

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali  
Dipartimento Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e  
Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

***Tossicità da eccessi di rame in viticoltura: l'alternativa delle  
varietà resistenti***

**Relatore**

Prof. Serena Varotto

**Laureando**

Luca Corrà

**Matricola n. 1202014**

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>6</b>
<b>CAPITOLO 1 – RAME IN VITICOLTURA</b>	<b>10</b>
1.1 – IMPIEGO DI RAME	10
1.2 – QUADRO LEGISLATIVO RIGUARDANTE IL RAME	12
1.3 – DESTINO DEL RAME A SEGUITO DELLA SUA DISTRIBUZIONE	13
1.4 – EFFETTI DELLA TOSSICITÀ DEL RAME IN VITICOLTURA	16
<b>CAPITOLO 2 – PERONOSPORA DELLA VITE</b>	<b>20</b>
2.1 – STORIA E CARATTERISTICHE DEL PATOGENO	20
2.2 – CICLO EPIDEMIOLOGICO	21
2.3 – SINTOMI SU FOGLIA	23
2.4 – SINTOMI SU GRAPPOLO	24
2.5 – SINTOMI SU GERMOGLIO E ORGANI VERDI	25
<b>CAPITOLO 3 – MECCANISMI DI RISPOSTA DELLA PIANTA ALL’INFEZIONE</b>	<b>27</b>
3.1 – MECCANISMI DI RESISTENZA COSTITUTIVI	28
3.1.1 – TRICOMI	28
3.1.2 – BARRIERE STRUTTURALI	29
3.1.3 – DIFESE COSTITUTIVE DEL TIPO CHIMICO	29
3.2 – MECCANISMI DI DIFESA INDUCIBILI	30
<b>CAPITOLO 4 – LE VARIETÀ PIWI</b>	<b>34</b>
4.1 – CARATTERISTICHE GENERALI	34
4.2 – COSTITUZIONE DEGLI IBRIDI INTERSPECIFICI	37
4.3 – DIFESA FITOSANITARIA DELLE VARIETÀ RESISTENTI	40
4.4 – VARIETÀ PIWI ATTUALMENTE REGistrate AL REGISTRO NAZIONALE DELLE VARIETÀ DA VINO	42
<b>CONCLUSIONE</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>46</b>

## **ABSTRACT**

Il seguente elaborato finale ha come oggetto la valutazione dell'impiego delle varietà di vite ottenute per ibridazione interspecifica come alternativa efficace nella riduzione nell'uso di prodotti fitosanitari a base di rame in viticoltura contro *Plasmopara viticola*.

In fase iniziale sono stati trattati cenni storici riguardanti il rame: dalla sua scoperta come prodotto utile alla difesa contro la peronospora della vite. Questa è giunta dall'America a causa dell'importazione di materiale vegetale del genere *Vitis* da impiegare per la costituzione di portinnesti resistenti alla fillossera. Verrà poi esaminato l'impiego di questa molecola nel contesto attuale, evidenziandone i meccanismi d'azione che hanno portato il rame ad assumere un ruolo chiave nella viticoltura moderna.

Giunti al quadro legislativo, che classifica il rame come sostanza candidata alla sostituzione, verrà esaminato il comportamento della molecola di rame una volta giunta nel terreno.

Verranno inoltre analizzati i suoi comportamenti con le varie componenti del terreno e le sue possibili vie di ingresso ed uscita.

Una volta illustrate queste nozioni verranno trattati i fenomeni di tossicità associati al rame nei confronti degli organismi del terreno, delle specie vegetali, degli organismi acquatici e degli esseri umani.

Per comprendere il funzionamento della resistenza delle varietà PIWI è opportuno presentare un quadro sui meccanismi di azione di un patogeno nei confronti della pianta. A tal proposito verrà presa in esame *Plasmopara viticola*, contro la quale il rame è storicamente impiegato come mezzo preventivo all'infezione.

Verranno pertanto illustrati: il ciclo epidemiologico di tale patogeno, le condizioni climatiche che favoriscono l'infezione, le modalità di ingresso nella pianta e il quadro sintomatologico.

Al fine di comprendere i sistemi di resistenza dei nuovi ibridi di vite è necessario osservare i mezzi che quest'ultima può presentare o mettere in atto per contrastare l'infezione.

La selezione genetica per la creazione di ibridi resistenti si basa infatti su queste caratteristiche, che sono ben espresse in alcune specie del genere *Vitis*.

Una volta esposte queste informazioni verrà l'argomento riguardante le varietà resistenti, con particolare attenzione sui cenni storici, sugli obiettivi e sulle caratteristiche di queste cultivar.

È infatti fondamentale focalizzare una parte dell'elaborato su come siano state storicamente ottenute queste varietà e quali siano invece le nuove frontiere dell'ingegneria genetica che possono permettere lo sviluppo di nuovi ibridi.

Infine, l'obiettivo di questo elaborato è quello di evidenziare l'impiego di questi ibridi come proposta valida per la riduzione dell'impiego di prodotti fitosanitari a base di rame, a scopo di interfacciarsi con un modello di viticoltura rivolto verso la sostenibilità.

## ABSTRACT

This dissertation is focused on the employment of the vine varieties, which are obtained through crossbreeding as an effective alternative for the reduction of the employment of copper-based plant protection products, that operate against the *Plasmopara Viticola*.

First and foremost, a brief description of the history and the characteristics of copper needs to be made. The historical background begins with its discovery as a useful product to protect the plant from the downy mildew, which had started spreading due to the importation of plant material *Vitis* genus. The latter had been imported in order to be employed for the creation of rootstocks which could be able to resist the phylloxera.

After its discovery, the implementation of such molecule will be examined with regards to current viticulture. Special attention will be paid to the responsible mechanisms for the key role of copper in modern viticulture.

Thereafter, the legislative framework will be discussed briefly, in order to introduce the analysis of the copper molecule's behavior once it reaches the soil. As a result, its interactions with other soil components will be examined, as well as its possible entry and exit ways.

Once these notions will be examined, toxicity phenomena will be introduced. The phenomena which will be taken into consideration are the ones linked with the interaction between copper and soil organisms, vegetal species, aquatic organisms, and human beings.

In order to convey the functioning of the PIWI varieties' resistance, it is necessary to provide a framework of the pathogen's modes of action concerning the plant. This essay will focus on the *Plasmopara Viticola*, against which copper has been employed, so as to prevent the infection.

The analysis will then shift on the consideration of the pathogen's epidemiological cycle, the climatic conditions which favor the infection and its symptoms.

As far as the resistance systems of these new vine-hybrids is concerned, it is fundamental to observe the means that the vine can adopt so as to fight the infection. The genetic selection for these hybrids consists of characteristics belonging to some species of the *Vitis* genus.

Thereafter, fungus-resistant grapes will be introduced, with a brief mention of the historical background, and the individuation of the aims and the characteristics of these cultivars.

It is, in fact, fundamental to focus a brief part of the dissertation on how these varieties have been obtained and which are the new frontiers of genetic engineering that can lead to the development of new hybrids.

To conclude, the aim of this dissertation is to highlight the implementation of fungus-resistant grapes as a valuable alternative to the reduction of copper-based plant protection products, with the intention of leading to a further discussion on a more sustainable viticulture model.

## INTRODUZIONE

Nella lotta contro *Plasmopara viticola* e altre malattie crittogamiche i prodotti a base di rame risultano essere tuttora molto utilizzati, in quanto risultano essere una delle opzioni storicamente più efficaci per il controllo dello sviluppo di fitopatie fungine. Questo riguarda specialmente la viticoltura biologica, nella quale risulta addirittura essere l'unica alternativa di lotta chimica ammessa per legge in grado di contrastare efficacemente lo sviluppo della malattia.

La principale problematica di questi prodotti consiste nel destino del rame residuo nel terreno: essendo un metallo pesante, esso tende ad accumularsi per lunghi archi di tempo. In questa maniera espone le componenti biotiche del terreno a rischi di tossicità.

Con il passare degli anni, ormai, l'utilizzo del rame risulta essere una soluzione obsoleta, specie in viticoltura convenzionale, ove la gamma di fitosanitari ad azione fungicida è abbastanza ampia, anche se tuttavia comprende alcune composizioni attualmente destinate alla revoca.

L'impiego di prodotti a base di rame resta però, come accennato in precedenza, una realtà ancora solida all'interno di alcuni modelli di viticoltura, specialmente in quella biologica, che per la lotta contro la peronospora dipende ancora molto dall'uso di prodotti a base di rame (La Torre et al., 2018).

Ciò continua a persistere sebbene lavori, studi e ricerche stiano proponendo sempre più soluzioni che, come obiettivo, hanno quello di ridurre o sostituire l'uso del rame. Esso, oltre tutto, risulta attualmente come sostanza candidata alla sostituzione e, di conseguenza, soggetto ad imminente revoca.

Tra le varie possibili alternative, una valida opzione è quella dell'impiego in campo di varietà resistenti a peronospora e oidio, le quali vengono ottenute attraverso l'incrocio tra cultivar di *Vitis vinifera* L. con altre varietà del genere *Vitis*. Quest'ultime hanno allo stesso tempo una buona attitudine enologica e l'induzione di un fattore di resistenza alle malattie fungine. Ventisette di queste varietà sono iscritte al Registro Nazionale delle varietà da vino.

Considerando le problematiche legate all'uso di fitosanitari contenenti rame, si valuta se l'impiego in campo di queste varietà è sufficientemente utile alla riduzione nelle quantità di fitosanitari rameici in viticoltura, presentandosi quindi come un efficace modello sostenibile.

Una questione sottintesa in questa tesi, ma che risulta opportuno puntualizzare in sede introduttiva, è che le suddette varietà risultano resistenti anche alle infezioni da oidio e botrite. Di conseguenza l'impatto in zolfo apportato a queste colture sarà a sua volta sensibilmente minore rispetto ad una cultivar convenzionale. Tuttavia, questa tesi si soffermerà nella rilevanza nell'impiego di prodotti rameici.

Verrà innanzitutto dedicato un capitolo all'utilizzo del rame, ponendo attenzione alla sua storia, al suo impiego ed alle questioni legislative che lo riguardano. Un'altra componente fondamentale da discutere riguardo al rame è quella del suo destino in seguito al suo impiego, ovvero tutti i fenomeni di incorporamento di questa molecola all'interno degli ecosistemi. Per finire, verrà posto un quadro sui fenomeni di tossicità dati da esso. Ciò è fondamentale per comprendere i meccanismi d'azione di questa molecola e perché questa sia ormai considerata rischiosa e prossima candidata alla sostituzione, di fatto, tale questione risulta essere il fulcro di questa tesi.

Un secondo argomento essenziale è la comprensione dei meccanismi d'infezione delle malattie fungine, in particolar modo la *Peronospora*, per la quale il rame è tradizionalmente impiegato.

Unito ai meccanismi d'azione del fungo, è fondamentale poi capire quali siano gli strumenti di difesa che normalmente la pianta impiega al fine di proteggersi naturalmente dalle infezioni. Essi possono essere sistemici o acquisisti.

Discusse queste tematiche, vi sono tutti gli strumenti per introdurre l'argomento delle varietà resistenti. Con le conoscenze precedentemente acquisite verrà esposto il metodo di come avviene la resistenza alle malattie di queste cultivar, analizzando quindi come agiscono i sistemi di difesa della pianta alle infezioni da peronospora.

Un altro punto importante da esaminare ha come oggetto le modalità per ottenere un ibrido di vite resistente alle malattie. Pertanto, verrà esposto come avviene il processo di ottenimento di un ibrido tra vite europea e vite americana che possa raggiungere



dei risultati apprezzabili dal punto di vista enologico, arrivando ad essere, allo stesso tempo, il meno suscettibile possibile ad infezioni fungine.

Per ultimare quest'analisi, verrà esposto il quadro legislativo riguardante queste cultivar, specificando quali di queste sono attualmente iscritte al registro nazionale delle varietà da vino.

