

**ATTIVITÀ DI MICRORGANISMI BENEFICI E DI UN MASTICE SU
PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA DEL COMPLESSO ESCA DELLA VITE**

G. BRUSSI¹, E.G. METRUCCIO², F. OSTI², R. ROBERTI¹, S. DI MARCO²

¹ DISTAL Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Università degli Studi di Bologna, viale G. Fanin 40 - 40127 Bologna

² Istituto per la BioEconomia, CNR, via P. Gobetti, 101 - 40129 Bologna
elisagiorgia.metrucchio@gmail.com

RIASSUNTO

Le malattie del legno, in particolar modo il complesso Esca, rappresentano uno dei principali problemi in viticoltura. Le loro crescenti presenza e diffusione richiedono interventi mirati ed efficaci, soprattutto nella protezione delle ferite di potatura. Il presente lavoro ha voluto confrontare l'attività di protezione delle ferite espressa da tre formulazioni commerciali contenenti, rispettivamente, *Trichoderma atroviride*, *Bacillus amyloliquefaciens* e un mastice inerte a base di un polimero. L'attività di ciascun formulato è stata valutata *in vitro* a due temperature, nei confronti di *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch) principale patogeno del complesso Esca. Si è inoltre operato su piante in vaso e in vigneto, rispettivamente delle cv Sauvignon e Barbera, proteggendo con i formulati le ferite di potatura poi inoculate con Pch. I dati ottenuti mostrano come *T. atroviride* e, in misura minore, *B. amyloliquefaciens* mostrino attività *in vitro* e capacità di protezione delle ferite dalle infezioni artificiali di Pch *in vivo*. Il mastice ha mostrato la maggiore efficacia nelle prove *in vitro*, mentre *in vivo* ha fornito risultati contrastanti.

Parole chiave: malattie del legno, strategie di difesa, *Trichoderma*, *Bacillus*, mastice polimerico

SUMMARY

ACTIVITY OF BENEFICIAL MICROORGANISMS AND A SEALANT POLYMER TOWARDS *PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA* OF GRAPEVINE ESCA COMPLEX
Wood diseases, Esca complex in particular, are one of the biggest problems in viticulture. The peculiarity and the increasing incidence of these diseases require an integrated control strategy including specific treatments, as well as the protection of pruning wounds. The present work aimed to compare the activity of three formulations based on *Trichoderma atroviride* and *Bacillus amyloliquefaciens*, and a wound sealant polymer. The activity of each formulation was evaluated *in vitro* at two temperatures, against *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), the main pathogen associated with Esca disease. The study was also carried out on potted vines, cv Sauvignon, and in the vineyard, cv Barbera, by protecting the pruning wounds with the formulations that were applied before the Pch inoculations. Results showed *in vitro* activity by *T. atroviride* and, to a lesser extent, by *B. amyloliquefaciens* and their efficacy *in vivo* to protect pruning wounds by consistently reducing the Pch infections. The polymer displayed the best activity in *in vitro* assays, with conflicting results *in vivo*.

Keywords: wood diseases, control strategy, *Trichoderma atroviride*, *Bacillus amyloliquefaciens*, sealant polymer

INTRODUZIONE

Il complesso Esca è una delle più importanti e diffuse malattie del legno della vite. Le infezioni che lo originano interessano tutti gli stadi di vita della pianta, dal vivaio al vigneto maturo e sono associate a un variegato gruppo di funghi patogeni (agenti di tracheomicosi,

cancri e carie) capaci di colonizzare la pianta attraverso le ferite, soprattutto quelle di potatura (Bertsch et al., 2018). La presenza dei patogeni è necessaria ma non sufficiente a scatenare i sintomi fogliari, in quanto diversi altri fattori, quali conduzioni agronomiche, eventi meteorici (piogge in particolare) e cultivar sembrano influenzare l'espressione della malattia (Gramaje et al., 2018). Attualmente, l'unica forma di difesa efficace è di tipo preventivo e si basa su interventi effettuati in diversi momenti della crescita delle piante, a partire dalle operazioni di vivaio fino a un'adeguata gestione del vigneto in produzione. Particolare importanza assume, in questa strategia, la protezione delle ferite che ha lo scopo di limitare l'occorrere dell'infezione, ridurre l'inoculo in campo e minimizzare gli effetti dei patogeni sulla produzione e sulla longevità del vigneto (Mondello et al., 2018).

