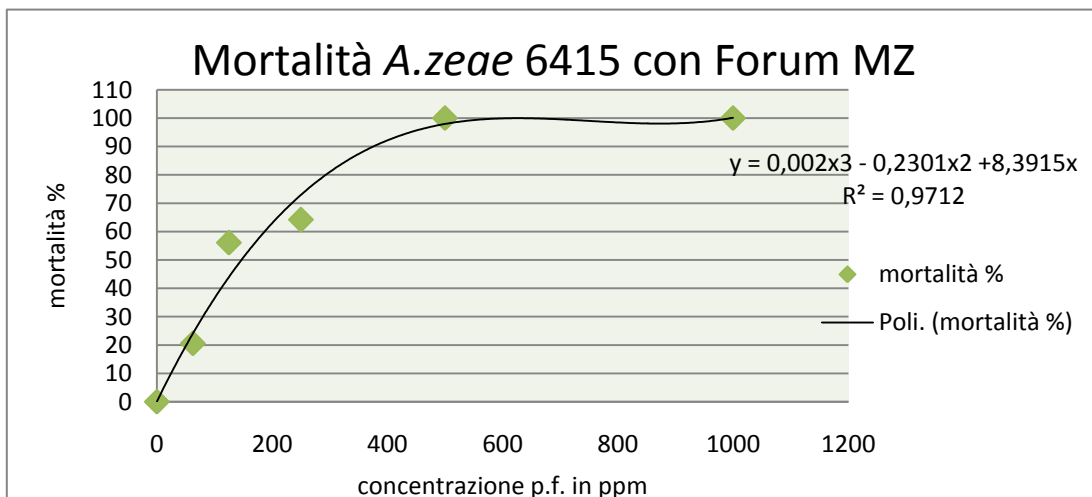


Figura 34. Grafico della mortalità di *A.zaeae* 6415 rispetto al Forum MZ

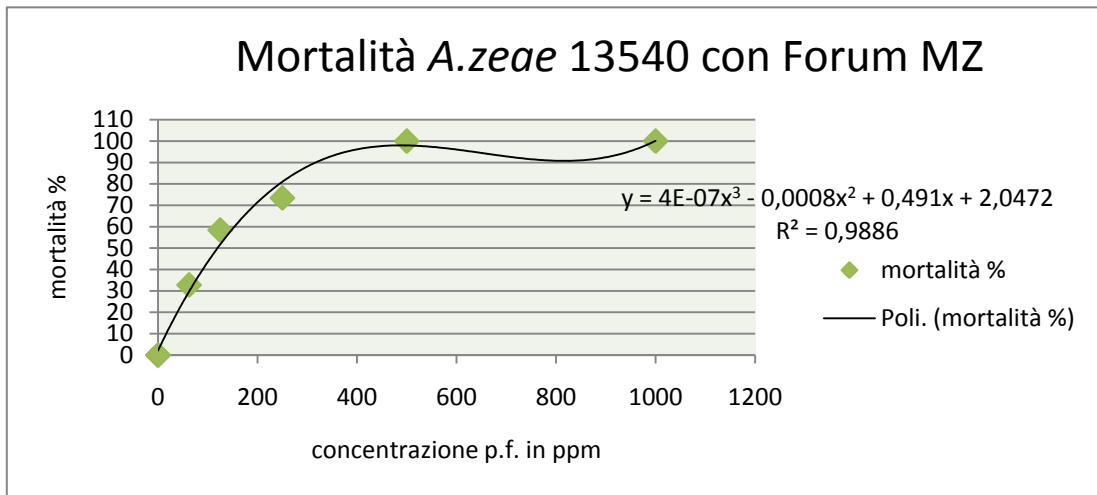


Figura 35. Grafico della mortalità di *A.zaeae* 13540 rispetto al Forum MZ

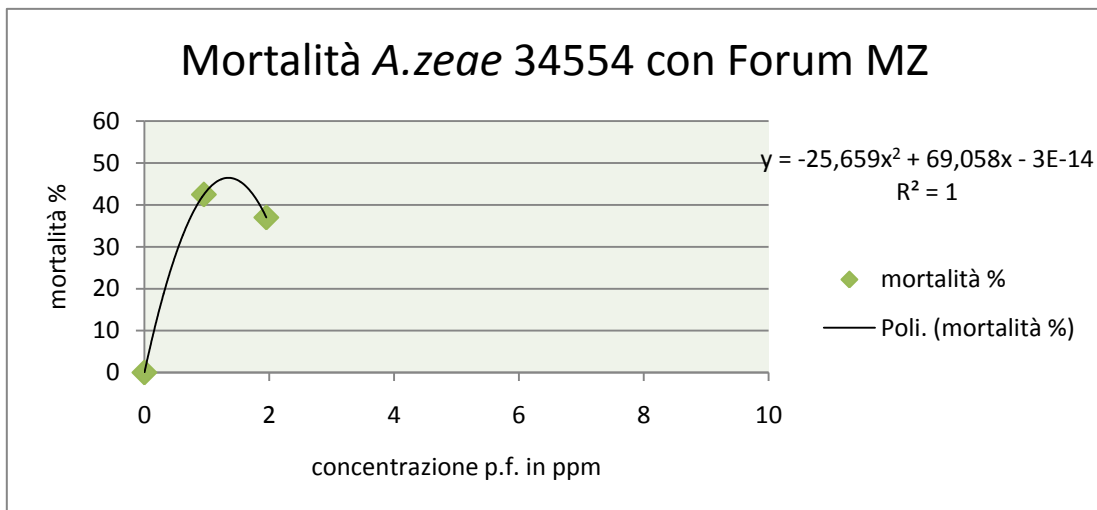


Figura 36. Grafico della mortalità di *A.zaeae* 34554 rispetto al Forum MZ

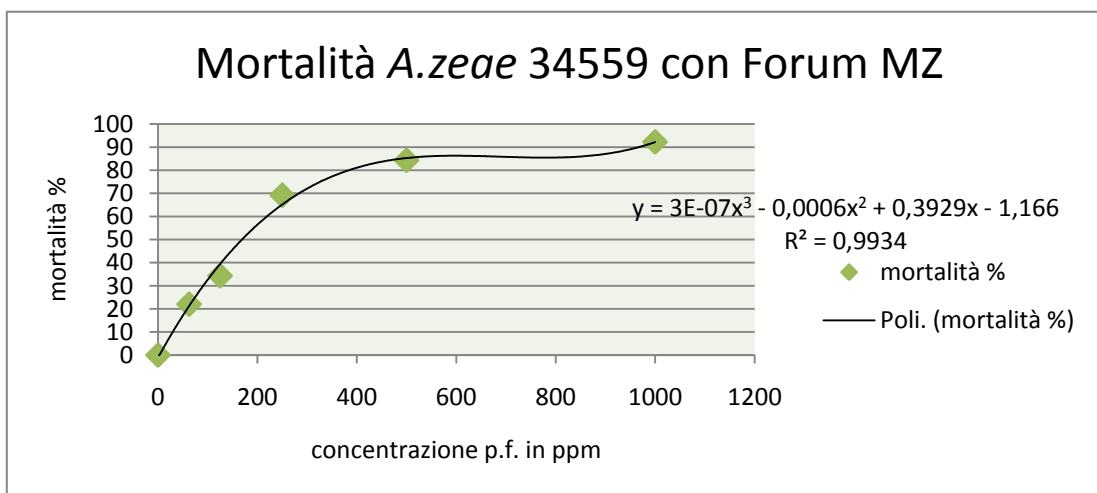


Figura 37. Grafico della mortalità di *A.zaeae* 34559 rispetto al Forum MZ

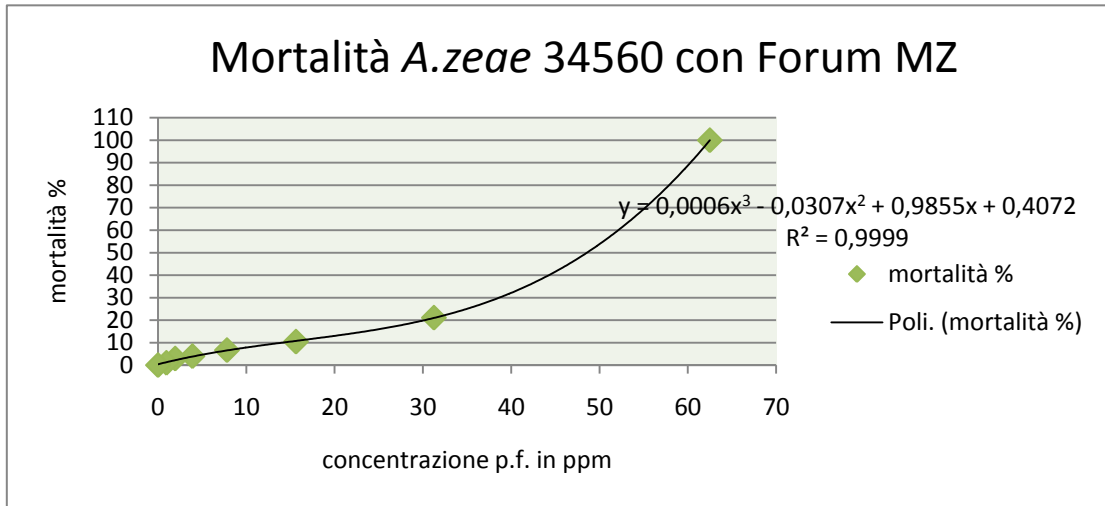


Figura 38. Grafico della mortalità di *A.zeae* 34560 rispetto al Forum MZ

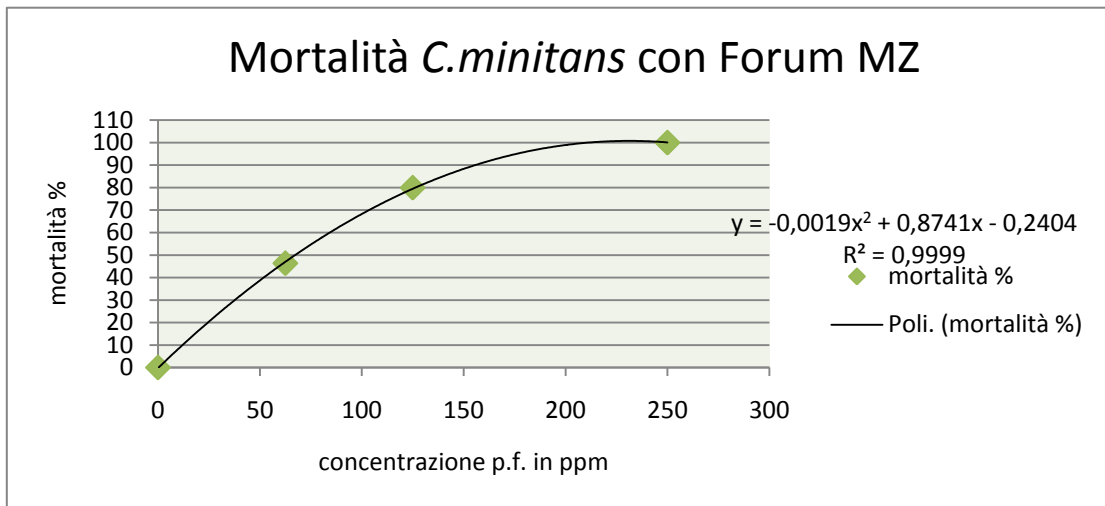


Figura 39. Grafico della mortalità di *C.minitans* rispetto al Forum MZ

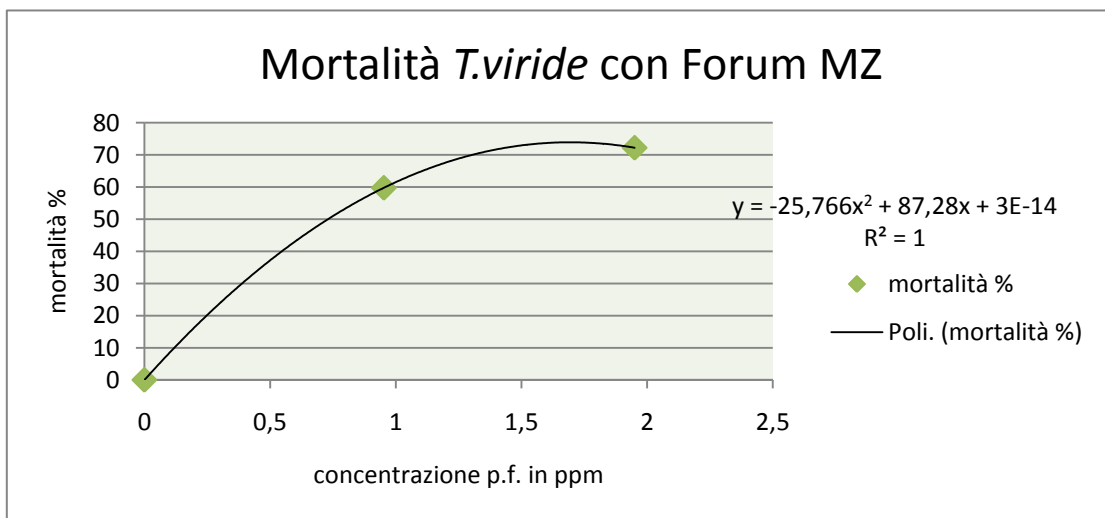


Figura 40. Grafico della mortalità di *T.viride* rispetto al Forum MZ

I dati sulle concentrazioni minime inibitrici ai tre prodotti fitosanitari saggiati sono visibili nella tabella 7.

Prodotti fitosanitari	<i>T.viride</i>	<i>C.minitans</i>	<i>A.zeae</i> 6415	<i>A.zeae</i> 13540	<i>A.zeae</i> 34554	<i>A.zeae</i> 34559	<i>A.zeae</i> 13560
Flowbrix Blu	2,3e	1,858f	6,048a	3,112c	1,106g	3,3b	2,51d
Ridomil Gold	0,52a	0,18f	0,23e	0,32d	0,4c	0,31d	0,47b
Forum MZ	0,003f	0,24e	0,63a	0,35c	0,0036f	0,56b	0,3d

Tabella 7. CMI in ppm dei tre prodotti fitosanitari saggiati rispetto gli antagonisti fungini impiegati nella prova di campo.

I valori della stessa riga contrassegnati dalla medesima lettera, non sono diversi per $P=0,05$ al test di Duncan

Per rendere più facilmente interpretabile la tabella 7, dai dati in essa contenuti è stato ricavato il grafico in figura 41. Si può notare che c'è una differenza evidente tra Flowbrix Blu e gli altri due prodotti: mentre i valori delle

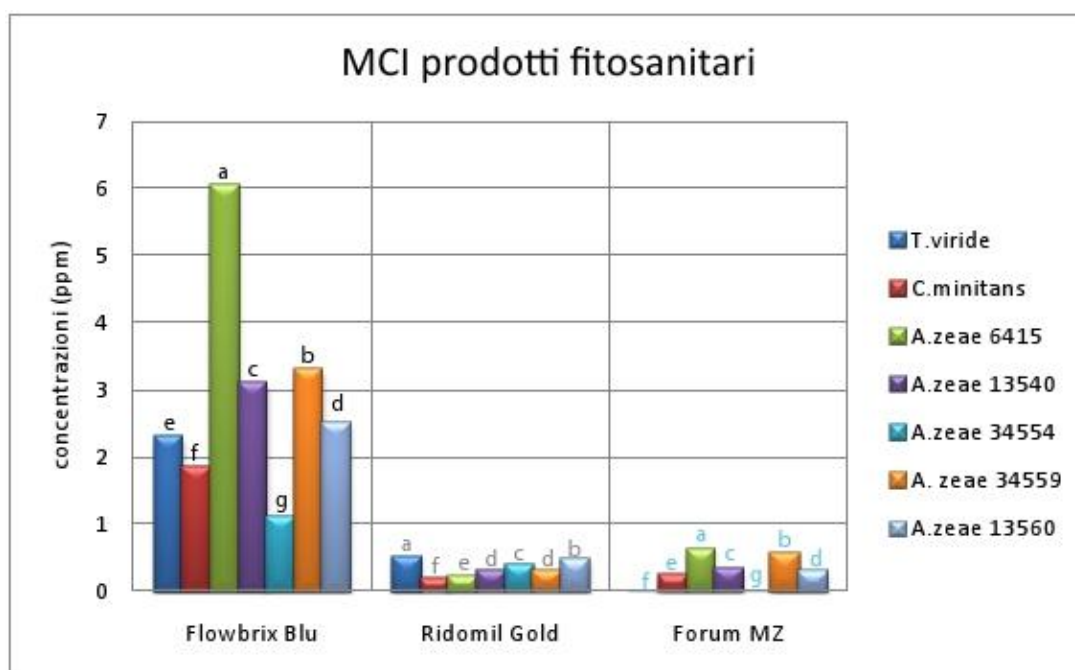


Figura 41. Istogramma delle CMI dei tre prodotti fitosanitari messe a confronto rispetto i vari antagonisti. I valori, divisi per prodotto fitosanitario, aventi lo stesso simbolo/lettera non sono diversi per $P=0,05$ al test di Duncan

CMI di Ridomil Gold e Forum MZ si attestano al di sotto di 1 ppm, per Flowbrix sono sempre superiori all'unità, con un massimo di 6,048 ppm.

Forum MZ è il prodotto fitosanitario meno tollerato riuscendo a ridurre l'accrescimento fungino già a dosi di 0,003 ppm.

I ceppi di *A.zeae* presentano molta eterogeneità nella sensibilità ai prodotti fitosanitari soprattutto rispetto il Flowbrix blu.

T.viride esprime una buona tolleranza per il prodotto rameico e per il prodotto a base di metalaxil e folpet, mentre è inibito fortemente dalla miscela di mancozeb + dimetomorf già a dosi di 0,003 ppm.

