

Università degli Studi di Napoli Federico II



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base
Area Didattica di Scienze Matematiche, Fisiche, Naturali
Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

in
ECOLOGIA

Effetti della biostimolazione sulla fotosintesi di
***Vitis vinifera* L.: risvolti ecologici**

Effects of biostimulation on photosynthesis of
***Vitis vinifera* L.: ecological implications**

RELATORE

Prof.ssa Carmen Arena

CANDIDATO

Giuseppe De Luise

Matr: N88/4925

CORRELATORE

Dott.ssa Ermenegilda Vitale

Anno accademico 2017-2018

INDICE

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1 Ripercussioni ecologiche della Rivoluzione verde ed agricoltura sostenibile

1.2 Viticoltura in Irpinia

1.2.1 Caratteristiche del territorio

1.2.2 Importanza economica ed ecologica del settore vinicolo

1.3 Protezione della vite dalle malattie crittogamiche

1.3.1 Principali fitopatologie fungine

1.3.2 Strategie di prevenzione

1.3.3 Impiego di fungicidi e relativo impatto ambientale

1.4 Uso di biostimolanti e implicazioni ecologiche

1.4.1 Definizione, tipologie e vantaggi

1.4.2 Utilizzo di biostimolanti in viticoltura sostenibile

1.5 Effetto dei biostimolanti sulla crescita e sulla fotosintesi

CAPITOLO 2. OBIETTIVO DELLA TESI

CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI

3.1 La specie studiata

3.1.1 La cultivar Aglianico

3.2 Sito di studio

3.3 Disegno sperimentale e trattamenti

3.4 Analisi di monitoraggio

3.4.1 Misure di emissione di fluorescenza della clorofilla a

3.4.2 Determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici

3.4.3 Determinazione delle caratteristiche fogliari funzionali

3.4.4 Determinazione dei polifenoli in acini d'uva

3.5 Analisi statistica

CAPITOLO 4. RISULTATI

4.1 Effetto dell'applicazione di fitostimolante sulla fotosintesi e sui

pigmenti fotosintetici nelle diverse fasi fenologiche della vite

**4.2 Influenza dell'applicazione di fitostimolante sulle
caratteristiche fogliari funzionali nelle diverse fasi fenologiche
della vite**

**4.3 Effetto dei diversi trattamenti sul contenuto di polifenoli totali
nei frutti**

CAPITOLO 5. DISCUSSIONE

CAPITOLO 6. CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1 Ripercussioni ecologiche della Rivoluzione verde ed agricoltura sostenibile

L'agricoltura moderna, di tipo intensiva, ha avuto origine in concomitanza con l'intenso progresso tecnologico del XX secolo. Questo fenomeno, noto come "Rivoluzione verde", con la diffusione di sostanze e tecniche innovative, ha garantito un aumento quantitativo della produzione agricola, soddisfacendo il fabbisogno alimentare di una popolazione mondiale crescente, a discapito delle potenzialità a lungo termine degli agroecosistemi (Tilman *et al.*, 2002; Cropper *et al.*, 1994).

Tra gli anni '60 e l'inizio del XXI secolo, la popolazione umana mondiale è raddoppiata fino a raggiungere i 6 miliardi di individui e si stima che, entro il 2050, raggiungerà i 9,6 miliardi (Cohen *et al.*, 2003; Gerland *et al.*, 2014).

Questo incremento demografico comporterà un aumento della richiesta alimentare, per cui si prospetta un'ulteriore intensificazione della produzione agricola con potenziali ripercussioni a livello ambientale (Tilman *et al.*, 2011).

Infatti, la domanda di prodotti agricoli dovrà essere soddisfatta sfruttando nuove zone rurali ed intensificando le terre già destinate ad uso agricolo.

Notevoli implicazioni ecologiche a livello globale risultano però già connesse all'agricoltura. La biodiversità, ad esempio, risulta continuamente minacciata dai processi di alterazione del territorio atti a incrementare le terre adibite alla coltivazione, come la frammentazione degli habitat o la deforestazione (Dirzo *et al.*, 2003). Circa un quarto delle emissioni globali di gas serra è dovuto alla meccanizzazione del lavoro agricolo e a processi di fertilizzazione (Burney *et al.*, 2010). Inoltre, lo stesso uso di fertilizzanti ha conseguenze dannose sia su ecosistemi acquatici che terrestri (Vitousek *et al.*, 1997).

Un fattore che incide negativamente sulla resa degli agroecosistemi è la presenza di organismi nocivi (insetti ed erbe infestanti, funghi e batteri patogeni). È stato infatti stimato che la perdita potenziale globale dovuta a questi organismi, relativa

ad esempio alla coltivazione di grano, può raggiungere un valore pari addirittura al 50% (Oerke *et al.*, 2006)

Per sopperire a queste perdite, all'indomani della "Rivoluzione verde" è stata intensificata l'applicazione di energia sussidiaria al sistema agricolo sotto forma di fertilizzanti e pesticidi, che hanno garantito, a livello mondiale, l'incremento della produzione agricola, in particolar modo nei paesi industrializzati (Ruttan *et al.*, 1999).

Tuttavia, i benefici ottenuti da queste sostanze hanno tuttora notevoli costi ambientali. Basti pensare che l'inquinamento chimico, dovuto a fertilizzanti e pesticidi, provoca danni all'ecosfera pari a 100 miliardi di dollari l'anno (Pimentel *et al.*, 1996), dovuti a fenomeni quali:

- l'eutrofizzazione dei corpi idrici, come conseguenza del dilavamento dall'agroecosistema di fertilizzanti inorganici a base di fosforo, azoto e potassio che instaurano una catena di eventi che culmina con la degradazione dell'ecosistema acquatico (Bhardwaj *et al.*, 2014);
- la perdita di biodiversità e l'allontanamento di specie utili all'ecosistema, come i pronubi (Kremen *et al.*, 2002);
- la selezione, all'interno di popolazioni nocive, di genotipi resistenti a pesticidi, che riducono la resa produttiva dell'agroecosistema (Brattsten *et al.*, 1986);
- la contaminazione delle falde acquifere e del suolo, da cui scaturiscono eventi di intossicazione umana, animale, edafica e vegetale (Dinham *et al.*, 1993).

Presa visione di queste pericolose ripercussioni, nei primi anni '80 iniziarono a diffondersi in ambiente scientifico le prime basi teoriche per delineare un'agricoltura alternativa, che prendesse in considerazione le capacità rigenerative degli ecosistemi e le relazioni ecologiche naturali (Hardwood, 1990). Mentre l'agricoltura convenzionale è guidata principalmente dalla massima produttività e dal profitto, l'agricoltura ecocompatibile integra in una visione olistica le scienze biologiche, chimiche, fisiche, ecologiche, economiche e sociali in modo tale da sviluppare nuove pratiche agricole a minimo impatto ambientale ma che garantiscano un certo introito economico (Lichtfouse *et al.*, 2009).