Nell'ambito dello sviluppo di strategie sostenibili, la protezione delle ferite di potatura si sta concentrando sulle potenzialità di microrganismi benefici in ragione delle loro peculiarità e molteplici meccanismi d'azione (Mesguida et al., 2023). Ceppi appartenenti al genere fungino *Trichoderma*, rappresentano i microrganismi più attivi. Il loro utilizzo consente, nel medio-lungo periodo, una riduzione delle infezioni e della manifestazione dei sintomi e un rallentamento dello sviluppo della malattia nel vigneto (Di Marco et al., 2022). Tra i batteri, il genere *Bacillus* è il più utilizzato e possiede buone capacità di antagonismo nei confronti di una vasta gamma di patogeni (Khan et al., 2021). *Bacillus subtilis* è stato testato, *in vitro* e con risultati positivi, nei confronti dei principali patogeni del complesso Esca (Alfonzo et al., 2009).

Un'altra possibile modalità di protezione delle ferite è data dall'uso di mastici e polimeri che creano una barriera fisica nei confronti dei patogeni, rendendo così più difficile l'infezione. Tali modalità, tuttavia, non sono sempre efficaci (Reis et al., 2021) e possono indurre alterazioni del microbioma del legno (Del Frari et al., 2023). Una formulazione specifica, basata sulla combinazione di un polimero con boscalid e pyraclostobin, è stata sviluppata e utilizzata efficacemente per la protezione delle ferite da patogeni del legno (Samaras et al., 2019).

In questo lavoro, si è inteso studiare l'attività di formulazioni a base di *Trichoderma atroviride*, già noto per la sua efficacia nella protezione delle ferite di potatura (Fрати et al., 2016), di *Bacillus amyloliquefaciens*, e di un polimero che esercita un'azione fisica e che non necessita di registrazione come prodotto fitosanitario. Le prove sono state condotte nei confronti di *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch), il principale patogeno del complesso Esca, operando *in vitro*, a due temperature (13°C e 18°C), e *in vivo*, su piante in vaso ed in vigneto, potate, trattate e inoculate artificialmente con Pch.

MATERIALI E METODI

Prove *in vitro*

Per le prove è stato utilizzato *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch), isolato CBS 229.95.

I formulati commerciali saggiati sono stati: TA = *Trichoderma atroviride* ceppo SC1 (Vintec®, Belchim Crop Protection); BA = *Bacillus amyloliquefaciens* ceppo D747 (Amylo-X®, Biogard); BC = polimero acrilico (BlocCade®, HortiPro).

I microrganismi *T. atroviride* e *B. amyloliquefaciens* sono stati isolati dai formulati commerciali e fatti crescere su piastre Petri contenenti Potato Dextrose Agar (PDA) a 20±2°C. Il ceppo di Pch è stato moltiplicato nelle stesse condizioni partendo da colonie conservate in frigo-termostato.

Le prove sono state condotte con tecniche differenti, in funzione delle caratteristiche del formulato, in piastre Petri di 9 cm di diametro contenenti PDA. L'inoculo fungino era rappresentato da dischetti di agar micelio di 0,5 mm di diametro. Nel caso di TA, il dischetto di agar-micelio di *Trichoderma* è stato deposto a contatto col bordo della piastra e un analogo

dischetto di Pch è stato anch'esso deposto a contatto col bordo, ma in posizione diametralmente opposta. Le prove con BA sono state condotte deponendo due strisciate parallele di inoculo batterico a 2,5 cm di distanza tra loro; tra le due strisce, in posizione centrale, è stato posizionato un dischetto di agar micelio di Pch. La prova con BC è stata realizzata in piastra Petri settata a metà: in una metà è stato versato solo BC e fatto asciugare a temperatura ambiente; nell'altra metà è stato versato PDA. In ogni metà è stato posto un dischetto di agar-micelio del patogeno.