Approfondite queste tematiche è essenziale entrare nel merito del quesito sul quale si fonda questa tesi: se, appunto, queste varietà di vite possono costituire una valida soluzione al fine di garantire una diminuzione delle quantità di prodotti a base di rame in viticoltura.

## RINGRAZIAMENTI

*Un sentito ringraziamento alla relatrice, Serena Varotto, per tutti i consigli e le indicazioni.*

*Alla mia famiglia, ai miei amici e tutti coloro che mi hanno aiutato e supportato durante questo periodo, alla loro pazienza.*

*Ma, soprattutto, il “grazie” più importante e speciale va ad Eleonora, senza il suo supporto questa tesi non avrebbe mai preso una forma, grazie a lei per aver sempre creduto in me.*

## CAPITOLO 1 – RAME IN VITICOLTURA

Il rame è una delle molecole con azione fungicida più utilizzate in viticoltura a partire dalla scoperta dei suoi effetti contro *Plasmopara viticola* negli ultimi 20 anni del 1800. Da quel momento viene impiegato in modo vasto nei vigneti europei, estrinsecando col passare degli anni fenomeni di tossicità verso le componenti del terreno.

Ciò avviene perché il rame è un metallo pesante e tende ad accumularsi nel terreno, legandosi alle componenti minerali e organiche di esso e, ad elevate concentrazioni, estrinsecando la sua azione tossica nei confronti delle comunità batteriche, degli organismi della rizosfera e nei confronti delle specie vegetali.

### 1.1 – IMPIEGO DI RAME

L'impiego di rame in agricoltura e, di conseguenza, anche in viticoltura inizia negli anni del 1880 grazie al contributo di Pierre-Marie-Alexis-Millardet, professore di botanica presso l'università di Bordeaux. Egli scoprì, infatti, che utilizzando sulla vite una miscela di limo o calce inattivata e solfato di rame ("Poltiglia Bordolese"), usata in principio sulle viti a bordo strada del Medoc per scoraggiare i furti di uva, le infezioni di *Peronospora* risultavano essere molto meno gravi rispetto alle viti sulle quali questa miscela non era stata applicata.

La *Peronospora* è una malattia fungina che colpisce diverse specie vegetali giunta dall'America grazie alle vie commerciali, prima in Irlanda, dal 1846 al 1850 causando una completa distruzione delle colture di patata causando una grave carestia.

Negli anni 1878 e 1879 si è diffusa prima in Francia poi in Italia, importata sempre dall'America settentrionale, una nuova forma di *peronospora* particolarmente virulenta e distruttiva verso la vite (Sancassani, 2017)

Dalla scoperta di Millardet, il rame sembra confermarsi come unica via per contrastare la germinazione delle spore della *peronospora*. Di conseguenza, prende piede su larga scala nelle varie colture sensibili a tale patogeno, l'utilizzo più massivo lo si ha però in viticoltura.

Un suo grande successo è dovuto essenzialmente grazie alla sua azione multi-sito sul patogeno: con una conseguente bassissima probabilità che quest'ultimo possa sviluppare fenomeni di resistenza al fungicida, ciò è stato confermato dal Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) nel 2018 (La Torre et al., 2018: 202).

Inoltre, esso risulta essere un principio attivo molto efficace non solo contro *Plasmopara viticola* ma anche contro altri agenti di malattia che colpiscono altre specie vegetali, ad esempio contro le diverse forme di peronospora che possono colpire ad esempio la patata ed il pomodoro, si può usare contro la ticchiolatura del melo (*Venturia inaequalis*) o l'occhio di pavone dell'olivo (*Spilocaea oleaginea*).

Originariamente disponibile sotto forma della cosiddetta poltiglia bordolese, attualmente il rame come principio attivo può essere distribuito secondo differenti formulazioni chimiche.

Ad oggi sono ammessi tali prodotti: poltiglia bordolese, solfato di rame tribasico, idrossido di rame, ossicloruro di rame e ossido di rame.

Per ottenere un quadro complessivo di quanto importante sia la lotta chimica contro le malattie fungine si prenda in considerazione un dato ISTAT che considera l'annata agraria 2009-2010: in funzione dell'andamento di tale annata agraria, con un'elevata quantità di idrometeorie (79.1 mm di pioggia solo nei primi mesi del 2010) e, di conseguenza, un'elevata incidenza di infezioni fungine (in tale annata ci sono state più infezioni da oidio che da peronospora) hanno comportato un complessivo di 2.7 milioni di trattamenti, in media 12,3 trattamenti per ettaro di superficie trattata. In tali trattamenti sono stati impiegati 19.1 milioni di kg di prodotti fitosanitari, 26,6 kg per ettaro di superficie trattata. Le aziende che praticano lotta fitosanitaria in vigneto sono l'89,6% e in media trattano il 94,3% della loro superficie totale.

Nella situazione complessiva di trattamenti effettuati l'89,4% di queste aziende ha effettuato trattamenti fungicidi effettuati sul 97,8% della superficie trattata.

Importante è sottolineare che della totalità di trattamenti effettuati nell'annata 2009-2010 i trattamenti antifungini risultano essere l'87,5% del totale dei trattamenti, su 19'082,27 tonnellate di prodotti distribuiti, 18'610,98 tonnellate risultano essere prodotti fitosanitari ad azione anticrittogamica (ISTAT, 2011).

## 1.2 – QUADRO LEGISLATIVO RIGUARDANTE IL RAME

Nella situazione attuale, secondo il Regolamento CE n° 1981 approvato il 1° gennaio 2019 risulta essere una sostanza candidata alla sostituzione entro il 31 Dicembre 2025, in conformità con l'articolo 24 del regolamento CE 1107/2009 ed il suo impiego è soggetto a limiti legali.

In viticoltura convenzionale non è possibile apportare più di 28 kilogrammi per ettaro in un arco di 7 anni per un complessivo di 4 kg/ha/anno, al fine di ridurre al minimo il rischio di accumulo nei suoli e l'esposizione degli organismi non bersaglio.

In viticoltura biologica, invece, il limite di rame applicabile nell'arco di un anno risulta essere superiore in quanto unica sostanza ammessa e considerato tuttora come unica opzione di lotta efficace contro *Plasmopara viticola*: se ne possono distribuire fino a 6kg/ha/anno, rimane tuttavia il limite da rispettare di 28kg/ha nell'arco di 7 anni (Perria et al., 2019)

Nella situazione legislativa attuale attuale, i prodotti endoterapici a base di rame permessi sono i seguenti:

- Idrossido di rame: con purezza  $\geq 573$  g/kg
- Ossicloruro di rame: con purezza  $\geq 550$  g/kg
- Ossido di rame: con purezza  $\geq 820$  g/kg
- Poltiglia bordolese: con purezza  $\geq 245$  g/kg
- Solfato di rame tribasico: con purezza  $\geq 490$ g/kg

Altro aspetto regolamentato riguardante la composizione di tali prodotti si occupa dei limiti legali di altri composti residui, definiti come impurezze che possono essere presenti a causa della produzione, estrazione o lavorazione del prodotto fitosanitario, i quali non devono superare la concentrazione ammessa secondo il regolamento CE 1981/2019.

Le impurezze che non devono superare le concentrazioni indicate:

- Arsenico: max 0.1 mg/g Cu
- Cadmio: max 0.1 mg/g Cu
- Piombo: max 0.3 mg/g Cu
- Nichel: max 1 mg/g Cu
- Cobalto: max 3 mg/kg
- Mercurio: max 5 mg/kg
- Cromo: max 100 mg/kg
- Antimonio: max 7 mg/kg

### 1.3 – DESTINO DEL RAME A SEGUITO DELLA SUA DISTRIBUZIONE

A seguito della sua immissione nel terreno, il comportamento del rame si può suddividere in tre frazioni: minerale, adsorbita e solubile (Cesco et al., 2019).

La frazione minerale comprende il rame contenuto nei minerali primari e secondari, quella adsorbita comprende le forme ioniche che reagiscono chimicamente con i minerali e con le sostanze minerali a carica negativa del suolo, ad esempio i colloidi, minerali argillosi, carbonati, ossidi di ferro o sostanze umiche come, ad esempio, l'acido fulvico (La Torre et al., 2018).

La frazione solubile, invece, comprende gli ioni  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{++}$ , quest'ultima frazione risulta essere quella libera che può essere adsorbita dalle piante o dai componenti del terreno (Cesco et al., 2019).

La quantità di quest'ultima frazione è strettamente legata alla quantità di materia organica disponibile nel terreno e, soprattutto, al suo pH: terreni più acidi hanno una maggiore frazione di rame disponibile, in quanto in suoli con un pH superiore al 7 il rame precipita sottoforma di idrossido di rame  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , il quale ha una bassissima solubilità in acqua (La Torre et al., 2018).

Il rame ha un ruolo importante nei processi metabolici dei vegetali, è importante evidenziare che è un costituente importante del complesso IV della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale, è anche un costituente della plastocianina, proteina di trasporto degli elettroni all'interno del cloroplasto. È anche un cofattore di enzimi coinvolti alla risposta adattiva di fenomeni ossidativi. Essendo una componente fondamentale nei processi metabolici, le piante presentano mediamente 10 µg di rame metallo per grammo di sostanza secca.

L'assorbimento avviene a livello radicale, il rame si lega alle cariche negative presenti nell'apoplasto della parete cellulare o attraverso i sistemi di trasporto trans-membrana delle forme ioniche libere ( $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , quest'ultimo subisce un processo riduttivo di tipo enzimatico a livello della membrana plasmatica). Una volta all'interno dei sistemi vascolari della pianta il rame non viene mai traslocato come tale ma sempre complessato a molecole organiche, specialmente all'acido citrico (Cesco et al., 2019).

È però fondamentale specificare che, considerando un terreno agrario, nel modo più specifico un terreno coltivato a vite, la frazione di rame presente nel terreno non dipende solamente dalla parte presente nel terreno nelle tre frazioni sopracitate, vi sono degli apporti che portano questo valore ad aumentare e possono essere di carattere naturale o antropico.

Alcune quantità di rame possono venire apportate ad un terreno in modo naturale, attraverso eventi atmosferici quali eruzioni vulcaniche o incendi boschivi. È però il fattore antropico quello che maggiormente interessa l'accumulo di rame nei terreni coltivati e non. Infatti, le principali vie di accesso di rame sono dovute alla fertilizzazione, alla difesa chimica ed alle attività industriali (Mantovi; 2003: 67).

Per la maggior quantità di rame presente nei terreni si considera come primo responsabile la frazione ceduta dai prodotti fitosanitari antifungini, i quali solitamente sono distribuiti per contatto sulla superficie fogliare, ma possono raggiungere il terreno attraverso fenomeni di lisciviazione dovute alle piogge, attraverso il vento o attraverso errate distribuzioni che possono causare il cosiddetto effetto deriva, portando il prodotto lontano dall'area bersaglio (La Torre et. al., 2018: 202).

Al di là di tali fenomeni, il rame non viene direttamente assorbito dall'apparato epigeo delle specie vegetali, di conseguenza con il passare del tempo è destinato ugualmente a raggiungere gli orizzonti superficiali del terreno.

Una volta raggiunto il terreno, i destini di tale prodotto possono essere diversi, come considerazione preliminare è fondamentale sottolineare che si tratta di un metallo pesante ed in quanto tale non è soggetto a fenomeni di degradazione.

Di conseguenza le quantità di rame che il terreno riceve difficilmente tendono a ridursi con il tempo, a meno che questo non venga allontanato per percolazione profonda o assorbito dalle piante o da altri organismi.

Non potendo essere quindi degradato o viene allontanato attraverso l'azione dell'acqua o viene assorbito da vegetali o da organismi del terreno o si lega alla frazione minerale o organica del terreno.