C.minitans e il ceppo di *A. zeae* 34554 sono risultati i BCA mediamente più sensibili ai tre prodotti fitosanitari saggiati.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dagli anni '60 in poi, le direttive ed i regolamenti europei riguardanti la produzione, la vendita e l'impiego dei pesticidi, hanno disciplinato progressivamente in modo sempre più rigido l'applicazione dei prodotti utilizzati per la protezione delle piante; ciò allo scopo di tutelare sempre più la salute degli esseri viventi e dell'uomo in modo specifico, nonché la biodiversità e l'ambiente nel suo complesso. Infatti, nel recente passato l'uso dei prodotti fitosanitari, oltre all'incremento delle rese e della qualità delle colture, ha portato all'inquinamento del suolo e delle falde acquifere e ad una riduzione e mutazione della componente biologica dell'ecosistema a causa della perdita o del calo di presenza di alcuni organismi tra cui microrganismi e insetti utili (Barnett *et al.*, 1995). Inoltre, la distribuzione generalizzata e poco attenta di molecole non sufficientemente conosciute per i loro effetti nocivi ha aumentato nel tempo il rischio di intossicazioni acute e croniche per l'uomo: per l'agricoltore che direttamente applica i prodotti fitosanitari, per coloro che risiedono nelle vicinanze dei siti di applicazione e per il consumatore, a causa della potenziale presenza di residui dei prodotti utilizzati per la difesa negli alimenti consumati (Steiner, 1995). Per tali ragioni la Commissione Europea e i vari stati nazionali che ne fanno parte, sono impegnati in iniziative che si propongono la riduzione dell'uso dei prodotti fitosanitari di sintesi e, collaborando con gli enti di ricerca indirizzano la sperimentazione verso alternative valide ed efficienti per la protezione delle colture. L'imminente entrata in vigore della 2009/128/CE che delinea le azioni da porre in atto per promuovere un utilizzo sostenibile dei pesticidi, ci pone di fronte a importanti cambiamenti che devono essere messi in atto in breve tempo. La legislazione prevede, tra le varie cose: la riduzione o il divieto dell'applicazione di prodotti fitosanitari in aree ad alto rischio di inquinamento ambientale (strade, linee ferroviarie, vicino a corsi d'acqua, etc.) o di alto rischio d'esposizione da parte dell'uomo (parchi, giardini, aree ricreative, etc.); l'uso di prodotti meno pericolosi, ove possibile; la creazione di zone di rispetto per limitare l'inquinamento da deriva; il controllo periodico delle attrezzature impiegate per effettuare i trattamenti. Oltre a ciò una particolare attenzione viene rivolta alla formazione di chi distribuisce i prodotti fitosanitari e di chi ne fa uso per quanto riguarda i pericoli ed i rischi

associati al loro impiego, nonché le modalità di identificazione e controllo degli stessi.

