



NELL'AREALE DI PRODUZIONE
DEL CONEGLIANO VALDOBBIADENE DOCG

Controllo e sostenibilità **DEI GIALLUMI DELLA VITE** *con il plasma*

per un vigneto più ecosostenibile

>> **Y. Zambon, N. Contaldo, A. Canel, R. Laurita,
M. Beltrami, M. Gherardi, V. Colombo, A. Bertaccini**

I fitoplasmi sono associati a malattie che si manifestano in differenti specie di piante con sintomi diversi e che sono il risultato dell'interazione fra pianta ospite, ceppo di fitoplasma e fattori ambientali. Le sintomatologie più comuni sono ingiallimento/arrossamento delle foglie e/o dei germogli, virescenza, fillodia, produzione di scopazzi, riduzione dello sviluppo, deperimento, anormale allungamento degli internodi e in alcuni casi morte della pianta.

Nel settore vitivinicolo sono numerose le malattie che causano perdite quanti-qualitative e da molto tempo rivestono una notevole importanza quelle associate alla presenza di fitoplasmi che, non solo limitano le produzioni, ma possono anche costringere all'estirpo delle piante colpite, con ingenti perdite economiche. Le principali fitoplasmosi presenti in vigneto sono flavescenza dorata e legno nero, sebbene studi recenti abbiano evidenziato la presenza in Italia, e in particolare in Veneto, di nuovi fito-

plasmii in vite e insetti diversi da quelli tradizionalmente noti come vettori di fitoplasmi (Zambon *et al.*, 2018). I metodi di lotta per queste malattie sono rappresentati dal controllo degli insetti vettori e dei materiali di propagazione e dal monitoraggio delle piante sintomatiche seguito da capitozzatura o, meglio, da estirpo. Nonostante l'applicazione di queste pratiche, la diffusione delle fitoplasmi in vigneto è in espansione e risulta di difficile contenimento, anche per la presenza di insetti (potenziali vettori) che, avendo un ciclo biologico diverso da quello di *Scaphoideus titanus*, storico vettore di flavescenza dorata, non vengono interessati dalla lotta obbligatoria in vigore in molte aree vitate nei confronti di quest'ultimo.

PAW (PLASMA ACTIVATED WATER) STIMOLA LA CRESCITA DELLE PIANTE

Allo scopo di verificare l'efficacia di strategie di lotta innovative ed ecosostenibili in grado di controllare le malattie associate alla presenza di fitoplasmi, nel 2014 è nata una collaborazione tra il Dipartimento di scienze e tecnologie agro-alimentari e quello di Ingegneria industriale dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna e alcune aziende vitivinicole della zona del Conegliano Valdobbiadene docg. La strategia di lotta sperimentata ha previsto l'utilizzo di un plasma atmosferico di non equilibrio, in grado di modificare la composizione chimica dell'acqua, con conseguente aumento della quantità di nitriti, nitrati e perossidi e diminuzione del pH. L'acqua così ottenuta, denominata *Plasma activated water* (PAW), possiede una buona attività antimicrobica (Laurita *et al.*, 2015) ed è inoltre dimostrato che influenzi positivamente la crescita delle piante (Park *et al.*, 2013). L'azione di PAW, inoltre, pare in grado di migliorare anche il profilo nutrizionale delle piante, grazie agli ioni azotati in esso contenuti. PAW è una soluzione molto reattiva, che è stata applicata mediante endoterapia direttamente nel sistema vascolare delle viti, allo scopo di evitare interferenze con l'am-

*L'utilizzo sperimentale,
mediante endoterapia,
di acqua attivata tramite plasma
atmosferico di non equilibrio
per il controllo dei giallumi
della vite ha determinato
un miglioramento dello stato
sanitario delle piante trattate*

biente esterno e rendere la soluzione prontamente disponibile alla pianta. A tale proposito, vista l'inefficienza delle strumentazioni endoterapiche a oggi in commercio su vite, è stato progettato un apposito puntale per velocizzare le tempistiche del trattamento e per limitare il più possibile le lesioni a carico dei tessuti legnosi.