Con l'avvento delle problematiche ambientali globali, è diventata sempre più impellente la necessità di adottare sistemi di produzione agricola più sostenibili, che non vadano a compromettere le risorse che dovranno essere utilizzate dalle generazioni successive. L'agricoltura sostenibile, infatti, si concentra sulla produzione agricola relativa ad un lungo arco temporale, proiettandosi verso il futuro, così da agire con rimedi preventivi sulle possibili conseguenze a lungo termine (Hardwood, 1990).

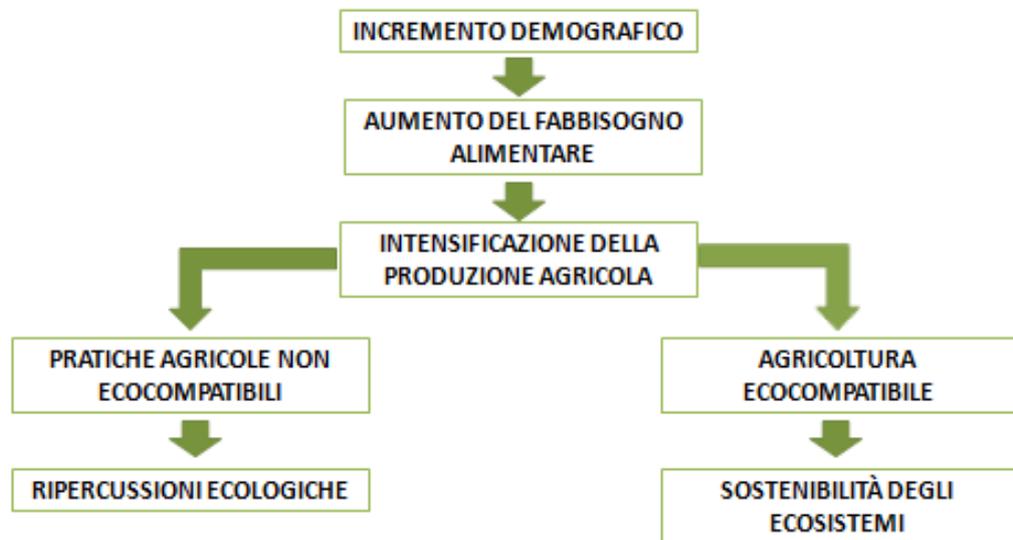


Figura 2: Schema che illustra le implicazioni derivanti dai diversi approcci di gestione dell'agroecosistema, in seguito all'incremento di popolazione.

La necessaria transizione al modello di sostenibilità si fa particolarmente evidente nell'ambito nelle produzioni locali del Mezzogiorno, che fanno della salubrità del territorio un elemento fondamentale per garantire la tipicità dei prodotti agricoli. Lo stato di buona salute dell'ambiente, infatti, fa sì che si instauri un corretta simbiosi fra la zona di produzione e le coltivazioni tipiche del territorio, contribuendo a preservare la biodiversità agricola dei prodotti vinicoli DOC e DOCG (Devecchi *et al.*, 2016; Scarpato *et al.*, 2012).

1.2 Viticoltura in Irpinia

Nel 1879 **Valagara** scrisse: ”Guardando i fertili poggi, le colline dai dolci e verdi pendii, onde è disseminato il territorio della provincia di Avellino, [...] guardando i ridenti vigneti, di cui codesti colli sono dovunque rallegrati, studiando la giacitura, l'altitudine, l'indole del terreno e il clima, ci sentiamo spinti ad esclamare: qui Bacco può avere il suo regno”.

Infatti, in Irpinia, l'equilibrio che si instaura tra la vite e i fattori che ne garantiscono un'ottima produzione, come l'orografia, il clima e il suolo, è tale da sostenere un'eccellente attività di viticoltura.

1.2.1 Caratteristiche del territorio

L'Irpinia è una regione storica dell'Italia meridionale il cui nome deriva da una tribù del popolo Sannita che per prima vi si insediò, gli Irpini. Dal 1860 coincide con l'intero territorio della provincia di Avellino, corrispondente all'area che confina a nord con il *Sannio beneventano*, a est con la *Daunia* e il *Vulture*, a sud con i *monti Picentini* del *Salernitano* e ad ovest con il *Nolano* e l'*Agro nocerino sarnese*.

L'identità della regione è sancita da un paesaggio eterogeneo, costituito da montagne, colline, valli e altipiani. Tale orografia disomogenea determina la formazione di *microclimi* e *terroirs*, variabili da zona a zona, che consentono una viticoltura altrettanto eterogenea con la produzione di differenti vini di gran pregio.

Il clima è uno degli elementi che condizionano maggiormente le annate viticole. L'Irpinia è esposta a inverni freddi e umidi ed estati calde, con forti escursioni termiche tra il giorno e la notte, che si verificano soprattutto in collina. Proprio l'escursione termica giornaliera e stagionale è determinante nella produzione di una buona concentrazione di sostanze aromatiche nelle bacche, che garantiscono vini con intense caratteristiche organolettiche (Iacono *et al.*, 2015).

Un altro fattore estremamente importante è la qualità del suolo. La fertilità della regione è dovuta alla deposizione di materiali vulcanici risalente ad una potente eruzione del Vesuvio avvenuta circa 4000 anni fa (Sulpizio *et al.*, 2010). Per cui l'Irpinia è caratterizzata da un suolo ricco di micronutrienti minerali, che spesso rappresentano fattori limitanti la crescita della vite. Inoltre, grazie alla tessitura del suolo d'origine vulcanica, i danni operati dalla diffusione della fillossera (*Daktulosphaira vitifoliae* F.) nel XIX secolo furono limitati e ciò consentì di evitare l'espanto e la sostituzione dei vecchi vigneti con varietà non autoctone (Costantini *et al.*, 2005).

La predisposizione della regione irpina alla coltivazione della vite era già nota al tempo dei romani che vi producevano i famosi "*vini degli imperatori*". Gli eredi attuali di questi vini hanno conservato un'eccellente qualità così come un'elevata eterogeneità, garantita dalle diverse combinazioni di fattori che agiscono sul territorio plasmando un'area che dispone di un'offerta estremamente variegata di vini. Infatti, le caratteristiche dei vini sono strettamente correlate al territorio o, meglio, al *terroir* che testimonia l'origine di quelle "sfumature", tipiche dei vitigni irpini, che rendono un vino unico ed irripetibile (Aquino *et al.*, 2008).

Attualmente l'Irpinia è un territorio di interesse mondiale per la vitivinicoltura, caratterizzata da una produzione di pregio che s'identifica in tre DOCG: Taurasi, Greco di Tufo e Fiano di Avellino (Figura 1).