Per ogni formulato testato, le prove sono state condotte a due temperature (13°C e 18°C). Per ogni tesi e temperatura, si sono utilizzate tre piastre, ciascuna rappresentante una ripetizione.

La crescita del patogeno è stata valutata ogni 2 giorni misurando il raggio di crescita della colonia dal centro del dischetto di agar-micelio. I rilievi sono stati eseguiti per 20-30 giorni circa, fino all'arresto di crescita del patogeno o alla colonizzazione totale delle piastre testimone. Nelle figure sono riportati i risultati ottenuti nei primi 13 giorni.

Prove *in vivo*

A fine marzo 2022, per ogni tesi sono stati eseguiti 10 tagli di potatura sulle piante in vaso (cv Sauvignon/K5BB) e 15 tagli di potatura sulle piante in vigneto (cv Barbera/110R, impianto 2007), lasciando speroni di circa 20 cm. Le ferite sono state praticate a ridosso della gemma. Le piante in vaso sono state mantenute all'aperto, regolarmente irrigate e senza la necessità di effettuare alcun trattamento fitosanitario. L'applicazione dei formulati è stata effettuata nella stessa giornata della potatura con pompa irroratrice a spalla. Per i due microrganismi si è operato con 2 g di formulato/L d'acqua. Il polimero è stato utilizzato a 100 mL/L d'acqua.

L'inoculazione artificiale è stata condotta a distanza di 7-8 giorni da potatura e trattamento. L'inoculo di Pch è stato preparato in laboratorio, ottenendo una sospensione conidica con concentrazione di $1,9 \times 10^6$ conidi/mL in 50 mL di acqua. Ogni ferita è stata inoculata con 0,2 mL di sospensione conidica.

A fine novembre 2022, i tralci inoculati sono stati prelevati per una lunghezza di circa 15 cm e portati in laboratorio, dove sono stati ridotti a 7-10 cm e scortecciati. Il materiale così ottenuto è stato sterilizzato sotto cappa sterile tramite 3 passaggi: immersione in ipoclorito di sodio 2% per 30 s, nebulizzazione di etanolo 70% e rapido passaggio su fiamma. Da ogni campione sono stati ricavati dei dischi di legno a 1, 2, 3 e 5 cm dal punto di inoculazione. Ogni disco è stato diviso in quattro frammenti, che sono stati posizionati in quattro punti equidistanti su PDA in piastra Petri. Le piastre sono state fatte crescere in termostato ad una temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Il riconoscimento delle colonie di Pch cresciute in piastra è stato di tipo morfologico. L'efficacia dei formulati è stata valutata, per ogni distanza dal punto di inoculazione, come percentuale media di frammenti fertili per Pch, a confronto col testimone.

Per il vaso e per il campo, separatamente, sono riportati i valori relativi a due diverse distanze dal punto di inoculazione: quella in cui il testimone ha mostrato la maggior percentuale di frammenti fertili per Pch e la distanza minima alla quale non è stato più rilevato alcun frammento fertile.

Analisi statistica

Nelle prove *in vitro*, per ogni temperatura e giorno di rilievo, ciascuna tesi è stata confrontata con il proprio testimone mediante ANOVA per $P < 0,05$.

Nelle prove *in vivo*, per ogni tesi e distanza dal punto di inoculazione, le percentuali medie di frammenti fertili per Pch sono state analizzate con ANOVA $P < 0,05$, seguita da test di Tukey HSD $P < 0,05$ per separare le medie.