La sperimentazione è stata svolta in campo e in laboratorio, utilizzando nel primo caso esclusivamente la tipologia di PAW (PAW1) ottenuta mediante sorgente DBD (*Dielectric Barrier Discharge*), mentre in laboratorio l'attività di questo preparato è stata comparata con PAW (PAW2) ottenuto con sorgente corona (vedi riquadro a pag. 70). In laboratorio si sono utilizzati germogli micropropagati e piante di vinca (*Catharanthus roseus*) infetti da fitoplasmi appartenenti al gruppo del giallume dell'astro (16SrI-B) trattati con PAW1 e PAW2 al fine di rilevarne l'effetto su sintomatologia, accrescimento vegetativo e quantità di fitoplasma a seguito del trattamento.

SPERIMENTAZIONE IN LABORATORIO

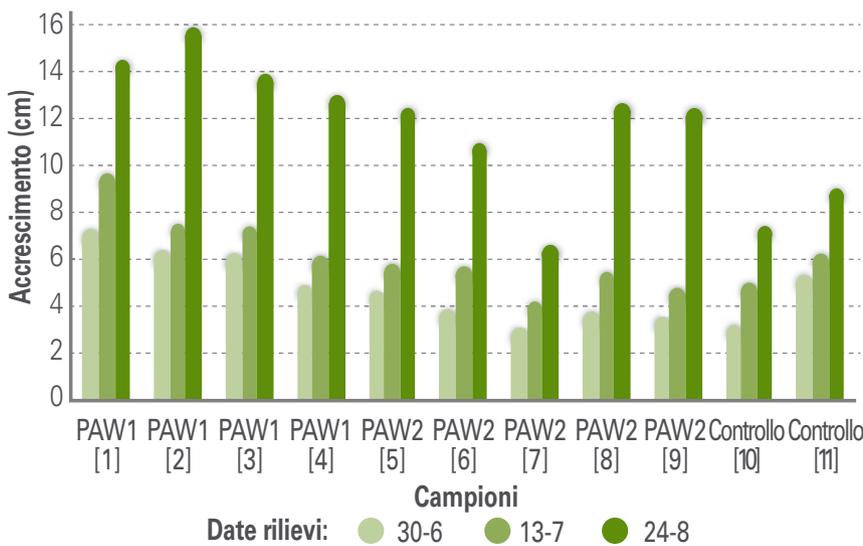
Allo scopo di eseguire la sperimentazione su piante con identico patrimonio genetico, sono state preparate 29 talee da una pianta madre di vinca infetta con il fitoplasma Hy-35 (giallume dell'astro) derivata da micropropagazione (Bertaccini, 2014). Successivamente 11 talee sono state trasferite in vaso e altre 18 *in vitro* in ambiente controllato (24 ± 2 °C, fotoperiodo di 16 ore di luce).

Su questi materiali sono stati eseguiti due trattamenti, a distanza di 18 giorni l'uno dall'altro, immergendo le piante nelle diverse soluzioni (PAW1, PAW2 e acqua distillata come controllo) per 30 minuti e monitorando i parametri di accrescimento (lunghezza internodi e numero di foglie) e sintomi riconducibili alla presenza di fitoplasmi. I risultati ottenuti in laboratorio hanno evidenziato che le piante trattate mantenute in vaso e *in vitro* hanno manifestato un maggior sviluppo sia in termini di accrescimento sia in termini di area fogliare rispetto ai controlli non trattati. Nel grafico 1 sono riportati gli accrescimenti rilevati a cadenza quindicinale per ogni pianta di vinca in vaso, mentre nel grafico 2 sono rappresentate le variazioni di accrescimento riscontrate nei germogli mantenuti *in vitro*. Analizzando gli accrescimenti ottenuti in vaso si può notare che il 90% delle piante trattate con PAW ha manifestato uno sviluppo maggiore rispetto ai controlli non trattati. Risultato confermato anche nel sistema *in vitro*, dove si è riscontrata una differenza di accrescimento pari al 20% tra le piante trattate e non (grafico 2). Sulle piante in vaso è stato eseguito anche un campionamento a 4 tempi diversi: T0 (prima del trattamento), T1 (18 giorni dal 1° trattamento); T2 (18 giorni dal 2° trattamento) e T3 (2 mesi dal 2° trattamento) prelevando 3-4 foglie per pianta e congelandole immediatamente in azoto liquido, per preservare l'integrità