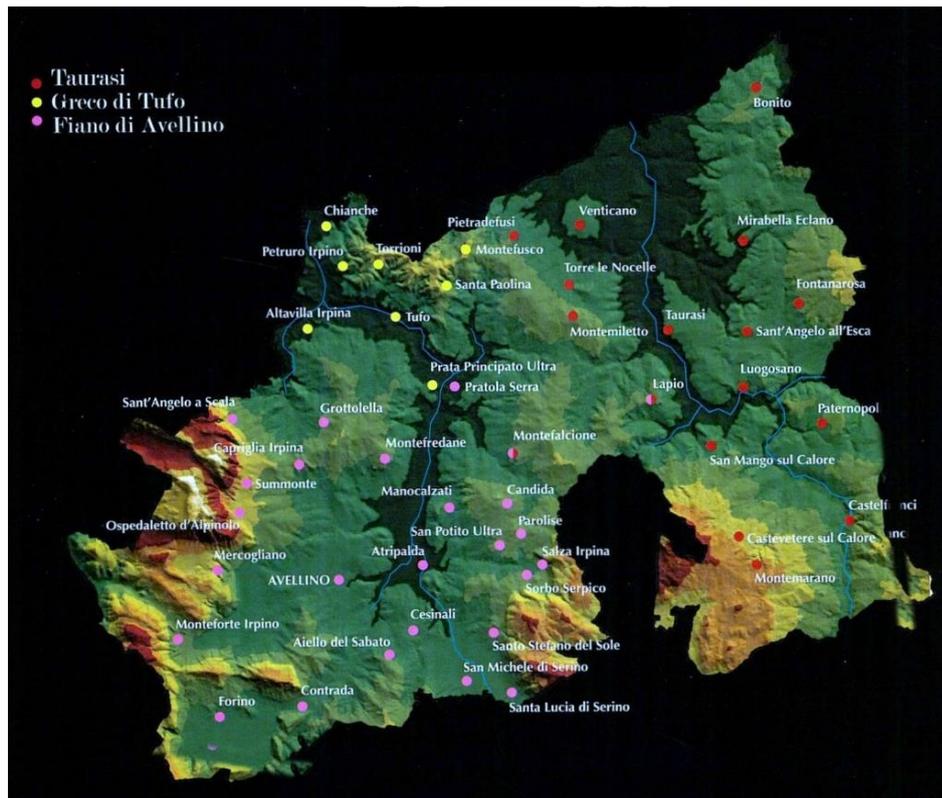


Figura 1: Mappa dei vini irpini DOCG (www.vinotaurasi.it).

Il **Taurasi DOCG (1993)** si ottiene dalla vinificazione delle uve di cultivar Aglianico. Le origini di questo vitigno a bacca rossa sono molto antiche, risalgono probabilmente alla *Vitis hellenica*, introdotta dalla Tessaglia durante la colonizzazione greca della Campania, tra il VI e il VII secolo a.C. Viene prodotto in 17 comuni irpini.

Il **Greco di Tufo DOCG (2003)**, anch'esso di origine greca, si ottiene dalla cultivar Greco, la quale deriverebbe dal vitigno *Aminea gemina* a bacca bianca. Oggi è prodotto in 8 comuni della provincia di Avellino.

Il **Fiano di Avellino DOCG (2003)**, il cui vitigno a bacca bianca (Fiano) viene fatto risalire alla *Vitis apiana*, probabilmente importata dai fenici. Prodotto in 26 comuni.

Accanto ai privilegiati vini DOCG, l'Irpinia vanta la denominazione Irpinia DOC, riconosciuta nel 2005, che corrisponde ad altre 19 tipologie di vini.

1.2.2 Importanza economica ed ecologica del settore vinicolo

L'intensificazione della produzione agricola all'indomani della *Rivoluzione verde*, in contemporanea con il processo di globalizzazione, che non solo ha contribuito alla trasformazione del settore agricolo ma ne ha anche modificato i processi di lavorazione e commercializzazione dei prodotti alimentari, hanno portato ad un inevitabile abbassamento dei margini di profitto dei piccoli agricoltori, che hanno visto i prezzi dei propri raccolti calare a causa di un'offerta estremamente alta (Robinson *et al.*, 2018). Di conseguenza i sistemi agricoli tradizionali sono scemati nel tempo, poiché non sono riusciti a sostenere la competizione con le multinazionali del settore, che minacciano le produzioni di qualità del Mezzogiorno, identificate in numerosi marchi DOCG, DOC, DOP e IGP (Lucchi, 2008).

I vini dell'Irpinia sono dei veri e propri veicoli di valorizzazione del territorio a livello mondiale. Nel panorama regionale, in effetti, sono proprio le aree delle province di Avellino e di Benevento quelle con maggiore vocazione viticola di qualità e con maggiori capacità organizzative per affrontare il mercato e per competere con altri produttori nazionali ed internazionali (Misso *et al.*, 2013).

Il punto di forza dell'economia viticola irpina è rappresentato proprio dall'eterogeneità del territorio (*terroir*), in quanto risulta essere un indicatore della qualità dei prodotti vinicoli percepita dai consumatori (Tempesta *et al.*, 2010).

Di conseguenza la sostenibilità del settore della viticoltura e il relativo progresso economico risiedono in una gestione adeguata del sistema viticolo e del territorio stesso. Le tecniche e le strategie impiegate in questo approccio gestionale hanno un duplice obiettivo:

- 1) il miglioramento delle potenzialità dei vitigni, in modo tale da garantire un'elevata produttività;
- 2) la conservazione delle caratteristiche territoriali, che si traduce nell'attuazione di pratiche viticole sostenibili e, viceversa, nella riduzione delle attività ad elevato impatto ambientale.

Infatti, a disegnare il panorama della vitivinicoltura mondiale, non vi sono solo quelle che potremmo definire le ‘questioni di mercato’. Problematiche di ordine sociale, ambientale e territoriale chiamano il settore vitivinicolo a confrontarsi con sfide globali quali, ad esempio, i cambiamenti climatici, la perdita di biodiversità e, in generale, il mantenimento del benessere dei territori di riferimento (Bernetti *et al.*, 2012; Bruggisser *et al.*, 2010; Novara *et al.*, 2011). Inoltre, una delle ragioni dell’interesse, da parte dei viticoltori, verso la problematica della sostenibilità è la crescente attitudine dei consumatori ad applicare scelte che implicano considerazioni ambientali ed ecocompatibili (Sellers *et al.*, 2016).

Tra le problematiche ambientali correlate alla viticoltura è particolarmente diffuso l’impiego di alcuni composti chimici, non compatibili con la sostenibilità dell’agroecosistema, al fine di prevenire fitopatologie fungine che possono compromettere la produttività dei vigneti e, quindi, l’introito economico del settore.

1.3 Protezione della vite dalle malattie crittogamiche

1.3.1 Principali fitopatologie fungine

Una delle principali fitopatologie che interessano la viticoltura, oltre all’*oidio*, è la peronospora. La suscettibilità a queste malattie è largamente condivisa da tutte le cultivar di *V. vinifera* L., tuttavia alcune di queste, come *Aglianico* e *Fiano*, mostrano una maggior tolleranza verso le suddette parassitosi fungine (Sivcev *et al.*, 2010).

La Peronospora è una malattia causata da *Plasmopara Viticola*, microrganismo appartenente alla classe degli oomiceti, originario dell’America e importato accidentalmente in Francia verso la fine del XIX secolo, da cui si è poi diffuso in tutta Europa.