RISULTATI

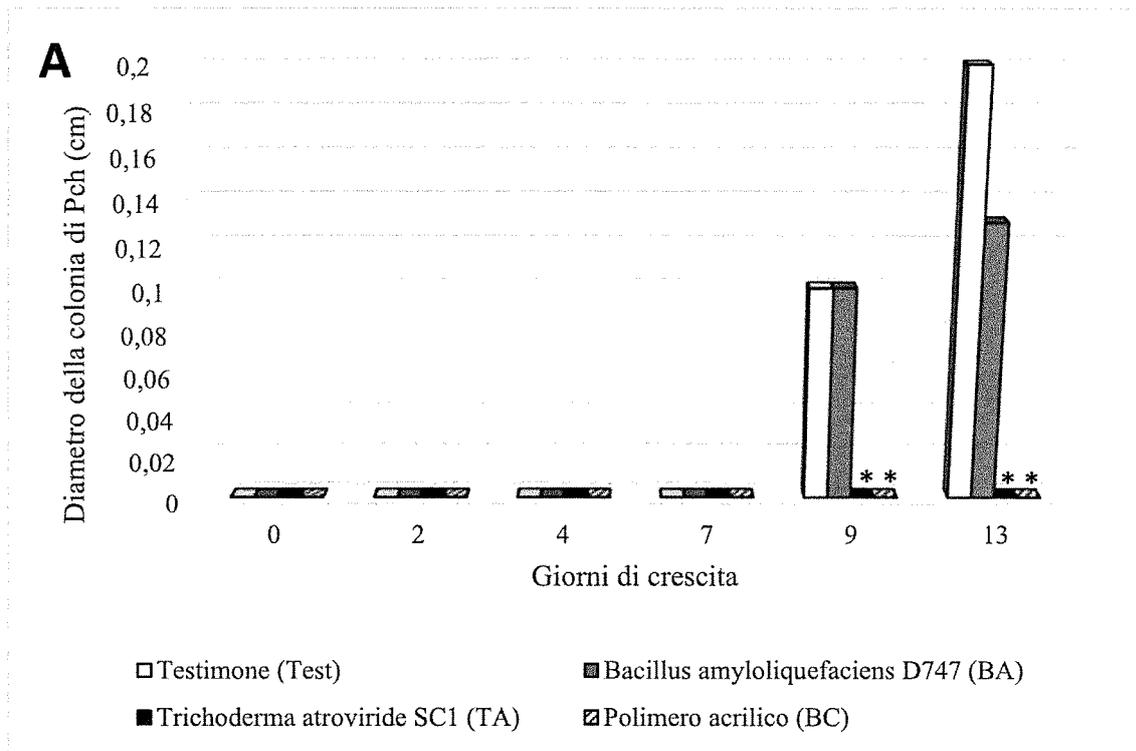
Prove *in vitro*

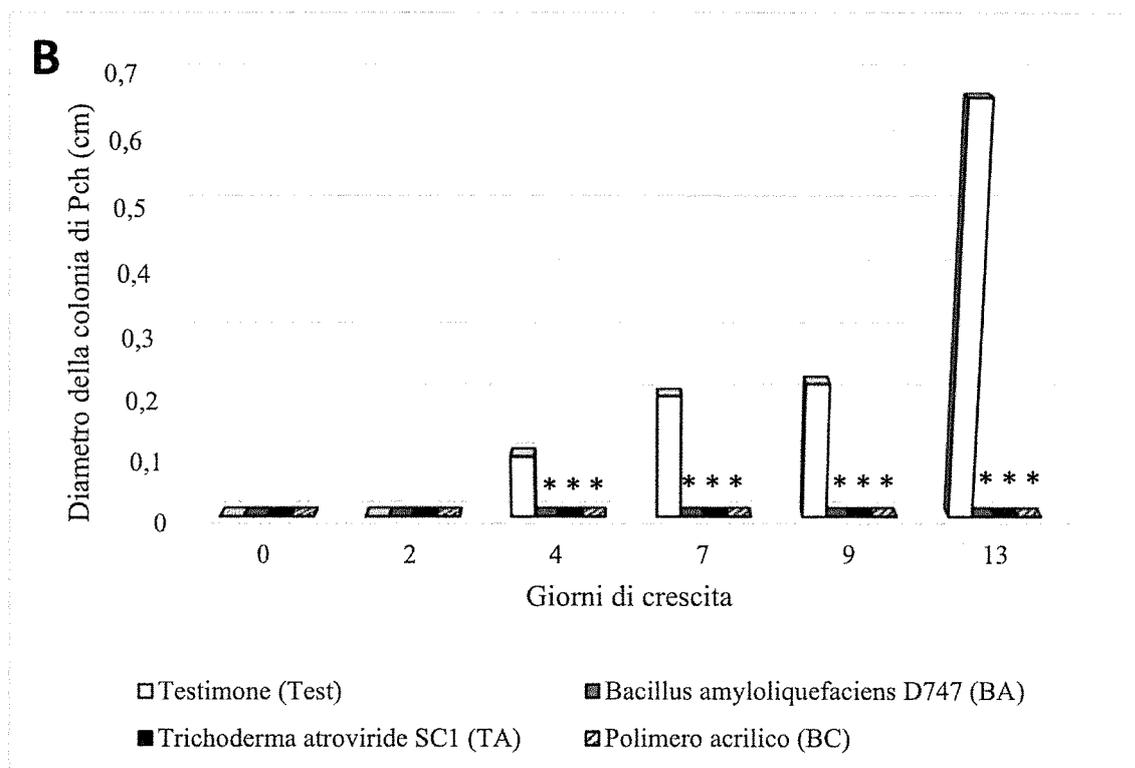
I risultati delle prove *in vitro* per le due temperature considerate (13°C e 18°C) sono riportati nella figura 1.

A 13°C, Pch si sviluppa nel testimone e in BA a partire da 9 giorni di coltura. A 9 e 13 giorni TA e BC impediscono significativamente ($P < 0,05$) la crescita del patogeno. Anche BA riduce lo sviluppo di Pch a 13 giorni, ma in maniera non significativa (figura 1A).

A 18°C, il testimone si sviluppa già dal quarto giorno di rilievo, mentre le altre tesi (BA, TA e BC) hanno impedito in modo significativo ($P < 0,05$) la crescita del patogeno (figura 1B).

Figura 1. Prove di attività dei diversi principi attivi contro *Phaeomoniella chlamydospora* condotte *in vitro* a 13°C (A) e 18°C (B)





Per ogni giorno di coltura, i dati sono stati sottoposti ad ANOVA. Istogrammi contrassegnati da asterisco differiscono significativamente dal testimone per $P < 0,05$

Prove *in vivo*

I risultati di efficacia dei trattamenti sulle ferite di potatura sono riassunti in figura 2A e B.