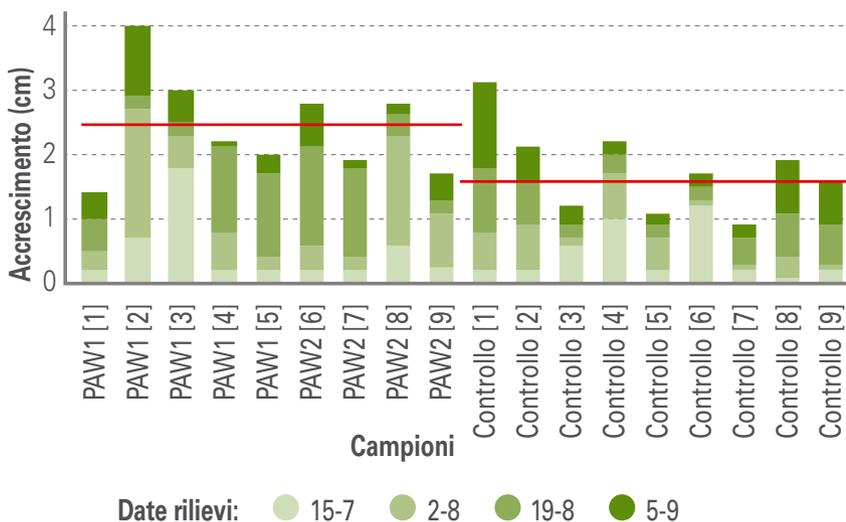


FOTO 1. A SINISTRA: Applicazione di trattamento endoterapico contenente blu di metilene allo scopo di verificare il suo trasporto acropeto e basipeto. A DESTRA: Sezione longitudinale della pianta trattata (in rosso il punto di iniezione).

G.1 ACCRESCIMENTO RISCOINTRATO NELLE 11 PIANTE IN VASO DI CATHARANTHUS ROSEUS IN VASO



G.2 ACCRESCIMENTO RISCOINTRATO NEI 18 ESPIANTI DI CATHARANTHUS ROSEUS IN VITRO



Le due linee rosse rappresentano gli accrescimenti medi riscontrati nelle due tesi. La prova *in vitro* conferma quanto evidenziato in vigneto, con una differenza tra trattato/non trattato del 20%.

dell'RNA per la sua successiva estrazione e quantificazione relativa mediante RT-PCR (PCR retrotrascritta). La quantificazione relativa del fitoplasma nei diversi intervalli temporali successivi al trattamento è stata eseguita comparando, in gel di agarosio, l'intensità delle bande ottenute da amplificazione del gene ribosomico 16S dei fitoplasmii con quelle ottenute dal gene di controllo ubiquitina, gene costitutivo della pianta sempre espresso. Con questo approccio, quindi, è stato possibile valutare la quantità relativa di fitoplasma ai vari tempi, comparando la sua concentrazione con quella del gene di controllo. Allo scopo di quantificare le variazioni riscontrate è stato attribuito un valore arbitrario da 0 a 3 in riferimento all'intensità della banda e per ogni campione è stato calcolato un indice di variazione tra i diversi tempi di analisi. Dal grafico 3 si evince che il trattamento con entrambe le tipologie di PAW ha ridotto in molte delle piante analizzate il quantitativo di fitoplasma presente.

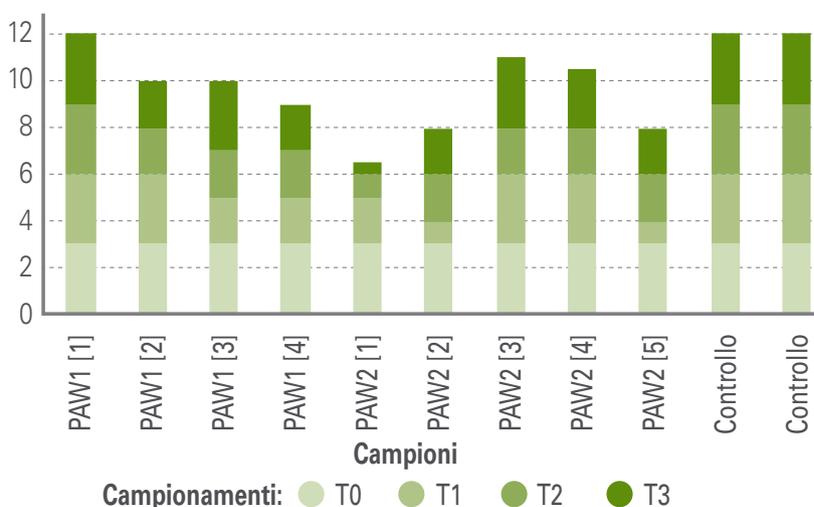
SPERIMENTAZIONE IN CAMPO

Allo scopo di verificare l'efficacia del trattamento PAW in pieno campo, all'interno dell'areale di produzione del Conegliano Valdobbiadene docg sono state selezionate 120 viti, dislocate in 17 vigneti differenti per impianto-età-varietà-ubicazione, che erano state analizzate molecularmente per la presenza di fitoplasmii

