

# I GEORGOFILI

Quaderni

2019-III

Sezione Centro Ovest



RIFLESSIONI SULL'USO DEL RAME  
PER LA PROTEZIONE DELLE PIANTE

Firenze, 2020



# I GEORGOFILI

Quaderni

2019-III

Sezione Centro Ovest



RIFLESSIONI SULL'USO DEL RAME  
PER LA PROTEZIONE DELLE PIANTE

Firenze, 22 novembre 2019

*Con il contributo di*



FONDAZIONE  
CR FIRENZE

Copyright © 2020  
Accademia dei Georgofili  
Firenze  
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti della Accademia dei Georgofili»  
Anno 2019 - Serie VIII - Vol. 16 (195° dall'inizio)

ISSN 0367-4134  
Edizione digitale

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Servizi redazionali, grafica e impaginazione  
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

## INDICE

- RITA PERRIA, GIUSEPPE CARELLA, MICHALAKIS CHRISTOFOROU,  
LAURA MUGNAI, DIMITRIS TSALTAS, PAOLO STORCHI,  
FABIO BURRONI, MARCO PIERUCCI  
*Strategie proposte nel progetto LIFE GREEN GRAPES  
per la riduzione dell'uso del rame in viticoltura* 7
- LUISA M. MANICI, FRANCESCO CAPUTO  
*Impatto del rame sulle comunità microbiche del suolo* 13
- STEFANO CESCO, YOURY PII, TANJA MIMMO, GUIDO ORZES,  
PAOLO LUGLI, FABRIZIO MAZZETTO, GUSTAVO BRUNETTO,  
ROBERTO TERZANO  
*Il rame nei suoli agrari: essenzialità versus tossicità* 23
- STEFANIA TEGLI, FRANCESCO TESSI  
*Difesa innovativa ed ecocompatibile delle piante dalle malattie:  
la scienza al servizio di economia ed ecologia, senza ideologia* 33
- YURI ZAMBON, ASIA KHAVIZOVA, MARTA COLAUTTI, EUGENIO SARTORI  
*Varietà di vite resistenti alle malattie e rame: opportunità e limiti* 39



RITA PERRIA\*, GIUSEPPE CARELLA\*\*, MICHALAKIS CHRISTOFOROU\*\*\*,  
LAURA MUGNAI\*\*, DIMITRIS TSALTAS\*\*\*, PAOLO STORCHI\*,  
FABIO BURRONI\*\*\*\*, MARCO PIERUCCI\*\*\*\*

## Strategie proposte nel progetto LIFE GREEN GRAPES per la riduzione dell'uso del rame in viticoltura

### INTRODUZIONE

Il progetto Life Green Grapes è un progetto dimostrativo finanziato dal programma EU Life 2014-2020, le cui attività sono iniziate nel luglio 2017 e si concluderanno a giugno 2021. L'idea alla base della proposta progettuale è stata quella di fornire ai viticoltori strategie di gestione del vigneto in grado di limitare lo sviluppo delle malattie fungine, riducendo, di conseguenza, la necessità di utilizzo dei fitofarmaci.

Il consumo di fungicidi in viticoltura, quando la proposta progettuale è stata presentata, era piuttosto elevato. Secondo i dati ISTAT, nel 2016 in Italia sono stati distribuiti per uso agricolo 124,1 milioni di chilogrammi di fitofarmaci, contenenti circa 60 milioni di chilogrammi di principi attivi, con un consumo medio di 4,85 kg/ha di SAU. Circa il 61% dei fitofarmaci era costituito da fungicidi, di questi oltre un quarto è stato utilizzato in viticoltura, settore di impiego nel quale il 70% è costituito da fungicidi a base di rame e di zolfo.

In questo quadro il progetto ha voluto rispondere all'obiettivo specifico del programma Life: sviluppare, sperimentare e dimostrare buone pratiche e soluzioni compatibili con le sfide ambientali, utilizzando e diffondendo tecnologie innovative, adatte ad essere replicate, trasferite o integrate, anche in

\* CREA, Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia, Arezzo

\*\* Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari, Ambientali e Forestali, Sezione Patologia vegetale e Entomologia, Università degli Studi di Firenze

\*\*\* Department of Agricultural Sciences, Biotechnology and Food Science, Cyprus University of Technology

\*\*\*\* Studio Associato Agronimivignai, Firenze

DENOMINAZIONE	TIPOLOGIA	PAESE
Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di ricerca Viticoltura ed Enologia	Ente Pubblico di Ricerca	IT
Università di Firenze – Dip. Scienze delle Produzioni Agroalimentari e dell'Ambiente	Ente Pubblico di Ricerca	IT
Cyprus University of Technology	Ente Pubblico di Ricerca	CY
P.Ri.Ma.Forma. - Progettazione Ricerca e Management per la Formazione	Società di ricerca e consulenza	IT
Castello di Gabbiano - Beringer Blass Italia srl	Impresa Agricola	IT
Vivai F.lli Moroni	Impresa Agricola	IT
Consorzio VITITALIA	Consorzio Vivaisti	IT
Società Agricola F.lli Tagliente	Impresa Agricola	IT

Tab. 1 *Composizione del partenariato di progetto*

relazione al legame tra ambiente e salute, come sostegno delle politiche e della legislazione in materia di efficienza delle risorse.

Il Life Green Grapes è un progetto piuttosto articolato, la cui complessità si evidenzia dalla eterogeneità del partenariato (tab. 1), che vede il coinvolgimento di 3 istituzioni di ricerca, una cooperativa per il project management, 3 aziende agricole ed un consorzio di vivaisti, per comprendere nelle attività tutta la filiera viticola “dalla barbatella alla tavola”. Infatti la filiera a cui fa riferimento il progetto inizia dall’attività vivaistica, quindi con l’allevamento delle piante madri per la produzione di gemme e poi delle barbatelle, l’attività si sposta poi in un vigneto per la produzione di uva da vino e infine in due aziende che producono uva da tavola.

Mentre tutte le proposte relative all’attività vivaistica sono rivolte alla produzione biologica di barbatelle, nella produzione di uva da vino e da tavola sono state prese in considerazione sia produzioni integrate, che biologiche. Nella produzione integrata l’obiettivo è quello di ridurre le quantità di fitofarmaci di sintesi per la difesa dalle principali malattie fungine (*Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, *Botrytis cinerea*) fino al 50% rispetto al normale utilizzo aziendale, mentre nelle produzioni biologiche l’obiettivo è la riduzione, sempre fino al 50%, della quantità di rame utilizzato. Quando la proposta è stata presentata, era ammesso un consumo di rame fino a 6 kg/ha/anno (Reg. 473/2002), passato poi a 28 kg/ha di rame nell’arco di sette anni (vale a dire, in media, 4 kg/ha/anno) dal 2019 (Reg. CE 1981/2018). Nella fase attuativa l’obiettivo rimane quello iniziale di dimezzamento dei quantitativi impiegati rispetto alla normativa vigente.

La sfida del progetto è quella di porre il “sistema vigneto” nelle condizioni migliori per consentire alle viti di rispondere agli stress biotici con minore

impiego di fitofarmaci, mantenendo una elevata qualità del prodotto finale e conservando (o possibilmente incrementando) la biodiversità del suolo. Tutto ciò attraverso la definizione di protocolli di difesa basati su una combinazione di interventi che favoriscono la stimolazione delle difese naturali e l'equilibrio vegeto-produttivo della pianta tramite prodotti capaci di agire come induttori di resistenza, rapporti simbiotici con altri microrganismi (micorrize), incremento della fertilità del suolo tramite sovesci, impiego di prodotti nutritivi e biostimolanti, il tutto mediato dall'applicazione di modelli previsionali per la difesa e sistemi di supporto alle decisioni (DSS).

Nella presente relazione vengono descritte in particolare le azioni di progetto che prevedono l'applicazione di strategie di gestione del vigneto con utilizzo ridotto di prodotti a base rameica per la difesa da peronospora in agricoltura biologica nell'attività vivaistica, nella produzione di uva da vino ed in quella di uva da tavola in ambienti diversi; verranno descritte le attività di monitoraggio e di valutazione dell'efficacia dei protocolli attuati e infine, riportati i risultati preliminari, riferiti agli anni 2018 e 2019.

#### ATTIVITÀ DI PRODUZIONE VIVAISTICA

I campi pilota nei quali vengono messe a punto le strategie di difesa relative alla produzione vivaistica sono localizzati in Toscana, rispettivamente in provincia di Pisa il campo di piante madri e in provincia di Lucca il barbatellaio.

La strategia di gestione proposta dal progetto ha previsto la sostituzione di alcuni trattamenti a base di rame usati nella normale gestione aziendale con trattamenti a base di biostimolanti e corroboranti, quali estratti di alghe, estratti di *Saccharomyces*, lisati batterici, zeoliti, presenti sul mercato con diversi nomi commerciali, aventi azione come induttori di resistenza.

Nel 2018 l'azienda interessata ha effettuato 18 trattamenti con prodotti fitosanitari nel vigneto destinato alla coltivazione delle piante madri, mentre nel campo pilota "Green Grapes" sono stati effettuati 7 trattamenti con fitofarmaci, alternati a 11 interventi di distribuzione di induttori di resistenza. Nell'anno successivo i trattamenti nel vigneto a conduzione integrata sono stati 17, mentre quelli sul campo condotto con strategia Green Grapes pilota sono stati ridotti a 12 e sono state effettuate 5 distribuzioni di induttori di resistenza. Complessivamente l'azienda ha quindi utilizzato 6 kg/ha di rame nel 2018 e 4 kg/ha nel 2019, contro 1,8 kg utilizzati nel campo Green Grapes in entrambe le annate.

Per valutare l'efficacia dei trattamenti è stata rilevata l'incidenza della malattia come percentuale di foglie con sintomi di peronospora. Sia nel 2018 che nel 2019

la gestione Green Grapes, pur permettendo un minore uso di fitofarmaci, non ha permesso di contenere la malattia in modo analogo al trattamento aziendale.

#### UVA DA TAVOLA

Il vigneto destinato alla produzione di uva da tavola biologica si trova nei pressi di Alektora (Cipro) ed è gestito direttamente dal partner Cyprus University of Technology. Il vitigno coltivato è Thompson seedless, varietà da tavola apirena a bacca bianca destinata al consumo fresco.

Il vigneto pilota è stato suddiviso in tre parcelle con gestioni diverse: una aziendale (CY3), una gestione con consumo di fitofarmaci ridotto del 50% rispetto alla gestione aziendale (CY2) e la terza che prevede trattamenti con fitofarmaci solo nella fase iniziale del ciclo vegetativo (CY1).

Le condizioni climatiche della zona non sono particolarmente favorevoli alle infezioni da peronospora, tanto che l'incidenza in entrambe le annate è stata considerata irrilevante.

Nel 2018 l'azienda ha comunque effettuato 7 trattamenti fitosanitari con prodotti contenenti rame, per un totale di 3,6 kg/ha di principio attivo; nelle due parcelle con gestione Green Grapes sono stati effettuati rispettivamente 4 (CY2) e 2 (CY1) trattamenti, inoltre sono state eseguite 2 distribuzioni di inductori di resistenza nella parcella CY2 e 6 nella parcella CY1, per un consumo totale di rame limitato rispettivamente a 2,16 e 1,44 kg/ha.

Sull'uva da tavola alla raccolta sono stati valutati i principali parametri quantitativi e qualitativi: uva prodotta, dimensioni dei grappoli, contenuto zuccherino (tab. 2): dall'analisi statistica dei valori rilevati non risultano differenze significative nella produzione per pianta e nel relativo contenuto in zuccheri espresso in °Brix. La produzione mostra comunque un aumento proporzionale al ridotto uso di fitofarmaci.

#### UVA PER LA PRODUZIONE DI VINO

L'azienda partner (Castello di Gabbiano), ha messo a disposizione del progetto tre vigneti con diversa esposizione (fig. 1) nei quali è stato possibile confrontare nel 2019 una strategia di difesa aziendale biologica con una strategia a ridotto uso di rame, con l'obiettivo di arrivare a una riduzione del 50%.

Complessivamente sono stati effettuati 13 trattamenti fitosanitari nella gestione aziendale e 9 nella gestione Green Grapes; in entrambe le gestioni

STRATEGIA	KG UVA/PIANTA	PESO MEDIO DEL GRAPPOLO	°BRIX
cY1	8,2 <sup>a</sup> ± 1,2	650,45 <sup>a</sup> ± 200,3	20,4 <sup>a</sup>
CY2	7,8 <sup>a</sup> ± 1,3	623,01 <sup>ab</sup> ± 285,1	20,6 <sup>a</sup>
CY3(aziendale)	7,2 <sup>a</sup> ± 1,7	591,25 <sup>b</sup> ± 247,8	19,7 <sup>a</sup>

Tab. 2 Parametri quantitativi e qualitativi dell'uva alla raccolta (valori medi ± SD, a lettere diverse corrispondono valori statisticamente differenti)

TRATTAMENTO	TSS (°BRIX)	PH	ACIDITÀ TOTALE (G/L)	PESO MEDIO DELL'ACINO (G)
Aziendale	24,4 ± 0,7 a	3,4 ± 0,0 a	5,5 ± 0,3 a	2,5 ± 0,1 a
Green Grapes	25,2 ± 1,2 a	3,3 ± 0,1 a	5,4 ± 0,2 a	2,1 ± 0,4 a,b

Tab. 3 Parametri qualitativi delle uve alla raccolta (valori medi ± SD)

l'incidenza di peronospora è risultata inferiore al 5% nei vigneti esposti a sud e ad est; nel vigneto esposto a nord è stata registrata un'incidenza media del 5,5% nella tesi Biologica aziendale e leggermente superiore, pari al 7%, nella strategia Green Grapes con riduzione del 50% di rame. Il consumo di rame per ha è stato di 4 kg nella gestione Biologica aziendale e 2,6 nella gestione Green Grapes con riduzione del 50% di rame, in tutti i vigneti indipendentemente dall'esposizione.

Al momento della vendemmia sulle uve sono stati valutati alcuni parametri qualitativi: contenuto zuccherino (solidi solubili espressi in °Brix), pH, acidità titolabile (tab. 3), dall'analisi statistica dei valori rilevati non risultano differenze significative nelle caratteristiche qualitative delle uve, così come non ci sono state differenze sulla quantità di uva prodotta.