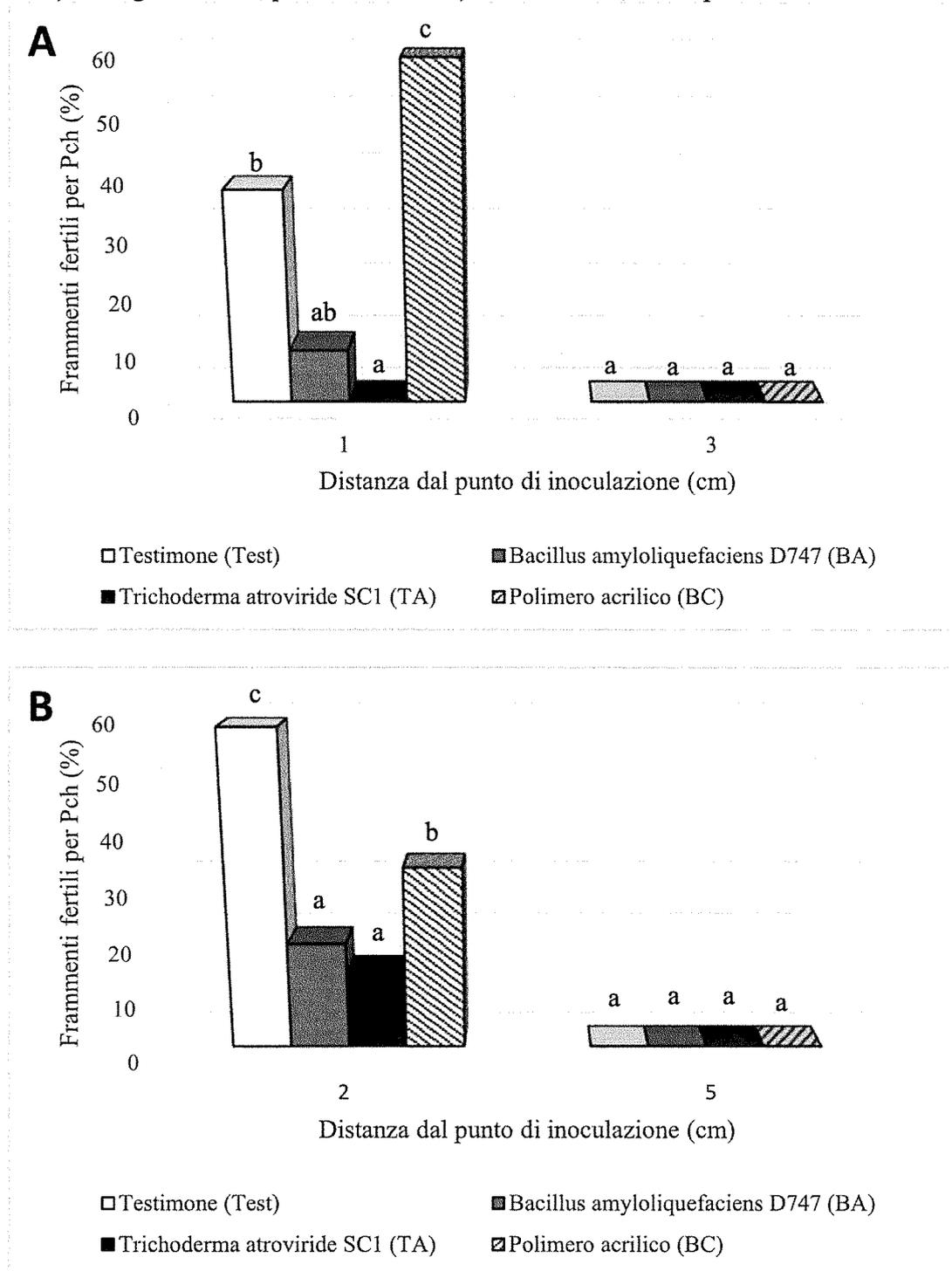
I re-isolamenti hanno mostrato la maggiore percentuale di Pch a 1 cm dalla superficie per la prova in vaso e a 2 cm per la prova in campo. Nella prova in vaso TA non presenta frammenti fertili per Pch già a 1 cm dalla superficie (statisticamente differente dal testimone per $P < 0,05$). La tesi BA mostra percentuali di frammenti fertili significativamente ($P < 0,05$) superiori a TA e inferiori al testimone.

In campo, si riscontra la presenza di frammenti fertili per Pch in tutte le tesi e sia TA sia BA sono risultati significativamente ($P < 0,05$) diversi dal testimone e più efficaci rispetto a BC.

La tesi BC ha fornito risultati contraddittori, risultando significativamente ($P < 0,05$) peggiore (prova in vaso) o migliore (prova in campo) del testimone.