Il sintomo più comune della malattia è la comparsa di zone clorotiche sulla pagina superiore della foglia, chiamate *macchie ad olio*, le quali corrispondono alle

porzioni invase dalle ife che con i loro austori sottraggono sostanze alle cellule (Sebela *et al.*, 2012). In condizioni di elevata umidità ed alta temperatura, sulla pagina abassiale, in corrispondenza di queste macchie, si può osservare la formazione di muffa biancastra costituita dalle strutture riproduttive del fungo. I danni alle foglie determinano una perdita di qualità delle uve, dovuta all'inibizione dell'attività della fase oscura della fotosintesi che causa una riduzione dell'accumulo di zuccheri ed aromi. Gli attacchi gravi determinano la caduta anticipata delle foglie (*filloptosi*).

A livello dei grappoli il contagio si manifesta con un disseccamento e un ripiegamento ad uncino della bacca, provocando un calo quantitativo del raccolto. Durante l'inverno le oospore, che raggiungono la maturità in autunno, rimangono dormienti e la loro germinazione in primavera è influenzata principalmente dalle condizioni di temperatura e dalle precipitazioni (Morando *et al.*, 1984).

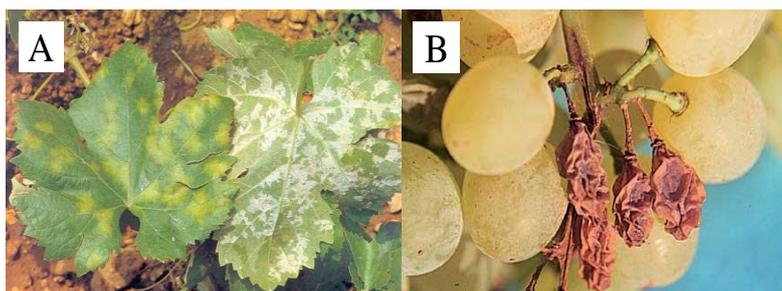


Figura. 2: Sintomi di infezione da *Plasmopara viticola*: **A)** A sinistra il peculiare sintomo delle *macchie ad olio*, sulla pagina superiore della foglia; a destra, sulla pagina abassiale, le strutture riproduttive del fungo formano delle caratteristiche macchie bianche; **B)** Bacche colpite dal fungo.

1.3.2 Strategie di prevenzione

Al fine di prevenire i danni di queste infezioni, che si ripercuotono sulla quantità e la qualità di biomassa prodotta, si mettono in atto diverse strategie, spesso applicate contemporaneamente su uno stesso vitigno in maniera integrata. I mezzi di lotta a disposizione possono essere:

- *genetici*, consistono nella scelta di portainnesti e varietà meno suscettibili agli attacchi fungini (Faretra *et al.*, 1991);

- *pratiche agricole*, come la corretta localizzazione del vigneto, in termini di esposizione e altitudine, o l'idonea gestione dell'acqua e della fertilità del suolo per garantire il corretto sviluppo della pianta e dei naturali meccanismi di protezione (Meynard *et al.*, 2003);
- *controllo biologico* attraverso organismi che predano parassiti, come funghi o artropodi (Núñez-Trujillo *et al.*, 2012; Angeli, 2007);
- *impiego di composti chimici* di origine naturale o di sintesi, per i quali è necessaria un'adeguata valutazione delle ripercussioni sull'ambiente, sulla coltura e sugli altri organismi viventi.

1.3.3 Impiego di fungicidi e relativo impatto ambientale

Nell'ambito dei fungicidi chimici, la vite gioca un ruolo fondamentale. Infatti, a fronte del 3% di superficie agricola in Europa, nei vigneti viene sfruttato il 65% di tutti i fungicidi impiegati in agricoltura (Serra *et al.*, 2015).

Per antonomasia i fungicidi utilizzati in viticoltura contro la *peronospora* e l'*oidio* sono rispettivamente a base di rame e zolfo. La lotta chimica contro questi due funghi patogeni adotta principi attivi completamente miscibili tra di loro, in modo tale da ottenere un unico formulato di copertura che previene da entrambe le malattie, come la combinazione di ossicloruro di rame e di zolfo.

Ossicloruro di rame:

Si tratta di combinazioni idrate di ossido rameico e cloruro, la cui formula bruta è $[\text{ClCu}_2(\text{OH})_3]$.

Il rame è un elemento dotato di azione anticrittogamica e in viticoltura vanta una lunga tradizione nel controllo delle infezioni di peronospora.

L'efficacia di tutti i fungicidi cuprici risiede negli ioni rame Cu^{2+} che, liberati in acqua, penetrano nella parete chitinosa e nella membrana delle cellule fungine (Pertot *et al.*, 2007). Il meccanismo d'azione multisito, in grado di inibire processi respiratori, biosintesi delle proteine e attività di membrana, costituisce una solida garanzia contro il pericolo di selezione di ceppi resistenti, che invece rappresenta una costante minaccia per le sostanze attive ad azione sito specifica. (Zanzotto *et al.* 2012).

Tuttavia, il rame, quando è impiegato in quantità eccessive, può presentare alcuni effetti ecotossicologici che si possono manifestare a livello del suolo, della pianta, e degli altri organismi che popolano l'agroecosistema.

Il rame depositato sulle porzioni epigee della vite, in seguito all'azione dilavante delle piogge e alla caduta delle foglie in autunno, giunge al suolo. Qui l'elemento, essendo un metallo pesante, non subisce biodegradazione e il relativo grado di biodisponibilità dipende dalle condizioni del suolo, in particolare, dalla capacità di scambio cationico, dal pH e dal contenuto di materia organica.

A seconda del pH, rispettivamente a valori acidi o alcalini, i colloidi argillo-umici rilasciano o trattengono maggiormente i cationi, come lo ione Cu^{2+} . In condizioni di pH neutro o basico l'*uptake* da parte degli organismi si riduce, in quanto sono promosse le interazioni tra il rame e i colloidi, che bloccano e accumulano il metallo negli orizzonti superficiali del suolo (Chuan *et al.*, 1996).

Infatti, l'utilizzo a lungo termine di fungicidi cuprici ha portato all'accumulo di rame nei *topsoils* dei vigneti italiani, caratterizzati da suoli con valori di pH intorno alla neutralità (Deluisa *et al.*, 2007; Mackie *et al.*, 2012).

Come conseguenza di ciò, negli strati più superficiali del suolo si registra una diminuzione dell'attività biologica: le popolazioni di lumbricidi e di numerosi funghi e batteri decompositori vengono notevolmente compromesse a causa del suo effetto tossico, provocando un rallentamento del ciclo della materia (Helling *et al.*, 2000; Pertot, 2012).

In particolare, quando il rame si accumula in concentrazioni elevate, si rilevano danni alle popolazioni di artropodi utili, come gli impollinatori o gli acari fitoseidi, importanti antagonisti naturali di fitofagi (Nicòtina *et al.*, 2003).

A seconda di vari parametri, come condizioni climatiche, concentrazioni d'uso, stadio fenologico della pianta e sensibilità della varietà coltivata di vite, il rame può avere effetti fitotossici, dando luogo a difficoltà di crescita, clorosi, senescenza delle foglie e plasmolisi delle cellule delle radici. Nelle parti verdi della pianta il rame agisce a livello fotosintetico, limitando l'attività del fotosistema II e la biosintesi di clorofilla (Petit *et al.*, 2012). Nella vite il danno si manifesta soprattutto alle radici, che accumulano una quantità maggiore di rame rispetto a tralci e foglie (Juang *et al.*, 2012).