Considerando questi fattori il rame è considerabile come sostanza soggetta a bioaccumulo, tale fenomeno non è però attribuibile unicamente al rame come elemento, ma anche al tipo di terreno, il quale può avere una differente tendenza ad accumulare metalli pesanti, la quantità di materia organica e minerale che può legare il rame possono portare la frazione adsorbita di rame ad aumentare.

È necessario però prestare riguardo all'azione del pH sul livello quantitativo della frazione disponibile del rame. In un terreno agricolo è plausibile che il pH del terreno possa variare in base ad alcune operazioni agronomiche, specie la nutrizione a base di ammonio, la quale tende ad acidificare la rizosfera e può spostare la frazione di rame adsorbita ad una frazione libera, lo stesso vale per la sostanza organica nel terreno, la quale sottrae parte del rame che giunge nel terreno, se quest'ultima viene consumata, la quantità di rame in forma ionica è ugualmente destinata ad aumentare (Cesco et al., 2019). Recrudescenze e problematiche di bioaccumulo di tale elemento possono generare varie problematiche le quali, come verrà discusso nella sezione successiva, non sono di difficile estrinsecazione in un ambiente viticolo.



## 1.4 – EFFETTI DELLA TOSSICITÀ DEL RAME IN VITICOLTURA

Il terreno presenta, come tale, una frazione di rame pari a mediamente 10 – 20 ng per kg di suolo e come elemento risulta essenziale alle specie vegetali come cofattore di alcuni enzimi nonché è fondamentale il suo ruolo nella catena di trasporto degli elettroni mitocondriale e nel trasporto di elettroni nel cloroplasto (plastocianina).

Tuttavia, in un ambiente agricolo, specialmente in viticoltura, gli apporti di rame attraverso la difesa fitosanitaria contro *Plasmopara viticola* e la nutrizione minerale possono portare a fenomeni di bioaccumulo di rame (Mantovi; 2003: 67).

Portando alcuni esempi le quantità di rame accumulato nei vigneti europei varia secondo questi valori: 22-398 mg/kg in Francia (Chaignon Et al, 2003), 33-1120 mg/kg in Spagna (Fernandez-Calvino Et al, 2010) e mediamente tra 215 a 800 mg/kg in Italia.

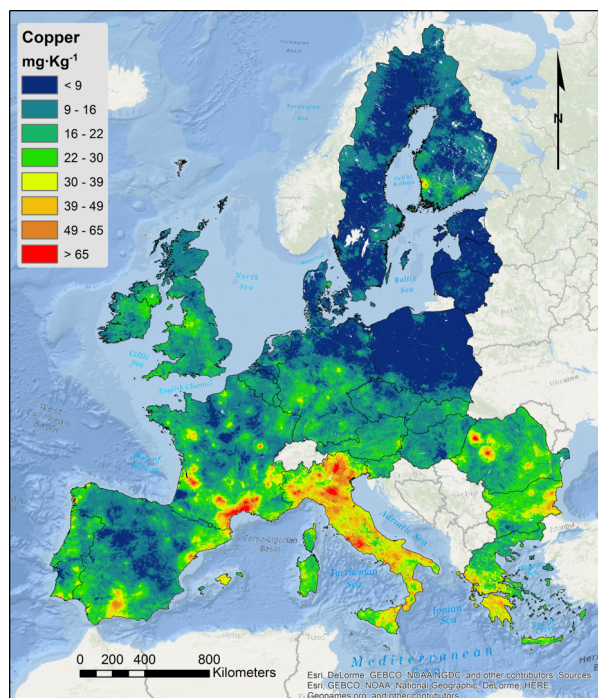


Figura 1 - Mappa di distribuzione del rame nei suoli degli stati della comunità europea (<https://esdac.jrc.ec.europa.eu/themes/copper-topsoils>)

La sola presenza dell'elemento rame non è tuttavia sufficiente ad estrinsecare fenomeni di tossicità. È stata stabilita una soglia di sicurezza, attraverso prove di laboratorio, che dimostra che il rischio di tossicità dato da eccessi di accumulo di rame nei terreni agrari si può presentare al di sopra dei 100-150 mg/kg di suolo (Manici et al., 2019).

Al di là dell'apporto umano la tossicità dipende anche dalla disponibilità del terreno di legare o adsorbire il rame non rendendolo quindi disponibile alla pianta o agli organismi della rizosfera.

Fenomeni di tossicità si possono visualizzare ad esempio attraverso le comunità batteriche indigene: nelle zone della rizosfera si può osservare una diminuzione della varietà delle specie, in quanto quelle più sensibili soffrono la presenza del rame, ciò porta ad un drastico calo della cosiddetta "richness" del terreno.

La perdita di quest'ultima diminuisce sensibilmente l'efficienza metabolica del terreno, indicato come rapporto tra anidride carbonica svolta per via della respirazione microbica e biomassa presente nel suolo (Manici et al., 2019)

I microrganismi più sensibili agli effetti tossici del rame fanno parte maggiormente ai generi *Clostridium*, *Azotobacter*, *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, molti dei quali risultano importanti per l'assimilazione dell'azoto nei terreni.

L'accumulo di rame legato alle sostanze organiche e umiche del terreno ha un effetto negativo non solo sui microrganismi ma anche organismi come i lombrichi, i quali nutrendosi della frazione organica possono risentire delle elevate quantità di rame o migrare nelle frazioni di suolo non contaminate, ad esempio negli strati di suolo più profondi, con un conseguente fenomeno di impoverimento dello strato coltivato.

La diminuzione di microrganismi ed organismi nel terreno può ridurre la capacità di quest'ultimo di decomporre la sostanza organica in humus, riducendo quindi progressivamente la fertilità del terreno e sottraendo la disponibilità di adsorbire ulteriori quantità di rame, aumentando quindi progressivamente il rischio e l'entità di fenomeni di tossicità.

Dal momento che il rame non subisce fenomeni degradativi nel terreno, non viene decomposto né assorbito facilmente da piante e organismi, si ha il rischio che la quantità eccessiva che si trova nel terreno possa venire allontanata tramite l'azione

dell'acqua: ovvero attraverso la percolazione profonda con conseguente accumulo di rame nelle falde o l'allontanamento attraverso i corsi d'acqua fino al raggiungimento dei bacini idrici. Di conseguenza si possono osservare ulteriori effetti tossici da parte del rame verso gli organismi acquatici e le alghe.

Gli effetti del rame nel terreno si possono esprimere inoltre con fenomeni di fitotossicità, con maggiore incidenza, nella vite, a livello radicale e fogliare.

Il rame nelle specie vegetali estrinseca facilmente fenomeni di accumulo a livello radicale in quanto tale apparato è il primo stadio di assorbimento di tutte le sostanze e molecole, compreso il rame, il quale viene assorbito attraverso l'apoplasto della parete cellulare ma, non venendo facilmente traslocato all'interno della pianta tende ad accumularsi, formando anche legami con le pareti cellulari aumentandone la rigidità e, di conseguenza, diminuendo l'accrescimento dell'apparato radicale compromettendone quindi la capacità esplorativa ed il potere di assorbimento di sostanze utili alla pianta. Tale problematica può essere significativa, ad esempio, in fase di reimpianto, compromettendo potenzialmente l'affrancamento e lo sviluppo dell'apparato radicale delle barbatelle (Cesco et al., 2019).

Essendo un oligoelemento fondamentale per alcuni processi metabolici, il rame può originare fenomeni di carenza che si manifestano con ridotti sviluppi fogliari, con ingiallimenti internervali e macchie necrotiche, tuttavia sono casistiche decisamente rare, favorite da terreni poveri di rame o particolarmente ricchi di sostanza organica in grado di immobilizzare l'elemento, non rendendolo quindi disponibile alla pianta. In aggiunta alla rarità di tale fenomeno si considerano i consistenti apporti di rame nei suoli agricoli.

A livello epigeo un eccesso di rame nel terreno si può tradurre visivamente con un ridotto accrescimento dei tralci, dovuti essenzialmente all'insufficiente traslocazione da parte dell'apparato radicale, si possono visualizzare inoltre ingiallimenti e necrosi su foglia. A livello cellulare è possibile che la presenza di rame in esubero generi fenomeni di stress ossidativi con emissione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che possono portare alla morte cellulare e alle conseguenti formazioni necrotiche sulle foglie (La Torre et al., 2018)

Come tutti i metalli pesanti, anche il rame può raggiungere l'alimentazione umana attraverso la catena alimentare nonché presentare un rischio per gli operatori durante la distribuzione di prodotti fitosanitari. Se ingerito in grandi quantità il rame può essere dannoso per la salute umana, causando problemi gastrointestinali, danni al fegato, disturbi immunitari e immunologici. Può generare problematiche nella sfera riproduttiva, ad esempio si sono riscontrati casi di impotenza nel 16% di personale esposto a dosi di rame da 111 a 434 mg/m<sup>3</sup> di rame in forma polverulenta.

Esposizioni al rame possono inoltre causare reazioni cutanee e secondo alcuni studi potrebbero essere un fattore ambientale scatenante del morbo di Alzheimer e di Parkinson (La Torre et al., 2018)

Un'altra problematica legata agli eccessi di apporti di rame la si può avere nella gestione delle fermentazioni in ambiente di cantina. Impiegando prodotti fitosanitari a base rameica per il controllo delle infezioni da parte di *Botrytis cinerea* nel periodo precedente all'epoca di vendemmia, seppur rispettando i tempi di carenza del prodotto, che per l'ossido di rame corrisponde ad esempio a 20 giorni, è possibile che le quantità di rame presenti nell'uva e di conseguenza nel mosto possano ostacolare le cinetiche di fermentazione, avendo un effetto inibente sui lieviti, a favore dell'azione dei batteri con un conseguente incremento di acidità volatile nel vino, abbinato a inefficienti cinetiche di fermentazione. Inoltre, si ha il rischio di superare il limite legale di rame presente nel prodotto finito e destinato al consumo, imposto a 1mg/l (Sancassani, 2017).

## CAPITOLO 2 – PERONOSPORA DELLA VITE

*Plasmopara viticola* è una delle principali patologie fungine della vite. Giunta in Europa dall'America a fine dell'Ottocento ha sviluppato un'elevata severità nei suoi sintomi verso la vite europea.

Si tratta di un oomicete che penetra attraverso le aperture stomatiche della pagina inferiore della foglia con l'avvento delle condizioni climatiche favorevoli.

Può sviluppare diversi cicli d'infezione all'interno di una singola annata agraria, colpendo così diversi organi della vite.

### 2.1 – STORIA E CARATTERISTICHE DEL PATOGENO

La peronospora della vite (*Plasmopara viticola*) è una delle patologie fungine più severe per quanto riguarda la coltivazione di *Vitis vinifera*, alla quale appartengono la quasi totalità delle uve atte alla vinificazione.

Peronospora, scoperta nel Nord-Est degli Stati Uniti nel 1834, inizialmente classificata come *Botrytis cana* e successivamente come *Botrytis viticola*, è stata infine correttamente denominata, secondo le classificazioni di Schröder, come *Plasmopara viticola* nel 1888.

Importata in Europa dal continente americano attraverso il materiale vegetale di *Vitis*, appartenente alle specie americane utilizzate per la realizzazione di portinnesti resistenti alla fillossera, *P. viticola* è considerabile endemica alle specie selvatiche americane.

Con il suo arrivo in Europa, il patogeno si diffonde nel 1878 a partire dalla Francia, poi in tutto il continente, estrinsecando i suoi effetti dannosi sulle coltivazioni. Nei primi anni ciò interessa solo gli apparati fogliari; tuttavia, in seguito, raggiunge anche le infiorescenze e, con le infezioni successive, gli acini.

Nei primi anni dall'arrivo in Europa, sebbene le infezioni risultarono sporadiche, i danni causati da *Plasmopara viticola* risultano essere sin dal principio di una severità rilevante.

