

Effect of treatment with products based on *Trichoderma* spp. on the development capacity of Sangiovese vines under replanting conditions.

Mauro E. M. D'Arcangelo*, Rita Perria, Alessandra Zombardo, Sergio Puccioni, Paolo Valentini, Paolo Storchi.

CREA Centro di ricerca Viticoltura ed Enologia, Viale Santa Margherita - 52100 Arezzo, Italy

Abstract: The research work carried out aimed at verifying the efficacy of *Trichoderma*-based products on the fertility maintenance in vineyard soils, in case of replanting. The presence of a hypofertile horizon, in fact, can cause problems in the engrafting of rooted cuttings and a slowing down in their vegetative development. The trial was carried out at the experimental farm of CREA - Research Center for Viticulture and Enology of Arezzo, during the setting up of a new Sangiovese vineyard. Rooted grafts treated with three different formulations containing some *Trichoderma* spp. strains were planted, considering an untreated negative control. In addition, treatments with the same formulations were repeated in the 2014-2016 three-year period, by spraying the soil, with an injector pole. Every year the shoot length and the pruning wood weight were evaluated, as well as the presence/absence of *Trichoderma* spp. on the root systems. Moreover, in 2016 the photosynthetic efficiency of the vines was verified. The presence of *Trichoderma* spp. within the rhizosphere of the vines treated was stable over time; the differences found between treated and untreated thesis were considerable, while only minor differences emerged among the plants subjected to the three different treatments. According to the results obtained, the application of *Trichoderma*-based products can be considered a valid practice to be used during vineyard implantation in case of difficult edaphic conditions.

1 Introduzione

Il reimpianto a breve intervallo dei vigneti, soprattutto in suoli con orizzonti ipofertili, mal strutturati, caratterizzati da scarso contenuto in sostanza organica e limitata attività biologica, risulta spesso quanto mai problematico. In queste condizioni uno scarso attecchimento delle barbatelle e soprattutto un rallentamento nella crescita vegetativa sono aspetti spesso evidenziati, in particolare a seguito di una intempestiva preparazione del terreno e più in generale di un mancato ripristino della fertilità [1].

Tali fenomeni vengono indicati, genericamente, sotto il termine di “stanchezza del terreno” [2] e sono riconducibili ad una semplificazione nella composizione microbiologica, con prevalenza di organismi che agendo in vario modo producono un effetto deprimente sullo sviluppo della coltura. Spesso si riscontrano in questi suoli alte concentrazioni di sostanze allelopatiche [3] prodotte e accumulate nel tempo ad opera degli

apparati radicali dei portinnesti del vigneto precedente, associate, spesso, a complessi fungini causa di marciumi (*Armillaria*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Rosellinia*) [4] e del mal dell'Esca [5].

In occasione del reimpianto di un vigneto è stata impostata una sperimentazione per verificare l'efficacia dell'azione di tre diversi formulati a base di *Trichoderma* spp. [6], [7], [8] sullo sviluppo vegetativo della vite in relazione alla capacità di tale fungo di svolgere azione di biocontrollo nei confronti di agenti patogeni presenti nel terreno [9], [10].

Lo scopo del lavoro è stato, in questa prima fase, di valutare gli effetti di tali formulati sull'accrescimento delle piante, nella consapevolezza che fornire alle viti un ambiente di sviluppo favorevole [11], preservando gli apparati radicali delle giovani barbatelle attraverso la creazione di una barriera microbiologica in fase d'impianto [12] sia il presupposto per un buon attecchimento [13] ed in ultima analisi per una viticoltura di qualità.

* Corresponding author: mauro.darcangelo@crea.gov.it

2 Materiali e metodi

2.1 Il Vigneto

La sperimentazione si è svolta presso l'azienda del CREA-VE sita in Arezzo (Italy, 43°28'29" N, 11°49'28" E), in un nuovo vigneto realizzato con Sangiovese innestato su 1103P, con sesti d'impianto di m 2,80 x 0,80. La formazione pedologica ove è situato il vigneto è riconducibile ad argille sabbiose fluviali profonde (Pleistocene superiore) con pH 6,3-6,6 e capacità di scambio cationico tra 27 e 18 meq/100g, rispettivamente per gli orizzonti Ap e Bc.