negli anni precedenti questa sperimentazione (Zambon *et al.*, 2018). Per ogni appezzamento sono state selezionate 3 piante infette e 2 piante sane (trattate con PAW1); 1 pianta infetta e 1 pianta sana (trattate con acqua distillata). Durante ogni annata di sperimentazione (2015-2016-2017) sono stati eseguiti 3 trattamenti endoterapici (aprile, giugno e luglio) e durante tutta la stagione vegetativa sono stati registrati i dati inerenti accrescimento, stato sanitario e presenza di sintomi riconducibili a giallumi.

Il trattamento veniva eseguito con l'apposito puntale dopo aver disinfettato con una soluzione di sali di rame la porzione di tronco selezionata (foto 1). Terminata l'iniezione si procedeva a disinfettare il puntale e nuovamente la porzione di legno, chiudendo successivamente il foro con cilindretti in cera naturale. PAW era prodotta il giorno prece-

G.3 RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DELLA QUANTITÀ RELATIVA DI FITOPLASMA PRESENTE IN CIASCUN CAMPIONE AI TEMPI T0, T1, T2 E T3 (1)



(1) T0 = prima del trattamento; T1 = 18 giorni dal 1° trattamento; T2 = 18 giorni dal 2° trattamento; T4 = 2 mesi dal 2° trattamento. Il quantitativo di fitoplasma con entrambe le tipologie di PAVV si è ridotto in tutti i campioni analizzati tranne uno.

dente ai trattamenti e immediatamente congelata allo scopo di preservarne le caratteristiche di composizione chimica. In campo era

scongelata gradualmente in modo da utilizzarla non appena tornata alla fase liquida. Per ogni anno di sperimentazione, nel mese di ago-

sto, sono stati raccolti campioni fogliari da tutte le viti trattate con PAW o con acqua distillata (controllo negativo) che sono stati sottoposti ad analisi molecolari «nested»-PCR/RFLP. Il trattamento endoterapico utilizzato in campo è risultato molto efficace in termini di assorbimento da parte delle piante. Infatti, le strumentazioni a oggi presenti sul mercato e utilizzate per endoterapia, non garantiscono sempre la massima efficacia in vite perché progettate per piante ornamentali a grande fusto. Per questo motivo, per eseguire le prove sono stati prodotti e sperimentati diversi puntali fino all'ottenimento del prototipo più efficiente.

Durante gli anni della sperimentazione è stato possibile verificare che le ore più fresche della giornata, prima mattina o tardo pomeriggio, rappresentano l'arco temporale più idoneo per eseguire l'iniezione, in quanto il tasso evapotraspirativo della pianta è più elevato. Paragonando i tre trattamenti eseguiti nell'arco dell'anno, quello di aprile è risultato il più efficiente in termini di assorbimento da parte della pianta, sebbene le piante presentassero un LAI (indice di area fogliare) minore; in generale, è sta-

to comunque possibile iniettare, per ogni singolo trattamento, un quantitativo medio pari a 20 mL di preparato. È stato possibile osservare nelle piante trattate, a differenza dei controlli negativi e dei testimoni non trattati, una lieve riduzione dei sintomi associati alla presenza di fitoplasmidi e soprattutto un ritardo nella loro comparsa (da agosto-settembre a inizio ottobre), che ha consentito alle piante di portare a raccolta il proprio carico produttivo. Piante severamente stentate a inizio stagione e trattate con PAW hanno manifestato un rapido accrescimento vegetativo riuscendo a terminare la stagione con LAI e carico produttivo nella norma. Anche dalle analisi eseguite per verificare la presenza di fitoplasmidi è stato possibile riscontrare che il trattamento ha ridotto il numero delle piante infette e ha limitato quello delle nuove infezioni (grafico 4) (Zambon *et al.*, 2017).