A 3 cm (vaso) e a 5 cm (campo) dalla superficie, non sono state re-isolate colonie di Pch in alcuna tesi.

Fig. 2 Prove di attività *in vivo* contro *Phaeomoniella chlamydospora* inoculata artificialmente su A) Sauvignon/K5BB, piante in vaso e B) Barbera/110R, in campo



Per ogni distanza dal punto di inoculazione, istogrammi contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente secondo test di Tukey HSD per $P < 0,05$

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questo studio hanno evidenziato l'attività contro Pch del formulato a base di *Trichoderma atroviride* SC1 e, in misura minore in presenza della temperatura più bassa, di *Bacillus amyloliquefaciens* D747.

L'attività *in vivo* del formulato a base di *T. atroviride* SC1 a 7-8 giorni dal trattamento è risultata la migliore, confermando le potenzialità del prodotto di proteggere le ferite di potatura (Fрати et al., 2016). In prove analoghe, tuttavia, Martin-Diz e collaboratori (2021) non avevano ottenuto risultati soddisfacenti inoculando Pch appena un giorno dopo l'applicazione del formulato. Nel presente studio tra applicazione e inoculazione artificiale sono intercorsi 7-8 giorni e questo maggior lasso di tempo, ha verosimilmente permesso la miglior colonizzazione della ferita di potatura da parte di *T. atroviride* SC1.

L'attività *in vivo* è stata osservata a livelli interessanti, ma parzialmente inferiori rispetto a *T. atroviride* nella prova in vaso, anche per il formulato a base di *B. amyloliquefaciens* D747.

La minore attività potrebbe essere ascrivibile anche alle differenti caratteristiche biologiche dei due microrganismi, messe in evidenza in questo lavoro anche dalle prove *in vitro*. Infatti, *T. atroviride*, ma non *B. amyloliquefaciens*, riesce a contenere lo sviluppo di Pch a 13°C ed entrambi i microrganismi sono risultati attivi a 18°C. Questi risultati sono coerenti sia con la capacità di *T. atroviride* SC1 di crescere già a 10°C (Longa et al., 2008), sia con le maggiori temperature di crescita richieste dalle specie di *Bacillus*, superiori a 15°C (Ngalimat et al., 2021). Temperature di 13°C, che ostacolano *B. amyloliquefaciens*, ma non *T. atroviride* SC1, sono possibili in vigneto durante le operazioni di potatura e nel periodo immediatamente successivo e potrebbero spiegare la minore attività *in vivo* del batterio rispetto al *Trichoderma* rilevata sulle prove eseguite su piante in vaso.

Il polimero ha mostrato *in vitro* un'efficacia totale a entrambe le temperature. Tuttavia, *in vivo* tale efficacia è stata confermata solo in vigneto e a livelli inferiori rispetto a quelli dei microrganismi. *In vitro* è stato utilizzato uno strato spesso di polimero, mentre *in vivo* il polimero è stato applicato al pari degli altri formulati con pompa a spalla, ottenendo, dunque, uno strato sicuramente meno spesso e, da osservazioni effettuate al microscopio elettronico, meno continuo rispetto a quanto ottenuto *in vitro*. Inoltre, il polimero è originariamente formulato per essere distribuito sopra gli organismi da combattere al fine di provocarne la morte per asfissia. In questo caso, il polimero è stato applicato direttamente sulla superficie della ferita di potatura senza probabilmente garantire una copertura uniforme e il patogeno è stato posizionato sopra di esso. Inoltre, si potrebbe ipotizzare che il polimero abbia agito in maniera non selettiva sui microrganismi naturalmente presenti sulla superficie legnosa che, occupando spazi, possono costituire un possibile ostacolo alla colonizzazione e penetrazione del patogeno. Pch potrebbe avere superato gli spazi non protetti dalla barriera fisica ed essersi sviluppato con minori ostacoli, proprio per la minor presenza naturale di microrganismi sulla superficie della ferita. Infine, una maggiore colonizzazione dei primi strati del legno potrebbe preludere a un maggiore sviluppo in profondità, stante la natura vascolare del patogeno. Nel complesso, dunque, il polimero, anche per l'incostanza dei risultati, non sembra un candidato affidabile per esercitare un'azione preventiva e protettiva delle ferite di potatura da Pch.