Nel 1915, ad esempio, il 70% del raccolto in Francia è stato distrutto da infezioni da peronospora. Durante gli anni tra le due guerre queste malattie sono state severe in tutta Europa; non solamente a causa delle condizioni climatiche, ma specialmente a

causa dell'inefficienza degli approvvigionamenti di rame alle colture dovute alle Guerre Mondiali (Gessler et al., 2011).

Per quanto riguarda le sue caratteristiche, il patogeno può essere considerato un oomicete policiclico: ovvero che può generare più infezioni successive all'interno di una singola annata (Vercesi 1995).

Esso appartiene al regno dei *chromisti*, phylum *heterokontophyta* e classe *oomycota*. Quest'ultimi non sono propriamente classificati come funghi in senso stretto, poiché presentano alcune differenze rispetto al regno dei funghi: sono caratterizzati infatti da un micelio cenocitico, ovvero sprovvisto di setti tra le cellule.

Pertanto, la peronospora consiste in un micelio non settato con più nuclei, i quali sono diploidi a differenza dei funghi che sono solitamente aploidi o dicariotici, mentre alcuni solo brevemente diploidi.

Essa presenta una parete di cellulosa e glucani, non presenta chitina (caratteristica di un fungo).

Un'altra differenza rispetto al regno dei funghi è la presenza di mitocondri con creste tubolari a differenza delle creste lamellari (Causin, 2020).

Una sua caratteristica peculiare è il polimorfismo delle sue spore: le oospore, le forme svernanti nonché responsabili dell'infezione primaria sono originate da una riproduzione sessuata mentre le oospore che generano le infezioni successive, durante la stagione vegetativa della pianta, sono prodotte attraverso una riproduzione asessuata (Caffi et al., 2010).

## 2.2 – CICLO EPIDEMIOLOGICO

Si considera l'inizio del ciclo con la corrispondenza dell'evento dello svernamento delle oospore, ovvero lo stadio dormiente del patogeno, situato ad esempio nei resti di potatura infetti lasciati in campo durante l'inverno. Come esigenze per la germinazione delle oospore, le quali maturano durante l'inverno e le prime fasi primaverili, si ha una somma termica di almeno 8°C.

Avvenuta la completa maturazione l'oospora germina ed emette un macrozoosporangio con un favore delle temperature almeno al di sopra dei 10°C, fondamentale è inoltre l'umidità della lettiera, in quanto le zoospore, emesse dal macrozoosporangio hanno bisogno dell'acqua per potersi muovere.

Al fine che l'infezione possa avvenire è necessario, inoltre, che il germoglio si sia già sviluppato fino ad una lunghezza di almeno 10 cm e che ci siano stati almeno 10 mm di pioggia concentrati in 24 ore (Pertot et al., 2007).

Con l'avvento della pioggia cosiddetta "infettante" le zoospore raggiungono la pianta attraverso gli schizzi di pioggia o attraverso i moti d'aria e migrano verso le aperture stomatiche, attraverso le quali germinano e iniziano a formare il micelio attraverso le cellule del mesofillo, penetrando in esse anche grazie alla costituzione di austori, questa fase è considerata di incubazione, la cui durata varia in funzione della temperatura (Burruano, 2000).

In condizioni di foglia bagnata e con temperature circa superiori a 12°C avviene la sporulazione del micelio, il quale emette svariati rami zoosporangiofori sempre attraverso le aperture stomatiche. Dei vari rami zoosporangiofori che vengono emessi da uno stoma soltanto uno completerà la maturazione mentre gli altri vengono generalmente abortiti nell'arco di 6 o 8 ore.

Giunto a questo punto del ciclo, in funzione delle temperature e della stagione, da questi rami zoosporangiofori si possono ottenere ulteriori zoospore responsabili delle infezioni secondarie oppure delle oospore, le quali maturano durante la stagione invernale, generando poi le infezioni primarie nell'anno successivo.

Nel caso delle infezioni secondarie, in condizioni di umidità superiori a 12°C, con umidità relativa superiore al 93%, durante la notte avviene l'emissione dei rami zoosporangiofori, i quali emettono degli sporangi per via asessuata, questi ultimi vengono rilasciati e da essi vengono emesse le zoospore che daranno inizio al secondo ciclo di infezione.

Nella stagione autunnale nei rami zoosporangiofori avviene l'unione dell'oogonio e dell'anteridio, di conseguenza attraverso la riproduzione sessuata vengono emesse le oospore (Causin, 2020).

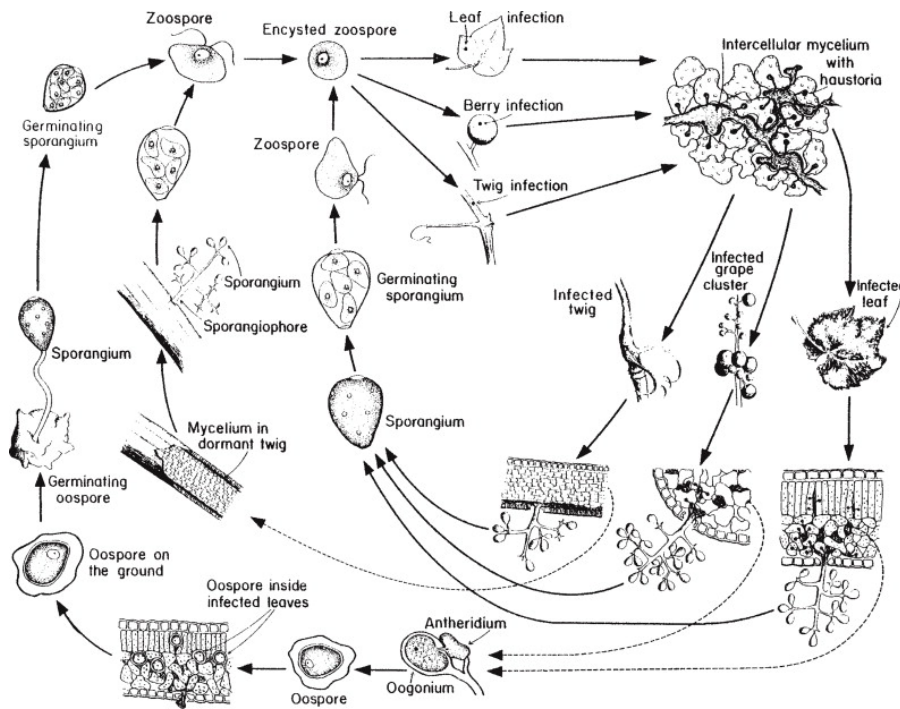


Figura 2 – Ciclo epidemiologico di *Plasmopara viticola* (<https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B978012373646850007X-f04-44-9780123736468.jpg>)

### 2.3 – SINTOMI SU FOGLIA

I primi sintomi visibili di patologia da *Plasmopara viticola* si manifestano sulle foglie. Durante la fase di incubazione è possibile iniziare ad individuare sulla pagina superiore della foglia delle chiazze di un colore dal verde chiaro ad un giallo. Tanto più si sviluppa il micelio all'interno delle cellule fogliari più l'aspetto di queste chiazze tondeggianti sembra essere traslucido, costituendo la cosiddetta macchia d'olio (Figura 3).

Sulla pagina inferiore, in corrispondenza della chiazza sulla pagina superiore, si può notare una chiazza polverulenta bianco-grigiastria: si tratta dei rami zoosporangiofori che vengono emessi durante la fase di sporulazione.

Con l'avanzare dell'infezione le chiazze necrotizzano a partire dal centro, causando disseccamenti localizzati su foglia, che in casi severi possono generare gravi fenomeni di filloptosi. Nelle foglie più sensibili è possibile che si notino direttamente la sporulazione e la necrosi direttamente senza la formazione della macchia d'olio. Se le



infezioni secondarie colpiscono foglie in età più avanzata si possono notare fenomeni di peronospora a mosaico (necrosi originate da piccole macchie clorotiche sparse sull'intera superficie fogliare, specialmente in prossimità delle nervature) quanto le foglie più mature hanno una maggiore resistenza al patogeno e, di conseguenza, estrinsecano in un modo meno marcato la manifestazione sintomatologica della malattia (Pertot et al., 2007).

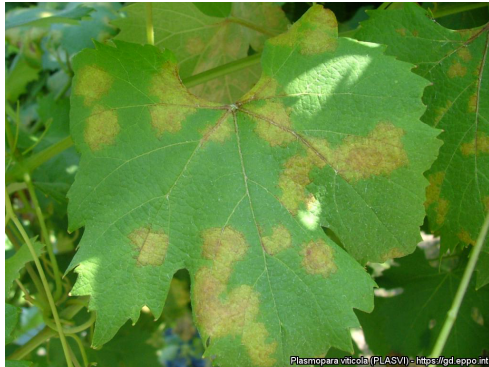


Figura 3 – Sintomi su pagina superiore, visibili svariate “macchie d’olio” (<https://gd.eppo.int/taxon/PLASVI/photos#>)

Figura 4 – Sintomi su pagina inferiore, visibile fenomeno di sporulazione con rami zoosporangiofori (<https://gd.eppo.int/taxon/PLASVI/photos#> )

## 2.4 – SINTOMI SU GRAPPOLO

In seguito all’infezione primaria che interessa le foglie, i sintomi della malattia iniziano a manifestarsi anche sul grappolo. Tale fenomenologia sintomatologica è la più severa dal punto di vista quantitativo della produzione d’uva, in quanto colpisce direttamente il frutto stesso.

Le infezioni possono avvenire con il grappolo ancora in fase di sviluppo, portando ad uno sviluppo deforme, ad uncino o ad esse.

Un altro stadio di sviluppo caratterizzato da un’alta sensibilità al patogeno lo si ha dopo l’allegagione, quando gli acini in fase di sviluppo e ancora verdi possono risultare visibilmente ricoperti dai rami zoosporangiofori.

Se i fenomeni sul grappolo si sviluppano ad una fase fenologica più avanzata, in funzione delle temperature e dell'umidità si possono notare le solite ramificazioni biancastre.

Una volta superati i 2mm di diametro, gli stomi dell'acino tendono atrofizzano, di conseguenza non vi sono siti d'ingresso per il patogeno, a meno che questo non raggiunga le cellule dell'acino attraverso il peduncolo. In questo caso si parla di peronospora in forma larvata, la quale si manifesta con un imbrunimento dei frutti, i quali sono sensibili alle infezioni fino all'inizio dell'invasatura (Pertot et al., 2007).



Figura 5 – Sintomi su grappolo in seguito all'allegagione, visibili i rami zoosporangiofori sulla buccia dell'acino (<https://gd.eppo.int/taxon/PLASVI/photos#>)



Figura 6 – Sintomi su grappolo di forma larvata di *P. viticola* (<https://gd.eppo.int/taxon/PLASVI/photos#>)

## 2.5 – SINTOMI SU GERMOGLIO E ORGANI VERDI

I germogli in fase erbacea possono subire infezioni dirette soprattutto in corrispondenza dei nodi o in modo indiretto attraverso i piccioli delle foglie che hanno precedentemente subito un'infezione. Di conseguenza è importante sottolineare che tutti gli organi verdi sono suscettibili a *Plasmopara viticola*, in quanto presentano stomi, i quali fungono da sito d'ingresso per il patogeno.

La sintomatologia sul germoglio si può tradurre con una crescita stentata ed irregolare, contorte, a causa della formazione di zone necrotiche che perturbano l'accrescimento regolare del germoglio. Lo stesso fenomeno si può notare sui viticci, i quali se presentano zone infette possono anch'essi presentarsi contorti e scarsamente sviluppati (Pertot et al., 2007).



Figura 7 – *Sintomi su germoglio, visibile all'essatura brunastra* (<http://agroambiente.info.arsia.toscana.it/arsia/arsia?ae5Diagnosi=si&IDColtura=2&IDSchedaFito=1>)

## CAPITOLO 3 – MECCANISMI DI RISPOSTA DELLA PIANTA ALL'INFEZIONE

Generalmente, la suscettibilità al patogeno nelle varie specie del genere *Vitis* non è una caratteristica globalmente riconoscibile come qualitativa della pianta: non tutte le specie e, addirittura, non tutte le cultivar hanno un medesimo meccanismo di risposta alle infezioni da parte di agenti patogeni come ad esempio *Plasmopara viticola*.