Tutto ciò porterà a limitazioni nella disponibilità e possibilità di utilizzo dei prodotti fitosanitari di natura chimica, che in parte sono già evidenti. Questo fatto, unito alla necessità di individuare possibilità di difesa diverse dal mezzo chimico, rende indispensabile ed urgente accelerare le ricerche nell'ambito dei sistemi alternativi di lotta.

Fra le possibili alternative all'uso dei prodotti di sintesi, la più promettente sembra essere l'utilizzo degli agenti di biocontrollo.

Per quanto riguarda la vite, in letteratura si trova un discreto numero di studi sul biocontrollo nei quali si riporta la possibilità d'impiego di alcuni antagonisti efficaci nella lotta biologica contro le malattie fungine. Ad esempio è stato visto che *T.harzianum* è in grado di contrastare lo sviluppo di *Plasmopara viticola* e *B.cinerea* in modo efficace riuscendo a ridurre rispettivamente del 60% e del 36,3 % tali malattie (Perezoli *et al.*, 2008; O'Neil *et al.*, 1996); *A.quiqualis* risulta essere un efficiente antioidico, riducendo le infezioni di *Uncinula necator* fino al 90% (Zanzotto, 2005) infine *B.subtilis* ha dimostrato di avere un grande spettro d'azione riducendo l'incidenza di *B.cinerea* del 52%, di *Plasmopara viticola* del 61%, di *Phomopsis viticola* del 51% e di *Uncinula necator* del 58 % (Shilder *et al.*, 2002).

In Italia sono in commercio da tempo alcuni prodotti a base di microrganismi; tra cui ricordiamo il Trichodex® (Intrachem Bio Italia S.p.a) a base di *Trichoderma harzianum* T39, selezionato in Israele da Elad *et al.* nel 1994 e il Serenade® contenente *Bacillus subtilis* QST-713, messo a punto in California dagli scienziati dell'AgraQuest nel 2000, proposti per il controllo di *B.cinerea* e l'AQ10® a base di *Ampelomyces quisqualis* (Intrachem Bio Italia S.p.a) classificato tra gli antioidici.

I vantaggi individuati, nell'applicazione di tali agenti come alternativa al mezzo chimico, sono molteplici:

- I BCA riducono il rischio ambientale provocato dalle sostanze di sintesi essendo più compatibili con l'ambiente ed essendo caratterizzati da un profilo tossicologico molto favorevole riducono gli impatti negativi sulla fertilità del terreno e il pericolo della perdita della biodiversità;

- I BCA riducono il rischio di intossicazione per l'agricoltore e in generale i rischi di esposizione per il cittadino, poiché sono scelti tra quelli che non producono sostanze tossiche per l'uomo;
- I BCA riducono il rischio alimentare per il consumatore dal momento che non lasciano residui sui prodotti destinati al consumo, aumentando le qualità e la salubrità dei prodotti;
- I BCA possono prevenire i danni economici indiretti relativi all'uso dei prodotti fitosanitari di natura chimica abbattendo il costo sociale derivante dall'inquinamento provocato da questi ultimi.

L'efficacia dei microrganismi però non è paragonabile a quella dei prodotti di sintesi. L'effetto delle molecole sintetiche non è o è pochissimo influenzato dalle condizioni ambientali (es. umidità e temperatura), viceversa i BCA per ottenere l'effetto voluto devono arrivare vitali sulla pianta per poi svilupparsi su di essa e qui esprimere la propria azione antagonista; pertanto le tecniche di distribuzione e le condizioni d'uso possono influenzarne pesantemente l'efficacia fino a ridurla completamente. Quindi l'impiego di BCA richiede una maggiore professionalità, la conoscenza dei meccanismi che avvengono durante il biocontrollo e l'influenza dei fattori ambientali che intervengono su esso.

In viticoltura, in funzione di una riduzione del consumo di pesticidi, l'impiego di BCA può essere considerato nel controllo di malattie endemiche, delle quali si può tollerare una presenza, purchè esse rimangano sotto una soglia di danno accettabile.

Tra queste malattie, una delle più importanti è senza dubbio la muffa grigia.

Le prove svolte nel corso del presente lavoro confermano questa possibilità.

I saggi di laboratorio hanno evidenziato una grande capacità di *B.subtilis* di ridurre la crescita del patogeno a distanza. Tale effetto trova conferma in quanto riportato in letteratura a proposito della elevata capacità di *B.subtilis* di produrre metaboliti secondari ad azione antifungina, in particolare lipopeptidi ciclici (LP) appartenenti alle famiglie della *surfactina*, *iturina* e *fengicina* (o *plipastatina*) (Tsuge *et al.*, 1999; Bonmatin *et al.*, 2003; Stein, 2005; Ongena e Jacques, 2007).

I risultati ottenuti dalla coltura duale di *T.viride*-*B.cinerea* hanno dimostrato un'efficiente controllo del patogeno da parte dell'antagonista, soprattutto mediante la colonizzazione di gran parte del terreno di coltura e la sovrapposizione del micelio del BCA a quello del patogeno; il fenomeno di coiling sulle ife di *B.cinerea*

osservato nel corso della prova fa supporre, in accordo con quanto dimostrato in diversi lavori (Haran *et al.*, 1996; Agrois, 1998; Elad e Kapat, 1999; Ait-Lahsen *et al.*, 2001), che il BCA abbia agito come iperparassita.

L'inibizione a distanza verificatasi in alcune aree della piastra, ha contribuito, sebbene in minor entità, all'effetto antagonistico e fa supporre che, seppure in modo limitato sia stato presente un antagonismo basato sulla produzione di sostanze ad effetto antibiotico.

Questo fenomeno è già stato descritto in *Trichoderma spp.* (Elad, 2000; Vinale, 2007) nell'ambito dell'antibiosi e della degradazione degli enzimi secreti dal patogeno.

La prova di antagonismo di *A.zeae* e *C.minitans* nei confronti di *B.cinerea* non ha fornito risultati soddisfacenti. Entrambi i BCA sono stati in grado di bloccare lo sviluppo del patogeno e la presenza di un'area d'inibizione, seppur ristretta, può essere interpretata come il risultato della produzione di sostanze di tipo antibiotico, già riportate in letteratura. E' noto che *A.zeae* è in grado di produrre metaboliti secondari, possibilmente riconducibili alle pirrocidine A e B (Wicklow e Poling, 2009) e *C.minitans* di sintetizzare il macrospherelide A (McQuilken *et al.* 2003). Nonostante questo effetto antagonistico il controllo sullo sviluppo del patogeno è stato moderato, probabilmente per la maggiore velocità di crescita di *B.cinerea* nelle condizioni sperimentali adottate.

I risultati della prova di antagonismo *in vitro* sono stati parzialmente confermati dalla prova di campo.

Nella situazione sperimentale in cui si è operato, le condizioni climatiche non sono state propizie per lo sviluppo del patogeno. Un evento piovoso in concomitanza del primo trattamento ha provocato l'azzeramento dell'inoculo di *B.cinerea* in campo (fig.19). Oltre a ciò l'andamento stagionale è stato caratterizzato da temperature superiori alla media ventennale e da un'umidità inferiore alla media storica (allegato 1).

Tali condizioni hanno portato nella parte del vigneto non oggetto di prova ad uno scarso o nullo sviluppo della malattia sebbene in assenza di alcun trattamento antibiotico.

Tutti i BCA saggiati hanno controllato lo sviluppo della muffa grigia ad esclusione di *C.minitans*; nella tesi trattata con questo fungo la malattia si è sviluppata con un'incidenza di infezione paragonabile al testimone. Tale risultato è simile a quanto ottenuto dalla prova effettuata da Truman *et al.*, (2009) nel controllo biologico di *S.sclerotiorum* con *C.minitans* sulla parte epigea della pianta di pisello; ed il citato autore giustifica il controllo non riuscito con la mancata presenza dell'antagonista; ciò è successo anche nella prova di campo dato che i rilievi sul grappolo non hanno mai consentito di individuare *C.minitans*; è quindi possibile supporre che questo BCA incontri delle difficoltà nel colonizzare i tessuti del grappolo.

I risultati emersi dalle tesi trattate con *T.viride* e *B.subtilis*, hanno dimostrato un'evidente maggior efficacia di questi BCA rispetto agli altri (fig. 15).

Alla riduzione della malattia del 98% e del 79% rispettivamente per *T.viride* e *B.subtilis* corrisponde una buona densità d'inoculo degli antagonisti, e soprattutto, un abbattimento della popolazione di *B.cinerea* al di sotto del limite di quantificazione. L'azione esercitata dai due antagonisti però non è sovrapponibile; si è visto infatti che mentre l'uso di *T.viride* riduce la malattia a uno o pochissimi acini per grappolo con l'evasione del micelio del patogeno, nel caso del *B.subtilis* la percentuale del marciume è significativamente maggiore ma, soprattutto non si è notata evasione di *B.cinerea* sugli acini danneggiati. Tale aspetto, modificando l'atteso comportamento del patogeno, dovrà essere ulteriormente approfondito con successive ricerche e con successive sperimentazioni per meglio comprendere l'effetto antagonistico di *B.subtilis*.