In conclusione, i dati ottenuti suggeriscono l'uso di *Trichoderma* e di *Bacillus*, in caso di temperature favorevoli, per la protezione delle ferite di potatura, secondo protocolli che possono essere adottati in regime di agricoltura sia integrata, sia biologica.

Ringraziamenti

Si ringrazia l'Azienda agricola Bortolotti Maria di Zola Predosa (BO).

LAVORI CITATI

- Alfonzo A., Conigliaro G., Torta L., Burruano S., Moschetti, G., 2009. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 1, 155-158.
- Berbegal M., Ramón-Albalat A., León M., Armengol J., 2020. Evaluation of long-term protection from nursery to vineyard provided by *Trichoderma atroviride* SC1 against fungal grapevine. *Pest Management Science*, 76, 3, 967-977.
- Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clement C., Fontaine F., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62, 243-265.
- Del Frari G., Aggerbeck M.R., Gobbi A., Ingrà C., Volpi L., Nascimento, T., Ferrandino A., Hansen R.H., Ferreira, R. B., 2023. Pruning Wound Protection Products Induce Alterations in the Wood Mycobiome Profile of Grapevines. *Journal of Fungi*, 9, 4, 488.
- Di Marco S., Metruccio E.G., Moretti S., Nocentini M., Carella G., Pacetti A., Battiston E., Osti F., Mugnai L., 2022. Activity of *Trichoderma asperellum* strain ICC 012 and *Trichoderma gamsii* strain ICC 080 toward diseases of esca complex and associated pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12, 813410.
- Frati S., Nesler A., Saegher J. de, Ruggiero P., 2016. *Trichoderma atroviride* SC1, a new control means of wood diseases. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 147-153.
- Gramaje D., Úrbez-Torres J. R., Sosnowski M. R., 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease*, 102, 12-39.
- Khan M., Salman M., Jan, S.A., Khan Shinwari Z., 2021. Biological control of fungal phytopathogens: a comprehensive review based on *Bacillus* species. *MOJ Biol Med.*, 6, 2, 90-92.
- Longa C.M.O, Pertot I., Tosi S., 2008. Ecophysiological requirements and survival of a *Trichoderma atroviride* isolate with biocontrol potential. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 269-277.
- Mesguida O., Haidar R., Yacoub A., Dreux-Zigha A., Berthon J.-I., Guyoneaud R., Attard E., P. Rey, P. 2023. Microbial biological control of fungi associated with Grapevine Trunk Diseases: a review of strain diversity, modes of action, and advantages and limits of current strategies. *Journal of Fungi*, 9, 638.
- Mondello V., Songy A., Battiston E., Pinto C., Coppin C., Trotel-Aziz, P., Clément C. Mugnai L., Fontaine F., 2018. Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*, 102, 7, 1189-1217.
- Ngalimat M.S., Yahaya R.S.R., Baharudin M.M.A.-a., Yaminudin S.M., Karim M., Ahmad S.A., Sabri S., 2021. A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microorganisms*, 9, 614.
- Reis P., Gaspar A., Alves A., Fontaine F., Rego C., 2021. Combining an HA+ Cu (II) site-targeted copper-based product with a pruning wound protection program to prevent infection with *Lasiodiplodia* spp. in grapevine. *Plants*, 10, 11, 2376.
- Samaras A., Ntasiy P., Testempasis S., Theocharis S., Koundouras S., Karaoglanidis G., 2019. Evaluation of the fungicide Tessior (boscalid and pyraclostrobin) for control of grapevine trunk diseases in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 58, 421.