Sulla base di tali osservazioni l'Unione Europea ha emanato delle norme volte a limitarne l'uso come anticrittogamico. L'ultima, attualmente in vigore è il Reg. (CE) n. 889/2008 che ha stabilito un tetto massimo annuale di 6 kg di rame per ettaro. Inoltre, nel 2015, la Commissione Europea ha incluso i fitosanitari a base di rame tra le sostanze candidate alla sostituzione.

Zolfo bagnabile:

Lo zolfo rappresenta il fungicida più antico mai utilizzato, infatti, le sue proprietà anticrittogamiche erano già note agli antichi greci (Tweedy, 1981).

È stato impiegato contro l'oidio sin dalla seconda metà del XIX secolo e rappresenta ancor oggi il mezzo più economico ed utilizzato in viticoltura.

Al contrario del rame, il regolamento comunitario sull'agricoltura biologica N° 2092/91 non ha fissato alcun quantitativo massimo utilizzabile per lo zolfo, in quanto manifesta un impatto ambientale irrilevante (Provenzano *et al.*, 2006).

1.4 Uso di biostimolanti ed implicazioni ecologiche

Attualmente non esiste un trattamento più efficace del rame per il controllo delle infezioni di peronospora. Tuttavia, è stato dimostrato che formulati di varia natura, come estratti vegetali o idrolizzati proteici, possono agire su un organismo vegetale implementandone i processi fisiologici relativi alla resistenza verso patologie, all'efficienza di assorbimento di nutrienti o alla tolleranza verso fattori di stress. Formulati di questo tipo, che rientrano nella definizione di biostimolanti, sono candidati, non alla sostituzione dei fungicidi cuprici, quanto piuttosto ad un utilizzo integrato volto alla riduzione delle concentrazioni di rame applicate ai vigneti, in modo tale da limitarne gli effetti sull'ambiente e sugli organismi, assicurando uno strumento adoperabile in viticoltura ecocompatibile (Guitierrez-Gamboa *et al.*, 2018).

1.4.1 Definizione, tipologie e vantaggi

Delineare una definizione oggettiva di biostimolante può risultare complesso a causa della relativa eterogeneità. Ciò è dovuto sia al fatto che le fonti possono

essere diverse (composti biologici, inorganici, inoculati microbici) sia perché il principio attivo non è unico ma si trova all'interno di una miscela polifunzionale capace di mettere in atto diversi meccanismi d'azione, i cui risultati sono altrettanto variegati (Yakhin *et al.*, 2017).

L'industria di prodotti agricoli ha avuto un ruolo chiave nel definire e promuovere un concetto chiaro di biostimolante (BS).

Infatti, per tenere fronte alla necessità di delineare un profilo legale per il marketing e la regolazione di questi prodotti, compagnie del settore hanno fondato delle associazioni, come la EBIC (European BS Industry Council) in Europa e la BS Coalition negli USA che hanno dato luogo a simposi come il 'First World Congress on the Use of BS in Agriculture', il quale si tenne a Strasburgo nel 2012. La definizione di biostimolante proposta al congresso fu: "sostanza organica e/o microrganismo applicato ad una pianta o alla sua rizosfera al fine di migliorare l'uptake di nutrienti, stimolare la crescita, incrementare l'attività fotosintetica, potenziare la tolleranza allo stress e aumentare la resa dei tratti relativi alla coltivazione". Inoltre, fu specificato che i biostimolanti non si comportano da nutrienti e non hanno un'azione diretta contro le infestazioni, e quindi non ricadono nella definizione di fertilizzanti o pesticidi (EBIC, 2012; BS Coalition, 2012; Van Oosten *et al.*, 2017).

È opportuno sottolineare che l'effetto finale di una biostimolazione può essere influenzato dalla specie selezionata, dallo stadio di sviluppo della pianta, dalle condizioni ambientali (come temperatura e umidità), da dose, tempi e metodo di applicazione così come dalla tipologia e quindi dalla composizione chimica del biostimolante (Ertani *et al.*, 2016).

Le principali categorie di biostimolanti sono: estratti algali, estratti botanici, vitamine, idrolizzati proteici, acidi umici e fulvici, inoculati microbi.

Estratti algali: miscele algali fitostimolanti o composti purificati, che includono polisaccaridi come alginati, carragenani, laminarina e i loro prodotti di degradazione. Numerosi studi hanno rivelato un ampio range di effetti positivi sulla crescita delle piante, come germinazione precoce, incremento della produttività, resistenza verso fattori di stress biotico o abiotico.

Tra i meccanismi d'azione vi è la formazione di un gel di polisaccaridi ad elevata ritenzione idrica che contribuisce a garantire un corretto scambio cationico del suolo e un'elevata ritenzione idrica (Khan *et al.*, 2009; Craige *et al.*, 2011).

Estratti vegetali: si tratta di miscele di origine vegetale, costituite da un'ampia serie di composti bioattivi, come metaboliti secondari, vitamine ed enzimi, che agiscono in maniera sinergica fornendo alla pianta diversi effetti positivi, tra cui una maggior efficienza di *uptake* e di tolleranza agli stress (Bulgari *et al.*, 2015). Ad esempio, estratti di *Medicago sativa* possono stimolare la crescita di *Zea mays* in condizioni di eccessiva salinità (Ertani *et al.* 2013); stimolanti biologici a base di composti derivanti da *Salvia officinalis* e *Yucca schidigera*, sono in grado di implementare i meccanismi di autodifesa in *Vitis vinifera*, nei confronti della peronospora (Dagostin *et al.*, 2010 e 2011). Analogamente, estratti acquosi di *Moringa oleifera*, applicati sottoforma di spray su foglie di *Eruca vesicaria subsp. sativa*, possono incrementarne la crescita, tramite aumento del contenuto di pigmenti fotosintetici e di ormoni, come le auxine e le giberelline (Abdalla *et al.*, 2013).

Vitamine: giocano un ruolo importante nel processo di resistenza indotta, sia nei confronti di fattori di stress biotici che abiotici.

Agendo come co-fattori enzimatici, potenziano l'attività dei catalizzatori biologici, e per questo motivo sono tra i principali costituenti dei biostimolanti in commercio. Tra questi, in *V. vinifera* la tiamina (vitamina B1) e la riboflavina (Vitamina B2) stimolano le naturali difese della pianta nei confronti della peronospora, attraverso aumentata produzione di perossido d'idrogeno ed induzione dei geni che codificano per chitinasi e glucanasi con attività antifungina (Boubakri *et al.* 2012; 2013)

Idrolizzati proteici:

Gli idrolizzati proteici sono composti di polipeptidi e aminoacidi ottenuti dall'idrolisi parziale di sostanze di origine vegetale o animale, sebbene i formulati di origine animale siano meno efficienti (Colla *et al.*, 2015).