UNA GESTIONE CHE MIGLIORA LO STATO FISILOGICO DELLE PIANTE

Considerando la metodologia di analisi molecolare utilizzata, di tipo qualitativo e non quantitativo, e le

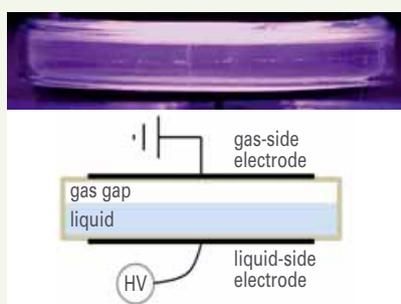
METODOLOGIA DI PRODUZIONE DI PAW E CONCENTRAZIONE *delle specie chimiche reattive*

La produzione di PAW avviene trattando l'acqua con un plasma freddo di non equilibrio a pressione atmosferica. Il plasma è un gas parzialmente ionizzato, composto da elettroni, ioni e particelle neutre che si trovano nello stato fondamentale o eccitato. Per produrre le due tipologie di PAW utilizzate nella sperimentazione sono state usate due strumentazioni diverse: un DBD (*Dielectric Barrier Discharge*) e una sorgente a corona. Il plasma viene prodotto applicando una differenza di potenziale elettrico a un gas (ad esempio aria) superiore alla tensione di *breakdown* ed è in grado di produrre specie chimiche eccitate e ioni. Le specie che si

generano all'interno del plasma sono sia specie reattive dell'ossigeno (ROS) come H_2O_2 (perossido di idrogeno), sia specie reattive dell'azoto (RNS), come ad esempio il NO (monossido di azoto). Il perossido d'idrogeno si discioglie immediatamente nell'acqua, mentre il monossido d'azoto reagendo con l'acqua forma nitriti (NO_2^-) e nitrati (NO_3^-). La sorgente DBD (figura A) consiste in una capsula di vetro borosilicato, con spessore minimo di 2 mm, che funge sia da recipiente sia da barriera dielettrica. L'ambiente in cui è posizionata l'acqua da trattare è chiuso e non soggetto a flussi d'aria. All'interno della sorgente il volume non occupato dall'acqua è occupato da aria ambiente. Sulle superfici superiore e inferiore della capsula di vetro sono presenti due elettrodi

collegati a un generatore nanopulsa-to. La tensione utilizzata è pari a 20 kV con una frequenza di 1 kHz e fornisce 50 mJ di energia per impulso. Con questa sorgente, a partire da acqua distillata, in 10 minuti vengono prodotti 80 mL di PAW1. La sorgente corona invece, consiste di un elettrodo in metallo connesso a un polo del generatore di alta tensione. L'elettrodo presenta un'estremità acuminata, posizionata a 12 mm dal pelo liquido dell'acqua da trattare, contenuta in un contenitore in vetro borosilicato. Il generatore di alta tensione in questo caso eroga un impulso avente tensione di picco pari a 15 kV con una frequenza di 5 kHz. In tabella A sono riportati il pH e le concentrazioni di perossido di idrogeno, nitriti e nitrati di PAW1 e PAW2.

FIGURA A: Schema e fotografia della sorgente DBD (Laurita *et al.*, 2015)