## CONCLUSIONI

Le differenze di efficacia registrate nelle due annate 2018 e 2019, in particolare nella gestione vivaistica, sono dovute alle diverse condizioni meteorologiche registrate verificatesi, nonché alla necessità di mettere a punto l'intero sistema.

I risultati ottenuti nell'anno 2019 mostrano che, in determinate condizioni climatiche, è possibile ridurre al minimo l'uso di fitofarmaci a base rameica senza influire sulla produzione.

Ciò è possibile integrando i sistemi DSS, un monitoraggio costante e frequente sul campo, indirizzando la strategia di gestione basata su induttori di resistenza e individuando il momento di intervento più appropriato.

Le differenze qualitative sono risultate minime e in alcuni casi, favorevoli nelle tesi Green Grapes, e comunque da confermare nelle prossime annate.



## Impatto del rame sulle comunità microbiche del suolo

### I LIMITI DELLA TOSSICITÀ DI RAME

La concentrazione di rame totale (Cu totale) nel suolo pari a 100-150 mg kg<sup>-1</sup> è convenzionalmente riconosciuto come la soglia al di sopra della quale la crescita delle piante e il funzionamento del suolo possono essere negativamente influenzati. Questa soglia deriva da prove di fitotossicità svolte in laboratorio con dosi crescenti di contaminazione artificiale su un numero di suoli e di colture limitato. Tali condizioni di laboratorio hanno anche evidenziato che dosi di rame fra 250-500 mg kg<sup>-1</sup> di suolo sono fitotossiche su mais e riducono la diversità batterica con la predominanza di una o poche specie (Ippolito et al., 2010).

L'effetto della contaminazione con rame osservato in laboratorio sui batteri è quello tipico osservato nei suoli contaminati da idrocarburi o metalli pesanti che in termini di indici di biodiversità si può sintetizzare come segue: la *Richness* (numero di taxa) si riduce; ma cambia il rapporto fra le specie, ovvero, una o poche specie diventano dominanti, aumenta pertanto il valore della *Dominance* ( $D = 1 - \text{Simpson index}$ ).

La tessitura, il pH e la sostanza organica del suolo influenzano fortemente l'immobilizzazione del rame perché il rame è un microelemento a bassa biodisponibilità e può essere presente in diverse forme nel suolo. Questo spiega anche la risposta molto variabile in letteratura delle comunità batteriche osservata su suoli diversi nelle prove di fitotossicità di rame in laboratorio. Poco invece si sa dell'effetto a lungo termine di rame nel suolo.

\* CREA - Agricoltura Ambiente, Bologna

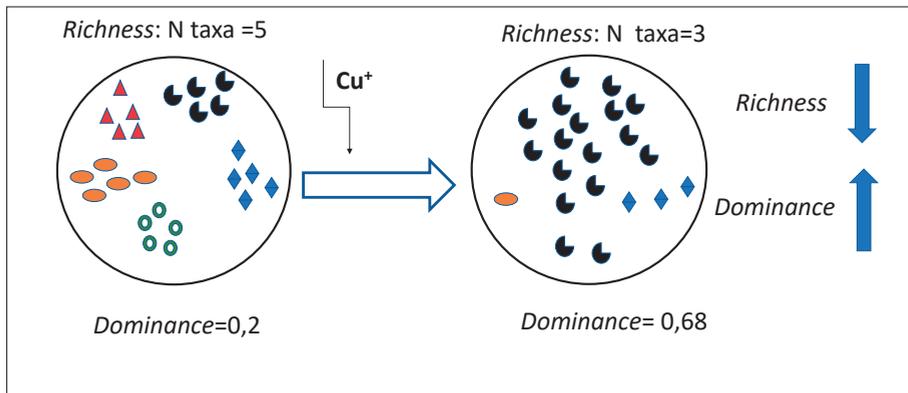


Fig. 1 Rappresentazione schematica delle variazioni in termini di biodiversità della comunità batterica del suolo in risposta alla contaminazione con rame nel breve periodo in laboratorio

#### LA CONTAMINAZIONE CON RAME DEI SUOLI

Dalla fine del XIX secolo fino agli anni '60, e in molti casi anche dopo, le applicazioni di fungicidi rameici sui vigneti sono state l'unico metodo per la peronospora della vite (*Plasmopara viticola*). Pertanto, la natura non biodegradabile del rame in combinazione con la sua scarsa mobilità nei suoli ne ha determinato l'accumulo nello strato coltivato nei vigneti dei paesi produttori di vino in Europa. Alcuni casi indicativi del contenuto di rame totale nello strato coltivato dei vigneti al di sopra della quantità naturalmente presente nei suoli, in base alla letteratura scientifica degli ultimi 20 anni varia da 22-398 mg kg<sup>-1</sup> in Francia (Chaignon et al., 2003); da 33 a 1120 mg kg<sup>-1</sup> in Spagna (Fernandez-Calvino et al., 2010); da 215 a 800 mg kg<sup>-1</sup> suolo in Italia (dell'Amico et al., 2008; Kelderer et al., 2012).

#### EFFETTO A LUNGO TERMINE DI CONTAMINAZIONI DI RAME SULLE COMUNITÀ MICROBICHE DEI SUOLI. CASI STUDIO

##### *Caso studio su meleti dell'Alto Adige*

Il primo caso studio sull'effetto della contaminazione a lungo termine di rame dei suoli, in realtà deriva da un'osservazione nell'ambito di uno studio svolto in Alto Adige dal Centro di Sperimentazione Laimburg e dal CREA - Agricoltura e Ambiente. Questa ricerca mirava a valutare l'opportunità di trapiantare le piante dei giovani meleti sulla inter-fila come opzione agronomica per

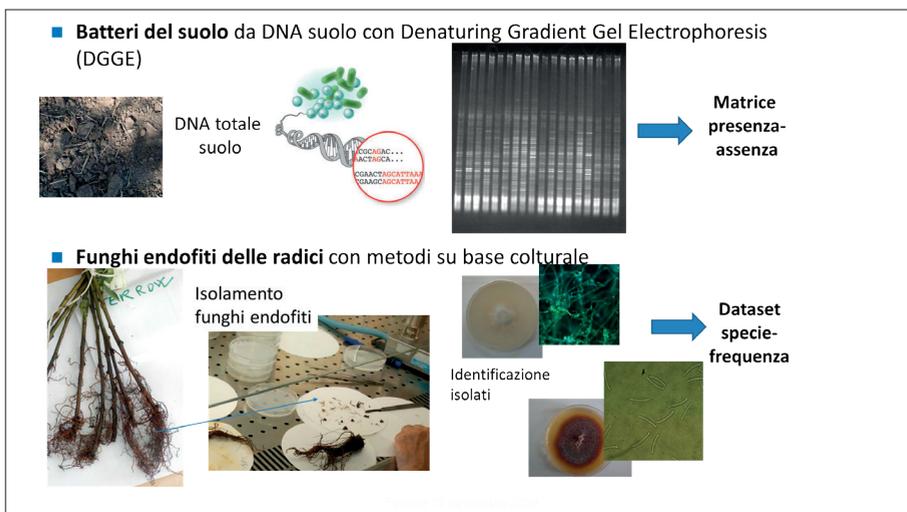


Fig. 2 *Metodologia*

ridurre le problematiche di reimpianto dei meleti di terza e più generazione nella provincia di Bolzano, ovvero, la più importante zona di produzione della melicoltura italiana. Dalla fine degli anni '90 infatti le problematiche di reimpianto dei meleti quali: lento accrescimento delle giovani piante, ritardo in produzione e ridotta capacità di superare gli stress abiotici, sono state osservate anche in questa zona di produzione (Manici et al., 2003). Questo studio è stato svolto in 5 frutteti di riferimento con degli indicatori microbici: i batteri del suolo e i funghi tellurici che colonizzano le radici (Kelderer et al., 2012). La metodologia di valutazione di questi indici è sintetizzata in figura 2.

Le popolazioni batteriche sono risultate diverse fra i 5 frutteti, ma molto simili fra file e inter-fila entro ogni frutteto con similarità fra 60 e 80% in 4 casi su 5, si veda la similarità fra fila alberata (**R**) e inter-fila (**IR**) dei frutteti n. 1, 2, 3, 5 in figura 3. Solo il frutteto n. 4 aveva una composizione della comunità batterica dei suoli profondamente diversa fra file e inter-fila (similarità intorno al 10%), come evidenziato con un cerchio rosso sul dendrogramma dalla *Cluster analysis* in figura 3. L'unico fattore evidente per cui il frutteto n. 4 differiva dagli altri era una concentrazione di rame nel suolo molto al di sopra dei limiti di tossicità (fig. 3). Questa contaminazione di rame dei suoli ha incrementato la variabilità delle comunità batteriche inducendo una ampia differenza qualitativa anche entro lo stesso frutteto. Questa alta concentrazione di rame dello strato coltivato derivava dai trattamenti rameici di un vigneto precedente alla conversione in meletto di quell'appezzamento (almeno

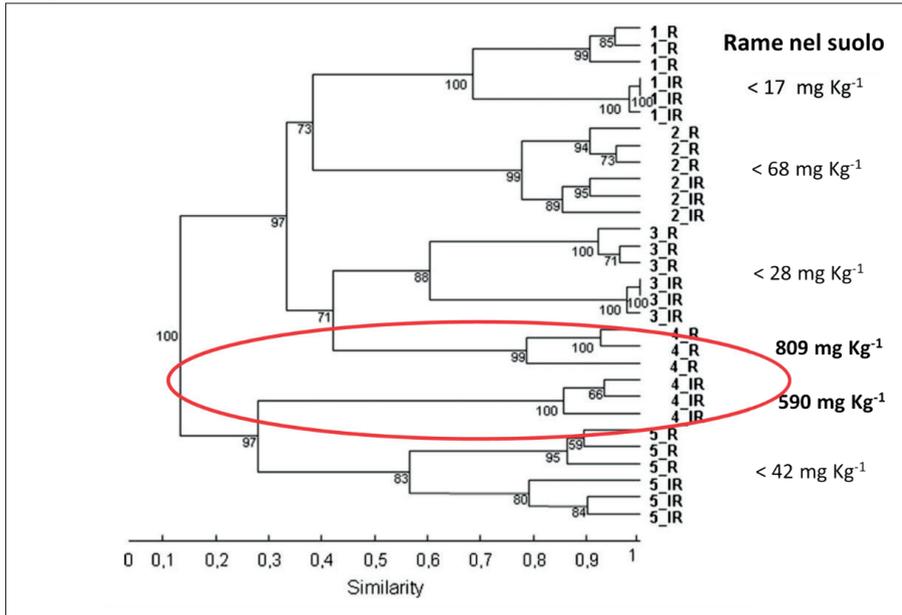


Fig. 3 Effetto di rame sulle comunità batteriche di 5 meleti

40 anni prima). Inoltre, il meieto contaminato con rame è stato l'unico in cui la diversità batterica nella fila ( $800 \text{ mg kg}^{-1}$  suolo) differiva da quella della inter-fila ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$  suolo). Anche in questo caso, tale differenza è stata imputata al rame; quindi, la contaminazione a lungo termine dei suoli con rame ha indotto un aumento della biodiversità batterica (Kelderer et al., 2012).

I funghi endofiti delle radici delle radici invece non differivano per composizione fra i meleti, né fra fila e inter-fila. Questo perché il ritorno di melo sullo stesso appezzamento ha influenzato la composizione delle comunità fungine favorendo così l'instaurarsi dei tipici patogeni non obbligati responsabili della riduzione di sviluppo radicale associata al reimpianto di melo (Kelderer et al., 2012; Manici et al., 2013). Il frutteto contaminato da rame era solo caratterizzato da un minore numero delle specie di minore importanza, mentre le specie più rappresentate erano le stesse osservate negli altri frutteti (riduzione della *richness*).

#### *Caso studio Podere Pantaleone*

Questo caso studio parte da una preliminare analisi del suolo svolta nei laboratori di Chimica Agraria del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-

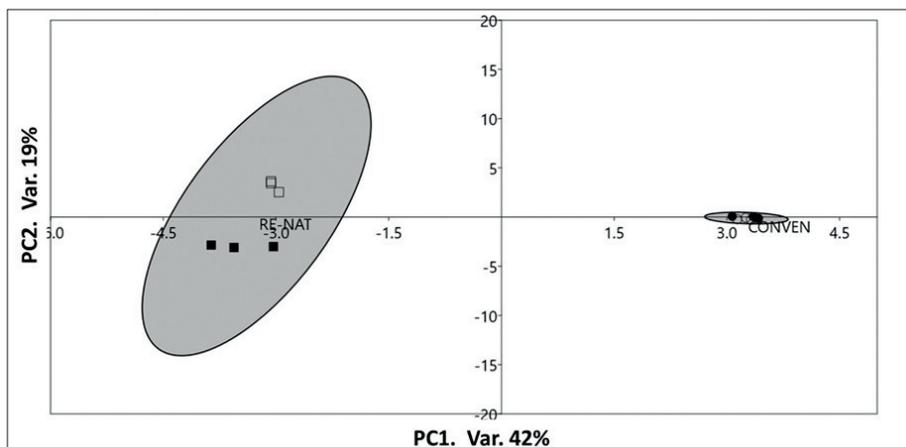


Fig. 4 *Analisi delle componenti principali. Composizione delle comunità batteriche del sito re-naturalizzato (RE-NAT, vigneto con fila contaminata da rame) e convenzionale (CONVEN, pescheto). File, simboli pieni, inter-fila simboli vuoti*

Alimentari dell'Università di Bologna e il rilevamento di un contenuto di rame molto al di sopra dei  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  di suolo in un vecchio vigneto allevato a "vite maritata" entro il Podere Pantaleone (Bagnocavallo, RA) (Cavani et al., 2016). Questo era in passato un'azienda agricola gestita tradizionalmente che comprendeva un vigneto fino agli anni '60, poi abbandonata e trasformata prima in area protetta nel 1989 e poi dal 2006 inclusa nel network dell'EU Natura 2000 come 'Site of Community Importance' in the Mediterranean biogeographical region.