Questa differenza è data dalla presenza di meccanismi di difesa che la pianta può attuare, i quali si possono suddividere essenzialmente in due categorie: le difese costitutive che comprendono tutte quelle caratteristiche naturalmente presenti nella pianta le quali possono costituire un ostacolo all'ingresso di patogeni e le difese inducibili, le quali vengono attuate come risposta attiva all'infezione (Causin, 2020).

Come accennato in precedenza l'efficacia di questi sistemi di difesa non è costante in tutte le specie e varietà del genere *Vitis*: comparando ad esempio le varietà provenienti dall'America con quelle eurasiatiche è normale constatare che le prime, essendo evolute in contemporanea con molte delle fitopatie che colpiscono il settore viticolo, presentano una suscettibilità minore rispetto a quelle europee, le quali non si sono invece evolute in presenza del patogeno e non presentano di conseguenza una base genetica di resistenza o, per lo meno, non ugualmente efficace rispetto a specie che hanno avuto un percorso evolutivo a stretto contatto con il patogeno e che, di conseguenza, hanno avuto maggiori opportunità di coevolvere con esso estrinsecando delle caratteristiche di resistenza (Paolucci, 2012).

Per quanto riguarda le varietà possiamo considerare ad esempio i Pinot Noir, Pinot Blanc, Riesling e Cabernet Sauvignon come poco suscettibili, i Müller-Thurgau come mediamente resistenti mentre alcune varietà come ad esempio Tempranillo, Touriga Nacional e Albariño risultano essere decisamente suscettibili alle infezioni (Boso et al., 2008).

### 3.1 – MECCANISMI DI RESISTENZA COSTITUTIVI

Nella considerazione dei rapporti pianta-ambiente, la vite può presentare delle caratteristiche precostituite che possono contrastare l'ingresso dei patogeni.

Tra queste si possono suddividere due categorie: le barriere strutturali, le quali creano un ostacolo fisico ad azione meccanica e le difese costitutive di tipo chimico, costituite da sostanze naturalmente presenti nei tessuti della pianta, le quali presentano un'azione repellente verso il patogeno. (Causin, 2020)

#### 3. 1.1 – TRICOMI

Ponendo attenzione al sito di infezione della pianta negli stadi primari, ovvero la pagina inferiore della foglia la quale presenta le aperture stomatiche, fondamentale è l'azione dei tricomi. (Kono et al., 2020)

Questi sono originati da estroflessioni del tessuto epidermico o dall'idatode (non nel caso della vite) e possono suddividersi in tricomi non ghiandolari e ghiandolari (Wagner et al., 2004).

Tra le tante funzioni che hanno, tra cui la termoregolazione, la regolazione della traspirazione e della bagnatura possono costituire un ostacolo alla mobilità delle oospore impedendo che esse raggiungano l'apertura stomatica (Wagner et al., 2004). Tale fenomeno avviene grazie alla tensione superficiale che l'acqua crea con la superficie idrofobica dei tricomi, così facendo le zoospore, necessitando di acqua per il movimento, non riescono a raggiungere così l'apertura stomatica. Inoltre, la presenza di tricomi può di fatto essere un ostacolo fisico allo spostamento delle zoospore verso gli stomi (Paolucci, 2012).

Vi sono poi i tricomi ghiandolari, i quali possono emettere sostanze che possono risultare repellenti verso il patogeno o anche verso degli insetti, in particolare sostanze volatili appartenenti alla famiglia degli isoprenoidi mono e diterpenici, i quali hanno azione antimicrobica.

La presenza di tricomi è quantitativa e dipende dalla specie e dalla varietà. Una specie che ad esempio presenta una fitta trama di tricomi nella pagina inferiore è *Vitis*

*labrusca*, la loro espressione genica è mediata dai quantitative trait locus (QTL) (Kono et al., 2020)

### 3.1.2 – BARRIERE STRUTTURALI

Un altro ostacolo all'ingresso e alla proliferazione del patogeno sono tutte quelle componenti strutturali della pianta e delle cellule: la superficie della foglia, ad esempio, presenta una cuticola protettiva di uno spessore di circa 5 -20  $\mu\text{m}$ , costituita da uno strato spugnoso di cutina, un polimero di monolignoli esterificati con acidi grassi C-16 C-18 all'interno della quale sono infiltrate delle cere idrofobe.

La cuticola cede poi il passo alle pareti cellulari caratterizzate da cellulosa e dalle lamelle mediane costituite principalmente da pectine, tali strutture sono importanti per contrastare lo sviluppo del micelio e dei suoi austeri. La rigidità aumenta con l'aumento di cellulose, lignina, xiloglucani e idrossiprolina che legano le microfibrille di pectina dando una struttura più rigida alla parete cellulare

### 3.1.3 – DIFESE COSTITUTIVE DEL TIPO CHIMICO

La vite presenta delle sostanze chimiche precostituite le quali possono contrastare l'azione dei patogeni. Queste vengono solitamente sintetizzate e stoccate all'interno del vacuolo cellulare, anche in forma glicosidata e liberate in seguito per via enzimatica.

Per la maggior parte si tratta di complessi proteici ad azione organo-specifica o tessuto-specifica. Nel contrasto contro i patogeni fungini la pianta può impiegare enzimi come chitinasi e glucanasi per disgregare le pareti del micelio, o può inibire le pectinasi fungine, attraverso dei complessi proteici inibitori delle pectinasi del patogeno, grazie alle quali può penetrare attraverso le pareti cellulari vegetali. Altri complessi enzimatici come le lectine e le tionine possono disturbare la formazione del micelio attraverso meccanismi inibitivi verso la sintesi delle macromolecole e alterando le funzionalità delle membrane

### 3.2 – MECCANISMI DI DIFESA INDUCIBILI

Oltre alle forme di difesa passiva delle quali la vite può disporre per il contrasto all'ingresso dei patogeni, questa può indurre dei meccanismi difensivi ex-novo che vengono messi in atto quando viene percepita un'infezione in corso da parte di un patogeno (Causin, 2020).

Un tipo di risposta possibile è quella ipersensibile: ove la pianta, riconosciuto il patogeno, porta ad una rapida morte delle cellule a contatto col patogeno per evitare che quest'ultimo si possa diffondere sul resto dei tessuti.

Un altro meccanismo comune di risposta alle infezioni è il Burst ossidativo: il quale comporta un accumulo nell'apoplasto cellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), anione superossido ( $O_2\cdot$ ) e radicale idrossile ( $OH\cdot$ ). Le ROS sono emesse per azione enzimatica da NADP(H) ossidasi nel plasmalemma, dalle perossidasi e il superossido dismutasi dell'apoplasto. È fondamentale la presenza dello ione  $Ca^{2+}$ , il quale passando nei canali apoplastici attiva la chinasi che a sua volta innesca la produzione di anione superossido da parte della NADP(H) ossidasi, il quale poi viene trasformato in  $H_2O_2$  dall'enzima superossido dismutasi.

Il perossido di idrogeno è una molecola con elevata mobilità ed essendo una forma chimicamente instabile è molto reattiva, può trasferirsi facilmente nelle cellule vicine innescando consecutivi burst ossidativi, importante è inoltre il legame con le glicoproteine della parete ricche di idrossiprolina, questo porta ad un irrigidimento della parete, la quale risulterà quindi più robusta.

Le ROS accelerano inoltre la risposta ipersensibile della pianta velocizzando quindi la necrosi delle cellule affette dal patogeno.

Fondamentale è l'azione delle ROS nella traslocazione del segnale di attivazione dei geni di difesa: questa forma attiva innescata dal burst ossidativo porta alla sintesi di altre forme difensive come le fitoalessine e le PR proteins.

Le fitoalessine derivano dalla deviazione dalla via delle sintesi degli isoprenoidi e non vengono sintetizzate nelle piante sane. L'enzima chiave per la sintesi di questi composti è la fenilalanina ammonioliasi, è di conseguenza fondamentale la presenza della fenilalanina, la quale, per l'azione enzimatica porta alla sintesi del resveratrolo,

il quale ha una mite azione contro i patogeni ma funge come importante intermedio nella sintesi di fitoalessine con un'azione più impattante: la dimerizzazione del resveratrolo porta alla formazione delle viniferine (Jeandet et al., 2002)

Altre fitoalessine sono prodotte non solo come sottoprodotto della via di sintesi dei composti fenolici ma anche prodotte, ad esempio, dall'acido benzoico, dal quale si può ottenere acido salicilico, fondamentale per la sistemizzazione della risposta inducibile (Causin, 2020).

Se emesse in rapidità all'inizio dell'infezione le fitoalessine hanno un effetto inibente nella crescita del micelio e bloccano la sporulazione degli sporangi, mentre alcune fitoalessine della famiglia degli stilbeni portano a deformazioni del micelio.

Un'altra forma di risposta inducibile associata all'attivazione dei geni di difesa da parte del burst ossidativo è la sintesi delle PR-proteins, le proteine associate alla patogenesi: una serie di proteine o enzimi appartenenti a famiglie diverse, con azioni diverse nei confronti del patogeno, vi sono proteine che agiscono contro la parete del micelio fungino come le chitinasi e le  $\beta$ -1,3-glucanasi, vi sono poi le perossidasi che rafforzano la lignificazione della parete e promuovono la sintesi di fitoalessine, altre con azione antimicrobica come le difensine e le tionine.

La risposta inducibile non è solo del tipo chimico, una forma strutturale può essere ad esempio la costituzione della papilla in corrispondenza del sito di ingresso del micelio, nel quale la cellula ispessisce la sua parete con una trama di callosio e cellulosa al fine di bloccare l'ingresso del patogeno.

Affinché tutti questi meccanismi possano essere avviati è fondamentale però che la pianta riconosca e noti la presenza del patogeno, ciò avviene attraverso il riconoscimento di una parte di quest'ultimo chiamata elicitore, il quale viene riconosciuto da un recettore presente sulla parete cellulare della pianta, il quale invia un segnale ad una proteina chiamata effettore, la quale avvia i canali di ingresso dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ , il quale avvia le chinasi che attivano il processo del burst ossidativo e, di conseguenza, la risposta indotta all'ingresso dell'organismo nocivo. Gli elicitori possono essere aspecifici, quindi caratteristici di diverse specie di patogeni come ad esempio molecole come chitosano, chitina, ergosterolo, flagellina o oligogalatturonidi.



Vi sono poi degli elicitori specifici, appartenenti ad un patogeno e consentono alla pianta di riconoscerlo direttamente come tale. Tale principio denota la presenza quindi di una resistenza di tipo sia aspecifico che specifico, quest'ultima innescata dal riconoscimento di un elicitore specifico e come effetto solitamente si traduce in una risposta ipersensibile, quindi con una morte cellulare localizzata solo nei siti di ingresso del patogeno.

Gli elicitori aspecifici vengono riconosciuti come pattern molecolari e vengono suddivisi in pattern associati al patogeno (PAMPS) o al danno causato (DAMPS). La risposta difensiva: ovvero l'attivazione delle chinasi con conseguente burst ossidativo può venire innescata in due modi diversi: o attraverso l'elicitore o attraverso l'effettore. Nel primo caso il recettore (NB-LRR proteins: *nucleotide-binding-leucine-rich-repeat*) riconosce direttamente l'elicitore avviando quindi i meccanismi di resistenza, questa si chiama PAMPS triggered immunity (PTI), poiché attivata dall'elicitore del patogeno. Tuttavia, in alcuni casi, ad esempio se prima del riconoscimento dell'elicitore da parte del recettore il patogeno genera un austorio all'interno della cellula, il quale emette un effettore che può assumere il ruolo di elicitore ed innescare i meccanismi difensivi della pianta venendo riconosciuto da un recettore interno, questa si chiama effector triggered immunity (ETI).