L'impiego della miscela tra i 5 ceppi di *A.zaeae* ha portato ad una riduzione della malattia rilevante però pur sempre nettamente inferiore alle tesi trattate con *T.viride*. La presenza di *A.zaeae* nel grappolo si è mantenuta su livelli discreti e quindi tale antagonismo si dimostra in grado di colonizzare il grappolo.

I dati raccolti non permettono di discriminare tra i ceppi utilizzati per comporre la miscela e quindi non è possibile stilare un giudizio definitivo, visto che nel caso solo uno dei ceppi fosse l'unico e sopravvivere sulla pianta l'effetto non ottimale osservato potrebbe essere legato alla dose di BCA distribuito che nel caso qui prospettato potrebbe essere stata 1/5 di quella desiderata.

Tale fatto tra l'altro potrebbe anche spiegare in parte quanto riportato nel grafico 19 dove, a parte *C.minitans* che non colonizza il grappolo, *A.zeae* è presente con densità d'inoculo nettamente inferiori a quelle degli altri due BCA.

Quanto fin'ora riportato induce perciò ad approfondire lo studio sulle potenzialità di funghi del genere *Acremonium* come agenti di biocontrollo utilizzabili nella difesa della vite. Ciò, anche alla luce di quanto presente in letteratura dove già si riporta l'efficacia di *A.cephalosporium* su *B.cinerea*, *A.niger* e *R.stolonifer* (Zahavi *et al.*, 2000)

La tolleranza dei BCA saggiati nei confronti di rame, metalaxil + folpet e mancozeb + dimetomorf è risultata diversa a seconda delle specie, del ceppo e del prodotto.

Il rame è risultato il meno tossico per tutti gli antagonisti.

Per quanto riguarda *T.viride*, precedenti prove di campo ad opera di Topolovec-Pintaric *et al.*, (1999) hanno già rivelato un possibile utilizzo di tale BCA integrato a prodotti a base di rame nel controllo di *B.cinerea* in vigneto, oltre a ciò Kredics *et al.*, (2004) riportano un'attività antiproteica rafforzata dalla presenza dello ione rameico. La tolleranza a tale elemento chimico da parte di *Trichoderma* sembra essere dovuta a meccanismi di bioaccumulazione che portano all'utilizzo dello ione metallo come nutrimento (Anand *et al.*, 2005).

T.viride, però, è risultato sensibile agli altri due prodotti saggiati, soprattutto alla miscela mancozeb + dimetomorf. Quest'ultimo risultato non trova molti riscontri in letteratura dove non è stato possibile rintracciare dati sull'effetto del metalaxil e del mancozeb su questo BCA. Dai dati raccolti, emerge pertanto, la possibilità di uso di *T.viride* in protocolli ove sia previsto l'uso di rame ad esempio in viticoltura biologica mentre l'impiego in piani di lotta comprendenti l'utilizzo di prodotti di sintesi deve essere più prudente.

Come già più volte riferito, tra i ceppi di *A.zeae* saggiati è affiorata molta eterogeneità nella tolleranza al rame; il ceppo 6415, dimostrando un valore di MCI più alto rispetto a tutti i funghi della prova è un buon candidato per studi futuri riguardanti la possibilità d'uso in protocolli di lotta integrata in cui sia previsto l'impiego di prodotti fitosanitari di sintesi. Ciò è ulteriormente supportato dal fatto che questo ceppo di *A.zeae* è risultato il meno sensibile alla miscela mancozeb + dimetomorf e che la sua sensibilità a folpet + metalaxil potrebbe essere dovuta

principalmente al folpet che è una sostanza attiva in via di dismissione, visto che come è noto metalaxil è una sostanza attiva che agisce quasi esclusivamente nei confronti degli oomiceti (Muccinelli, 2004). Il genere *Acremonium* ha già destato interesse in relazione al rame: Zapotoczny *et al.*, (2007) hanno visto che *A.pinkertoniae* tollera in modo eccellente questa sostanza tant'è che questo fungo può essere utilizzato per il risanamento di ambienti caratterizzati da alti livelli cuprici.

C.minitans manifesta una tolleranza ai prodotti fitosanitari saggiati mediamente inferiore agli altri BCA, pertanto, in accordo con Budge e Whipps (2001) e Patridge *et al.*,(2006) che riportano un'alta suscettibilità di tale BCA a numerosi prodotti fitosanitari si può concludere che *C.minitans* sia poco adatto all'uso abbinato con i prodotti chimici utilizzati in vigneto.

In conclusione, il lavoro svolto dimostra la possibilità di utilizzare strategie di controllo biologico contro la *B.cinerea* nella cultivar Glera nella zona del Valdobbiadene-Conegliano DOCG, evidenziando una più che buona efficacia di *T.viride* e un più che vantaggioso effetto di *B.subtilis*. Sembra, invece, da escludere l'utilizzo di *C.minitans* visto che mal si adatta all'ambiente-grappolo. Restano da approfondire le potenzialità di *A.zaeae* e più in generale del genere *Acremonium*, vista anche la capacità di tale genere fungino di comportarsi come endofita della vite (Burruano *et al.*, 2003; 2008).

La possibilità di stabilire nella vite una popolazione fungina endofitica in grado di contrastare lo sviluppo di malattie come *B.cinerea* risulterebbe estremamente vantaggiosa sul piano pratico evitando la necessità di distribuire il BCA più volte durante la stagione vegetativa.

Le prove svolte però, mettono in evidenza, che in una logica di lotta integrata, gli antagonisti fungini possono essere fortemente inibiti da alcuni prodotti fitosanitari utilizzati per la difesa della vite. Ciò sottolinea la necessità di studiare con particolare attenzione epoche, tipo e dosi d'impiego dei prodotti utilizzati, nell'intento di mantenere il più possibile distante il BCA dalla presenza del prodotto di sintesi.

Molto più interessante da questo punto di vista è il possibile utilizzo di *B.subtilis* che, essendo un batterio, risente meno dei prodotti fitosanitari e quindi il suo impiego potrebbe risultare meno critico a patto che si ricordi l'azione batteriostatica del rame

e quindi esso non venga distribuito in concomitanza o vicinanza dei trattamenti con i prodotti rameici (Weed, 1962; Yoon *et al.*, 2007).

BIBLIOGRAFIA

- Abarca M.L., Accensi F., Bragulat M.R., Castellá G., Cabañes F.J., (2003). *Aspergillus carbonarius* as the Main Source of Ochratoxin A Contamination in Dried Vine Fruits from the Spanish Market. *Journal of Food Protection*, 66,504-506.
- Abrunhosa L., Serra R., and Venâncio A., (2002). Biodegradation of Ochratoxin A by Fungi Isolated from Grapes *J. Agric. Food Chem.*, 50 (25), 7493–7496.
- Agrios G.N., (1988). *Plant Pathology*, 3ed. Academic Press, Inc. NewYork. 803: 2.
- Aguín O., Mansilla J. P. e Sainz M. J., (2006). In vitro selection of an effective fungicide against *Armillaria mellea* and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest Management Science*, 62: 223–228.
- Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., De la Cruz J., Monte E., and Llobell A., (2001). An Antifungal Exo- -1,3-Glucanase (AGN13.1) from the Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Applied and Environmental Microbiology, 67:5833-5839.
- Akram A., Ongena M., Duby F., Dommes J., Thonart P., (2008). Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biology*, 8,:113.
- Alavanja M.C.R., Hoppin J.A. e Kamel F., (2004). Health Effects of Chronic Pesticide Exposure: Cancer and Neurotoxicity. *Annual Review of Public Health*.Vol. 25: 155-197.

- Aleu J. e Collado I.G., (2001). Biotransformation by *Botrytis* species. J. of Molecular catalysis B: Enzymatic 13:77-93
- Anagnostakis SL (1982) Biological control of chestnut blight. Science 215:466–471
- Anand P., Isar J., Saran S., Saxena R. K., (2005). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. Bioresource Technology 97 : 1018–1025
- Andrews JM., (2002). Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother; 49:1049.
- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bazier A., Lambert B., Joubert J.M., Pugin A., (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 1118-1128.
- Badalyan S.M., Innocenti G., Garibyan N.G., (2002). Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. Phytopathol. Mediterr. 41: 200–225.
- Baker R., (1987). Mycoparasitism: ecology and physiology. Can. J. Plant Pathol. 9:370-379.
- Bardas G.A., Veloukas T., Koutita O., Karaoglanidis G.S., (2010). Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. Pest Management Science. Volume 66: 967–973.
- Barnett V., Payne R., Steiner R.A: (1995). Agricultural Sustainability: Economic, Environmental and statistical consideration. John Wiley & Sons Ltd, 209-230.

- Barka E.A., Belarbi A., Hachet C., Nowak J., Audran J.C., (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiology Letters 186:91-95.
- Bautista-Baños S., Hernández-Lauzardo A.N., Velázquez-del Valle M.G., Hernández-López M., Barka E.A., Bosquez-Molina E. e Wilson C.L., (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection; 25:108-118
- Beever R.E. & Weeds P.L., (2004). Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia* (citato da: Elad Y. et al. (2007). Botrytis: Biology, Pathology and Control. 243-272).
- Belli N., Marín S., Argilés E., Ramos A.J., Sanchis V., (2007). Effect of Chemical Treatments on Ochratoxigenic Fungi and Common Mycobiota of Grapes (*Vitis vinifera*). Journal of Food Protection, 70:157-163.
- Belli N., Marin S., Duaigu A., Ramos A.J., Sanchis V.,(2005). Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. J Sci Food Agric 84:591–594.
- Benhamou N., Gagne´ S., Le Que´re´ D., Dehbi L., (2000). Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. Phytopathology; 90:45–56.
- Bertagnolli B. L., Dal Soglio F. K. e Sinclair J. B., (1996). Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and of two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008. I. Possible correlations with

inhibition of growth and biocontrol. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 48:145-160.