In base ai risultati preliminari è stato impostato uno studio comparativo fra le comunità microbiche del vecchio vigneto a gestione conservativa da più di 50 anni e un adiacente pescheto a gestione convenzionale. Il primo fattore di variabilità era: la gestione, ovvero conservativa (vecchio vigneto a vite maritata) *vs* intensiva (pescheto), il secondo: siti di campionamento: ovvero, fila alberata *vs* inter-fila.

Dalle analisi dei campioni di suolo prelevati nei primi 30 cm, il sito a gestione conservativa è risultato migliorato come contenuto in sostanza organica e biomassa microbica. Il suolo sotto al filare del vecchio vigneto è risultato contaminato con una concentrazione di rame totale intorno a  $1000 \text{ mg per kg}^{-1}$  di suolo, mentre quantità variabili da 60 a  $80 \text{ mg per kg}^{-1}$  di suolo sono state rilevate nel pescheto e nella inter-fila del vecchio vigneto (Cavani et al., 2016). La composizione delle comunità batteriche, valutata con la tecnica molecolare già illustrata nel caso studio precedente ed elaborate con analisi multivariata per dati non pa-

rametrici, differiva sia per gestione (CONVEN *vs.* RE-NAT) che per posizione di campionamento entro frutteti. Tuttavia, nel pescheto a gestione convenzionale (CONVEN, fig. 4), le comunità della fila e dell'inter-fila (3 cerchi pieni e vuoti rispettivamente nel quadrante +X in figura 4), erano molto simili, come facilmente rilevabile dalla sovrapposizione dei punti che le rappresentano intorno all'asse +X (fig. 4). Al contrario, nel vigneto re-naturalizzato (RE-NAT), la composizione delle comunità batteriche sotto il vecchio filare (3 quadrati pieni nel quadrante -X -Y del grafico in figura 4) differivano ampiamente da quelle dell'inter-fila inerbita che nel grafico della PCA sono posizionate nell'altro quadrante (+Y, fig. 4). L'ampiezza della differenza di composizione batterica entro le due diverse gestioni (fig. 4) può essere dedotta dall'ampiezza dell'ellisse che raggruppano le comunità della stessa gestione con il 95% di probabilità.

Inoltre, nella fascia alberata del vigneto, con contenuto di rame totale pari a  $\approx 1000 \text{ mg kg}^{-1}$  di suolo, le comunità batteriche avevano un indice di diversità superiore di tutti gli altri punti campionati.

In base ai due casi studio illustrati, la contaminazione a lungo termine di rame (valori fra 600 e 1000  $\text{mg kg}^{-1}$  in suoli con pH variabile da 6.5 a 7.5) ha due principali effetti:

- modifica la composizione delle comunità batteriche indigene incrementando la variabilità spaziale. Questo suggerisce un effetto disturbo localizzato del rame sulle popolazioni batteriche;
- incrementa la biodiversità batterica. Questo può essere interpretato come uno sforzo di adattamento delle comunità batteriche agli effetti tossici dovuti alle alte concentrazioni di rame;
- un altro effetto della contaminazione di rame è la riduzione del quoziente metabolico dei suoli ( $q\text{Co}_2$ ), ovvero del rapporto fra respirazione e biomassa microbica. Questo è, di fatto, un indice di efficienza metabolica, il quale suggerisce un chiaro effetto di tossicità di rame sulla funzionalità del microbioma del suolo. Questo dato, sempre dal lavoro di Cavani et al, (2016), è in linea con l'effetto riduttivo di rame sulla quantità di funghi tellurici rilevata nello strato coltivato in corrispondenza dei vecchi filari di vite.

#### CONCLUSIONI SU RAME E COMUNITÀ MICROBICHE DEI SUOLI

Mentre nei test di laboratorio su effetti nel breve periodo viene osservato quanto segue:

- la contaminazione di rame nel suolo riduce la diversità batterica (riduzione della *Richness*);

- aumenta la prevalenza di poche specie nella comunità batterica dei suoli (aumento della *Dominance*).

Nello strato coltivato dei suoli contaminati da tempo, concentrazioni di rame molto al di sopra dei limiti di tossicità, inducono le seguenti variazioni rispetto ai suoli non contaminati:

- modificano la composizione delle comunità batteriche indigene incrementandone la variabilità spaziale;
- incrementano la biodiversità batterica;
- riducono l'efficienza metabolica dei suoli;
- riducono la massa fungina dei suoli suggerendo un generale effetto riduttivo del rame.

In base ai due casi studio qui descritti (Kelderer et al., 2012; Cavani et al., 2016), l'arricchimento con sostanza organica dei suoli contaminati con rame permette in generale di attenuare gli effetti negativi della contaminazione a lungo termine dei suoli.

In conclusione, poiché a distanza di 40-50 anni dalle ultime applicazioni di rame, gli effetti di disturbo e di tossicità osservati sulle comunità microbiche dello strato coltivato sono persistenti, la decisione presa dalla comunità europea nel 2019 di limitare e poi vietare entro pochi anni l'uso dei prodotti rameici per la protezione delle piante, è condivisibile. Dal 1° febbraio 2019 è concesso l'uso rame per un totale complessivo di 28 kg ha<sup>-1</sup> nell'arco di sette anni. Tale decisione ha fatto seguito a valutazioni dell'EFSA pubblicate nel 2018 su uso, limiti e tossicità dei prodotti rameici ed una serie di successive contrattazioni a livello UE che hanno coinvolto tutte le parti interessate.

## RIASSUNTO

La concentrazione di rame totale nel suolo pari a 100-150 mg kg<sup>-1</sup> è convenzionalmente riconosciuta come la soglia di tossicità di rame per piante e microorganismi del suolo. Queste soglie derivano da prove di fitotossicità in laboratorio con contaminazione artificiale e verifica l'effetto nel breve periodo. Tali condizioni di laboratorio hanno evidenziato che dosi di rame fitotossiche sulle piante (per es. da 250 a 500 mg kg<sup>-1</sup> rame totale su mais), riducono la diversità batterica inducendo la predominanza di alcune specie. Tuttavia, poco si sa dell'effetto a lungo termine di rame sui microorganismi del suolo.

Studi recenti hanno evidenziato che l'effetto di disturbo sull'attività microbica a partire da concentrazioni di rame superiori ai limiti, si evidenzia facilmente a distanza di 50-60 anni dalle ultime applicazioni di rame. In questo caso, diversamente dall'effetto al breve periodo dei test di laboratorio, il rame nel suolo aumenta la variabilità delle comunità batteriche e la loro diversità.

Per quanto riguarda la capacità metabolica, alte concentrazioni di rame presenti a lungo termine nei suoli ne riducono l'efficienza metabolica. Tuttavia, si riportano evidenze in cui la gestione conservativa, ed il graduale incremento della sostanza organica attenuano gli effetti tossici di rame su batteri e funghi del suolo, permettendo di raggiungere buoni livelli di fertilità biologica anche in presenza di concentrazioni di rame di gran lunga superiori a quella dei limiti convenzionali di tossicità.

#### ABSTRACT

*Impact of copper on soil microbial communities.* The total copper (Cu) concentration in the soil equal to 100-150 mg kg<sup>-1</sup> is conventionally recognized as the threshold of copper toxicity for plants and soil microorganisms. These thresholds derive from phytotoxicity tests in laboratory where artificial contamination of soil samples is obtained with increasing doses. These laboratory conditions have determined the phytotoxic copper doses on several plant species. For example, dosed varying from 250 to 500 mg kg<sup>-1</sup> of total Cu are phytotoxic on maize and reduce bacterial diversity by inducing predominance of some species in soil bacterial communities. Therefore, in laboratory tests, copper contamination reduces bacterial richness and conversely increases the values of dominance. However, little is known about the long-term effect of copper on soil microorganisms.

Recent studies have shown that disturbance effect on microbial activity starting from copper concentrations above the limit can be easily detected after 50-60 years from the last copper applications. In this case, unlike the short-term effect of laboratory tests, copper increases spatial variability of bacterial soil communities as well as bacterial diversity. Soil fungi, under the same conditions, are suppressed as biomass, but do not seem overall affected in composition.

Finally, long-term soil contamination with high copper concentration (~ 1000 mg kg<sup>-1</sup> soil at 7.5 pH) reduces metabolic quotient which is a measure of metabolic efficiency of soil. However, recent case studies showed that conservative management and gradual increase of organic substance, can mitigate the toxic effects of copper on soil bacteria and fungi, allowing to reach good levels of biological fertility even in the presence of copper concentrations far superior to that of conventional toxicity limits.

#### BIBLIOGRAFIA

- CAVANI L., MANICI L.M., CAPUTO F., PERUZZI E., CIAVATTA C. (2016): *Ecological restoration of a copper polluted vineyard: Long-term impact of farmland abandonment on soil bio-chemical properties and microbial communities*, «Journal of Environmental Management», 182, pp. 37-47.
- CHAIGNON V., SÁNCHEZ-NEIRA I., JAILLARD B., HINSINGE P. (2003): *Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area*, «Environmental Pollution», 123, pp. 229-238.
- DELL'AMICO E., MAZZOCCHI M., CAVALCA L., ALLIEVI L., ANDREON V. (2008): *Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil*, «Microbiological Research», 163, pp. 671-683.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY), ARENA ET AL. (2018): *Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds cop-*

- per(I), copper (II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper(I) oxide, Bordeaux mixture*, «EFSA Journal», 16, 5152, 25 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5152>.
- FERNÁNDEZ-CALVIÑO D., MARTÍN A., ARIAS-ESTÉVEZA M., BÅÅTHC E., DÍAZ-RAVIÑA M. (2010): *Microbial community structure of vineyard soils with different pH and copper content*, «Applied Soil Ecology», 46, pp. 276-282.
- KELDERER M., MANICI L.M., CAPUTO, F., THALHEIMER M. (2012): *Planting in the 'inter-row' to overcome replant disease in apple orchards: A study on the effectiveness of the practice based on microbial indicators*, «Plant and Soil», 357, pp. 381-393.
- IPPOLITO J.A., DUCEY T., TARKALSON D. (2010): *Copper impacts on corn, soil extractability and the soil bacterial community*, «Soil Science», 175, pp. 586-592.
- MANICI L.M., CIAVATTA C., KELDERER M., ERSCHBAUMER G. (2003): *Replant problems in South Tyrol: Role of fungal pathogens and microbial population in conventional and organic apple orchards*, «Plant and Soil», 256, pp. 315-324.
- MANICI L.M., KELDERER M., FRANKE-WHITTLE I.H., RÜHMER T., BAAB G., NICOLETTI F., CAPUTO F., TOPP A., INSAM H., NAEF A. (2013): *Relationship between root-endophytic microbial communities and replant disease in specialized apple growing areas in Europe*, «Applied Soil Ecology», 72, pp. 207-214.



STEFANO CESCO\*, YOURY PII\*, TANJA MIMMO\*, GUIDO ORZES\*,  
PAOLO LUGLI\*, FABRIZIO MAZZETTO\*, GUSTAVO BRUNETTO\*\*,  
ROBERTO TERZANO\*\*\*

## Il rame nei suoli agrari: essenzialità *versus* tossicità

I terreni agrari coltivati, con l'eccezione di quelli dedicati a colture agrarie perenni che richiedono piani specifici di difesa basati su prodotti anche cuprici e applicati ripetutamente nel corso della stagione vegetativa, presentano un contenuto naturale di rame che si aggira mediamente tra i 10 e i 20 mg di metallo per kg di suolo (Alloway, 2013). Questa quantità di rame risulta poi nel suolo distribuita in più frazioni (minerale, adsorbita e solubile) in equilibrio dinamico tra loro. La frazione minerale è rappresentata dal rame contenuto nei minerali primari e secondari (quali ad es. olivina, orneblenda, ecc.) mentre quella adsorbita annovera la quota di metallo che interagisce con le cariche negative dei minerali e della sostanza organica del suolo. Le forme di rame solubili, come ioni liberi ( $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) o complessati con molecole organiche solubili e di varia natura (essudati radicali e microbici, frazioni solubili della sostanza organica del suolo, ecc.), rappresentano invece la frazione di metallo disponibile per l'assorbimento delle piante. È interessante notare che l'entità di quest'ultima dipende dai contenuti di sostanza organica del suolo e dei carbonati del suolo, così come dal pH del suolo stesso. Infatti, a parità di contenuto totale di rame, i suoli acidi si caratterizzano per una maggiore disponibilità del metallo rispetto a quelli calcarei (McBride, 1994). A questo riguardo va sottolineato che alla rizosfera, zona di stretto contatto e interazione tra suolo-radice-microorganismi, le caratteristiche chimico-fisiche-biologiche del suolo possono risultare molto diverse da quelle del suolo non rizosferico proprio come conseguenza di queste molteplici interazioni (Mimmo et al.,

\* *Facoltà di Scienze e Tecnologie, Libera Università di Bolzano*

\*\* *Dipartimento di Scienza del Suolo, Università Federale di Santa Maria, Brasile*

\*\*\* *Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"*

2014; Pii et al., 2015). Anche l'intervento antropico può essere determinante in tal senso, come ad esempio la fertilizzazione azotata a base di ammonio o di nitrato. Infatti, è ben risaputo che, mentre l'ammonio induce una considerevole acidificazione della rizosfera, il nitrato ne causa una significativa alcalinizzazione (Marschner et al., 1986), con evidenti e prevedibili effetti in entrambi i casi sui livelli di disponibilità dei nutrienti in questo ben definito volume di suolo.

I contenuti di rame nella pianta si aggirano mediamente sui 10 µg di metallo per g di sostanza secca (Yruela, 2005). Alla superficie della radice, il metallo può rimanere adsorbito alle cariche negative dell'apoplasto e della parete cellulare (Marschner, 2012) o essere acquisito dalle cellule radicali attraverso processi di trasporto trans-membrana delle forme ioniche libere ( $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , Brunetto et al., 2016). Nel caso dell'acquisizione della forma ionica libera ridotta ( $\text{Cu}^+$ ), è ipotizzato il coinvolgimento a monte di un'attività enzimatica di riduzione del  $\text{Cu}^{2+}$  localizzata alla superficie della membrana plasmatica. Va inoltre fatto notare che non è escluso un possibile utilizzo diretto, come fonte nutrizionale, anche delle forme del rame complessate da leganti organici di ridotte dimensioni molecolari. Una volta all'interno della cellula radicale, il metallo, pur non godendo di elevata mobilità nella pianta, viene comunque sempre trasportato in forma complessata a molecole organiche di varia natura tra le quali l'acido citrico (Curie et al., 2008). Nei diversi compartimenti cellulari, il rame riveste ruoli fondamentali per il metabolismo, ad esempio come costituente del complesso IV della catena di trasporto degli elettroni nel mitocondrio o della plastocianina a livello del cloroplasto. È cofattore anche di enzimi coinvolti nella risposta adattativa agli stress ossidativi (Marschner, 2012).