Tra gli effetti ascrivibili all'uso di idrolizzati proteici, vi sono la modulazione dell'*uptake* dell'azoto e la sua assimilazione, dovute ad un incremento dell'attività

di enzimi coinvolti nella riduzione assimilativa dei nitrati (Calvo *et al.*, 2014). È stata descritta l'azione chelante che possono avere alcuni aminoacidi (come la prolina) nei confronti di metalli pesanti, diminuendone la biodisponibilità a livello del suolo (du Jardin *et al.*, 2015).

Acidi umici e fulvici: comprendono numerosi composti eterogenei, capaci di formare colloidali supermolecolari a livello del suolo. È noto che le sostanze umiche, agendo sulle proprietà fisiche, chimiche e biologiche del suolo, ne aumentano la fertilità. Gli effetti sugli organismi vegetali riguardano principalmente il miglioramento dell'assorbimento radicale, attraverso l'incremento della capacità di scambio cationico (Canellas *et al.*, 2015).

Inoculati microbici:

Sono noti anche come biofertilizzanti, ovvero 'inoculi batterici e/o fungini applicati a piante con l'obbiettivo di incrementarne l'assorbimento di nutrienti, a prescindere dal contenuto nutritivo dell'inoculato (du Jardin *et al.*, 2015). Essi arricchiscono il suolo di micro- e macronutrienti attraverso la fissazione dell'azoto atmosferico, la solubilizzazione o la mineralizzazione di fosfati e potassio, il rilascio di fattori che regolano la crescita della pianta, la produzione di antibiotici e la biodegradazione della materia organica (Bhardwaj *et al.*, 2014).

1.4.2 Utilizzo di biostimolanti nella Viticoltura sostenibile

I vigneti rappresentano sistemi ecologici dotati di una propria agrobiodiversità, la quale costituisce un patrimonio di risorse genetiche, vegetali e animali, utili nella transizione volta ad una maggiore sostenibilità delle pratiche agricole.

Inoltre, è da sottolineare l'importanza culturale e morale della salvaguardia di diversità biologica all'interno di un agroecosistema (D'Oronzio *et al.* 2012).

I biostimolanti, facilmente biodegradabili, non inquinanti e non pericolosi verso un certo numero di organismi (Yakhin *et al.*, 2017), potrebbero contribuire alla sostenibilità del settore agricolo offrendo un'alternativa alle sostanze sintetiche ad elevato impatto ambientale, come i pesticidi.

L'utilizzo di questi formulati in viticoltura è una pratica interessante nel prevenire le malattie, garantire una buona qualità delle uve e dei vini e tutelare le risorse ambientali.

Alcuni fitostimolanti in commercio dotati di composizioni complesse, come il Kendal, possono stimolare le difese naturali di *V. vinifera* e sono particolarmente indicati per infezioni causate da *P. viticola* (Portillo *et al.*, 2006).

Inoltre, è stato dimostrato che a livello delle radici di *V. vinifera*, l'applicazione di estratti algali migliora l'assorbimento di azoto e potassio, incrementando le potenzialità di crescita della pianta e limitando la fertilizzazione del vigneto (Mugnai *et al.*, 2008).

In un prossimo futuro i biostimolanti potrebbero ridimensionare l'impiego di fertilizzanti e pesticidi, diminuendo le ripercussioni che questi hanno sull'agroecosistema viticolo e sull'ambiente circostante (Guiterrez-Gamboa *et al.*, 2018).

Si prospetta, quindi, la necessità di implementare le attuali conoscenze circa la biostimolazione, in modo tale da migliorare l'efficacia di questi strumenti e ottimizzarne la produzione industriale (Brown *et al.*, 2015).

1.5 Effetto dei biostimolanti sulla crescita e sulla fotosintesi

Biostimolanti di varia natura hanno mostrato effetti positivi sulla crescita e sulla resa produttiva di piante coltivate dall'uomo.

In piante di *Solanum lycopersicum* è stato osservato che l'applicazione di biostimolanti a base di linfa algale implementa il tasso di crescita dell'organismo e la resa quantitativa dei frutti (Zodape *et al.*, 2011).

Analogamente, Xu *et al.*, (2015) hanno evidenziato che estratti di *Ascophyllum nodosum* su piante di *Spinacia oleracea*, ne stimolano la crescita, monitorata attraverso parametri relativi alle caratteristiche fogliari funzionali, come l'area fogliare specifica (SLA), il contenuto relativo d'acqua (RWC) e l'area fogliare (LA).

È stato inoltre osservato un incremento della fotosintesi netta e del tasso di traspirazione in piante di *Zea mays*, trattate con biostimolanti a base di acidi fulvici (Diaz-Leguizamòn *et al.*, 2016).

L'effetto protettivo di molti biostimolanti contro i fattori di stress ossidativo, si esplica nella riduzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e nell'aumento delle concentrazioni di composti fenolici (Yakhin *et al.*, 2017). Inoltre, estratti fitostimolanti di *Quercus sessiliflora* possono modulare la composizione fenolica di *Vitis vinifera*, incidendo sulle caratteristiche del vino (Pardo-Garcia 2014).

Per di più, i biostimolanti possono influire sul colore delle foglie, incrementandone il contenuto di pigmenti fotosintetici. Questo risultato si è ottenuto in piante di *Eruca sativa* trattate con estratti di *Moringa oleifera*, in particolare, si è registrato un aumento della concentrazione di clorofilla e un raddoppio del contenuto di carotenoidi (Bulgari *et al.*, 2015).

Risultati simili sono stati raggiunti da Vernieri *et al.* (2005) e Spinelli *et al.* (2010), i quali, infatti, hanno osservato che l'applicazione del biostimolante *Actiwave* (Valagro s.p.a) su *Eruca Sativa* e su *Fragaria Ananassa*, ha determinato un importante incremento del contenuto di clorofille e carotenoidi totali, rispetto alle piante non trattate.

CAPITOLO 2. OBIETTIVO DELLA TESI

L'intensificazione della produzione agricola all'indomani della 'Rivoluzione verde' ha garantito un'elevata offerta di prodotti agricoli, mantenuta grazie all'applicazione di sostanze sintetiche all'agroecosistema. Infatti, fertilizzanti inorganici e pesticidi vengono adoperati per fronteggiare i fenomeni responsabili delle perdite di raccolto come, ad esempio, il depauperamento dei nutrienti del suolo o le infezioni delle specie coltivate.

Tuttavia, queste strategie chimiche hanno avuto degli importanti costi ecologici e possono tuttora compromettere il corretto funzionamento degli ecosistemi e degli agroecosistemi.

Nel Mezzogiorno queste sostanze minacciano le produzioni locali, a causa delle conseguenze che possono avere sulla biodiversità agricola, ovvero sulle varietà coltivate tipiche del territorio, i cui prodotti sono esportati in tutto il mondo ed etichettati con marchi che ne garantiscono l'autenticità della provenienza. Quindi, per preservare l'enorme patrimonio biologico, culturale ed economico insito nella agricoltura dell'Italia meridionale, è necessario garantire agli agroecosistemi le condizioni adatte all'accrescimento e allo sviluppo delle coltivazioni, tuttavia è parimenti di estrema importanza preservare il funzionamento a lungo termine del sistema agricolo tramite l'applicazione di strategie agricole ecosostenibili.