- Blackman J.P., (1975). Germination of *Botrytis cinerea* conidia *in vitro* in relation to nutrient conditions on leaf surface. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65:239-247.

- Blackman J.P., Pitt J.L., (1980). Behavior of conidia on aerial plant surfaces (citato da: Jacometti M.A., Wratten S.D. e Walter M., (2009). Review: Alternative to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.).

- Bock G., Benda I., and Schreier P., (1988). Microbial transformation of geraniol and nerol by *Botrytis cinerea* *Appl Microbiol Biotechnol.* 27:351-357.

- Bonmatin J.M., Laprevote O., Peypoux F., (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*6: 541–556.

- Broome J.C., English J.T., Marois J.J., Latorre B.A. e Aviles J.C., (1995). Development of an Infection Model for *Botrytis* Bunch Rot of Grapes Based on Wetness Duration and Temperature. *Phytopathology* 85:97-102.

- Brunerie P., Benda I., Bock G., and Schreier P., (1987). Bioconversion of citronellol by *Botrytis cinerea* *Appl Microbiol Biotechnol.* 27:6-10.

- Budge S.P. e Whipps J.M., (2001). Potential for integrated control of *Sclerotinia sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. *Phytopathology* 91:221-227.

- Bunster L., Fokkema N.J. e Schippers B., (1989). Effect of Surface-Active *Pseudomonas* spp. On Leaf Wettability. *Applied and environmental microbiology*, pp 1340-1345.
- Buonauro R., Scarponi L., Ferrara M., Sidoti P., Bertona A., (2002). Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 41-49.
- Burruano S., Conigliaro G., Lo Piccolo S.,Torta L., (2003). Detection of endophytic *Acremonium* sp. in healthy or naturally damaged leaves of *Vitis vinifera*. *Journal of Plant Pathology [J. Plant Pathol.]*. 85: 318.
- Burruano S., Alfonzo A., Lo Piccolo S., Conigliaro G., Mondello V., Torta L., Moretti M., Assente G., (2008). Interaction between *Acremonium byssoides* and *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera*. *Phytopathol. Mediterr.* 47:122-131.
- Cus` F. e Raspor P., (2008). The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts *Letters in Applied Microbiology* 47 : 54–59.
- Cabanes F.J., Accensi F., Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella` G., Minguez S., Pons A., (2002). What is the source of ochratoxin A in wine? *International Journal of Food Microbiology*.79:213– 215.
- Cabras P. e Angioni A., (2000). Pesticide Residues in Grapes, Wine, and Their Processing Products *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, No. 4.
- Cabras P., Angioni A., Garau V. L., Pirisi F.M., Farris G.A., Madau G. e Emonti G., (1999). Pesticides in Fermentative Processes of Wine *J. Agric. Food Chem.* 47: 3854-3857.

- Cabras P., Angioni A., Garau V.L., Melis M., Pirisi F.M., Minelli E. V., Cabitza F. e Cubeddu M., (1997). Fate of Some New Fungicides (Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil, and Tebuconazole) from Vine to Wine J. Agric. Food Chem. 45: 2708-2710.
- Calhelha R.C., Andrade J.V., Ferreira I. C., Estevinho L.M., (2005). Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. Food Microbiology 23 : 393–398.
- Campanile G., Ruscelli A. e Luisi N., (2007). Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. Eur J Plant Pathol 117:237–246.
- Campbell W.A., (1947). A new species of *Coniothyrium* parasitic on sclerotia. Mycologia 39 : 190-195.
- Castro M., Kramer K., Valdivia L., Ortiz S., Castillo A., (2003). A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Letters 228: 87-91
- Chalet L.D., Olson D., Glogoza P.A. (2002). Biological Control of Insect and Weed Pests in north Dakota Agriculture. North Dakota State Univ. Ext.Serv., E-1225, p 1-3.
- Chu Y.M., Jeon J. e Yea S.J., (2002). Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*, *Appl Environ Microbiol* 68: 2529–2534.
- Cilindre C., Castro A.J., Cle´ment C., Jeandet P., Marchal R., (2006). Influence of *Botrytis cinerea* infection on Champagne wine proteins (characterized by two-dimensional electrophoresis/immunodetection) and wine foaming properties. Food Chemistry 103 : 139–149.

- Clouvel P., Bonvarlet L., Martinez A., Lagouarde P., Dieng I., Martin P., (2008). Wine contamination by ochratoxin A in relation to vine environment. *International Journal of Food Microbiology*. 123: 74-80.
- Coley-Smith JR., (1980). Sclerotia and other structure in survival (citato da: Elad Y. et al., (2007) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. 9-27).
- Costacurta A., Lavezzi A., Tomasi D., Giorgessi F., Sancassani G., Antoniazzi P., (2004). Guida per il viticoltore. Azienda Regionale Veneto Agricoltura.
- Daniel M. e Purkayastha R.P., (1995). Handbook of phytoalexin, metabolism and action. Books in soils, plants, and the environment. Marcel Dekker, New York.
- Danielsson J., Reva O., Meijer J., (2007). Protection of oilseed rape (*Brassica napus*) toward fungal pathogens by strains of plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microb Ecol* 54:134–140.
- De Liguoro M., (2010). Micotossine: aspetti tossici per gli animali e per l'uomo. Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata e Igiene veterinaria. Università degli Studi di Padova. Disponibile online: www.venetoagricoltura.org/upload/pubblicazioni/MAIS_SICUREZZA_ALIMENTARE/Volume_Mais_-_Cap._7.pdf. (scaricato nel 2010).
- De Meyer G., Bigirimana J., Elad Y. e Hofte M., (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 104: 279–286.
- Deng F., Xu R., e Boland G. J., (2003). Hypovirulence-Associated Double-Stranded RNA from *Sclerotinia homoeocarpa* Is Conspecific with *Ophiostoma novo-ulmi* Mitovirus 3a-Ld. *Virology*, 93:1407-1414.

- Elad Y. e Backer R., (1985). The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053-1059.
- Elad Y. e Kapat A., (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 105: 177–189.
- Elad Y., (1994). Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Prot.*, 13: 35-38.
- Elad Y., (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited disease. *Eur.J. Plant. Pathol.* 102:719-732.
- Elad Y., (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709-714.
- Elliston, J. E. 1985. Characteristics of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology* 75:151-158.
- Elmer P.A.G. e Michailides T.J., (2004). Epidemiology of *Botrytis cinerea* in orchard and vine crops (citato da: Elad Y. et al., (2007) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. 243-272).
- Elmer PAG e Reglinski T., (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd., Ruakura Research Centre, Private Bag 3123, Hamilton, New Zealand.
- English J.T., Bledsoe A. M., Marois J. J. e Kliwer W. M., (1990). Influence of Grapevine Canopy Management on Evaporative Potential in the Fruit Zone *Am. J. Enol. Vitic.* 41:137-141.

- English J.T., Thomas C.S., Marois J.J. e Gubler W.D., (1988). Microclimates of Grapevine Canopies Associated with Leaf Removal and Control of *Botrytis* Bunch Rot. *Phytopathology* 79:395.
- Fillinger S., Leroux P., Auclair C., Barreau C., Al Hajj C. e Debieu D., (2008). Genetic Analysis of Fenhexamid-Resistant Field Isolates of the Phytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 3933-3940.
- Food and Agriculture Organisation of the United Nations (1968). Report of the first session of the FAO Panel of Experts on Integrated Pest Control. *FAO Meeting Report No. PL/1967/M/7*. FAO, Rome.
- Fowler S.R., Jaspers M.V., Walter M. e Stewart A., (1999). Suppression of overwintering of *Botrytis cinerea* inoculums on grape rachii using antagonistic fungi. *Proc. 52nd N.Z. Plant Protection Conf.* 1999: 141-147.
- Fravel D.R., (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathology* 26:75-91.
- Gabriolotto C., Monchiero M., Nègre M., Spadaro D. e Gullino M.L., (2009). Effectiveness of control strategies against *Botrytis cinerea* in Vineyard and evaluation of the residual fungicide concentrations. *Journal of Environmental Science and Health, Part 44:4*, 389-396.
- Garcia M.A., Oliva J., Barba A., Camara M.A., Pardo F., Diaz-Plaza E.M., (2004). Effect of Fungicide Residues on the Aromatic Composition of White Wine Inoculated with Three *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1241-1247.
- Gerlagh M., Whipps J. M., Budge S. P. e Goossen van de Geijn H. M., (1996). Efficiency of isolates of *Coniothyrium minutans* as mycoparasites of

Sclerotinia sclerotiorum, *Sclerotium cepivorum* and *Botrytis cinerea* on tomato stem pieces. *European Journal of Plant Pathology*, 102:787–793.

- Giczey G., Kerenyi Z., Fulop L. e Hornok L., (2001). Expression of *cmg1*, an exo-beta-1,3-glucanase gene from *Coniothyrium minutans*, increases during sclerotial parasitism. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:865–871.
- Gindro K. e Pezet R., (2001). Effects of long-term storage at diuerent temperatures on conidia of *Botrytis cinerea* (Pers.: Fr.). *FEMS Microbiology Letters* 204:101-104.
- Giraud T., Fortini D., Levis C., Leroux P. e Brygoo Y., (1997). RFLP Markers Show Genetic Recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and Transposable Elements Reveal Two Sympatric Species. *Mol. Biol. Evol.* 14(11):1177-1185.
- Giraud T., Fortini D., Levis C., Leroux P. e Brygoo Y., (1999). RFLP Two Simbling Species of the *Botrytis cinerea* Complex, *transpose* and *vacuma*, Are Found in Sympatry on Numerous Host Plants. *American Phytopathological Society* 01:0830.
- Haran S., Schickler H. e Chet., (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142: 2321-2331 Printed in Great Britain.
- Harman G. E., Howell C.R., Viterbo A., Chet and I. e Lorito M., (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology*. Volume 2.
- Harman G.E., Latorre B., Agoin E., San Martin R., Riegelp D.G., Nielsen A., Tronsmo A., Pearson R.C., (1996). *Biological and Integrated Control of*

Botrytis Bunch Rot of Grape Using *Trichoderma* spp. BIOLOGICAL CONTROL 7:259–266.