Anche se raramente, alcuni casi di limitata disponibilità di rame sono stati registrati in particolare in suoli formati da minerali costituzionalmente poveri di rame o in casi di abbondante presenza di sostanza organica. In queste situazioni è possibile riscontrare un ridotto sviluppo dell'apparato fogliare associato alla comparsa di ingiallimenti internervali associati spesso a macchie necrotiche.

Tuttavia, in questi ultimi decenni la necessità nelle colture arboree da frutto di contrastare sempre più frequenti infezioni fungine ha favorito il ricorso a una abbondante applicazione di agrofarmaci anche a base di rame, causando in questo caso specifico un significativo incremento dei livelli di metallo nel suolo. Tale fenomeno risulta particolarmente pronunciato nei suoli coltivati a vite dove si sono registrati valori prossimi o addirittura, in taluni casi, superiori ai 1000 mg di Cu per Kg di suolo (Flores-Vélez et al.,

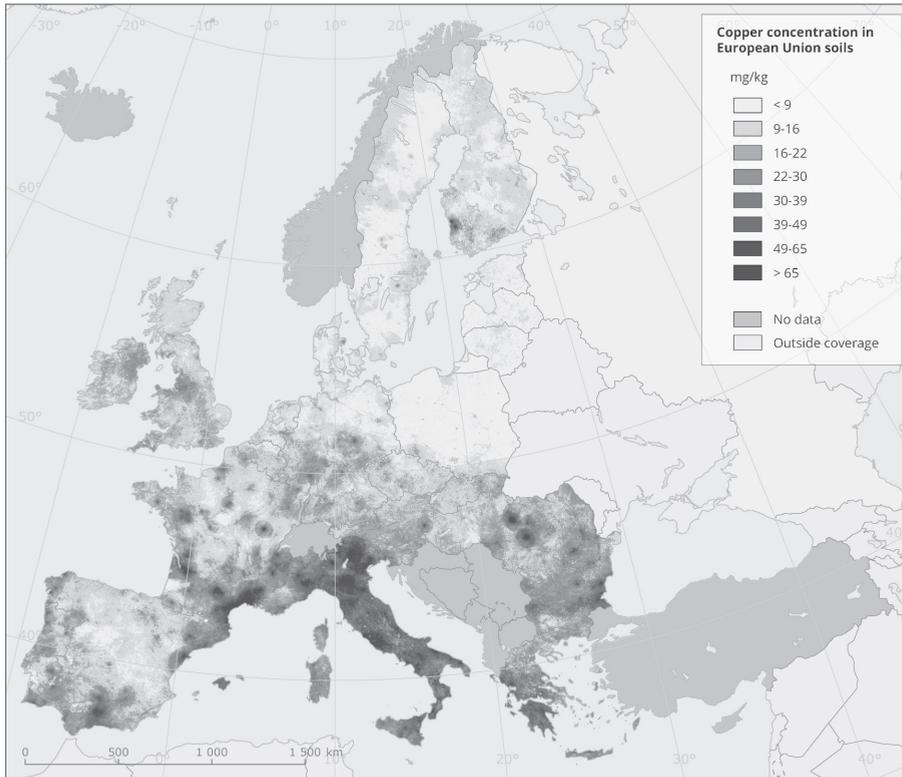


Fig. 1 *Mapa di distribuzione del rame in suoli degli stati della Comunità Europea* (<https://esdac.jrc.ec.europa.eu/themes/copper-topsoils>)

1996). Dal punto di vista del livello di diffusione del fenomeno, i dati riportati in figura 1 ci indicano quanto esso sia esteso sul territorio nazionale anche se con livelli di criticità diversificati. In queste condizioni e in particolare in suoli a reazione subacida, viene sempre più frequentemente evidenziata l'insorgenza di sintomi di tossicità sia a livello radicale che fogliare (fig. 2A) associati a chiari squilibri nutrizionali (Baldi et al., 2018). Ciò suggerisce una possibile interferenza del rame con i meccanismi di acquisizione di alcuni degli altri elementi nutritivi essenziali e determinanti per garantire standard qualitativi elevati del raccolto. Inoltre, l'accumulo del metallo a livello della parete cellulare radicale con conseguente suo irrigidimento pare essere alla base del mancato sviluppo del tessuto radicale in condizioni di tossicità da rame (Kopittke et al., 2011). In un contesto agrario questo fenomeno può indubbiamente rappresentare un serio problema, in particolare nelle fasi di reimpianto dei vigneti. Infatti, è risaputo che i primi anni

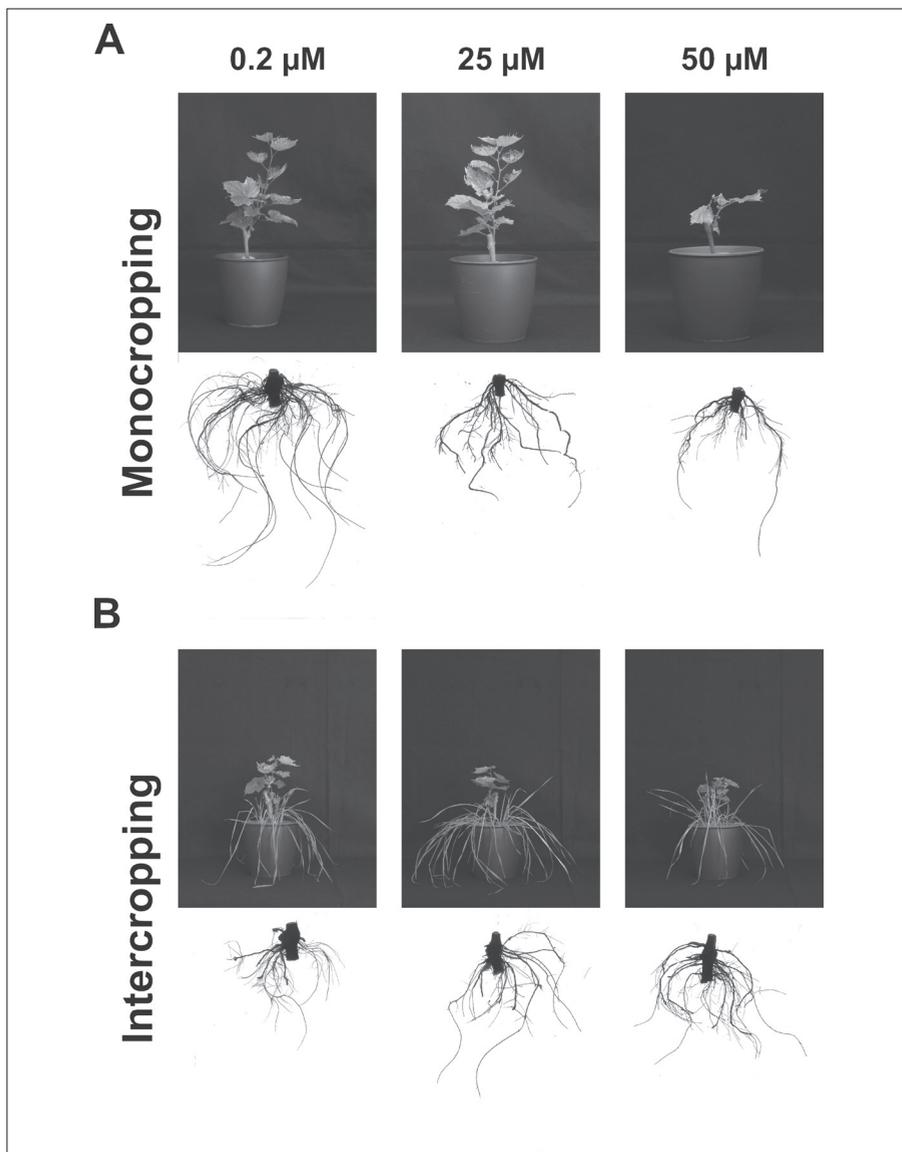


Fig. 2 Effetto della concentrazione di rame (Cu) sui tratti fenotipici di piante di portinnesto di vite 196.17 (*Vitis vinifera* × *Vitis berlandieri*). **A.** Immagini rappresentative di piante allevate in soluzione idroponica ed esposte a concentrazioni di Cu crescenti (0.2, 25 e 50 µM). I rilevamenti fenotipici su foglie e radici sono stati condotti dopo 14 giorni di trattamento. **B.** Immagini rappresentative di piante allevate in soluzione idroponica in consociazione con piante di *Avena sativa* cv. Fronteira ed esposte a concentrazioni di Cu crescenti (0.2, 25 e 50 µM). I rilevamenti fenotipici su foglie e radici sono stati condotti dopo 14 giorni di trattamento (Tratto e modificato da Marastoni et al, 2019b)

di allevamento delle barbatelle sono fondamentali per l'affrancamento della pianta stessa in termini anche di uno sviluppo appropriato del suo apparato radicale. Inoltre, l'attivazione a livello radicale dei meccanismi di acquisizione del Fe in risposta alla limitata disponibilità del Fe nel mezzo di crescita (aumento della capacità di riduzione del  $\text{Fe}^{3+}$ , trasporto trans-membrana del  $\text{Fe}^{2+}$ , acidificazione della rizosfera, Kobayashi e Nishizawa, 2012) e il concomitante sbilanciamento tra anioni-cationi (a favore di quest'ultimi), che si verifica nelle piante esposte a questa condizione di stress nutrizionale, determina un accumulo indifferenziato di cationi tra cui il Cu nei diversi tessuti vegetali (Tomasi et al., 2014). Considerata la natura prettamente calcarea dei suoli dell'area mediterranea che spesso induce fenomeni di limitata disponibilità di Fe per le specie vegetali coltivate, appare chiaro che in tale area una non corretta gestione della nutrizione ferrica dell'impianto arboreo (carenza di Fe) potrebbe tradursi nei suoli contaminati con rame in una induzione della sua tossicità, nonostante i valori di pH del suolo siano di per sé sfavorevoli a una consistente disponibilità del metallo.

I dati presenti in letteratura e rappresentati in figura 1 ci mostrano chiaramente come in questi ultimi anni si sia verificato un significativo incremento dei contenuti di rame nei suoli agrari per effetto delle pratiche colturali di difesa. È indubbio che questo fenomeno richieda una seria riflessione, che però andrebbe inserita in un contesto più ampio di sostenibilità ambientale in senso generale. Infatti, le evidenze sempre più frequenti di contaminazioni con composti organici di sintesi per uso umano (come medicinali ad es. ibuprofene, Luo et al., 2014) delle risorse idriche impiegabili a valle in piani di irrigazione di soccorso delle colture agrarie sono uno dei tanti esempi di quanto sia necessaria una discussione che coinvolga sia il produttore che il consumatore, in una visione molto più ampia di tutela dell'ambiente. Crociate contro o a favore dell'uso del rame in agricoltura potrebbero risultare di scarsa utilità, particolarmente in ambito scientifico, soprattutto se svincolate da un contesto di sostenibilità generale dell'agricoltura a cui ogni cittadino, indipendentemente se coinvolto nel ciclo produttivo in prima persona o meno, può fornire un suo significativo contributo. La contestualizzazione del problema dell'accumulo del rame nei suoli agricoli diventa pertanto di fondamentale rilevanza per una sua corretta analisi.

Dal punto di vista pratico, la situazione attuale di accumulo del rame nei suoli di alcuni areali agrari può essere affrontata ricercando (o applicando, qualora già disponibili) strategie che consentano la coesistenza con il problema e/o che ne contengano l'ulteriore apporto al suolo.

Relativamente alle prime, la letteratura ci offre una serie di soluzioni agro-

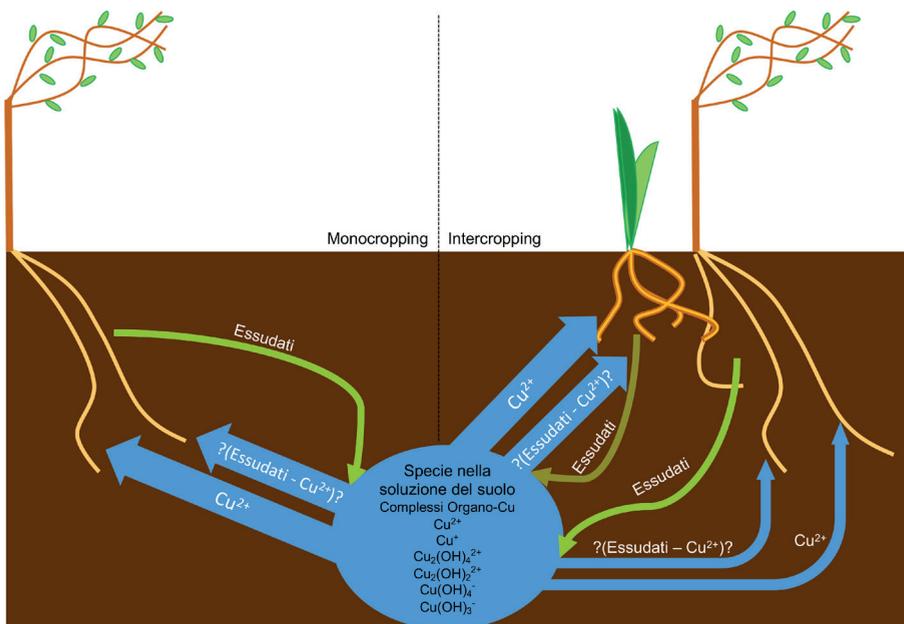


Fig. 3 Rappresentazione schematica delle interazioni alla rizosfera tra piante e forme di Cu disponibili nella soluzione del suolo in caso di sistema di allevamento monocropping e quello intercropping. Lo spessore delle frecce, che indicano il movimento del rame libero ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e degli ipotetici complessi tra rame e essudati radicali (Essudati- $\text{Cu}^{2+}$ ), è rappresentativo dei livelli di concentrazione delle specie nella soluzione del suolo

nomiche già applicabili (si veda anche Brunetto et al., 2016), messe a punto per lo più in suoli subacidi/acidi dove la disponibilità del metallo è piuttosto elevata e il problema è avvertito in modo significativo già da tempo. Sono soluzioni che mirano al contenimento della frazione disponibile del metallo alla rizosfera (fig. 3) limitandone quindi gli effetti tossici sulla specie coltivata (Brunetto et al., 2016), come ad esempio la consociazione delle piante di vite con particolari specie vegetali da copertura (fig. 2B) anche in alcuni casi autoctone (Marastoni et al., 2019a). Oppure, si tratta di strategie agronomiche mirate alla coesistenza con il problema, che in alcuni casi hanno anche fornito risultati promettenti (De Conti et al., 2019).