L'impianto è stato effettuato nella primavera del 2013 ed i rilievi sulle piante sono stati effettuati nel quadriennio successivo.

In fase d'impianto non è stata eseguita una concimazione di fondo e si è proceduto, invece, negli anni ad una concimazione di allevamento localizzata, utilizzando un fertilizzante complesso con titolo 12-12-17 nella quantità di 60 g/pianta per ogni anno.

L'impianto del vigneto è stato eseguito a macchina con barbatelle il cui apparato radicale era stato tagliato ad una lunghezza di 7-8 cm.

Le barbatelle, prima dell'impianto, sono state tenute ventiquattro ore a bagno con una soluzione in cui erano presenti i diversi formulati a base di *Trichoderma*, nelle concentrazioni riportate nella Tabella 1. Le piante delle singole tesi, costituite da ventiquattro barbatelle per blocco (per uno schema sperimentale a blocchi con 4 ripetizioni) sono state, al momento della messa a dimora, "inzaffardate" con prodotto tal quale sulle radici. Negli anni della sperimentazione le radici delle viti di ogni tesi sono state ulteriormente trattate, *in situ*, attraverso l'uso di pali iniettori con una soluzione la cui composizione, in termini di p.a. e CFU (Colony Forming Unit) apportate, è risultata analoga a quella utilizzata in fase pre-impianto, utilizzando circa 0,6 l/pianta.

Tabella 1: Tesi, p. a. e dosi impiegate nella sperimentazione.

Tesi	p.a.	A.I. dose CFU/ml
T1	<i>T. atroviride</i>	4×10^7
T2	<i>T. harzianum</i> e <i>T. viride</i>	1×10^6
T3	<i>T. harzianum</i> e funghi endomicorrizici (gen. <i>Glomus</i>) e batteri della rizosfera	4×10^7
TEST	-	-

2.2 Rilievi

Nel vigneto oggetto della prova è presente una stazione meteorologica automatica (Pessl Instruments, Austria), attraverso la quale sono state rilevate piogge e temperature (Figg. 1-2).

Negli anni della sperimentazione sono stati registrati, in fase di potatura invernale, i pesi e le lunghezze dei

tralci delle diverse tesi (la misurazione delle lunghezze dei tralci è stata effettuata nei primi due anni).

I dati ottenuti sono stati poi sottoposti all'analisi statistica della varianza e al Test Duncan.

Al termine della prova sono state svolte ulteriori misurazioni al fine di valutare l'efficienza fotosintetica delle piante sottoposte ai diversi trattamenti, impiegando il fluorimetro Handy PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments).

Sono state rilevate, nella prima decade di agosto, le grandezze relative a: F_0 (Fluorescenza basale) capace di indicare l'eventuale perdita di efficienza nel trasferimento di energia; F_m (Fluorescenza massima) che indica la capacità massima a ricevere impulsi di luce saturante; F_v (Fluorescenza variabile) che fornisce una misura dell'efficienza quantica del Fotosistema II. Sono stati poi calcolati i rapporti F_v/F_0 e F_v/F_m , particolarmente utili per valutare l'attività fotochimica del sistema. Il parametro calcolato dal rapporto F_v/F_m esprime la probabilità che ha un elettrone di raggiungere il centro di reazione riducendo l'accettore primario. Questo valore varia da 0 a 1 e valori ridotti indicano che siamo in presenza di foto-inibizione. Al termine è stato calcolato il P.I. (Performance Index) per ogni tesi. Le misurazioni sono state fatte in tre parti diverse dei germogli (basso, medio e alto) su foglie adulte.

La presenza di *Trichoderma spp.* è stata infine valutata attraverso il prelevamento di campioni di radici da tre barbatelle per ogni tesi. La metodica ha previsto un primo lavaggio dei campioni con acqua demineralizzata, per allontanare eventuali residui di terra e la successiva coltivazione su piastra con terreno selettivo [14] per la determinazione della presenza/assenza (TSM) di *Trichoderma spp.* sugli apparati radicali.