- Havir E.A., Anagnostakis S.L., (1983). Oxalate production by virulent but not by hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Physiol Plant Pathol* 23:369–376
- Hellman E., (2004). Bunch rot and sour rot management. Texas Cooperative Extension. Department of Horticultural Sciences, Texas A&M University. (citato da : Valero A., Sanchis V., Ramos A.J. and Marin (2008). Brief in vitro study on *Botrytis cinerea* and *Aspergillus carbonarius* regarding growth and achratoxin A. *App. Microbiology* ISSN 0266-8254).
- Hilber W. e Hilber-Bodmer M., (1998). Genetic Basis and Monitoring of Resistance of *Botryotinia fuckeliana* to Anilinopyrimidines *Plant Dis.* 82:496-500.
- Hillman B. I., Tian Y., Bedker P. J. & Brown M. P., (1992). A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. *J. Gen. Virol.* 73: 681–686
- Hocking A.D., Ailsa D., Su-lin L., Leong, Benozir A., Kazi, Robert W., Emmett, Eileen S., Scott, (2007). Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *International Journal of Food Microbiology.* 119: 84–88.
- Hokkanen H. e Lynch J.M., (1995). *Biological control: Benefits and Risks*, Cambridge, Cambridge University Press.
- Holz G., Coertze S., Williamson B., (2004). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces (citato da: Elad Y. et al., (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* 9-27).

- Holz G., Gütschow M., Coertze S., and Calitz F. J., (2003). Occurrence of *Botrytis cinerea* and subsequent disease expression at different positions on leaves and bunches of grape. *Plant Dis.* 87:351-358.

- Hong Y., Dover S. L., Cole T. E., Brasier C. M. & Buck K. W. (1999). Multiple mitochondrial viruses in an isolate of the Dutch elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*. *Virology* 246: 158–169.

- Howell C. R., e Stipanovic R. D., (1983). Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol.* 29:321- 324.

- Howitt R. L. J., Beever R. E., Pearson M. N., Forster R. L. S., (2006). Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, *Botrytis virus X*, reveals high amino acid identity to genes from plant ‘potex-like’ viruses. *Arch Virol.* 151: 563–579

- Huang, H. C.e Erickson R. S., (2002). Overwintering of *Coniothyrium minitans*, a mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, on the Canadian prairies. *Australasian Plant Pathology*, 31:291–293.

- Huszcza E. e Burczyk B., (2006). Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Z. Naturforsch. [C]* 61: 727–733.

- Inbar J., Menendez A. e Chet I., (1996). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.* 28: 757-763.

- Iriti M., Faoro F., (2003). Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology*, 151: 171-180.

- Irtwange S.V., (2006). Application of Biological Control Agents in Pre- and Postharvest Operation. Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal. Invited Overview No. 3. Vol. VIII.
- Jacometti M.A., Wratten S.D. e Walter M., (2009). Review: Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.
- Janisiewicz W.J. e Martinsburg W.V. (1990). Biocontrol of grey-mould in pome fruit using *Acremonium breve*. United State Paten. App.No.: 159,915.
- JARC (International Agency for Research on Cancer), (1993). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, Vol 56. pp. 489–521. Lyon:. Disponibile online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56-18.pdf>.
- Jarvis, W.R., (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* Species; Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. Monograph No. 15. Canada Department of Agriculture, Ottawa. (citato da Lahlali R., Serrhini M.N., Friel D., Jijakli M.H., (2007). Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* (Pers). International Journal of Food Microbiology 114: 1–9).
- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M., (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. J. Agric. Food Chem.50: 2731-2741.
- Kamel F. e Hoppin J. A., (2004). Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease Environmental Health Perspectives • VOLUME 112 | NUMBER 9.

- Kapat A., Rakshit S.K. e Panda T., (1996) Optimization of carbon and nitrogen sources and the environmental conditions for the production of chitinase using *Trichoderma harzianum*. *Bioproc Eng* 15: 13–20
- Kapat A., Zimand Y., Elad Y., (1998). Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 52: 127-137.
- Kars I. e Van Kan J.A., (2004). Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis* (citato da: Elad Y. et al., (2007). *Botrytis: Biology, Pathology and Control.* 99-118).
- Kasselaki A. M., Shaw M. W., Malathrakis N. E. e Haralambous J., (2006). Control of *Leveillula taurica* in tomato by *Acremonium alternatum* is by induction of resistance, not hyperparasitism *European Journal of Plant Pathology.* 115:263–267.
- Keller M., Kummer M., Vasconcelos M. C., (2001). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Australian Journal of Grape and Wine Research* Volume 7: 12–18.
- Keller M., Viret O., e Mary Cole F., (2003). *Botrytis cinerea* Infection in Grape Flowers: Defense Reaction, Latency, and Disease Expression. *Phytopathology* 316-322.
- Kim K.K., Fravel D.R., Papavizas G.C., (1988). Identification of a metabolite produced by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in biocontrol of *Verticillium dahlia*. *Phytopathology* 78:488-492.
- Kim, P., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R. and Chi, Y.-T. (2004), Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 942–949.

- Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S., (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259–1266.
- Koumoutsi A., Chen X., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J. e Boris R., (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186:1084–1096.
- Kretschmer M., Leroch M, Mosbach A., Walker AS., Fillinger S., (2009). Fungicide Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog* 5(12)
- Kredics L., Hatvani L., Antal Z., Szekeres A., Manczinger L., Nagy E.,(2004). Protease over-production in the presence of copper by a *Trichoderma harzianum* strain with biocontrol potential. *IOBC/ wprs Bulletin*, 27:371-371
- Kubicek C.P.e Harman G.E., (1998). *Trichoderma e Glucadium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Taylor & Francis e-Library. Volume 1.
- Kuć J., (1982). Induced Immunity to Plant Disease. *BioScience*. 32: 854-860.
- Lahlali R., Serrhini M.N., Friel D., Jijakli M.H., (2007). Predictive modeling of temperature and water (solutes) on the in vitro radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. *International Journal of Food Microbiology* 114: 1-9.

- Langcake P., (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*. 18: 213-226.
- Latorre B.A., Spadaro I., Rioja M.E., (2002). Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection* 21: 957–961.
- Leong S.L., Hocking A.D., Pitt J.I., Kazi B.A., Emmett R.W., Scott E.S., (2006). Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A *International Journal of Food Microbiology* 111:S10–S17.
- Leroch M., Kretschmer M., Hahn M., (2010). Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology*.
- Leroux P., Chapeland F., Desbrosses D., Gredt M., (1999). Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Protection*. 18: 687-697.
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M. and e Chapeland F., (2002). Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea* . *Pest Manag Sci*. 58:876–888
- Li G.Q., Huang H.C. e Acharya S. N., (2002). Sensitivity of *Ulocladium atrum*, *Coniothyrium minitans*, and *Sclerotinia sclerotiorum* to benomyl and vinclozolin. *Canadian Journal of Botany*, 80:892–898.
- Li G.Q., Huang H.C. e Acharya S. N., (2003a). Importance of pollen and senescent petals in the suppression of alfalfa blossom blight (*Sclerotinia sclerotiorum*) by *Coniothyrium minitans*. *Biocontrol Science and Technology*, 13: 495– 505.

- Li G.Q., Huang H.C. e Acharya S. N., (2003b). Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum* .Biological Control 28:11–18.
- Li H., White D., Lamza K.A., Berger F. e Leifert C., (1998). Biological control of *Botrytis*, *Phytophthora* and *Pythium* by *Bacillus subtilis* Cot1 and CL27 of micropropagated plants in high-humidity fogging glasshouses. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 109–112.
- Linder-Basso D., Dynek J. & Hillman B. I., (2005). Genome analysis of *Cryphonectria hypovirus 4*, the most common hypovirus species in North America. Virology, 337:192-203
- Lockwood J.L., (1992). Exploitation competition. In Wickloe D.T. e Carol G.C.(eds), The Fungal Community; its organization and Role. 2nd edn. Maecel Dekker, New York, pp. 243-263.
- Loper J.E., (1988). Role of Fluorescent Siderophone production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomans fluorescens* strain. Phytopathology 78: 166-172.
- Lorenzini G., (2001)._Principi di fitoiatria. Bologna: Edagricole - Edizioni Agricole della Calderini s.r.l. 1a edizione
- Ludwig W., K. Schleifer e William B., Whitman., (2008). Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3.
- Madigan M.T. e Martinko J.M., (2006). Microbiologia genereale. Brock. Biologia dei microorganismi. Volume 1.
- Marrone P.G., (2002). An effective biofungicide with novel modes of action. Pesticide Outlook, 2002. The Royal society of Chemistry.

- Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C.; Dubos B. e Fermaud M., (2003). Phenotypic differences between *vacuina* and *transposa* subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 479-488.
- Martinez F., Dubos B. e Fermaud M., (2005). The Role of Saprotrophy and Virulence in the Population Dynamics of *Botrytis cinerea* in Vineyards. *Phytopathology* 95:692-700.
- McQuilken M.P., Gemmell, J., Hill R. A. e Whipps J. M., (2003). Production of macrospore A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiology Letters*, 219: 27–31.
- Milgroom M.G. e Cortesi P., (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis, *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 311–338.
- Moleleki N., van Heerden S. W., Wingfield M. J., Wingfield B. D. & Preisig O., (2003). Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe* RNA virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 3952–3956
- Molloy C., Cheah L.H., Koolaard J.P.,(2004). Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan, *Postharvest Biology*
- Moon B.J.; Cho C.T., Chung H.S., Suwon, (1988). Studies on antagonism of *Trichoderma* species to *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*, 2; effects of nutrient and environment on antagonistic activity. *Korean Journal of Plant Pathology* .

- Moyano C., Gomez V. e Melgarejo P., (2004). Resistance to Pyrimethanil and other Fungicides in *Botrytis cinerea* Populations Collected on Vegetable Crops in Spain. *J. Phytopathology* 152: 484-490.