Sull'altro fronte e cioè quello del contenimento dell'ulteriore apporto di rame ai suoli, sicuramente l'applicazione anche al contesto agricolo dei paradigmi propri della rivoluzione industriale 4.0 e delle sue relative tecnologie (sensoristica, *IoT*, *Big data*, *cloud computing*, ecc.) potrebbe garantire una distribuzione dell'agrofarmaco più tempestiva, localizzata e bilanciata con le necessità d'intervento. Alcuni esempi promettenti di *smart agriculture* sono

già disponibili in letteratura (ad es Augmenta Field Analyzer, <https://www.augmenta.ag/product>). Tuttavia, a causa dei livelli di rame accumulati nel corso degli anni e al fine di poter ancora garantire in una visione di lungo periodo la possibilità di coltivare la vite proprio negli areali storicamente vocati alla viticoltura, la disponibilità di materiale vegetale geneticamente resistente alle diverse patologie pare essere una condizione imprescindibile al contenimento dell'ulteriore apporto di rame ai suoli e per una viticoltura più sostenibile in senso lato. In questi ultimi anni, gli ambiti scientifici della Genetica Vegetale e del Miglioramento Genetico hanno avuto un enorme sviluppo in termini di conoscenze e di strumenti che sicuramente consente loro di dare un fondamentale contributo in tal senso. Le evidenze recenti delle interazioni tra nutrienti e degli squilibri nutrizionali indotti dalla tossicità da rame nelle piante di vite evidenzia tuttavia la necessità di un coinvolgimento di tutti gli ambiti disciplinari/scientifici propri della viticoltura nel raggiungimento di tale obiettivo. Infatti, solo un approccio multidisciplinare al problema, che assicuri una accurata valutazione di tutti i livelli di performance del nuovo materiale vegetale proprio nei suoli ad elevato contenuto di rame, sarà garanzia di riuscita nell'impresa e di una corretta formulazione di una appropriata risposta per la sostenibilità della viticoltura nel lungo periodo.

#### RINGRAZIAMENTI

Ricerca eseguita con fondi di ricerca della Libera Università di Bolzano (TN2081, TN2053 and TN2071).

#### RIASSUNTO

Il rame è un elemento essenziale per le piante e svolge ruoli chiave in diversi processi biochimici e fisiologici collegati alla crescita e allo sviluppo delle piante. Anche se il suo contenuto totale nei terreni agrari viene generalmente ritenuto adeguato, la frazione disponibile per la pianta può invece variare considerevolmente in funzione dei valori di pH del suolo stesso e del suo contenuto in sostanza organica. I meccanismi radicali di acquisizione del rame sfruttano la frazione ionica libera del nutriente ( $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ), anche se l'utilizzo diretto di fonti complessate a leganti organici di varia natura non è esclusa. In questi ultimi decenni tuttavia, l'uso ripetuto e prolungato di fungicidi a base di rame per i piani di difesa delle colture agrarie di pregio, in particolare le piante di vite, ha determinato un significativo accumulo del metallo nei suoli vitati (in particolare negli strati superiori), raggiungendo in diversi casi livelli di concentrazioni tossici per le piante e, in alcune circostanze, addirittura superiori ai limiti imposti nell'UE per

i terreni agricoli. In queste condizioni, le piante mostrano evidenti sintomi di tossicità sia a livello radicale che fogliare associati a chiari squilibri nutrizionali, suggerendo una possibile interferenza del rame con i meccanismi di acquisizione di alcuni degli altri elementi nutritivi essenziali e determinanti per standard qualitativi elevati del raccolto. Ne consegue che una conoscenza più approfondita di tali fenomeni risulta determinante a individuare (o mettere a punto) pratiche agronomiche più appropriate a garantire, anche nel lungo periodo, la coltivazione delle varietà tradizionali di vite nelle zone particolarmente vocate alla viticoltura. Tuttavia, per i livelli di rame accumulati in tali areali nel corso degli anni, la disponibilità di materiale vegetale geneticamente resistente alle diverse patologie, condizione imprescindibile alla limitazione dell'apporto di rame ai suoli e per una viticoltura più sostenibile in senso lato, richiede necessariamente una accurata valutazione dei livelli di performance di tale materiale proprio in questi suoli.

#### ABSTRACT

Copper is an essential element playing key roles in several biochemical and physiological processes related to plant growth and development. Although its total content in agricultural soils is generally considered adequate, the plant-available soluble fraction can instead vary considerably depending on the pH values and the organic matter contents. It is well known that roots are able to use for their copper acquisition the free ionic forms ( $\text{Cu}^+$ / $\text{Cu}^{2+}$ ), although the direct use of copper complexes with the different organic molecules present in the rhizosphere is not excluded. In the recent decades, however, the prolonged and repeated application of copper-based agrochemicals for the defense plans of valuable agricultural crops, in particular vine plants, has caused a significant accumulation of the metal in the vineyards (in particular in the upper layers), reaching in several cases levels of toxicity for plants and, in some circumstances, even levels higher than the limits imposed in the EU for agricultural lands. Under these conditions, the plants exhibit evident symptoms of toxicity both at the root and the leaf level associated with some manifest nutritional imbalances. This aspect suggests a possible copper interference with the acquisition mechanisms of some of the other essential nutrients which are determinant for the high-quality standards of the crop. Consequently, it appears evident that a deeper knowledge of these phenomena results decisive in identifying (or setting) more appropriate agronomic practices aimed at ensuring, even in the long term, the cultivation of vine plants, also in the future, in the areas vocated to viticulture. Nonetheless, due to the levels of copper accumulated in these areas over the years, the availability of vine-plant varieties genetically resistant to the different pathologies appears to be an essential condition for limiting the further supply of copper to the soils and for a more sustainable viticulture in the broad sense. Considering the micronutrient interactions among the diverse nutrients recently evidenced, for an accurate assessment of the performance levels of this new vegetative material in these specific soils a multidisciplinary approach appears to be essential.

#### BIBLIOGRAFIA

ALLOWAY B.J. (2013): *Sources of heavy metals and metalloids in soils*, Springer, Dordrecht, pp. 11-50.

- BALDI E., MIOTTO A., CERETTA C.A., QUARTIERI M., SORRENTI G., BRUNETTO G., TOSELLI M. (2018): *Soil-applied phosphorous is an effective tool to mitigate the toxicity of copper excess on grapevine grown in rhizobox*, «Scientia Horticulturae», 227, pp. 102-111.
- BRUNETTO G., BASTOS DE MELO G.W., TERZANO R., DEL BUONO D., ASTOLFI S., TOMASI N., PII Y., MIMMO T., CESCO S. (2016): *Copper accumulation in vineyard soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity*, «Chemosphere», 162, pp. 293-307.
- DE CONTI L., CERETTA C.A., BASTOS DE MELO G.W., TIECHER T.L., SILVA L.O.S., GARLET L.P., MIMMO T., CESCO S., BRUNETTO G. (2019): *Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils*, «Chemosphere», 216, pp. 147-156.
- CURIE C., CASSIN G., COUCH D., DIVOL F., HIGUCHI K., LE JEAN M., MISSON J., SCHIKORA A., CZERNIC P., MARI S. (2008): *Metal movement within the plant: Contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters*, «Annals of Botany», 103, pp. 1-11.
- FLORES-VÉLEZ L.M., DUCAROIR J., JAUNET A.M., ROBERT M. (1996): *Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods*, «European Journal of Soil Science», 47, pp. 523-532.
- KOBAYASHI T., NISHIZAWA N.K. (2012): *Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants*, «Annual Reviews of Plant Biology», 63, pp. 131-152.
- KOPITTKE P.M., MENZIES N.W., DE JONGE M.D., MCKENNA B.A., DONNER E., WEBB R.I., PATERSON D.J., HOWARD D.L., RYAN C.G., GLOVER C.J., SCHEKEL C.G., LOMBI E. (2011): *In situ distribution and speciation of toxic copper, nickel, and zinc in hydrated roots of cowpea*, «Plant Physiology», 156, pp. 663-673.
- LUO Y., GUO W., NGO H.H., NGHIEM L.D., HAI F.I., ZHANG J., LIANG S., WANG X.C. (2014): *A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment*, «Science of the Total Environment», 473-474, pp. 619-641.
- MARASTONI L., SANDRI M., PII Y., VALENTINUZZI F., BRUNETTO G., CESCO S., MIMMO T. (2019a): *Synergism and antagonisms between nutrients induced by copper toxicity in grapevine rootstocks: Monocropping vs. intercropping*, «Chemosphere», 214, pp. 563-578.
- MARASTONI L., SANDRI M., PII Y., VALENTINUZZI F., CESCO S., MIMMO T. (2019b). *Morphological root responses and molecular regulation of cation transporters are differently affected by copper toxicity and cropping system depending on the grapevine rootstock genotype*, «Frontiers in Plant Science», 10, pp. 946.
- MARSCHNER H., RÖMHELD V., HORST W.J., MARTIN P. (1986): *Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants*, «Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenk», 149, pp. 441-456.
- MARSCHNER P. (2012): *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 3rd ed. London.
- MCBRIDE M. (1994): *Trace and toxic elements in soils*, a cura di McBride M., Oxford University Press, New York, pp. 308-341.
- MIMMO T., DEL BUONO D., TERZANO R., TOMASI N., VIGANI G., CRECCHIO C., PINTON R., ZOCCHI G., CESCO S. (2014): *Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: their role in iron availability*, «European Journal of Soil Science», 65, pp. 629-642.

- PII Y., MIMMO T., TOMASI N., TERZANO R., CESCO S., CRECCHIO C. (2015): *Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review*, «Biology and Fertility of Soils», 51, pp. 403-415.
- TOMASI N., MIMMO T., TERZANO R., ALFELD M., JANSSENS K., ZANIN L., PINTON R., VARANINI Z., CESCO S. (2014): *Nutrient accumulation in leaves of Fe-deficient cucumber plants treated with natural Fe complexes*, «Biology and Fertility of Soils», 50, pp. 973-982.
- YRUELA I. (2005): *Copper in plants*, «Brazilian Journal of Plant Physiology», 17, pp. 145-156.

STEFANIA TEGLI\*, FRANCESCO TESSI\*

## Difesa innovativa ed ecocompatibile delle piante dalle malattie: la scienza al servizio di economia ed ecologia, senza ideologia

Con il Regolamento d'Esecuzione (UE) 2018/1981 del 13 dicembre 2018, la Commissione Europea ha stabilito il rinnovo dell'approvazione dei composti a base di rame per uso fitoiatrico, che potrà essere richiesto fino al 2025, ma fissando contemporaneamente dei limiti più ristretti per la loro soglia d'impiego (Commissione UE, 2018). Le nuove disposizioni, valide dal 1 gennaio 2019 sia in agricoltura tradizionale che integrata e soprattutto biologica, prevedono una soglia di 28 kg/ettaro nell'arco di 7 anni, con un limite annuale massimo che gli Stati membri possono fissare a 4 kg/ettaro. In realtà, allo stato attuale è ancora valido anche quanto previsto dal Regolamento (CE) 889/2008 (Commissione UE, 2008), che ancora permette alle produzioni biologiche il raggiungimento di 6 kg/ettaro/anno con l'ulteriore deroga fino ad un massimo di 30 kg/ettaro nei 5 anni, purché nei 7 anni non sia superato il totale di 28 kg/ettaro stabilito nel Regolamento 2018/1981. Il 31 marzo 2019 era la data ultima per presentare il dossier di rinnovo dei prodotti fitosanitari a base di rame attualmente autorizzati, salvo essere revocati a partire dal 1° aprile 2019, con commercializzazione e uso ancora consentiti rispettivamente fino allo scorso 30 settembre e al 31 marzo 2020. Dopo tale data, la lista dei prodotti revocati verrà quindi resa pubblica sul sito web del MIPAAFT.

La complessa articolazione della normativa attuale, incluso le varie deroghe, deriva da ciò che il Regolamento 2018/1981 stesso afferma in modo esplicito, ovvero che i composti fitoiatrici a base di rame sono «sostanze candidate alla sostituzione». Ciò accoglie quindi la valutazione globalmente negativa pubblicata da EFSA il 30 Agosto 2018, effettuata per incarico della Commissione europea al fine di fornire assistenza scientifica

\* *Laboratorio Patologia Vegetale Molecolare, DAGRI, Università degli Studi di Firenze*

sulla valutazione del rischio relativo ai composti fitoatirici rameici. Analogamente, le ragioni dell'impegno alla sostituzione è implicito nella nuova etichetta, anch'essa prevista dal Regolamento 2018/1981 e da includere nel dossier di rinnovo, in cui a premessa del limite d'utilizzo deve comparire la frase «al fine di ridurre al minimo il potenziale accumulo nel suolo e l'esposizione per gli organismi non bersaglio, tenendo conto al contempo delle condizioni agroclimatiche, non superare l'applicazione cumulativa di...».