3 Risultati

L'andamento meteorologico negli anni della prova è schematizzato nelle Figure 1 e 2.

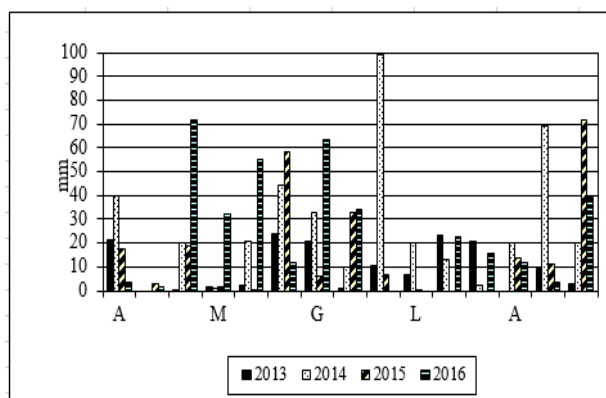


Fig. 1: Grafico delle precipitazioni mensili nel periodo di accrescimento vegetativo, rilevate nel quadriennio 2013-16.

I giorni di pioggia rilevati per ogni anno dal primo aprile al 31 agosto sono stati 55 nel 2013, 46 nel 2014, 37 nel 2015 e 49 nell'ultima annata. I millimetri di pioggia del periodo considerato per gli stessi anni sono

stati rispettivamente 145, 432, 242 e 366. Le piogge si sono concentrate, come di norma, nel periodo aprile-maggio (Fig. 1).

Relativamente all'andamento termico, nell'anno 2015 si sono registrate le temperature più basse del quadriennio, in aprile, e le più alte (fino a 35 °C) in Luglio e Agosto (Fig. 2).

Per quanto riguarda gli aspetti vegeto-produttivi, in Tabella 2 sono riportati i pesi del legno asportato con la potatura invernale nelle diverse annate. Risulta evidente il maggiore peso rilevato per i diversi trattamenti, in particolare per T1 e T3, in confronto al testimone.

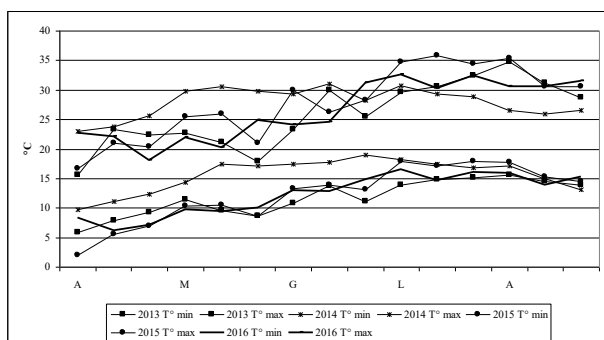


Fig. 2: Grafico delle Temperature massime e minime (medie decadali in °C nel periodo di accrescimento vegetativo), rilevate nel quadriennio 2013-16.

Tabella 2: Pesi (Kg) del legno di potatura per tesi in ogni anno.

Tesi	Anno	Media	Dev. St.
T1	2013	0,4533	0,0461
	2014	0,6466	0,0416
	2015	2,0966	0,4367
	2016	2,1010	0,4626
T2	2013	0,3266	0,0901
	2014	0,5266	0,1474
	2015	2,2240	0,8434
	2016	1,3133	0,5169
T3	2013	0,2666	0,0808
	2014	0,5533	0,0611
	2015	2,2400	0,7054
	2016	2,2300	0,7502
TEST	2013	0,1200	0,0400
	2014	0,2666	0,1514
	2015	1,3133	0,6197
	2016	0,9833	0,4903

*R quadrato = 0,830 (R quadrato corretto = 0,750)

Tabella 3: Test Duncan^{a,b} relativo alle differenze del peso del legno di potatura tra tesi.

Tesi	N	Sottoinsieme	
		1	2
TEST	24	0,671	
T2	24		1,102
T1	24		1,323
T3	24		1,325
Sig.	Totale	1,000	0,253

a Media armonica = 12 b Alfa = 0,05

Anche la misurazione delle lunghezze dei tralci (Tabella 4) ha evidenziato, nel secondo anno di rilievo, differenze significative tra le tesi trattate e il non trattato.