- Muccinelli M., (2004). *Prontuario dei fitofarmaci*; X edizione; Edagricole, Bologna.

- Muhammad O.K. e Saleem S., (2007). Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. *Pak. J. Bot.*, 39: 945-951.

- Mukherjee A.K.e K. Das, (2005). Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54: 479–489.

- Nair N.G. e Allen R.N., (1992). Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycological Research.* 97: 1012-1014.

- Nair N.G., Guilbaud-Oulton S., Barchia I., Emmett R., (1995). Significance of carry over inoculum, flower infection and latency on the incidence of *Botrytis cinerea* in berries of grapevines at harvest in New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 1177- 1180.

- Nikki D. Charlton, Stellos M. Tavantzis e Marc A. Cubeta, (2009). Detection of Double-Stranded RNA Elements in the Plant Pathogenic Fungus *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology Methods in Molecular Biology*, Volume 508:1-12.

- Nuss D.L.,(2005) Hypovirulence: Mycovirus at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology*, 3:632-642

- O'Malley M., (1997). Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings Lancet. 349: 161–166.
- O'Neil T.M., Elad Y., Shtienberg D., Cohen A., (1996). Control of Grapevine Grey Mould with *Trichoderma harzianum* T39. Biocontrol science and technology. Volume 6: 139-146.
- Ongena M. e Jacques P., (2007). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol Trends in Microbiology Vol.16 No.3.
- Papavizas G.C. e Lumsde R.D., (1980). Biological control of soilborne fungal propagules. Ann. Rev. Phytopathology 18:389-413.
- Partridge D.E., Sutton T.B. e Jordan D.L., (2006). Effect of environmental factors and pesticides on mycoparasitism of *Sclerotinia minor* by *Coniothyrium minitans*. Plant Disease, 90:1407-1412.
- Pearson R.C. e Goheen A.C., (1988). Compendium of grape diseases. APS Press: St. Paul, Minnesota, USA (citato da: Jacometti M.A., Wratten S.D. e Walter M., (2009). Review: Alternative to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. Australian Society of Viticulture and Oenology Inc.).
- Peixin H., Xinsheng H. e Changkai Z., (2005). Interactions between *Psilocybe fasciata* and its companion fungus *Acremonium strictum*. The Ecological Society of Japan 2005. Volume 21: 387-395.
- Perazzolli M., Dagostin S., Ferrari A., Elad Y., Pertot I., (2008). Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. Biological Control 47: 228–234

- Perez L., Valcarcel M.J., Gonzalez P. e Domecq B., (1999). Influence of *Botrytis* Infrction of Grapes on the Biological Aging Process of Fino Sherry . Am. J. Enol. Vitic. 50:4:456-460.
- Peypoux F., Bonmatin J. M. e Wallach J., (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 553–563.
- Pielken P., Stahmann P. and Sahm H., (1989). Increase in glucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan Appl Microbiol Biotechnol. 33: 1-6.
- Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L., Piva G., (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. Food Additives and Contaminants. Volume 18: 647 – 654.
- Poling S. M., Wiclow D. T., Rogers K. D. e Gloer J.B., (2008). *Acremonium zeae*, a Protective Endophyte of Maize, Produces Dihydroresorcylide and 7-Hydroxydihydroresorcylides. J. Agric. Food Chem. 56: 3006–3009
- Preisig O., Moleleki N., Smit W. A., Wingfield. B. D. & Wingfield M. J., (2000). A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. J. Gen. Virol. 81: 3107–3114
- Pritts M., (2000). Growing strawberries, healthy communities, strong economies and clean environments: what is the role of the researcher? Acta Hort. 567: 411-417.
- Prosperi F., (2008). La muffa grigia della vite. L'informatore Agricolo. Anno 24 n.5.

- Rigling D., Heiniger U., Hohl H.R., (1989) Reduction of laccase activity in dsRNA-containing hypovirulent strains of *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Phytopathology* 79:219–223.
- Rodriguez-Kabana R., Kelley W.D., Curl E.A., (1978). Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfii* in soil. *Can. J. Microbiol.* 24: 487-490
- Rose A.H., (1979). *Economic microbiology. Secondary products of metabolism.* New York: academic.3:595.
- Rosslenbroich H.J. e Stuebler D., (2000). *Botrytis cinerea* – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19 : 557-561.
- Salvi R.M., Lara D. R., Ghisolfi E.S., Portela L.V., Dias R.D.e Souza D.O., (2003) Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. *Toxicological sciences.* 72: 267–271.
- Samuels G.J., (2005). *Trichoderma: Systematics, the sexual state, and ecology.* *Phytopathology* 96:195-206.
- Sasaki A., Kanematsu S., Onoue M., Oyama Y., e Yoshida K., (2006). Infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of *Partitiviridae* (RnPV1-W8). *Arch. Virol.*
- Sautour M., Mansur C.S., Divies C., Bensoussan M. e Dantigny P., (2002). Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 28: 311 – 315.

- Seyb A.M., (2004). *Botrytis cinerea* inoculum sources in the vineyard system. PhD Thesis, Lincoln University, Canterbury, New Zealand, 227.
- Shah J., Tsui F., Klessig D.F., (1997). Characterization of a salicylic acidinsensitive mutant (sai 1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol Plant Microbe Interact*; 10:69–78.
- Schilder A.M.C., Gillett J.M., Sysak R.W. e Wise J.C., (2002). Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes. Ecofruit - 10th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing, Weinsberg/Germany.
- Shtienberg D. e Elad Y., (1997). Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 87:332-340.
- Silué D., E. Pajot, Y. Cohen, 2002. Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL--amino-*n*-butanoic acid (BABA). *Plant Pathology*, 51: 97-102.
- Soldevila I., Havens W. M. e Ghabrial S. A., (2000). A Cellular Protein with an RNA-Binding Activity Co-purifies with Viral dsRNA from Mycovirus-Infected *Helminthosporium victoriae*. *Virology*. [272](#): 183-190.
- Soufleros E.H., Tricard C., Bouloumpasi, E. C., (2003). Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83: 17-39.

- Spadaro D. e Gullino M.L., (2004). State of art and future of biological control of postharvest fruit disease. *Int. J. F. Mic.* 91:185-194.
- Stein T., (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56: 845–857.
- Steiner R.A., McLaughlin L., Faeth P., Janke R.R. (1995). Incorporating externality costs into productivity measures: a case study using US agriculture, in Barnett V., Payne R., Steiner R.A: (1995). *Agricultural Sustainability: Economic, Environmental and statistical consideration*. John Wiley & Sons Ltd, 209-230.
- Suzuki N., Supyani S., Maruyama K. & Hillman B. I., (2004). Complete genome sequence of Mycoreovirus-1/Cp9B21, a member of a novel genus within the family *Reoviridae*, isolated from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *J. Gen. Virol.* 85:3437–3448
- Thomas C.S., Marois J.J. e English J.T., (1988). The Effect of Wind Speed, Temperature, and Relative Humidity on Development of Aerial Mycelium and Conidia of *Botrytis cinerea* on Grape. *Phytopathology* 78:260-265
- Tjamos S. E., Antoniou P. P., Kazantzidou A., Antonopoulos D. F., Papageorgiou I., (2004). *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth Raisin and Wine-Producing Vineyards in Greece: Population Composition, Ochratoxin A Production and Chemical Control. *Journal of Phytopathology*, 152: 250–255.
- Topolovec-Pintaric S., Cvjetkovic B. & Jurjevic Z., (1999). Experience in integrated chemical-biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) on grapevines in Croatia. *J. Wine Res.* 10: 33-41.

- Townsend, G.R. and J.W. Heuberger, (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.* 27(17): 340-343.
- Tronsmo A. e Raa J., (1977). Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 89: 216-220.
- Trutmann P., Keane P.J., Merriman P.R.,(2009). Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on aerial parts of plants by the hyperparasite *Coniothyrium minitans*. *Transaction of the British Mycological Society*, 78: 512-529
- Tsuge K., Ano T., Hirai M., Nakamura Y., and Shoda M., (1999). The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2183–2192.
- Vail M.E. e Marois J.J., (1991). Grape Cluster Architecture and the Susceptibility of Berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 81:188-191.
- Valero A., Sanchis V., Ramos A.J. e Marin S., (2008). Brief in vitro study on *Botrytis cinerea* and *Aspergillus carbonarius* regarding growth and ochratoxin A. *Applied Microbiology* 47: 327-332.
- Van Loon L.C., (1997). Induced resistance and the role of pathogenesisrelated proteins. *Eur J Plant Pathol*; 103:753–765
- Van Loon L.C., Bakker P. A. H. M e Pieterse C. M. J ., (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1998. 36:453–483.

- Verkley G.J.M., Da Silva M., Wicklow D.T. e Crous P.W., (2004). *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new. *Studies in mycology*. 323–335.
- Vinale F., (2004). *Attività antimicrobica di Sepedonium chrysospermum: un nuovo agente di lotta biologica in patologia vegetale*. Tesi di dottorato, Facoltà di agraria, Università degli studi di Napoli “Federico II”.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Wooa S.L., Lorito M.. (2007). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions *Soil Biology & Biochemistry* 40:1–10.
- Walters D.e Heil M., (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 3–17.
- Weed L.L., (1962). Effects of copper on *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 85:1003-1010.
- Whipps J. M., Sreenivasaprasad S., Muthumeenakshi S., Rogers C. W. e Challen M.P.,(2007). Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism *Eur J Plant Pathol.* 121:323–330.
- Wicklow D. T. e Poling, S. M., (2009). Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. *Phytopathology* 99:109-115.
- Wicklow D.T., Roth S., Stephen T. Deyrup and Gloer J.B., (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* *Mycol. Res.* 109: 610–618.

- Willetts H.J., (1997). Morphology, development and evolution of stromata/sclerotia and macroconidia of the Sclerotiniaceae. *Mycol. Res.* 101: 939-952.