Pertanto il Regolamento 2018/1981 implicitamente accetta che allo stato attuale non ci siano sostituti fitoatirici al rame altrettanto efficaci, nonostante la crescente consapevolezza dei problemi di natura eco-tossicologica derivanti dal suo uso continuato, e talvolta inutilmente eccessivo, a protezione delle colture dalle malattie. Tutto ciò ha portato in tempi recenti alla ricerca di possibili alternative. Mentre per i funghi fitopatogeni sono già disponibili promettenti sostituti all'uso del rame, capaci di soddisfare le esigenze legate sia alla protezione dell'ambiente che alla produttività dell'agroindustria, a oggi pochissime sono le opzioni dimostrate essere efficaci e sostenibili, che potrebbero potenzialmente sostituire il rame contro i batteri fitopatogeni. Se importanti come ruolo nella difesa integrata, i battericidi rameici sono talvolta addirittura indispensabili in agricoltura biologica. Mentre negli USA è permesso l'uso in pieno campo anche di taluni antibiotici, in Europa i battericidi ammessi sono rappresentati esclusivamente da composti a base di rame. Ma il numero crescente di segnalazioni relative allo sviluppo di resistenza al rame in batteri fitopatogeni afferenti a vari e diversi generi, riportato a partire dagli anni '80 dello scorso secolo, ha destato notevoli preoccupazioni per la sostenibilità di questi interventi. In generale, il controllo delle malattie delle piante a eziologia batterica è senza dubbio molto impegnativo e difficoltoso. Nonostante molteplici siano le modalità d'interazione che i batteri fitopatogeni possono instaurare con i loro ospiti vegetali, la lotta alle batteriosi delle piante deve essere sempre basata essenzialmente sulla prevenzione dell'infezione e della disseminazione del patogeno, piuttosto che sulla cura della malattia quando conclamata. Le principali misure di controllo delle batteriosi delle piante dovrebbero prevedere, e spesso prevedono, l'introduzione e l'uso di varietà, cultivar o ibridi resistenti, l'adozione di pratiche colturali-agronomiche e di monitoraggio che permettono di ridurre l'inoculo infettante o la probabilità d'infezione, l'implementazione e applicazione di misure diagnostico-ispettive e di quarantena per escludere o limitare introduzione e/o diffusione del fitopatogeno e del materiale vegetale infetto.

Tra le attuali e promettenti alternative candidate a sostituire, o almeno a ridurre le quantità utilizzate, i fitoiatrici rameici contro le batteriosi delle piante vi sono estratti vegetali, anche ottenuti da processi di economia circolare e bioeconomia. Tra questi si ricordano estratti polifenolici in acqua di castagno, carciofo, vinacciolo e tè verde, saggianti contro *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* (Biancalani et al., 2016). Altri esempi poi consistono negli estratti di neem (*Azadirachta indica*) contro il colpo batterico del riso da *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, gli olii estratti dalle foglie di pepe (*Piper nigrum*) e geranio (*Pelargonium graveolens*) attivi contro batteri Gram positivi e negativi, oltre a specifici estratti da *Brassica napus* e pomodoro contro alcune batteriosi della cipolla (Gurjar et al., 2012). Anche l'uso di formulati a base di agenti di lotta biologica ("Biological Control Agents", BCA) si è dimostrato in certi casi efficace per il controllo di alcune batteriosi di specie coltivate, con riduzione dell'incidenza e spesso anche della severità degli attacchi. A oggi sono stati registrati per uso commerciale in agricoltura circa 250 ceppi microbici di cui 94 utilizzati per il controllo delle malattie, incluso quelle batteriche. Prodotti basati su *Aureobasidium pullulans* (ceppi DSM 14940 e 14941), *Pantoea agglomerans* (ceppi C9-1, E325 e p10c) e *Pseudomonas fluorescens* ceppo A506 sono usati per il controllo del colpo di fuoco batterico da *Erwinia amylovora*, mentre *Pseudomonas rhodesiae* ceppo HAI-0804 è usato comunemente in Giappone contro *Pseudomonas syringae* (Lamichhane et al., 2018). Altro esempio molto promettente è poi rappresentato dall'uso di batteri lattici contro *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*), *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*) e *Xanthomonas fragariae* (*Xfr*) (Daranas et al., 2018). Successivamente alle iniziali prove di screening per la selezione dei ceppi dotati di maggiore attività, l'efficienza di *Lactobacillus plantarum* e di *Leuconostoc mesenteroides* è stata valutata in esperimenti di semi-campo e in frutteto, in condizioni controllate secondo quanto previsto per legge per tali fitopatogeni. D'impatto positivo sulla riduzione della severità dei sintomi nonché sull'incidenza di *Psa*, *Xap* e *Xfr* si sono rivelati i ceppi PM411 e TC92 di *L. plantarum*, i quali hanno anche dimostrato una notevole capacità di persistenza a livello epifittico. In pieno campo, a seguito del trattamento con tali ceppi di *L. plantarum*, è stata osservata una riduzione dell'incidenza della malattia paragonabile a quella dei trattamenti rameici.

Infine, recentemente le nuove norme europee hanno contribuito a chiarire il confine funzionale esistente tra presidi fitosanitari, o "Plant Protection Products" (PPPs), ed eventuali composti deputati a migliorare lo stato generale della pianta, aumentandone quindi anche la capacità di fare fronte ad attacchi biotici e abiotici ma senza un effetto diretto sul fitopatogeno. Definiti di volta

in volta come fitostimolanti, corroboranti o talvolta anche induttori delle difese, questi fertilizzanti spesso contengono anche elementi d'origine biologica così come microorganismi attivi. A oggi, tra i prodotti già commercializzati non sono stati ufficialmente riportati casi di conclamata attività contro batteri fitopatogeni, al contrario degli esempi d'efficacia rilevati per alcuni funghi fitopatogeni. Eventuali conflitti o errori nell'interpretazione nell'assegnazione della categoria funzionale (PPPs o biostimolante?) sono stati definitivamente risolti dal nuovo Regolamento 2019/1009 del Parlamento europeo e del Consiglio (5 giugno 2019) sulle norme da seguire per l'immissione sul mercato di prodotti biostimolanti per vegetali in UE, pubblicato sulla Gazzetta ufficiale UE il 25 giugno 2019 (Parlamento UE, 2019). I lavori necessari per la stesura di questo Regolamento sono durati tre anni. La piena applicazione è prevista per il 16 luglio 2022, quando i primi prodotti fertilizzanti/biostimolanti a marchio CE saranno immessi sul mercato UE, ma il Regolamento 2019/1009 è in vigore già dallo scorso 15 luglio 2019. È bene sottolineare che da tale data i biostimolanti e corroboranti sono stati esplicitamente esclusi e separati dai prodotti destinati alla protezione fitosanitaria, con un mercato mondiale dei biostimolanti per il quale è previsto un tasso annuo di crescita composto medio pari al 12,4% nel periodo 2019-2026. Ancora di più quindi la scienza e la ricerca sono chiamate a rispondere alla sfida non solo di cercare alternative al rame quale battericida e anche fungicida, ma soprattutto di verificarne efficacia e profilo eco-tossicologico secondo l'oggettività scientifica.

#### ABSTRACT

Agriculture and market are increasingly oriented towards a more sustainable and eco-friendly control of plant diseases, that still mainly relies on copper-based compounds. Starting from the 1<sup>st</sup> January 2019, the new EU Regulation 2018/1981 is in force, the average annual threshold for copper usage in plant protection is now 4 kg/ha or 28 kg/ha/7 years. In the last years, the trend towards the copper reduction or substitution in agriculture has induced many companies to focus on R&D of innovative plant protection products (PPPs). While several promising alternative to copper fungicides are already available, still now copper is essential in organic agriculture against bacterial plant pathogens, which are definitely more challenging to be controlled. Several putative solutions have been proposed, including botanical extracts also from circular economy processes, and biological control agents (BCAs). To this concern, the interpretative conflict up to now existing between PPPs and biostimulants/resistance inducers has been definitely resolved by the new EU Regulation on this topic. The clear-cut identification of the functional category is important to give science-supported answers to orientate an authentic and really sustainable agroecology.

## BIBLIOGRAFIA

- BIANCALANI C., CERBONESCHI M., TADINI-BUONINSEGNI F., CAMPO M., SCARDIGLI A., ROMANI A., TEGLI S. (2016): *Global analysis of Type Three Secretion System and Quorum Sensing inhibition of Pseudomonas savastanoi by polyphenols extracts from vegetable residues*, PLoS ONE 11: e0163357. <http://doi:10.1371/journal.pone.0163357>
- COMMISSIONE EUROPEA (2018): *Regolamento di esecuzione (UE) 2018/1981* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1981&from=EN>
- COMMISSIONE EUROPEA (2008): *Regolamento 889/2008* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0889&from=IT>
- DARANAS N., ROSELLO G., CABREFIGA J., DONATI I., FRANCÈS J., BADOSA E., SPINELLI F., MONTESINS E., BONATERRA A. (2018): *Biological control of bacterial plant diseases with Lactobacillus plantarum strains selected for their broad-spectrum activity*, «Ann Appl Biol.», 174, pp. 92-105. <https://doi.org/10.1111/aab.12476>
- GURJAR M.S., SHAHID A., MASOOD A., SINGH K.S. (2012): *Efficacy of plant extracts in plant disease management*, «Agricultural Science», 3, pp. 425-433. <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/as.2012.33050>
- LAMICHHANE J.R., OSDAGHI E., BEHLAU F., KOHL J., JONES J.B., AUBERTOT J.N. (2018): *Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review*, «Agron. Sustain. Dev.», 38, 28. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0503-9>
- PARLAMENTO EUROPEO E CONSIGLIO (2019): *Regolamento 2019/1009* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R1009&from=IT>



## Varietà di vite *resistenti* alle malattie e rame: opportunità e limiti

### INTRODUZIONE

La sostenibilità delle produzioni vitivinicole è, ad oggi, il tema di principale interesse dell'opinione pubblica mondiale e di tutti gli operatori della filiera. Studi recenti condotti dall'associazione Sudvinbio e presentati a Millèsime Bio (Montpellier) evidenziano come, nei prossimi anni, la produzione di vino biologico sia destinata a crescere in tutti i Paesi europei. La previsione di una domanda futura in continua crescita, per essere soddisfatta, deve prevedere un graduale e proporzionale incremento di superfici viticole a coltivazione biologica; condizione, allo stato attuale, di non semplice realizzazione. La domanda sorge dunque spontanea: come sarà possibile implementare la viticoltura biologica e nel contempo garantire produzioni di vino di alta qualità? La risposta non appare per nulla scontata, tanto più se valutiamo le richieste sempre più pressanti dell'Unione Europea in termini di sostenibilità ambientale: la riduzione dell'impiego di composti rameici in agricoltura a 4 kg/ha/anno, ad esempio, renderà incerto il futuro dell'agricoltura biologica in diversi areali viticoli. I produttori sostengono che in assenza di alternative efficaci al rame le produzioni biologiche, a causa delle ingenti perdite produttive, non risulteranno più economicamente sostenibili e conseguentemente le aziende, pur di non fallire, saranno obbligate a utilizzare prodotti chimici di sintesi (Matasci et al., 2008; Pellegrini et al., 2010). L'approccio dell'Unione Europea sulla regolamentazione della viticoltura biologica appare agli occhi dei massimi produttori di vino troppo semplicistico e lontano dalle reali esigenze della filiera, pertanto propongono una strategia più graduale e che contenga

\* *Vivai Cooperativi Rauscedo (VCR), Rauscedo (PN)*

reali proposte di cambiamento, in primis, l'impiego in viticoltura delle nuove varietà resistenti ai principali patogeni.

#### LA VITICOLTURA BIOLOGICA SOPRAVVIVERÀ SENZA RAME?

Il rame è il primo anticrittogamico utilizzato in viticoltura e, insieme allo zolfo, rappresenta il pilastro portante della viticoltura biologica poiché il suo utilizzo, nella lotta alla peronospora, non induce resistenze da parte del patogeno (Marco and Stall, 1983; Martin et al., 2004). Questa molecola favorisce inoltre la maturazione dei tralci, ha una buona persistenza sulla vegetazione e presenta un'attività secondaria contro altre malattie quali marciume nero, escoriosi e botrite (Cha and Cooksey, 1991). Proprio per queste sue caratteristiche è ampiamente utilizzato in viticoltura da oltre 150 anni. Il rame è però un metallo pesante che a differenza degli agrofarmaci di sintesi non degrada e si accumula sia nel frutto sia nel terreno dove inibisce lo sviluppo di microrganismi (Delusa et al., 1996; Brun et al., 2003; Van Xwieten et al., 2004; Van Rhee, 1967; Vršič et al., 2011). A causa dei ripetuti trattamenti questo composto si accumula nel terreno sia per effetto deriva, sia in autunno con la caduta delle foglie a terra e, se presente in eccesso, risulta tossico per la vite (Dumestre et al., 1993). Il rame nel terreno può essere classificato in rame totale (forme solubili e insolubili), frazione assimilabile (frazione idrosolubile, forme assimilabili e chelate), rame mobile (forme solubili). Le tre forme di rame si accumulano per l'80% nei primi 40 cm di terreno, inducendo in molti casi sintomi di tossicità nelle piante e modificando la microfauna e la microflora presente mediante una riduzione dei lombrichi e l'inattivazione di importanti batteri quali *Azotobacter*, *Clostridium*, *Nitrosomas* e *Nitrobacter*, tutti responsabili della fissazione dell'azoto (Brun et al., 2001; Moolenaar et al., 1998; Chaignon et al., 2003). Questo metallo inoltre, inibendo l'enzima deidrogenasi, provoca l'acidificazione del terreno e conseguentemente una diminuzione dell'attività biologica. Se la concentrazione normale di rame presente sulla crosta terrestre si aggira intorno a 70 mg/kg, in un vigneto possiamo raggiungere anche i 1000 mg/kg a causa del suo accumulo (Fernandez-Calvino et al., 2008). Per quanto riguarda invece la salute umana questo microelemento è già presente nel nostro corpo in quanto necessario alla formazione dell'emoglobina ma a concentrazioni troppo alte viene espulso attraverso i reni. Risulta irritante per le vie respiratorie e può provocare ustioni all'apparato digerente (Oliver, 1997; Uriu-Adams and Keen, 2005). Diventa quindi indispensabile dosarlo correttamente, per

evitare effetti deleteri non solo per l'ambiente ma anche per la salute dei consumatori (Stern et al., 2017). La presenza di alte concentrazioni di rame nei mosti, inoltre, ha delle ripercussioni notevoli sulla qualità del vino: la sua presenza può influenzare significativamente la cinetica di fermentazione dei lieviti di *S. cerevisiae*; aumentare notevolmente l'azione dell'ossigeno e la velocità delle reazioni di ossidazione influenzando i titoli aromatici nelle uve e nei vini come nel caso del Sauvignon blanc (John, 2003).