Per quanto riguarda la viticoltura, le annate vinicole europee sono compromesse principalmente dalle parassitosi fungine e, per evitarne le conseguenze, inevitabilmente si ricorre a strategie di lotta chimica non ecosostenibili. Infatti, ad oggi gli anticrittogamici più efficaci contro la peronospora sono a base di rame, elemento che, rilasciato nell'ambiente, può provocare seri disturbi ecotossicologici (Helling *et al.*, 2000; Nicòtina *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2012).

Negli ultimi anni la soluzione all'impiego di fungicidi cuprici è stata riscontrata nell'eterogenea potenzialità dei biostimolanti (Yakhin *et al.*, 2017; Guitierrez-Gamboa *et al.*, 2018). Questi preparati, a basso impatto ambientale, mettono in atto diversi meccanismi d'azione al fine di implementare le potenzialità della pianta, tra cui anche le naturali difese nei confronti di funghi (Portillo *et al.*, 2006; Mugnai *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2015).

Il lavoro presentato ha lo scopo di verificare se l'applicazione del biostimolante Trym, a base di estratti vegetali, a piante di *V. vinifera*, sottoposte a diversi trattamenti quantitativi di fungicida rameico, può avere effetti positivi sulle difese fisiologiche delle piante, e dunque migliorare alcuni parametri ecofisiologici legati alla produttività primaria della specie in questione. In particolare, l'effetto dei diversi trattamenti è stato valutato:

- 1) sulla massima efficienza fotochimica del fotosistema II (Fv/Fm), indicatore della capacità dell'apparato fotosintetico di convertire la luce ai centri di reazione durante la fase luminosa della fotosintesi;
- 2) sui pigmenti fotosintetici (clorofille e carotenoidi) marcatori di efficienza di cattura della luce nel processo fotosintetico;
- 3) sulle caratteristiche fogliari funzionali, indicatori di come la pianta si adatta ai fattori ecologici del proprio habitat.

In ultima analisi, è stato anche valutato il contenuto di polifenoli in foglie e uva per stabilire se i trattamenti potessero sortire effetti desiderati anche sulla produzione di questi antiossidanti importanti per la salute umana.

CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI

3.1 *La specie studiata*

Vitis vinifera è un'angiosperma arbustiva lianosa appartenente alla famiglia delle Vitaceae.

Il processo di domesticazione della vite selvatica (*V. vinifera* L. subsp. *Sylvestris*) è avvenuto tra i 6000 e i 9000 anni fa, in un'area compresa tra il Mar Nero e l'Iran. Da queste zone le forme selvatiche coltivate si sarebbero diffuse, ad opera dell'uomo, in Medio Oriente e in Europa, dove, nel corso dei secoli ed in seguito ad eventi di domesticazione secondaria, sono state selezionate le attuali varietà coltivate.

Queste ultime appartengono alla sottospecie *V. vinifera subsp. Sativa* e sono coltivate per la produzione di uva da tavola, succhi e principalmente vino (Terral *et al.*, 2010).

La vite è una pianta perenne, il cui ciclo vitale segue a sua volta dei sottocicli annuali, detti anche cicli riproduttivi.

Siccome si tratta di una pianta caduca, il periodo invernale corrisponde a quello del riposo vegetativo, che inizia con la caduta delle foglie e termina in primavera.

All'inizio del periodo vegetativo iniziano a formarsi i primi germogli, da cui si origineranno le foglie e, successivamente, le infiorescenze nella fase di **fioritura**.

In seguito ad impollinazione, gli ovari dei fiori fecondati si accrescono, formando degli acini immaturi di colore verde. Già in questa fase, detta **allegagione**, si inizia ad osservare un richiamo di carboidrati dagli altri organi della pianta.

Durante l'**invaiatura**, gli acini vanno incontro al processo di maturazione: il frutto aumenta di dimensioni e la colorazione vira dal verde al giallo o al rosso violaceo.

La fase finale del ciclo riproduttivo è la **maturazione**, in cui la bacca si arricchisce ulteriormente di zuccheri, aumenta di dimensioni ed è pronta per essere raccolta.



Figura 3: Successione delle fasi del ciclo riproduttivo di *V. vinifera*.

3.1.1 La cultivar *Aglianico*

L'*Aglianico* è da secoli coltivato nel Mezzogiorno dove, in base all'area geografica di produzione, si possono distinguere tre biotipi d'origine monofiletica: *Aglianico del Vulture Superiore* in Basilicata; *Aglianico del Taburno* e *Aglianico di Taurasi* in Campania (De Lorenzis *et al.*, 2013; Nuzzo *et al.*, 2015).

Si tratta di un vitigno a bacca nera poco vigoroso e caratterizzato da moderati fenomeni di acinellatura del grappolo, da germogliamento e fioritura precoci, da invaiatura e maturazione tardive.

Le foglie sono medio-piccole, di forma pentagonale e colore verde scuro.

Il grappolo, piuttosto compatto, è costituito da acini di medie o piccole dimensioni, di forma sferica, con una buccia molto pruinosa. I frutti sono destinati esclusivamente alla vinificazione.

Sotto il profilo fitosanitario, resiste bene all'oidio, ma è sensibile alla peronospora (Moio *et al.*, 2014).

La scelta di questo vitigno risiede non solo nella grande importanza che occupa nello scenario enologico ma anche nel ruolo ecologico che riveste questa cultivar in Irpinia. Vaste aree del territorio sono infatti dedicate alla viticoltura di vigneti autoctoni, che, ormai da secoli, hanno modificato le connotazioni paesaggistiche della regione (Caputo *et al.*, 2009). Tra questi l'Aglianico risulta perfettamente adattato alle condizioni geologiche e climatiche irpine, infatti richiede terreni collinari di origine vulcanica e soffre le alte temperature.

3.2 Sito di studio

Il vigneto target della sperimentazione si trova in Irpinia, all'interno del territorio aziendale della Tenuta Fonzone-Caccese (Fig. 3B), che sorge su una collina della contrada Scorzagalline, a Est del comune di Paternopoli (AV). Questo colle ha una superficie di circa 20 ettari ed è delimitato dal fiume Fredane e dal torrente Ifalco.

Il vigneto dedicato allo studio (Fig. 3A) occupa 1.1 ettari ed è localizzato ad un'altitudine compresa tra i 400 e i 450 metri s.l.m. con esposizione Nord-Ovest e pendenza media del 10%.