In tutti i casi alla fine del secondo anno è stato possibile impostare la forma di allevamento a controspalliera e potatura a cordone speronato posizionato ad un'altezza di 75 cm.

Tabella 4: Numero dei tralci e loro lunghezze medie (cm) rilevate nel biennio 2013-14.

Tesi	2013		2014	
	N.	Lunghezze	N.	Lunghezze
T1	21 a	41,5 a	75 a	86,1 a
T2	18 a	40,3 a	90 a	92,2 a
T3	26 a	41,1 a	86 a	90,7 a
TEST	16 a	42,7 a	58 a	69,7 b

(*) Per colonne le medie con le stesse lettere per il test Duncan non sono tra loro significativamente diverse per P = 0,05.

I parametri ottenuti dalle misure fluorimetriche (Tab. 5) evidenziano come la Tesi T3 si discosta dalle altre significativamente ed in particolare per il valore di **F_o** che risulta il più basso registrato: questo indica come in tale tesi l'efficienza nel trasferire i fotoni catturati dai pigmenti antenna ai centri di reazione sia migliore rispetto alle altre; la dotazione di clorofilla e la ridotta influenza degli stress ambientali viene definita dal parametro **F_m** (Fluorescenza massima), nella tesi T3 questo valore è statisticamente differente e più alto rispetto alle altre tesi, ad indicare un ridotto livello di stress; anche nel caso di **F_v** la tesi T3 presenta un valore che indica una buona attività del PSII, con la minima dissipazione di energia sottoforma di calore; pure il rapporto **F_v/F_o** (efficienza della reazione di fotolisi dell'acqua) risulta statisticamente superiore rispetto agli altri; il parametro calcolato dal rapporto **F_v/F_m** esprime la migliore efficienza nella tesi T3, avvicinandosi più delle altre a valori ottimali; per finire, anche il valore assunto dal **Performance index**, pur non significativo, mostra un valore superiore. Tale termine multiparametrico tiene conto dell'efficienza delle tre fasi funzionali di assorbimenti dei fotoni, della capacità di trattenere l'energia di attivazione e della conversione di tale energia in trasporto di elettroni.

Tabella 5: Dati fluorimetrici rilevati al quarto anno d'impianto sulle diverse tesi.

Var.	Sig	T1	T2	T3	TEST
F ₀	*	637a	629a	573b	597ab
F _m	*	2393ab	2356a	2553b	2302a
F _v	**	1756a	1727a	1979b	1705a
F _v /F ₀	**	2,8 a	2,8 a	3,4 b	2,9 a
F _v /F _m	**	0,731 a	0,733 a	0,775 b	0,740 a
P.I.	n.s.	1,19	1,08	1,51	1,26

(*) Per righe le medie con le stesse lettere per il test Duncan non sono tra loro significativamente diverse per $P = 0,05$.

La capacità di colonizzare le radici da parte del *Trichoderma* è stata infine valutata ponendo, su terreno selettivo (TSM) [14] [15], spezzoni prelevati nell'ultimo anno della prova dalle diverse tesi. Tutte le tesi trattate hanno mostrato crescita di micelio abbondante, senza differenze significative (dati non riportati).

4 Considerazioni e conclusioni

La prova impostata al fine di verificare l'effetto sull'impianto del vigneto di alcuni prodotti microbiologici a base di *Trichoderma* ha fornito risultati positivi sul versante della capacità di attecchimento e accrescimento delle barbatelle in una condizione di reimpianto ravvicinato. I pesi del legno delle tesi trattate risultano superiori e significativamente diversi rispetto a quelli della tesi non trattata. Tale differenza si manifesta per tutti gli anni, mentre dall'analisi statistica si evince altresì che non esistono differenze significative relative all'interazione tra tesi ed anno. In altri termini i diversi andamenti climatici registrati nel quadriennio hanno avuto pari influenza sullo sviluppo della vite sia per le tesi trattate che per la non trattata. Considerando il numero dei tralci e le loro lunghezze si può osservare come per i primi non esitano differenze significative tra le tesi trattate ed il non trattato nel 2013, mentre nel secondo anno le lunghezze dei tralci della tesi non trattata risulta significativamente diversa e più bassa rispetto a quelle sottoposte a trattamento.