- William Roberts, (1874). Citazione da: evolving concepts of biological control of plant pathogens di Kenneth F. Backer *Ann.Rev. Phytopathol.* 25:67-85

- Williams R. H., (1996). Dispersal of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. In *Animal and Plant Sciences* (pp 144). PhD thesis University of Sheffield, Sheffield.

- Williams R. H., Whipps, J. M. e Cooke, R. C., (1998). Splash dispersal of *Coniothyrium minitans* in the glasshouse. *Annals of Applied Biology*, 132:77–90.

- Williamson B., Duncan G. H., Harrison J.G., Harding L. A., Elad Y. e Zimand G., (1995). Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 99:1303-1310

- Wilson M., Crawford E.K., Campbell R., (1988). Biological control by *Trichoderma harzianum* of damping-off of lettuce caused by *Rhizoctonia solani*. *EPPO Bulletin* Volume 18: 83–89.

- Wu M. D., Zhang L., Li G. Q., Jiang D. H., Hou M. S., e Huang H.- C., (2007). Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 97:1590-1599.

- Yoon K.Y., Byeon J.H., Park J.H., Hwang J., (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment* 373:572-575.

- Zaccardelli M., Campanile F., Del Galdo A., Ronga D., Perrone D., (2007). Selezione e impiego, in pieno campo, di batteri promotori della crescita (PGPR) per la produzione e la difesa del pomodoro. *Agroindustria*, 6: 167-170.
- Zaccardelli M., Del Galdo A., Campanile F., Carella A., Lahoz E., (2005). Valutazione di batteri termoresistenti per il controllo, *in vivo*, di *Rhizoctonia solani* e *Fusarium sambucinum*. *Agroindustria*, 4:259-263.
- Zahavi T., Cohen L., Weiss B., Schena L., Daus A., Kaplunov T., Zutkhi J., Ben-Arie R., Droby S., (2000). Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel Postharvest. *Biology and Technology* 20: 115–124.
- Zapotoczny S., Jurkiewicz A., Tylko G., Anielska T., Turnau K., (2007). Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. *Microbiological Research* 162: 219-228
- Zanzotto A., Bellotto D., Borgo M., (2005). Efficacia antioidica di AQ10 ed effetti sulla formazione di cleistotecie in vigneto. *Informatore fitopatologico*, 7/8, 68-76.
- Zimand G., Elad Y., Chet I., (1996). Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Phytopathology* 86: 1255-1260.
- Ziogas N. e Kalamarakis A. E., (2001). Phenylpyrrole Fungicides: Mitotic Instability in *Aspergillus nidulans* and Resistance in *Botrytis cinerea* *Journal of Phytopathology*. Volume 149: 301–308.

ALLEGATO 1

DATI CLIMATICI

GIORNO	TMxg °C	TMng °C	TMmd °C	UMxg %	UMng %	UMd %	PGg mm	BAG mm
01/07/2009	30,8	18,4	24,4	97	20	59	0	539
02/07/2009	29,7	19,8	24,4	83	26	60	0	85
03/07/2009	30	18	24,1	97	29	69	0,6	584
04/07/2009	30	18	22,9	97	34	76	22,2	821
05/07/2009	30	17,5	23,8	97	25	69	1,6	553
06/07/2009	28,7	20,4	23	94	42	70	0	321
07/07/2009	25,2	16	20,1	97	29	82	23,2	805
08/07/2009	26	14,8	20,2	97	17	69	8,8	676
09/07/2009	24,6	15,8	19,9	95	31	65	0	570
10/07/2009	24,3	14,4	18,5	97	22	70	8	513
11/07/2009			13,8			94		
12/07/2009	26	13,7	20,4	97	22	64	0	638
13/07/2009	26,8	16,2	21,8	97	29	72	0	696
14/07/2009			20,4			92		
15/07/2009	30,3	19,5	25,3	97	50	75	0	570
16/07/2009	32,8	21,1	26,4	97	18	63	0	503
17/07/2009	31,8	19	25,4	97	21	58	3,6	301
18/07/2009	22,3	13,3	18,5	97	29	78	21,4	790
19/07/2009	27	12	19,6	95	17	61	0	536
20/07/2009	28,6	15,2	21,4	97	25	63	0	482
21/07/2009	29,6	17,2	22,9	91	32	66	0	554
22/07/2009	30	18,4	24	97	35	75	0	667
23/07/2009	31	19,3	25	97	41	70	0	497
24/07/2009			20,6			82		
25/07/2009	29,2	19	24,3	97	17	37	0,8	152
26/07/2009	28,7	17,9	23	68	9	34	0	0
27/07/2009	29,4	16,3	22,2	88	16	57	0	389
28/07/2009	30	18	23,4	97	25	63	0,2	542
29/07/2009	32	18,7	25	91	20	55	0	335
30/07/2009	32,7	18,7	25,4	91	25	62	0	511
31/07/2009	29,5	21,6	26,1	86	25	47	0	69
01/08/2009	32,7	19,6	25,3	88	17	54	0	414
02/08/2009	33,2	19,2	26,1	89	15	54	0	666
03/08/2009	26,7	16,1	21,2	97	52	83	47,8	882
04/08/2009	27,8	15,9	21,5	97	25	69	0	424
05/08/2009	30,8	15,7	23,3	97	14	57	0	340
06/08/2009	30,5	18,8	24,5	86	19	58	0	0
07/08/2009	31,6	19,5	25,1	86	19	56	0	47
08/08/2009	30,4	21,2	25,2	82	29	57	0	102

09/08/2009	31,1	21,6	24,7	66	16	49	0	11
10/08/2009	30,7	18,8	23,2	94	25	65	0,8	301
11/08/2009	30,6	17,1	23,2	97	29	66	0,6	610
12/08/2009	30,7	19	23,3	97	32	75	7,2	719
13/08/2009	30,4	18,6	23,2	97	26	75	3,4	821
14/08/2009	30,4	17,9	23,1	97	27	72	1,2	657
15/08/2009	31,3	17,6	23,9	97	19	65	0	451
16/08/2009	31,8	19	24,7	95	31	72	0	534
17/08/2009	35,2	21,2	27	95	8	42	0	130
18/08/2009	34,8	19,7	26,8	81	10	44	0	0
19/08/2009	34,4	21,2	26,8	86	17	51	0	0
20/08/2009	34	21,2	27	89	21	62	0	154
21/08/2009	34,3	21,7	27,1	92	29	64	0	166
22/08/2009	31,6	21,1	24,7	91	12	54	1,2	258
23/08/2009	30,2	17,4	23,5	85	13	43	0	89
24/08/2009	29,2	17,2	22,6	79	13	45	0	0
25/08/2009	30,6	15,7	22,6	88	15	48	0	0
26/08/2009	30,8	17	23,4	91	15	58	0	69
27/08/2009			20,4			91		
28/08/2009								
29/08/2009								
30/08/2009								
31/08/2009	29,7	13,5	23,1	91	1	29	0	144
01/09/2009	29,1	14,7	21,2	88	20	62	0	193
02/09/2009	29,2	16,2	22,2	94	26	68	0,8	620
03/09/2009	28,1	18,8	23,1	97	47	80	1,4	772
04/09/2009	30	19,8	23,7	97	17	69	0	575
05/09/2009	24,2	13,6	19,6	91	1	34	0	193
06/09/2009	25,4	10,9	17,3	89	2	42	0	196
07/09/2009	25,5	13,1	18,3	77	10	38	0	0
08/09/2009	26,4	12,1	19,1	88	10	38	0	91
09/09/2009	26	14,6	19,9	61	5	32	0	0
10/09/2009	27,6	14,3	20,4	83	8	44	0	0
11/09/2009	28,4	15,8	20,9	77	3	45	0	1
12/09/2009	25,9	16,3	20,6	83	13	45	0	60
13/09/2009	26	13,8	19,5	97	20	53	23,8	133
14/09/2009	15,2	11,4	12,7	97	85	96	80,6	1440
15/09/2009	23,4	12,4	17,3	96	41	75	0	910
16/09/2009	19	15,8	16,7	97	69	96	62,4	1341
17/09/2009	24,8	15	19,3	97	41	84	0,4	819
18/09/2009	24,4	17	19,7	97	68	90	0	952
19/09/2009	25,6	16,3	19,7	97	50	83	0	853
20/09/2009	26,8	15,1	20,8	97	31	64	0	495
21/09/2009	26,7	16,8	21,3	83	25	57	0	33

22/09/2009	28	15,6	20,8	89	20	63	0	257
23/09/2009	28,8	14,7	20,3	96	25	64	0	321
24/09/2009	28,6	13,9	20	97	22	66	0	544
25/09/2009	27,4	16,8	20,7	82	25	59	0	58
26/09/2009	25	16,3	20	87	20	51	0	202
27/09/2009	25,3	13,1	18,6	89	20	55	0	216
28/09/2009	26,5	12,9	18,5	91	25	67	0	622
29/09/2009	26	13,1	18,8	93	29	70	0	656
30/09/2009	23,3	17	19,5	94	51	80	0	785
01/10/2009	23,7	16,7	19,4	97	57	85	1,2	856
02/10/2009	23,8	13,7	17,4	97	41	80	2,2	805
03/10/2009	21,5	11,6	15,1	96	26	71	0	710
04/10/2009	21,9	10,1	15,3	96	32	73	0	592
05/10/2009	22,5	14,7	17,5	95	54	81	0	860
06/10/2009	22,9	13,5	18,1	97	52	84	0	863

Tabella 7. Dati climatici relativi all'anno 2009 nei mesi di luglio, agosto, settembre. In evidenza le date in cui sono stati effettuati i trattamenti.

TMxg °C: temperature massima giornaliera;

TMng °C: temperature minima giornaliera;

TMmd °C: temperature media ;

UMxg %: umidità massima giornaliera;

UMng %: umidità minima giornaliera;

UMd %: umidità media;

PGp mm: pioggia;

BAG mm: pressione atmosferica.

Dati forniti da Co.Di.Tv (Consorzio Difesa Treviso)