Una volta riconosciuta la presenza del patogeno all'interno della pianta la risposta difensiva può essere sistemizzata all'interno della pianta: ovvero il segnale di innesco della reazione che porta alla sintesi della difesa indotta può essere inviato alle parti sane della pianta, attraverso due modalità: resistenza sistemica acquisita (SAR) e resistenza sistemica indotta (ISR).

La sistemizzazione del tipo SAR dipende dal riconoscimento degli austori del patogeno e dagli acidi salicilico e jasmonico (Chong et al. 2007). Queste molecole non sono il segnale di sistemizzazione che viene traslocato, il loro compito è quello di sbilanciare il potenziale redox citoplasmatico, liberando dal legame disolfuro il mediatore NPR1, il quale passa nel nucleo dove interagisce con i fattori di trascrizione TGA e WKRY, i quali legano ai promotori dei geni di resistenza SA-dipendenti, i quali vengono attivati traducendosi nella traduzione di PR-proteins.

La sistemizzazione della resistenza nei tessuti sani avviene infatti attraverso l'emissione di proteine associate alla patogenesi.

Il segnale di sistemizzazione SA-dipendente, come accennato in precedenza non è l'acido salicilico, quest'ultimo innesca i processi che portano all'attivazione della SAR. La diffusione del segnale avviene attraverso il floema grazie a segnali di derivazione lipidica come G3P glicerolo-3-fosfato (Causin, 2020).

Considerando infine che la risposta di tipo SAR non può portare solo all'accumulo di PR-proteins ma anche innescare una risposta ipersensibile che si traduce in una morte cellulare programmata, la quale può favorire lo sviluppo di organismi necrotrofici quali *Botrytis cinerea* (Govrin et al., 2000).

La resistenza sistemica indotta avviene attraverso il mutualismo radicale con microorganismi benefici per la pianta appartenenti ai generi *Trichoderma*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, noti come *Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria* (PGPR). Un'altra forma mutualistica è quella con i miceli dei funghi, che con il sistema radicale costituiscono le micorrize, questi vengono classificati come *Plant-Growth-Promoting-Fungi* (PGPF).

La simbiosi mutualistica, oltre all'apporto di sostanze utili alla pianta possono innescare fenomeni di resistenza sistemica indotta (ISR).

Nella creazione di una simbiosi mutualistica, l'organismo e la pianta ospite rispondono a segnali reciproci che innescano una serie di reazioni al fine di stabilire il rapporto di mutualismo desiderato, basandosi su questo principio, PGRP e FGRP innescano un fenomeno di resistenza indotta fungendo come elicitori attivando NRP1 innescando una risposta JA-dipendente o ET-dipendente, sistemizzando all'interno della pianta una risposta indotta, la quale si differenzia dalla SAR in quanto non sintetizza PR-proteins. (Pieterse et al. 2014)

## CAPITOLO 4– LE VARIETÀ PIWI

Questo capitolo illustra le varietà resistenti alle principali patologie fungine, trattando in primo luogo i cenni storici, come si ottengono e le basi genetiche per il loro ottenimento, ponendo attenzione alle caratteristiche ricercate dai costitutori e come si possono ottenere.

Sarà poi valutato il livello di importanza nella riduzione di trattamenti che si può raggiungere grazie all’impianto di questi ibridi.

Verranno infine elencate le varietà resistenti attualmente iscritte al Registro Nazionale delle Varietà da Vino.

### 4.1 – CARATTERISTICHE GENERALI

Le varietà resistenti, conosciute anche come PIWI, dal tedesco “Pilzwiderstandsfähige”, ovvero “resistenti alle patologie”, sono vitigni ottenuti dall’incrocio tra cultivar di *Vitis vinifera* con specie di vite americane o asiatiche quali *Vitis riparia*, *Vitis amurensis*, *Vitis labrusca*, *Vitis rupestris*. Queste specie, a differenza della vite europea, presentano un buon grado di resistenza contro le patologie fungine quali *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* e *Botrytis cinerea* (Pedneault et al., 2016: 70).

Storicamente, i primi incroci sono stati effettuati a partire dalla fine dell’800, nel tentativo di rispondere alla pressione esercitata dalla fillossera a livello degli apparati radicali, cercando così di ottenere delle specie resistenti sotto questo punto di vista.

Una fase embrionale di un incrocio interspecifico di nuova generazione inizia negli anni 50, quando Philip Wagner sperimentò i cosiddetti ibridi francesi nella zona dei Grandi Laghi, nell’America Settentrionale. Di fatto in questa zona erano principalmente coltivate varietà di *Vitis labrusca* quali Concord, Niagara e Delaware, varietà endemicamente resistenti poiché coevolute con le principali fitopatie fungine. Questi nuovi ibridi, forme interspecifiche tra cultivar di *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* hanno di fatto aperto la strada al moderno miglioramento genetico (Sabbatini et al., 2013: 35).

In realtà, l'Istituto Statale di Viticoltura ed Enologia di Friburgo in Germania lavora sugli incroci al fine di ottenere degli ibridi resistenti alle fitopatie fungine a partire dagli anni 30 del 1900, portando, tra gli anni 70 e 80 alla registrazione di 15 varietà da vino bianche e rosse con una espressione genica di resistenza contro le malattie (Weinmann et al., 2019: 1)

Rispettivamente agli ibridi francesi di Wagner, per l'ottenimento delle varietà PIWI è stato necessario operare con una serie di back-crossing consecutivi all'ibridazione interspecifica (Pedneault et al., 2016: 58).

L'obiettivo di tale combinazione era quello di ottenere un incrocio con un pedigree di almeno un 85-90% di geni provenienti da *Vitis vinifera* e la restante parte proveniente dalle altre specie del genere *Vitis*, al fine che queste ultime conferissero all'ibrido finale l'espressione della resistenza al patogeno. Allo stesso tempo dovevano avere delle caratteristiche apprezzabili dal punto di vista enologico, dal momento che la presenza di parte genica di tali varietà apporta in parte le caratteristiche note aromatiche denominate come "Foxy" dovute alla presenza di metil-antranilato o la presenza eccessiva di pectine che in fermentazione possono generare metanolo.

Per quanto riguarda quest'ultimo è fondamentale tener conto che deve rispettare un limite legale di concentrazione nel vino poiché risulta essere neurotossico. Questo è il motivo principale che porta le specie di vite non europee ad essere classificate come non vinificabili dall'OIV, non come specie in sé, ma in quanto presentano molte pectine nelle pareti cellulari, le quali si traducono in alcol metilico durante i processi di vinificazione per via enzimatica.

Questa nozione è importante poiché sottolinea il fatto che l'OIV non rende esclusiva la vinificazione solo per le cultivar di *Vitis vinifera*, ma fa sì che anche le varietà PIWI possano essere vinificate, a patto che non superino i limiti legali riguardo a tali sostanze, inclusi tutti gli altri limiti applicabili a tutte le varietà (De La Fuente Lloreda, 2018: 232). Di fatto, a patto che questi presentino almeno del 90% del genoma da *Vitis vinifera*, questi ibridi resistenti interspecifici vengono di fatto equiparati dal punto di vista legale alle cultivar di vite europea (Stefanini et al., 2014: 14).

La creazione di tali ibridi, inoltre, non ha solamente interessato l'espressione di resistenza contro le patologie dal punto di vista fungino, il miglioramento genetico

della vite si è anche occupato dell'ottenimento di ibridi resistenti a basse temperature o efficaci contro le infestazioni da parte di insetti dannosi.

L'impiego in campo di queste varietà è molto interessante e appetibile dal punto di vista della viticoltura biologica, poiché si tratta di una valida proposta per ridurre l'utilizzo di prodotti chimici per il controllo delle patologie fungine. Di conseguenza, resta in linea con i principi di questo tipo di viticoltura, sono anche un'ottima alternativa alle cultivar convenzionali, in quanto queste ultime possono subire una perdita dal punto di vista della produzione a causa dei limiti nelle possibilità di lotta, le varietà resistenti possono essere una valida alternativa in quanto tendono ad essere vigorose e, di conseguenza, altamente produttive.

Questo, a pari passo con l'aumento della conversione alla viticoltura biologica sta portando ad un aumento della superficie vitata impiegando varietà resistenti, in Germania, ad esempio, nell'anno 2003 la superficie vitata biologica con varietà PIWI era il 7,9%, mentre tra il 2010 ed il 2015 il 40% dei nuovi impianti di vigneti biologici ha impiegato questi ibridi interspecifici (Pedneault et al., 2016: 70).

Per quanto riguarda le caratteristiche della composizione delle uve di queste nuove varietà, si è notato che alcune di queste possono avere un'acidità totale piuttosto elevata.

Un'altra caratteristica importante è l'elevata disponibilità di azoto disponibile per i lieviti (YAN), che negli ibridi ottenuti ad esempio da *Vitis riparia*. (come il Frontenac) possono avere un quantitativo di azoto assimilabile anche superiore a 250 mg/L.

Nelle varietà a bacca rossa la quantità di antociani può variare dai 0,5 ai 1,5 mg/g. Per quanto riguarda la composizione in tannini si varia da 0.07 a 0.95 mg/g nel seme e da 0,03 a 0,79 mg/g nella buccia, per confronto, un Pinot Nero mediamente ne presenta fino a 1.2 mg/g al seme e 0,56 mg/g nella buccia.

Per quanto riguarda altri composti fenolici, è marcata la presenza di isorhamnetina-3-o-rutinoside nelle varietà Regent e Cabernet Cortis mentre quercetina-3-o-glucoside è più presente in Baco Noir e Lucy Khulmann. L'acido idrossicinnamico mediamente più presente in queste varietà è l'acido caftarico.

Presentano inoltre un'elevata concentrazione di stilbeni e resveratrolo, in quanto queste molecole sono fondamentali per l'espressione di resistenza al patogeno (Pedneault et al., 2016: 61).

Dal punto di vista sensoriale, è importante che queste varietà presentino la minor quantità percepibile possibile di metil-antranilato, responsabile degli aromi tipici delle varietà americane.

Tuttavia, è possibile apprezzare la presenza di 3-isobutil-2-metossipirazina e 2-isopropil-3-metossipirazina, molecole associate alla componente aromatica di peperone verde o da non maturo, associate a varietà come Sauvignon Blanc e percepibili in varietà resistenti quali Cabernet Blanc (Leis et al., 2018: 511).

La costituzione di nuove cultivar resistenti da parte, ad esempio, dell'Istituto statale di Viticoltura di Friburgo (WBI-FR), grazie anche ai molteplici reincroci, mira all'ottenimento di caratteristiche sensoriali che possano essere associate a determinati tipi di vino.

La varietà Bronner, ottenuta dall'incrocio tra Merzling e Gm 6494 ha caratteristiche associabili ai Pinot Blanc.

Un altro esempio può essere il Johanniter ottenuto da un incrocio da Riesling x [Seyve-Villard 12-481 x (Rülander x Gutedel)] sono associabili ai Riesling ed ai Pinot (*Vitis Rauscedo*).

#### 4.2- COSTITUZIONE DEGLI IBRIDI INTERSPECIFICI

I primi tentativi di costituzione di un ibrido sono iniziati a partire dai primi anni del ventesimo secolo, con dei primi esperimenti di incrocio, questi ultimi tuttavia risultarono spesso fallimentari a causa delle scarse conoscenze e le erronee autofecondazioni che portarono a risultati ingannevoli (Popoli, 2014)

Ad esempio, svariati tentativi di ibridazione tra *Vitis rotundifolia* e *Vitis vinifera* portati avanti ad esempio da Wylie, Millardet, Dejten tra il 1901 e il 1917, i quali risultarono sempre alla formazione di falsi ibridi o, in alternativa, di forme ibride con un'elevata variabilità fenotipica.