Recentemente sono stati sottoposti a screening contro la peronospora oltre cento trattamenti diversi, tra cui agenti di biocontrollo, materiali di origine animale, preparati omeopatici, materiali inorganici, estratti microbici, derivati naturali, estratti vegetali, metodi fisici e materiali sintetici (Kast, 2000; Tilcher et al., 2003; Schilder et al., 1996; Thüerlrg et al., 2003; Pellegrini et al., 2010; Slvčev et al., 2010). Nessuno di questi trattamenti si è dimostrato efficace quanto il rame contro questa ampelopatia. Il rame, fungicida di contatto ad ampio spettro, perde la sua efficacia con l'espansione del tessuto vegetale e per effetto del dilavamento causato dalla pioggia, ciò rende necessarie frequenti irrorazioni per limitare la presenza delle principali malattie fungine. In condizioni meteorologiche favorevoli al patogeno, ossia in presenza di un'elevata pressione della malattia, in agricoltura biologica, risultano necessari ripetuti trattamenti in archi temporali molto ristretti. Sarà difficile, probabilmente impossibile, garantire gli standard produttivi attuali alle nostre coltivazioni di *Vitis Vinifera* e voler nel contempo ridurre in modo sostanziale gli apporti di rame.

La ricerca sta concentrando le proprie risorse nell'individuazione di soluzioni innovative e sostenibili allo scopo di garantire un futuro certo e lungimirante all'agricoltura biologica (Vecchione, 2005). L'argomento di più attualità tra i banchi dell'Unione europea risulta essere l'impiego delle varietà resistenti ai principali patogeni (peronospora, oidio) che potrebbero rappresentare una svolta epocale per tutta la viticoltura mondiale riuscendo a ridurre gli apporti di pesticidi fino al 70-80%.

#### VARIETÀ RESISTENTI, SOLUZIONE DISPONIBILE AGLI AGRICOLTORI

Nonostante i costi elevatissimi e i tempi lunghi richiesti dai programmi di miglioramento genetico, i Vivai Cooperativi Rauscedo sono fermamente convinti che la strada intrapresa sia la più concreta e sicura per fare della viticoltura mondiale una coltura più rispettosa dell'ambiente e meno dipendente dall'uso massiccio di fitofarmaci. Oggi il buon uso della genetica ci può



Fig. 1 *Creazione di nuove varietà resistenti: fase di demascolazione dei fiori in vigneto*

permettere di raggiungere nuovi traguardi, migliorando l'inestimabile valore derivante dalle varietà di vite oggi coltivate al mondo.

Già nel 2006, i Vivai Cooperativi Rauscedo avevano percepito la necessità di dare risposte concrete alle emergenti necessità in tema di sostenibilità vivaistico-viticola e per tale motivo hanno dato corso a una proficua collaborazione con l'Università di Udine e l'Istituto di Genomica Applicata con l'obiettivo di mettere a disposizione dei viticoltori nuove varietà a uva da vino resistenti alle malattie (fig. 1). Le prime dieci varietà italiane resistenti, di cui VCR è licenziatario esclusivo, sono state realizzate grazie a un'attività di ricerca iniziata nel 1998 dall'Università di Udine, incrociando le migliori linee resistenti con vitigni internazionali e locali di pregio (Sauvignon, Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Sangiovese, Tocai Friulano ecc.). L'ultima tappa di questo progetto ha riguardato la valutazione agronomica ed enologica dei nuovi vitigni resistenti a cui ha attivamente partecipato VCR e ha consentito l'iscrizione al Catalogo Nazionale nel 2015 di Fleurtaï, Soreli, Sauvignon Kretos, Sauvignon Nepis, Sauvignon Rytos, Mertot Kanthus, Merlot Khorus, Cabernet Volos, Cabernet Eidos, Julius e la successiva loro diffusione in Italia e all'estero. Nel 2019 saranno presentate per la registrazione nuove varietà ottenute da incroci di Pinot bianco e Pinot nero con diversi e più efficienti donatori di resistenza. I vini ottenuti da queste varietà resistenti sono stati presentati da VCR ai diversi concorsi internazionali dove sono stati premiati, collocandosi ai vertici della classifica, con medaglie d'oro e d'argento.

Nel 2015 VCR ha avviato anche un proprio programma di incrocio allo scopo di ottenere nuove varietà resistenti a uva da vino, da tavola e portinesti. Un'attenzione particolare è stata riservata alle varietà autoctone e ai loro cloni, che rappresentano il punto di forza della viticoltura Italiana e che, con l'introggressione di geni di resistenza alla peronospora e all'oidio, potrebbero veramente rappresentare un'opportunità unica per i viticoltori. In sostanza, per VCR, questi nuovi vitigni sono delle "Varietà Autoctone Migliorate" in quanto l'obiettivo è di coniugare nel loro DNA tradizione e innovazione: vini con un profilo aromatico e polifenolico (per i rossi) di qualità e tipicità comparabile, se non superiore, a quello del genitore di *V. vinifera*. Nel prossimo futuro nel mercato saranno quindi disponibili varietà resistenti derivanti da Glera, Nebbiolo, Sangiovese, Cannonao, Trebbiano Romagnolo e Toscano, Malvasia Istriana, Riesling Bianco, Chardonnay, Pinot grigio, Syrah ecc.

#### GESTIONE DELLE VARIETÀ RESISTENTI IN CAMPO

Capire il concetto della resistenza e i relativi meccanismi di azione è molto importante per poter gestire al meglio questa specificità, che è propria solo dei nuovi vitigni resistenti e poter così predisporre un piano di difesa ad hoc. Le sorgenti della resistenza alle malattie crittogamiche sono riscontrabili nelle specie di *Vitis* selvatiche, nella fattispecie quelle americane e asiatiche, oltre che in alcune varietà di *V. vinifera* dell'Asia Centrale (Cipriani et al., 2018). Oggi sono conosciuti circa 30 QTL (Quantitative Trait Locus) responsabili della resistenza a peronospora e oidio e altri ancora sono in corso di studio e saranno presto individuati (Di Gaspero and Cattonaro, 2010). L'obiettivo è quello di piramidare 2-3 geni di resistenza rispettivamente per peronospora e oidio in ognuna delle nuove varietà resistenti selezionate. Ottenere vitigni con resistenza poligenica è importante per escludere qualsiasi rischio, anche se remoto, di superamento della resistenza, che potremmo riscontrare in vitigni con resistenza monogenica. La presenza di più barriere genetiche da superare complica, infatti, i tentativi della peronospora e dell'oidio di infettare le viti assicurando così una alta resistenza a queste crittogame in modo permanente.

Per le varietà resistenti ad oggi autorizzate alla coltivazione si consigliano, in funzione dell'ambiente e del microclima presente, da 2 a 4 trattamenti da effettuare seguendo i modelli previsionali per l'identificazione dei periodi di maggior rischio infettivo (fig. 2). Questi trattamenti precauzionali sono indispensabili per scongiurare la comparsa di forme ipervirulente e per proteggere la coltura da malattie secondarie (escoriosi, black rot, antracnosi), normalmente control-

	Malattia	Trattamento*	Protezione black rot		
			Vigneto senza sintomi	Vigneto con alcuni sintomi	Vigneto con molti sintomi
2-5 FOGLIE	-Escoriosi -Oidio	Zolfo	coincide con la strategia di difesa contro peronospora ed/o oidio	dalla maturità dei periteci, prima di un episodio piovoso contaminante, intervenire con 300 g di rame metallo e 6 kg di zolfo bagnabile / ha	
7-10 GIORNI DOPO**	-Escoriosi	Zolfo		ripetere il trattamento prima della prossima pioggia, non superare i 10 giorni di intervallo	
PREFIORITURA O POSTFIORITURA	-Peronospora -Oidio	Zolfo, Rame		passare a 600 g di rame metallo e 8 kg di zolfo bagnabile / ha	
ACCRESCIMENTO ACINI**	-Peronospora -Oidio	Zolfo, Rame, Bicarbonato di K <sup>1</sup>		300 g di rame metallo e 6 kg di zolfo bagnabile / ha	
DOPO LA CHIUSURA DEL GRAPPOLO**	-Peronospora -Oidio	Zolfo, Rame, Bicarbonato di K <sup>1</sup>		coincide con la strategia di difesa contro peronospora ed/o oidio	300 g di rame metallo e 6 kg di zolfo bagnabile / ha - ultimo trattamento prima della completa invaiatura

Fig. 2. Possibile strategia di difesa biologica delle varietà resistenti per il contenimento delle principali malattie crittogamiche.

\* Il trattamento, in condizioni di elevata pressione infettiva, deve essere svolto alla dose massima di etichetta.

\*\* Ripetere i trattamenti nel caso di alta pressione della malattia.

<sup>1</sup> Azione su botrite ed oidio (attenzione in periodi di forti precipitazioni a causa della facile dilavabilità)

late dai medesimi principi attivi utilizzati per il controllo della peronospora e oidio. È necessario precisare che le malattie secondarie compaiono anche sulle varietà tradizionali in totale assenza di protezione fitosanitaria.

#### CONCETTO DI Pianta RESISTENTE O TOLLERANTE E PRINCIPI DELL'INTERAZIONE Pianta-PATOGENO

Le piante possiedono due diverse modalità di difesa: a) difese passive o costitutive, ossia barriere strutturali e chimiche precostituite che hanno effetto di esclusione per la maggior parte dei patogeni; b) difese attive o inducibili, in grado di individuare cellule o molecole estranee innescando una risposta rapida di difesa. Le difese si distinguono inoltre in strutturali e chimiche. Le difese passive strutturali comprendono i tessuti e le strutture cellulari che si frappongono fisicamente al patogeno, mentre le difese attive strutturali includono tutte le neo-apposizioni di materiale di varia natura (callosio, lignina, minerali), dirette a rafforzare le barriere strutturali precostituite. Le difese chimiche passive sono caratterizzate da composti ad attività antibiotica costitutivamente prodotti e presenti (fitoanticipine, proteine di difesa) nei tessuti dell'ospite, a differenza dei composti sintetizzati *ex novo*, quali le fitoalessine, e facenti parte delle difese chimiche attive. Qualsiasi forma di difesa attiva viene stimolata solo a seguito del riconoscimento del patogeno da parte della pianta ospite; nel caso in cui tale risposta sia in grado di bloccare il patogeno, l'interazione viene definita omologa incompatibile (Hutcheson, 1998), quando invece la pianta si ammala si parla di interazione omologa compatibile.

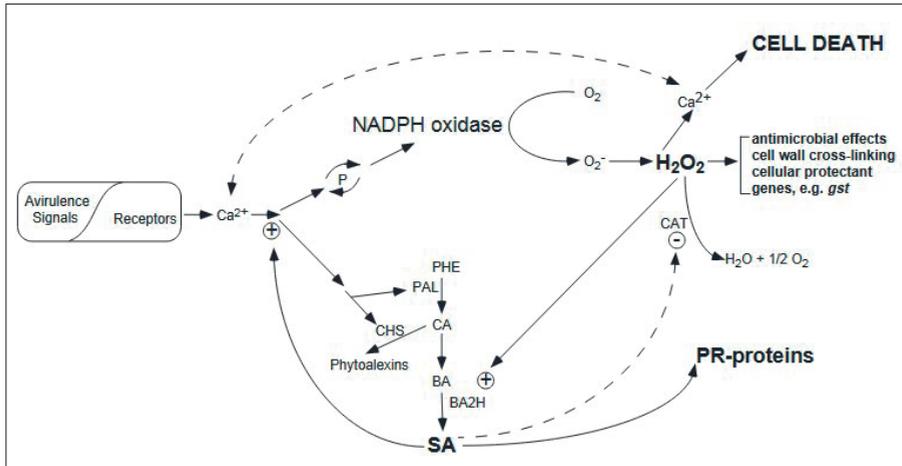


Fig. 3 *Networks di segnalazione nella risposta di ipersensibilità (da Lamb & Dixon, 1997)*

Nodo cruciale dell'interazione pianta-patogeno è rappresentato dalla fase di riconoscimento che determinerà, nel caso avvenga tempestivamente, l'instaurarsi di un'interazione omologa incompatibile oppure al contrario, un'interazione omologa compatibile contraddistinta da una risposta ritardata nel tempo che porterà quindi all'incapacità dell'ospite nell'attuare velocemente tutto il potenziale di cui dispone (Lusso & Kuc, 1999).

Le piante possono mettere in atto 3 classi di risposte attive di difesa: primarie, secondarie e terziarie. La risposta primaria denominata HR ("hypersensitive reaction") è localizzata nelle cellule a contatto con il patogeno e si manifesta mediante necrosi localizzata dei tessuti adiacenti l'area di infezione (fig. 3). Le risposte secondarie avvengono nelle cellule limitrofe a quelle interessate dalle risposte primarie e sono indotte da segnali generati da queste ultime ("local acquired resistance", LAR). Le molecole segnale sono principalmente forme reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RONs), tali composti fungono anche da elicitori per la morte cellulare programmata. Conseguentemente all'attivazione delle prime due forme di difesa si verifica un accumulo di acido salicilico che, diffondendo nei vari organi funge da segnale di attivazione per la resistenza sistemica acquisita ("systemic acquired resistance", SAR). Infine, in seguito a interazioni tra pianta e batteri non patogeni colonizzatori delle radici o tra pianta e insetti fitofagi si genera una risposta assimilabile a SAR denominata resistenza sistemica indotta ("Induced Systemic Resistance", ISR) e mediata principalmente da acido jasmonico (JA) ed etilene (ET). Le piante possono dunque attivare diverse vie di difesa in funzione al tipo di patogeno presente (Garcia et al., 2006).

La produzione di acido jasmonico e di etilene viene prevalentemente stimolata da agenti necrotrofici mentre quella dell'acido salicilico da patogeni biotrofici. L'attivazione di queste diverse vie metaboliche di difesa è vincolata al riconoscimento da parte della pianta di specifici composti denominati elicitori (Hammond-Kosack et al., 2000). Inizialmente il termine elicitore veniva utilizzato solamente per descrivere molecole in grado di indurre la produzione di fitolessine ad oggi comprende tutti quei composti in grado di stimolare una qualsiasi forma di difesa in pianta (Ebel et al., 1994; Hahn et al., 1996; Nüernberger et al., 1999). Nel corso degli anni sono state caratterizzate diverse classi di elicitori includendo carboidrati, polimeri (come ad esempio i chitosani, polimeri del N-acetil-glucosammina), lipidi, glicopeptidi e glicoproteine. Questi composti possono derivare sia dal patogeno (elicitori esogeni) sia dalla pianta stessa (elicitori endogeni).