I dati fluorimetrici confortano i buoni risultati ottenuti dalla tesi T3 anche sul versante dei pesi del legno di potatura. Non è da escludere, in questa manifesta superiorità della tesi T3, anche l'effetto di altri gruppi di funghi endomicorrizici [16] e batteri della rizosfera presenti nel formulato, di cui però non si è sondato il reale ed eventuale effetto sullo sviluppo della vite. Tale ultima ipotesi può trovare una giustificazione nel fatto che su tutti i campioni di radice prelevati dalle tesi trattate è stata riscontrata la presenza di *Trichoderma spp.*

Le fasi preliminari all'impianto di un vigneto sono fondamentali nel determinare l'entrata in produzione e la longevità dello stesso.

Garantire ottimali condizioni per lo sviluppo della coltura, sino dai primi anni, ha risvolti economici non secondari. In condizioni difficili come quelle che generalmente si riscontrano nei reimpianti è quindi necessario porre particolare attenzione al rischio di "stanchezza" del suolo. Una certa mitigazione degli effetti negativi di tale condizione, soprattutto se di natura fungina, può essere ottenuta attraverso l'uso di prodotti

microbiologici a base di *Trichoderma spp.*, che non solo pongono le giovani piante con l'apparato radicale all'interno di una cortina sanitaria [17] ma permettono, attraverso l'azione di competizione verso gli altri funghi [18], condizioni edafiche idonee ad un regolare accrescimento della vite.

Bibliografia

1. L.M. Manici, M.L. Saccà, F. Caputo, A. Zanzotto, M. Gardiman, G. Fila, *Applied Soil Ecology* **119**: 214-225 (2017).
2. F. Zucconi, *Declino del suolo e stanchezza del terreno (Soil decline an soil sickness)* (Ed. Pitagora, Bologna, 292, 2003)
3. F. Zucconi, *Acta Horticulturae*, **324**, 11-21 (1993).
4. M. Fregoni, *Viticultura di Qualità* (Ed. Informatore Agrario, 357-359, 1998)
5. L. Mugnai, G. Surico, A. Esposito, *Informatore Fitopatologico*, **46**, 49-55 (1996)
6. F. Savazzini, C.M. Oliveira Longa, I. Pertot, *SBB*: 1457-1465 (2009)
7. C.R. Howell, *Plant Dis.* **87**, 4-10 (2003).
8. M.R. Asef, E.M. Ebrahim Mohammadi Goltapeh, Y.R. Danesh, *Journal of Plant Protection Research* **48** (2), 213-222 (2008).
9. P.H. Fourie, F. Halleen, J. Van der Vyver, W. Schreuder, *Phytopathologia Mediterranea*, **40**(3), 473-478 (2001)
10. I. Pertot, D. Prodorutti, A. Colombini, L. Pasini, *BioControl* **61**, 257-267 (2016)
11. S. Di Marco, F. Osti, *La lotta contro il mal dell'esca in vivaio*. In "Il Mal dell'Esca della Vite. Interventi di ricerca e sperimentazione per il contenimento della malattia". Progetto MesVit: 456-463 (2010).
12. S. Di Marco, F. Osti, *Phytopathologia Mediterranea* **46**, 73-83 (2007).
13. A.G. Turmina, A.P.F. Lima, S.C. Uber, L. Rufato, A.R. Rufato, A.F. Fagherazzi, *Acta Horticulturae* **1157**, 423-428 (2017)
14. E.G. Kuhlman, F.J.R. Hendrix, *Phytopathological notes* **52**, 1310-1312 (1962).
15. D.J. Askew, M.D. Laing, *Plant Pathology* **42**, 686-690 (1993)
16. I. Tsvetkov, T. Dzhambova, V. Kondakova, R. Batchvarova, *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **20**(4), 849-855 (2014).
17. S. Di Marco, F. Osti, A. Cesari, *Phytopathologia Mediterranea* **43**, 1008-1015 (2004)
18. C. Cordier, C. Alabouvette, *Journal of Soil Biology* **45**, 267-274 (2009)