Un'altra caratteristica di questi esperimenti era quella che gli ibridi veri ottenuti da questi primi tentativi di ibridazione interspecifica portavano una prole sterile sia nella prima generazione che nei tentativi di back-crossing (Patel et al., 1955).

Tuttavia, questi primi tentativi hanno aperto la strada alla costituzione dei primi veri ibridi di vite che ancora oggi vengono utilizzati per l'ottenimento di ibridi di nuova generazione o attualmente impiegati per la produzione viticola.

Un esempio è la varietà Bronner, ottenuta dall'Istituto Statale di Viticoltura di Friburgo dall'incrocio tra Merzling e GM 6494 è stata costituita nel 1975, sebbene in Italia sia stata registrata come varietà da vino solo a partire dal 2009.

L'ottenimento di ibridi avviene mediante incrocio interspecifico. Al fine di evitare autofecondazioni è necessario emasculare la parte parentale femminile e far avvenire la fecondazione col parentale maschile. L'infiorescenza fecondata deve essere poi isolata per evitare ulteriori fecondazioni accidentali.

Per una efficace riuscita di un ibrido interspecifico è importante che il numero dei cromosomi dei due parentali sia equivalente. Una volta ottenuto l'ibrido iniziale, è opportuno al fine di ottenere una combinazione genica che esprima buone caratteristiche enologiche è opportuno effettuare dei reincroci utilizzando il parentale appartenente a *Vitis vinifera* (Palliotti et al., 2020)

L'evoluzione dell'ingegneria genetica, dagli anni '90 in poi, ha permesso l'impiego di nuove tecniche basate ad esempio sui marcatori (Popoli, 2014): ovvero quelle parti che marciano una determinata sezione del genoma di una specie che consente di tracciare le differenze genetiche tra due individui, fungendo anche come segnavia per l'individuazione dei geni (Hartl et al., 2009). La conoscenza acquisita sui marcatori permette quindi l'individuazione delle fonti di resistenza ad una malattia all'interno di un genotipo, nel caso del miglioramento genetico della vite all'interno di individui appartenenti alle specie americane quali ad esempio *Vitis muscadinia*, *Vitis rupestris* o specie asiatiche quali *Vitis amurensis* (Stefanini et al., 2018).

L'utilizzo dei marcatori permette una più efficace identificazione, quantificazione e caratterizzazione della variabilità genetica di un germoplasma ("corredo genetico di

una determinata specie, costituito dall'insieme dei suoi differenti genotipi", Enciclopedia Treccani) nonché l'evidenziazione, la clonazione e l'introggressione dei loci per i tratti quantitativi (QTL) (Xu et al, 2008).

I QTL, quantitative trait locus, per definizione sono geni che controllano caratteri complessi, di carattere quantitativo e soggetti a variabilità ambientale, individuabili mediante marcatori specifici, per questo motivo sono di difficile previsione in un germoplasma. Per ottenere un'analisi accurata di un QTL è fondamentale avere una mappatura del genoma il più completa possibile e conoscere bene la distribuzione dei marcatori. Una volta stabilita una buona correlazione tra un marcatore e la sua espressione fenotipica (Hartl et al., 2009 e Fisher et al., 2004).

All'interno del genere *Vitis* sono ad oggi conosciuti circa 30 QTL associati alla resistenza contro peronospora e oidio (Zambon et al., 2019).

Nella creazione di un ibrido, che riesca ad essere il più efficace possibile contro un patogeno, è importante che l'espressione genica della resistenza contro esso non sia monogenica, in quanto questa può essere elusa con rapidità dal patogeno.

Nel miglioramento genetico si può attuare la cosiddetta piramidazione genetica, che consente di unire all'interno di un genoma, più caratteristiche di resistenza diverse, situate in loci diversi (Popoli, 2014).

Si considera l'espressione genica della risposta difensiva contro *Plasmopara viticola*, nel genoma del genere *Vitis* sono presenti dei loci che codificano per delle risposte specifiche, sono denominati loci *Rpv* e, a seconda da che specie del genere *Vitis* questi provengono si situano in cromosomi diversi.

Nel genoma della vite sono stati riconosciuti più di 13 loci associati alla resistenza a *P. viticola*, i loci *Rpv1*, *Rpv2* provengono da *Vitis rotundifolia* *Rpv3*, *Rpv4* ed *Rpv11* sono presenti nell'incrocio Regent, *Rpv 5*, *6*, *9* e *13* appartengono a *Vitis riparia* mentre il locus *Rpv12* è presente nel genoma di *Vitis amurensis* (Venuti et al., 2013).

L'espressione genica di questi fattori di resistenza si traduce solitamente in una risposta di tipo ipersensibile, quindi con emissione di ROS, fitoalessine, PR-proteins e morte cellulare programmata.



Il riconoscimento del marcatore è fondamentale poiché esso viene ereditato insieme al gene ed è di conseguenza possibile individuarlo nel germoplasma dell'ibrido ottenuto (Hartl et al., 2009).

Queste opportunità analisi del genoma aprono la strada ad un metodo di ibridazione più ragionato e, di conseguenza efficiente, il suo esordio può di conseguenza velocizzare la fase di costituzione dell'ibrido (Popoli, 2014).

In Italia, diverse Istituzioni che si occupano di miglioramento genetico della vite hanno attivato programmi di miglioramento genetico mediante incrocio per il trasferimento e la piramidazione di geni di resistenza ottenuti da varietà non coltivate di vite. Importante il lavoro dell'Istituto di Genomica Applicata dell'Università di Udine, il quale in collaborazione con i Vivai Cooperativi Rauscedo ha sviluppato 10 ibridi, 5 a bacca bianca e 5 a bacca rossa: Fleurtaï, Soreli, Sauvignon Kretos, Sauvignon Nepis, Sauvignon Rytos, Cabernet Eidos, Cabernet Volos, Merlot Khantus, Merlot Khorus e Julius (Pusiol, 2016)

Oggi, grazie all'ingegneria genetica esiste la possibilità di creare piante di vite transgeniche o cisgeniche. Nel primo caso i geni di resistenza e il costrutto che si inserisce nella pianta appartengono a genomi di specie diverse; nel secondo caso il costrutto contiene solo sequenze della stessa specie. Tuttavia, in Italia le piante transgeniche e cisgeniche non possono essere coltivate in campo e pertanto queste strategie di miglioramento rimangono al momento solo potenziali, pur nella disponibilità di geni di resistenza che potrebbero essere usati anche in vite. Similmente, l'adozione di tecniche molecolari innovative di miglioramento genetico note come tecniche di evoluzione assistita (TEA) che permettono modifiche mirate e specifiche del genoma, non possono essere applicate per la produzione di piante di vite resistenti.

#### 4.3 – DIFESA FITOSANITARIA DELLE VARIETÀ RESISTENTI

La garanzia della sostenibilità ambientale è una sfida chiave per le prospettive future secondo le nazioni unite. Ciò impatta anche le politiche agricole e, di conseguenza, anche quelle viticole.

Questo settore, nonostante occupi soltanto il 3% della superficie coltivata in Europa, è quello che utilizza il 65% del totale dei prodotti fitosanitari ad azione fungicida impiegati nel settore agricolo, circa 68'000 t/anno.

Tale prospettiva, accostata a modelli di lotta chimica non sempre ben ragionati hanno portato la Comunità Europea a candidare alla revoca entro l'anno 2025 alcuni dei presidi sanitari attualmente impiegati.

Di queste sostanze prossime alla revoca fa parte il rame, storicamente impiegato come fungicida di copertura sotto varie formulazioni a partire dalla fine del XIX secolo, con l'arrivo di *Plasmopara viticola* dall'America; la scelta di revocare tale elemento è dovuta ai fenomeni di tossicità che possono causarsi da accumuli eccessivi da parte di questo elemento nel terreno, come spiegato nel capitolo 1.

La revoca di questo prodotto lascia però scoperto il settore biologico dall'unico formulato ammesso in grado di contrastare efficacemente le infezioni da *Peronospora*, il che pone un quesito su future prospettive di una crescita sostenibile di questo settore che non dipenda più dall'uso di rame.

La prospettiva degli andamenti climatici, inoltre, prevede un costante innalzamento delle temperature che, oltre a prolungare i cicli vegetativi delle colture può inoltre favorire l'andamento dei cicli biologici dei patogeni aumentandone presumibilmente anche l'aggressività.

Per una crescita sostenibile è importante che, al fine di contrastare a queste situazioni, la chimica non resti l'unica soluzione, specie se viene considerato l'impatto dei prodotti fitosanitari utilizzati in modo massivo in viticoltura.

Una risposta attuale a questo quesito è sita nell'impiego degli ibridi interspecifici resistenti alle principali malattie fungine: queste non presentano un'immunità al patogeno in quanto vengono ugualmente riconosciute ed attaccate, ma presentano dei meccanismi di difesa in grado di bloccare la diffusione del patogeno. In questo modo permettono che non si estrinsechino forme severe di malattia.

Questo consente una significativa riduzione nell'impiego di prodotti fitosanitari, ma non la sua totale eliminazione: va considerato, infatti, che l'estrinsecazione di queste caratteristiche di difesa è strettamente influenzata alle componenti ambientali e che un'esecuzione ragionata nei trattamenti è fondamentale per evitare la comparsa di forme particolarmente aggressive, in grado di superare le barriere di queste nuove varietà.

Si stima che l'impiego in campo di varietà PIWI possa portare ad un decremento del 70% nell'impiego di prodotti fitosanitari, in comparazione a modelli di viticoltura convenzionale nel medesimo territorio. (Vivai Cooperativi Rauscedo)

MESE	PIOVOSITÀ (MM)				CONVENZIONALI								RESISTENTI							
					PERONOSPORA				OIDIO				PERONOSPORA				OIDIO			
	2016	2017	2018	2019	2016	2017	2018	2019	2016	2017	2018	2019	2016	2017	2018	2019	2016	2017	2018	2019
APRILE	3	36	45	185	3	2	1	3	3	2	1	3								1
MAGGIO	78	111	53	313	3	3	3	4	3	3	4	4	1		1	1	1		1	
GIUGNO	169	136	54	44	4	4	3	3	4	4	3	3	1	2		1	2	2	1	2
LUGLIO	161	19	52	122	2	2	3	3	2	2	3	3	1		1	1		1	2	1
AGOSTO	430	32	62	136	2	1	1	2	1	1	1	1				1				
<b>TOTALE</b>	<b>841</b>	<b>334</b>	<b>266</b>	<b>800</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>% RESISTENTE SU CONVENZIONALE</b>												<b>-78%</b>	<b>-83%</b>	<b>-82%</b>	<b>-73%</b>	<b>-77%</b>	<b>-75%</b>	<b>-67%</b>	<b>-71%</b>	
<b>MEDIA DI 4 ANNI</b>												<b>-75%</b>								

Immagine 8 – Comparazione della difesa fitosanitaria applicata nelle annate 2016, 2017, 2018 e 2019 sulle varietà convenzionali e sulle varietà resistenti in Località Fossalon di Grado (Vivai Cooperativi Rauscedo)

#### 4.4 – VARIETÀ PIWI ATTUALMENTE REGISTRATE AL REGISTRO NAZIONALE DELLE VARIETÀ DA VINO

Nel registro nazionale le varietà da vino sono attualmente iscritte 37 ibridi resistenti, 16 a bacca bianca e 19 a bacca rossa.

Nel territorio italiano, i principali costitutori di ibridi sono i Vivai Cooperativi Rauscedo, i quali lavorano a stretto contatto con l'Istituto Statale di Viticoltura di Friburgo (WBI-FR) e la Fondazione Edmund Mach.