Nonostante siano molteplici gli organismi che entrano in contatto con le piante, nella maggior parte dei casi quest'ultime risultano resistenti alle malattie proprio perché non fungono da ospite alla stragrande maggioranza dei patogeni presenti in natura. Questa interazione, in patologia vegetale, viene definita Resistenza non ospite o immunità (Agrios, 2005). Le ragioni che rendono le piante non ospiti verso la maggior parte degli organismi od ospiti verso altri non sono ancora del tutto chiare. Sebbene una pianta risulti essere ospite a un particolare patogeno, alcune varietà al suo interno possono risultare più o meno suscettibili mentre altre più o meno resistenti. Questo dipende dal tipo e dal numero di geni di resistenza presenti nelle piante, dalle condizioni ambientali e da altri fattori biotici e abiotici. Nella quasi totalità dei casi alcune varietà risultano resistenti a determinati organismi proprio perché possiedono specifici geni di resistenza (R) in grado di riconoscere i fattori di avirulenza rilasciati dal patogeno (avr) (Agrios, 2005). In patologia vegetale si parla di *true resistance* ossia di resistenza reale quando la malattia è controllata geneticamente dalla presenza, nell'ospite, di uno o più geni di resistenza; si parla invece di tolleranza quando le piante, grazie a determinate caratteristiche ereditabili e a causa della perdita/inattivazione dei siti recettori, consentono al patogeno di svilupparsi e moltiplicarsi al loro interno senza subire particolare danno o perdite produttive (Agrios, 2005).

## CONCLUSIONI

Il successo nella produzione di uva e vino, soprattutto nei comparti biologici/biodinamici, richiede la considerazione del vigneto come un ecosistema

equilibrato in cui la flora e la fauna circostanti contribuiscono a mantenere l'equilibrio verso la crescita e la produttività della vite, mantenendo al contempo i parassiti, le malattie e le infestanti al livello più basso possibile. L'implementazione di pratiche e condizioni culturali in grado di migliorare il microclima della chioma e la presenza di popolazioni di insetti/microrganismi benefici è essenziale al raggiungimento di questo scopo. Tuttavia, l'uso di pesticidi a base di rame rimane indispensabile in presenza di alta pressione di malattia, rendendo l'accumulo di rame nei terreni una limitazione costante per la produzione di vino biologico, specialmente in areali molto umidi. Studi volti a migliorare la filiera vitivinicola biologica saranno di cruciale importanza per il futuro prossimo di questo settore. Le soluzioni future sono rappresentate dall'impiego delle varietà resistenti e dall'utilizzo di prodotti alternativi a basso impatto ambientale nella lotta alle crittogame; condizioni che potrebbero realmente favorire una viticoltura puramente ecosostenibile.

#### RIASSUNTO

La sostenibilità delle produzioni vitivinicole è, ad oggi, il tema di principale interesse dell'opinione pubblica mondiale e di tutti gli operatori della filiera. La viticoltura, sebbene rappresenti solamente il 3 % della superficie agricola europea, utilizza il 65% di tutti i fungicidi impiegati in agricoltura, ovvero 68 mila tonnellate/anno. Uno scenario preoccupante che ha spinto la Commissione europea a emanare regole sempre più restrittive con l'obiettivo di dimezzare l'uso dei presidi sanitari entro il 2025. La riduzione dell'impiego di composti rameici in agricoltura, la revoca di numerosi principi attivi, la stipula di disciplinari di polizia rurale sempre più limitanti unitamente alle problematiche connesse al cambiamento climatico rendono dunque incerto il futuro della nostra viticoltura. In quest'ottica, una delle risposte più concrete a disposizione dei nostri viticoltori è rappresentata dall'impiego delle varietà resistenti a peronospora e oidio. Già nel 2006, i Vivai Cooperativi Rauscedo avevano percepito la necessità di dare risposte tangibili alle emergenti necessità in tema di sostenibilità vivaistico-viticola e per tale motivo hanno dato corso a una proficua collaborazione con l'Università di Udine e l'Istituto di Genomica Applicata con l'obiettivo di mettere a disposizione dei viticoltori nuove varietà a uva da vino resistenti alle malattie (peronospora e oidio). I vitigni resistenti sono ottenuti mediante incroci interspecifici tra varietà sensibili di *Vitis Vinifera* e una selezione che porta i caratteri di resistenza, che deriva da 50, a volte 100, anni di reincrocio su vite europea di ibridi fatti alla fine dell'Ottocento e nei primi decenni del Novecento usando viti americane e/o asiatiche. Mediante l'utilizzo di queste varietà è possibile ridurre di circa l'80% i trattamenti fitosanitari, limitare gli sprechi d'acqua, evitare inutili fenomeni di compattazione del suolo e abbattere i costi di produzione. Tutto ciò, come dimostrato dalle analisi e dalle degustazioni svolte, senza compromettere la qualità, la salubrità e le caratteristiche del vino ottenuto che per l'appunto risulta molto gradito dal consumatore finale. L'impiego di queste varietà, soprattutto nell'ambito dell'agricoltura biologica, può

rappresentare una concreta soluzione/opzione nel rispetto dei limiti imposti a livello comunitario sull'impiego del rame.

#### ABSTRACT

The issues of sustainability of wine production are the object of increasing attention by the public opinion and the operators of the vine&wine supply chain worldwide. Although viticulture represents only 3% of Europe's agricultural land, it uses 65% of the total amount of fungicides used in agriculture, that is 68,000 tons per year. This worrying scenario has got the European Community to enact increasingly restrictive rules in order to halving the use of plant protection products within the 2025. The reduction of cupric compounds use in agriculture, the numerous active substances revocation, the increasing restrictions imposed by the new rural police regulations together with climate change consequence, make the future of viticulture uncertain. With this in mind, one of the most concrete responses available to our vine-growers is the use of resistant varieties to downy and powdery mildew. In 2006 the Vivai Cooperativi Rauscedo (VCR) felt the need to give concrete answers to the emerging requirements in terms of nursery-viticultural sustainability. For this reason, they started a fruitful collaboration with the University of Udine and the Institute of Applied Genomics with the aim of providing vine-growers with new wine grape varieties resistant to the most dangerous fungal diseases. Resistant varieties are obtained through interspecific crossbreeding between sensitive *Vitis Vinifera* varieties and a selection of other varieties that bear the resistance characters, deriving from 50, sometimes 100, years of backcrossing of European grape with hybrids created at the end of the nineteenth century and in the first decades of the twentieth century using American and/or Asian vines. Using these varieties is possible to reduce plant protection treatments by about 80%, to limit water waste, to avoid soil compaction and, obviously, to reduce production costs. All this, as demonstrated by the analyses and tastings carried out, without compromising the quality, the health and wine characteristics obtained, is precisely what the end consumer appreciates. The use of these varieties, especially in organic farming, can be a concrete solution in accordance with the limits of copper use imposed at EU level.

#### BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS G.N. (2005): *Plant Pathology*, Burlington, Massachusetts, Elsevier Academic Press Publications.
- BRUN L. A., MAILLET J., HINSINGER P. & PEPIN M. (2001): *Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils*, «Environmental Pollution», 111, pp. 293-302.
- BRUN L.A., LE CORFF J. & MAILLET J. (2003): *Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species*, «Environmental Pollution», 122, pp. 361-368.
- CHA J.S, COOKSEY D.A. (1991): *Copper resistance in Pseudomonas syringae mediated by periplasmic and outer membrane proteins*, «Proc. Natl. Acad. Sci.», 88, pp. 8915-8919.
- CHAIGNON V., SANCHEZ-NEIRA I., HERRMANN P., 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, pp. 229-238.
- CIPRIANI G., FORIA S., MONTE C., TESTOLIN R., DI GASPERO G. (2018): *Pyramidizing resistance genes in grape: a breeding program for the selection of 'elite' cultivars*, XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics, Bordeaux, France, July 15-20, pp. 43.
- DELUISA A., GIANDON P., AICHNER M., BORTOLAMI P., BRUNA L., LUPETTI A., NARDELLI F. & STRINGARI G. (1996): *Copper pollution in Italian vineyard soils*, «Communications in Soil Science and Plant Analysis», 27, pp. 1537-1548.
- DI GASPERO G. & CATTONARO F. (2010): *Application of genomics to grapevine improvement*, «Australian Journal of Grape and Wine Research», 16, pp. 122-130.
- DUMESTRE A., SAUVE S., MCBRIDE M., BAVEYE P., BERTHELIN J. (1993): *Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils*, «Arch Environ Contam Toxicol», 36, pp. 124-131.
- EBEL J. & COSIO E.G. (1994): *Elicitors of plant defense responses*, «International Review of Cytology», 148, pp. 1-36.
- FERNANDEZ-CALVIÑO D., RODRIGUEZ-SUAREZ J.A., LOPEZ-PERIAGO E., ARIAS-ESTEVEZ M., & SIMAL-GANDARA J. (2008): *Copper content of soils and river sediments in a wine-growing area, and its distribution among soil or sediment components*, «Geoderma», 145, pp. 91-97.
- GARCIA-BRUGGER A., LAMOTTE O., VANDELLE E., BOURQUE S., LECOURIEUX D., POINSOT B., WENDEHENNE D., PUGIN A. (2006): *Early signaling events induced by elicitors of plant defenses*, «Plant-Microbe interactions», 19 (7), pp. 711-724.
- HAHN M.G. (1996): *Microbial elicitors and their receptors in plants*, «Annual review of Phytopathology», 34, pp. 387-412.
- HAMMOND-KOSACK K.E. & JONES J.D.G. (2000): *Response to plant pathogens*, in Buchanan B., Gruissen W., Jones R. (ed), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, USA, pp. 1102-1156.
- HUTCHESON S.W. (1998): *Current concepts of active defense in plants*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 59-90.
- JOHN C. D. (2003): *Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of Iron and Copper*, «American Journal of enology and viticulture», 54, pp. 73-85.
- KAST W.K. (2000): *Salicylic and Phosphorous acid – possible alternative to copper?*, Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein-und Obstbau- Weinsberg, Proceedings 6th International Congress of Organic Viticulture, Basel, 2000, Willer, H. and Meier, U. (eds). Sol & ifoam & fibl, pp. 177-179.
- LAMB C., DIXON R.A. (1997): *The oxidative burst in plant disease resistance*, «Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology», 48, pp. 251-275.
- LUSO M., KUC J. (1999): *Plant responses to pathogens*, in Lerner H (ed), *Plant responses to environmental stresses from phytohormones to genome reorganization*, pp. 683-706.
- MARCO G.M. & STALL R.E. (1983): *Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria that differ in sensitivity to copper*, «Plant Dis», 67, pp. 779-781.
- MARTIN H., HAMILTON V., KOPITTKER R. (2004): *Copper tolerance in Australian populations of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria contributes to poor field control of bacterial spot of pepper*, «Plant Disease», 88, pp. 921-924.
- MATASCI C.L., GOBBIN L., SCHÄRER H.J., TAMM L., GESSLER C. (2008): *Selection for*

- fungicide resistance throughout a growing season in populations of Plasmopara viticola*, «European Journal of Plant Pathology», 120, pp. 79-83.
- MOOLENAAR S.W. & BELTRAMI P. (1998): *Heavy metal balances of an Italian soil as affected by sewage sludge and Bordeaux mixture applications*, «Journal of Environmental Quality», 27, pp. 828-835.
- NÜRNBERGER T. (1999): *Signal perception in plant pathogen defense*, «Cellular and Molecular Life Sciences», 55, pp. 167-182.
- OLIVER M.A. (1997): *Soil and human health: a review*, «European Journal of Soil Science», 48 (4), pp. 573-592.
- PELLEGRINI A., PRODORUTTI D., FRIZZI A., GESSLER C., PERTOT I. (2010): *Development and evaluation of a warning model for the optimal use of copper in organic viticulture*, «Journal of Plant Pathology», 92 (1), pp. 43-55.
- SCHILDER A.M.C., GILLET J.M., SYSAK R.W., WISE J.C. (1996): *Evaluation of environmentally friendly products for control of fungal diseases of grapes*, online, <http://www.infodienst-mlr.bwl.de/la/lvwo/ecofruvit/friendlyproducts33.pdf>.
- SIVČEV B.V., SIVČEV I.L., RANKOVIĆ-VASIĆ Z.Z. (2010): *Plant protection products in organic grapevine growing*, «Journal of Agricultural Sciences», 55, pp. 103-122.
- THÜERIG B., BINDER A., BOLLER T., GUYER U., JIMÉ-NEZ S., RENTSCH C., TAMM L. (2006): *An aqueous extract of the dry mycelium of Penicillium chrysogenum induces resistance in several crops under controlled and field conditions*, «European Journal of Plant Pathology», 114, pp. 185-197.
- TILCHER R., SCHMIDT C., LORENZ D., WOLF G.A. (2003): *About the use of antagonistic bacteria and fungi*, Forschungsanstalt Geisenheim/ Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft/ Institut für Pflanzenpathologie der Georg-August- Universität, online, <http://www.infodienst-mlr.bwl.de/la/lvwo/ecofruvit/antagonist29.pdf>.
- URIU-ADAMS J.Y., KEEN C.L. (2005): *Copper, oxidative stress, and human health*, «Molecular aspects of Medicine», 26 (4-5), pp. 268-298.
- VAN RHEE J. A. (1967): *Development of earthworm populations in orchard soils*, in O. Graff, J. Satchell (Editors), *Progress in Soil Biology*, North Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 360-371.
- VAN ZWIETEN M., STOVOLD G., VAN ZWIETEN I. (2004): *Literature Review and Inventory of Alternatives to Copper for Disease Control in the Australian Organic Industry*, A report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Project DAN-208°, Wollongbar N.S.W., pp. 101.
- VECCHIONE A. (2005): *Research and development of new strategies for copper replacement or reduction in organic viticulture*, Tesi di dottorato presso l'Università degli studi di Udine.
- VRŠIČ S., IVANČIČ A., PULKO B., AND VALDHUBER J. (2011): *Effect of soil management systems on erosion and nutrition loss in vineyards on steep slopes*, «Journal of Environmental Biology», 32, pp. 289-294.