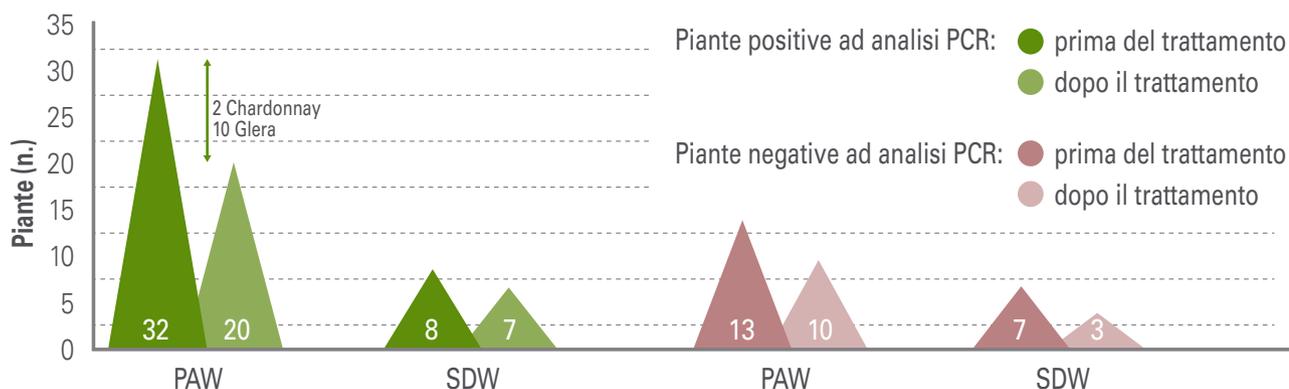


T.A PROFILI CHIMICI DELLE DUE TIPOLOGIE DI PAW UTILIZZATE NELLE PROVE SPERIMENTALI

PAW	H_2O_2 [mμ]	NO_2^- [mμ]	NO_3^- [mμ]	pH
PAW1	0,2	2,4	0	2,5
PAW2	0,2	5,6	0,8-1,7	6,5

PAW1 prodotta mediante sorgente DBD, PAW2 tramite sorgente corona.

G.4 EFFETTI DEL TRATTAMENTO PAW SU VITI INFETTE E NON DA FITOPLASMI



PAW = Plasma Activated Water, **SDW** = acqua distillata.

Il trattamento con PAW ha permesso non solo di ridurre il numero di piante infette, ma ha anche contenuto le nuove infezioni.

molteplici variabili presenti in campo, non è ancora possibile affermare che questa strategia di difesa consenta di controllare le malattie associate alla presenza di fitoplasmi, ma sicuramente rappresenta un approccio innovativo ed ecosostenibile per la gestione di tale problematica.

I risultati di laboratorio, sebbene ottenuti su un numero ridotto di piante, confermano i dati riscontrati in campo, che sono anche evidenziate da un miglioramento dello stato fisiologico delle piante trattate. Molto probabilmente anche la riduzione del titolo di fitoplasma all'interno delle piante trattate con PAW è da mettere in relazione al loro maggior sviluppo vegetativo, che riduce il quantitativo di patogeno e conferisce alla pianta un miglioramento dello stato sanitario. Studi su specie e sistemi di coltivazione diversi stanno dimostrando come il trattamento con PAW aumenti l'espressione dei principali geni coinvolti nei meccanismi di difesa delle piante verso i patogeni, confermando i risultati ottenuti in laboratorio in vinca e in

campo in vite. PAW sembra poter quindi svolgere un ruolo di controllo non solo nei confronti dei giallumi della vite, ma potenzialmente anche di altri patogeni di rilevante importanza in viticoltura.

**Yuri Zambon, Nicoletta Contaldo, Alessandro Canel
Manuel Beltrami, Assunta Bertaccini**

Dipartimento di scienze agro-alimentari (Distal)
Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Romolo Laurita

Dipartimento di ingegneria industriale (Din)
Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

Matteo Gherardi, Vittorio Colombo

Dipartimento di ingegneria industriale (Din)
Alma Mater Studiorum, Università di Bologna
Centro interdipartimentale per la ricerca
industriale-meccanica avanzata e materiali (Ciri-Mam)
Alma Mater Studiorum, Università di Bologna

*Questo articolo è corredato di bibliografia/contenuti extra. Gli abbonati potranno scaricare il contenuto completo dalla Banca Dati Articoli in formato PDF su:
www.informatoreagrario.it/bdo*

Si ringraziano per il contributo alla ricerca la ditta Agrifer di Zambon e Soldera e le cantine Adamo Canel e Colli del Soligo.
Per informazioni inerenti il progetto scrivere a tev.vite@libero.it

NELL'AREALE DI PRODUZIONE DEL CONEGLIANO VALDOBBIADENE DOCG

Controllo e sostenibilità dei giallumi della vite con il plasma per un vigneto più ecosostenibile

BIBLIOGRAFIA

- Bertaccini A. et al., 2014. *Am. J. Pl. Sc.*, 5, 1763-1788.
Park D.P. et al., 2013. *Curr. Appl. Phys.*, 13, S19.
R. Laurita et al., 2015. *Clinical Plasma Medicine*, 3, 61.
Zambon Y. et al., 2017. VII Incontro Nazionale sui Fitoplasmi e le Malattie da Fitoplasmi. Grugliasco (TO).
Zambon Y. et al., 2018. *Phytopathology* 108(2), 206-214.



www.viteevino.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.