Varietà a bacca bianca iscritte al registro nazionale		
Varietà	Anno Iscrizione	Costitutore
Bronner	2009	WBI - FR
Cabernet Blanc	2020	Volker Freytag
Charvir	2020	F. E. M.
Fleurtaï	2015	VCR
Kersus	2020	VCR + Pal Kozma

Johanniter	2013	WBI - FR
Muscaris	2014	WBI - FR
Pinot Iskra	2020	VCR + Pal Kozma
Palma	2021	
Poloskei Muskotaly	2019	
Sauvignon Kretos	2015	VCR
Sauvignon Nepis	2015	VCR
Sauvignon Rytos	2015	VCR
Solaris	2013	WBI - FR
Soreli	2015	VCR
Souvignier Gris	2014	WBI - FR
Valnosia	2020	F. E. M.

Varietà a bacca rossa iscritte al registro nazionale		
Varietàà	Anno Iscrizione	Costitutore
Cabernet Carbon	2013	
Cabernet Cortis	2013	WBI - FR
Cabernet Eidos	2015	VCR
Cabernet Volos	2015	VCR
Cabertin	2020	WBI -FR
Julius	2015	
Merlot Khantus	2015	VCR
Merlot Khortus	2015	VCR
Nermantis	2020	F. E. M.
Pinot Kors	2020	VCR + Pal Kozma
Pinot Regina	2020	
Pinotin	2020	Volker Freytag
Prior	2013	WBI - FR
Regent	2009	
Servar	2021	
Termantis	2020	F. E. M.
Volturnis	2020	VCR + Pal Kozma
Ronchella	2021	

(Stefanini, 2021)

(Vivai Cooperativi Rauscedo)

(Vitis Rauscedo)

## CONCLUSIONE

Gli obiettivi preposti in sede introduttiva erano quelli di valutare l'impianto di varietà resistenti come alternativa valida all'impiego di prodotti fitosanitari a base di rame.

Punto di attenzione di questo elaborato è il comportamento del principio attivo sopra citato, in quanto la sua azione tossica verso l'ambiente e le sue componenti e i rischi di bioaccumulo ad esso associati hanno portato questa molecola alla prossima revoca entro l'anno 2025.

In un'ottica di viticoltura biologica, ad esempio, la quale dipende tuttora dall'uso di rame per la difesa contro *Plasmopara viticola*, è opportuno ragionare su nuove soluzioni che permettano una produzione sostenibile che dipenda il meno possibile da prodotti chimici.

Grazie allo studio dei quadri patologici di *P. viticola* e, soprattutto, osservando i meccanismi di difesa della vite è stato possibile sviluppare delle strategie mirate all'ottenimento di specie di vite che esprimano una buona resistenza alle principali malattie fungine.

Sapendo che i maggiori caratteri di resistenza sono associati alle specie americane e asiatiche del genere *Vitis* sono stati sviluppati degli ibridi in grado di non accusare forme di malattia severe.

È infatti provato che l'impiego di questi nuovi ibridi è in grado di ridurre i trattamenti di almeno il 70% rispetto ad una cultivar tradizionale.

Verso un approccio di viticoltura sostenibile, con un basso impatto ambientale e ridotti rischi di tossicità dovuti al rame, l'impiego di cultivar PIWI risulta essere una valida proposta.

Inoltre, questo risulta essere un settore con buone prospettive di espansione grazie alla continua evoluzione dell'ingegneria genetica.

## BIBLIOGRAFIA

1. 2018. Regolamento di esecuzione (UE) 2018/1981 della commissione del 13 dicembre 2018 che rinnova l'approvazione delle sostanze attive composti di rame, come sostanze candidate alla sostituzione, in conformità al Regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari, e che ne modifica l'allegato del regolamento di esecuzione (UE) n. 540/2011 della Commissione. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea. 14.12.2018
2. Boso S., Kassemeyer K. 2008. Different susceptibility of European grapevine cultivars for downy mildew. *Vitis* 47 (1): 39-49
3. Burruano S. 2000, The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist* 14 (4): 180-183
4. Caffi T., Rossi V., Gilardi G., Monchiero M., Gullino M. L., Spanna F. 2010. Studi epidemiologici su *Plasmopara viticola*. 20.05.2010: 17-18
5. Causin R. Materiali impiegati per lo svolgimento delle lezioni di Patologia Vegetale per il corso di Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche. AA 2019/2020
6. Cesco S., Pii Y., Mimmo T., Orzes G., Lugli P., Mazzetto F., Brunetto G., Terzano R. 2019. Il rame nei suoli agrari: essenzialità versus tossicità. *Quaderni Georgofili* 3: 23-32
7. Chaignon V., Sanchez-Neira I., Jaillard B., Hinsinger P. 2003: *Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area*, *Environmental Pollution*, 123 : 229-238
8. Chong J., Le Henanff G., Bertsch C., Walter B. 2008. identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and biochemistry* 46: 469-481
9. De La Fuente Lloreda M. 2018. Use of Hybrids in viticulture. A challenge for the OIV. *Oeno One* 52 (3): 231-234

10. Fernandez-Calviño D., Martin A., Arias-Esteveza M., Baathc E., Diaz-Raviña M. 2010: *Microbial community structure of vineyard soils with different pH and copper content*, Applied Soil Ecology 46: 276-282
11. Fisher B. M., Salakhutdinov I., Akkurt M., Eibach R., Edwards K. J., Töpfer R., Zyprian E. M., 2004: *Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine*. Theor Appl Genet 108: 501-515
12. Gessler C., Pertot I., Perazzolli M. 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. Phytopathologia Mediterranea 50 (1): 3-44
13. Govrin E. M., Levine A. 2000. The hypersensitive response facilitates plants infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology 10: 751-757
14. Goyal N., Nag A., Samarth R. R., Upadhyay A., Singh K. 2021. Identification and identification of Simple Sequence Repeats (SSR) markers associated with downy mildew resistance locus “Rpv1” in grapes. Advances in Bioscience and Biotechnology 12: 371-387
15. Hartl. D. L. e Jones E. W. 2009. Genetica, Analisi di geni e genomi. Napoli: EdiSES
16. Istituto Nazionale di Statistica. 2011. Utilizzo dei prodotti fitosanitari nella coltivazione della vite. Annata agraria 2009-2010. (<http://agri.istat.it>)
17. Jeandet P., Douillet-Breuil A. C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. 2002. Phytoalexins from Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2731-2741
18. Kono A., Shimizu T. 2020. Leaf trichomes as an effective structure for disease resistance: the case of grapevine downy mildew. JARQ 54 (4): 293-298



19. La Torre A., Iovino V., Caradonia F. 2018. Copper in plant protection: current situation and prospects. *Phytopatologia mediterranea* 57 (2): 201-236
20. Leis D., Renner W., Leitner e. 2018. Characterisation of wines produced from fungus resistant grape varieties. *Flavour Sci.*: 511-514
21. Manici L. M., Caputo F. 2019. Impatto del rame sulle comunità microbiche del suolo. *Quaderni Georgofili* 3: 13-21
22. Mantovi P. 2003. Rischi di accumulo del rame nei terreni. *L'Informatore Agrario* 42: 67-70
23. Palliotti A., Poni S., Silvestroni O. 2020. *Manuale di Viticoltura*. Edagricole
24. Paolocci M. 2012. Valutazione del diverso grado di tolleranza di varietà di *Vitis vinifera* tradizionalmente coltivate in Italia centrale a *Plasmopara viticola* ed *Erysiphe necator*. Relatore Graifemberg A. Correlatore Muganu M. Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia. Corso di Dottorato di Ricerca in Ortofloroarboricoltura XXIV ciclo. Università degli Studi della Tuscia di Viterbo
25. Patel I., Olmo H.P. 1955. Cytogenetics of *Vitis*: The Hybrid *V. vinifera* x *V. rotundifolia*. *American Journal of Botany* 42 (2): 141-159
26. Pedneault K., Provost C. 2016. Fungus resistant grape varieties as a suitable alternative for organic wine production: benefits, limits and challenges. *Scientia Horticulturae* 208: 57-77
27. Perria R., Carella G., Christoforou M., Mugnai L., Tsaltas D., Storchi P., Burrioni F., Pierucci M. Strategie proposte nel progetto Life Green Grapes per la riduzione dell'uso di rame in viticoltura. *Quaderni Georgofili* 3: 7-12
28. Pertot I., Dagostin S., Ferrari A., Gobbin D., Prodorutti D., Gessler C. 2007. La Peronospora della Vite. Istituto Agrario di San Michele all'Adige. SafeCrop Centre: 1-78
29. Pieterse C. M. J., Zamioudis C., Berendsen R. L., Weller D. M., Van Wees S. C. M., Bakker P. A. H. M. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347-375

30. Popoli A. 2014. miglioramento genetico assistito per la resistenza alle malattie in vite. Relatore Lucchin M. Correlatore Grandi M. S. Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente. Tesi di laurea triennale in biotecnologie agrarie. Università degli Studi di Padova
31. Pusiol S. 2016. Ecco i “magnifici dieci”: i primi vitigni resistenti alle malattie prodotti in Italia. <https://qui.uniud.it/ricerca-e-innovazione/ecco-i-magnifici-dieci-primi-vitigni-resistenti-alle-malattie-prodotti-in-italia/>
32. Sabbatini P., Howell G. S., Herrera J. C. 2013. Ibridi di *Vitis*: storia status e futuro. *Italus Hortus* 20 (2): 33-43
33. Sancassani G.P. 2017. Il ruolo del rame nella difesa delle colture agrarie. *Vita in Campagna* 4: 31-37
34. Stefanini M., Velasco R. 2014. Miglioramento genetico della vite: verso una viticoltura sostenibile. *Vite, Vino e Qualità* 5: 14-18
35. Stefanini M. 2021. Le varietà PIWI iscritte al Registro Nazionale Italiano. Fondazione Edmund Mach
36. Stefanini M., Vezzulli S., Zulini L. 2018. Miglioramento genetico della vite per le resistenze ai patogeni. *L'attività di FEM. Il corriere vitivinicolo* 36: 20-21
37. Venuti S., Copetti D., Foria S., Falginella L., Hofmann S., Bellin D., Cindric P., Kozma P., Scalabrin S., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero. 2013. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *Plos one* 8(4): 1-7
38. Vercesi A. 1995. Considerazioni sull'applicazione di modelli epidemici a *Plasmopara viticola* (Berk. Et Kurt) Berl e De Toni. *Rivista di Patologia Vegetale* 5 (3): 99-111
39. Vitis Rauscedo – Società Cooperativa agricola. 2020. Schede tecniche PIWI ITA. ([vitisrauscedo.com/resources/img/downloads/Vitis\\_schede\\_tecniche\\_2020\\_PIWI\\_ITA.pdf](https://vitisrauscedo.com/resources/img/downloads/Vitis_schede_tecniche_2020_PIWI_ITA.pdf))

40. Vivai Cooperativi Rauscedo SCARL. 2022. Difesa fitosanitaria delle varietà resistenti. [Vivairauscedo.com/contributi/download/quaderno19-difesa-fitosanitaria.pdf](http://Vivairauscedo.com/contributi/download/quaderno19-difesa-fitosanitaria.pdf) . Quaderni tecnici VCR 19
41. Vivai Cooperativi Rauscedo SCARL. 2020. Le varietà resistenti alle malattie. Quaderni tecnici VCR 18 (4)
42. Wagner G. J., Wang E., Shepherd R. W. 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11
43. Weinmann E., Boos M., Ehret P., Flubacher L., Schneider C. Veith L. 2019. Breeding of new disease-tolerant grape varieties – Viticulture in times of climate change. *Bio Web of Conferences* 15: 1-3. 42<sup>nd</sup> World Congress of Vine and Wine
44. Xu Y. e Crouch J. H. 2008. Marker-assisted selection in plant breeding: from publication to practice. *Crop sci.* 48: 391-407
45. Zambon Y., Khavizova A., Colautti M. e Sartori E. 2019. Varietà di vite resistenti alle malattie e rame: opportunità e limiti. *Quaderni Georgofili* 3: 39-50