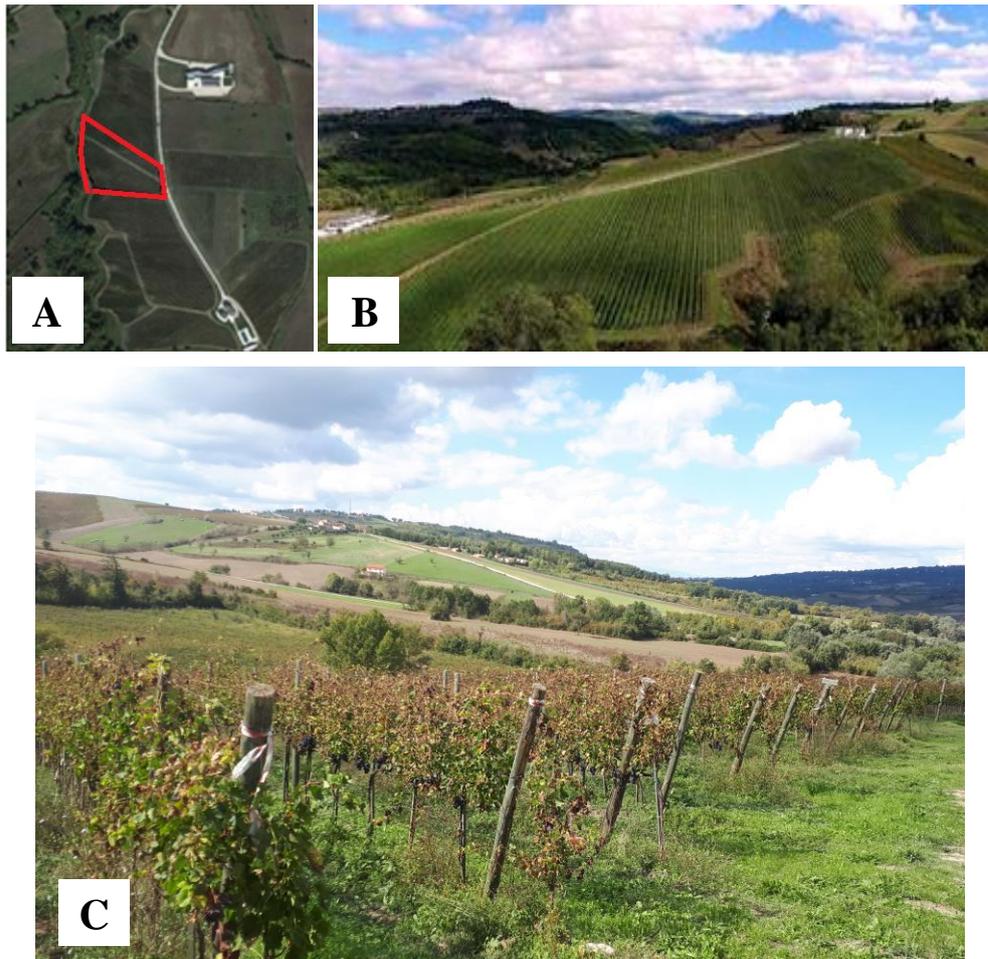


Figura 3: (A) Veduta satellitare della tenuta, in cui è stata evidenziata l'area di studio; (B) Veduta della Tenuta Fonzone; (C) Filari implicati nello studio.

In quest'area il clima è caratterizzato da escursioni termiche rilevanti, temperature minime invernali intorno a 0°C con punte negative nei primi 2 mesi dell'anno, il mese più freddo è gennaio (temperatura media mensile di 5°C) mentre il mese più caldo è luglio (temperatura media mensile di circa 25°C e temperature massime). La piovosità media annua è di circa 1000-1100 mm con precipitazioni concentrate nei trimestri ottobre-dicembre. Tali condizioni climatiche rendono possibile, come in altri siti della Regione Campania, la coltivazione della cultivar *Aglianico*, da inizio aprile fino al periodo di vendemmia, in ottobre (Bonfante *et al*, 2015).

3.3 Disegno sperimentale e trattamenti

I vigneti oggetto di studio appartengono al biotipo *Aglianico* di *Taurasi*, clone **VCR 23** (Figura 4) e sono impiantati su portainnesto **420 A** (Tabella 1), con sesto

d'impianto (2,2m x 0,90m). La forma di allevamento adottata è a spalliera con potatura a cordone speronato.



Figura 1: Caratteristiche del Clone VCR 23, biotipo *Taurasi*. (Vivai Cooperativi Rauscedo sca, 2011).

Gli otto filari implicati nello studio (Fig. 3C), sono disposti a *rittochino*, ovvero lungo le linee di massima pendenza del colle. Questa sistemazione consente il defluire dell'acqua riducendo rischi di erosione e smottamento a cui, i terreni argillosi, sono esposti.

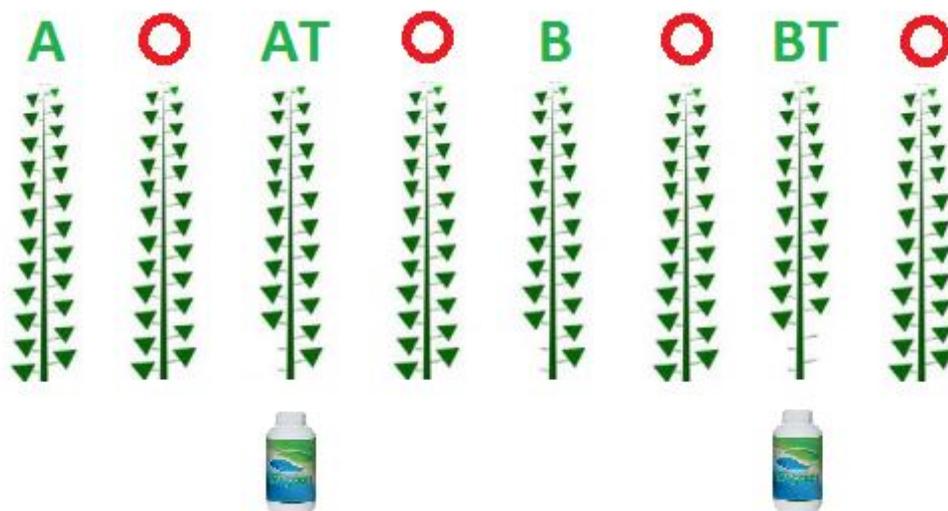


Figura 5: Schematizzazione degli 8 filari implicati nello studio: i 4 filari, sottoposti ai diversi trattamenti (A, AT, B, BT), sono indicati in verde e si alternano ai quattro filari buffer indicati con cerchi rossi.

Come riportato nella schematizzazione del disegno sperimentale del presente studio (Figura 5), quattro di questi filari sono stati sottoposti ad uno specifico trattamento (A, AT, B, BT) con cadenza di 10 giorni, a partire da Aprile 2018

mentre, gli altri quattro, hanno assunto la funzione di *filari buffer* per minimizzare l'impatto di un effetto deriva tra i trattamenti in esame.

I componenti totali utilizzati nelle quattro tesi sono:

- **Zolfo bagnabile**, in microgranuli idrodispersibili, con composizione in zolfo all'80% (esente da selenio);
- **Ossicloruro di rame**, in granuli idrodispersibili, con composizione al 32%;
- **Trym**, fitostimolante scelto.

In particolare, i filari A sono stati sottoposti a dose aziendale completa di fungicida, senza (A) e con aggiunta di biostimolante TRYM (AT); per quanto riguarda i filari B e BT, sono state dimezzate le dosi di fungicida rameico; per tutte le tesi è stato mantenuto costante l'impiego dello zolfo poiché non presenta particolari implicazioni eco tossicologiche (Provenzano *et al.*, 2006) ed inoltre, non rientra tra gli obiettivi di questo lavoro di tesi, dimostrarne gli effetti sulla produttività del vigneto

La Tabella 1 riporta nello specifico i dosaggi di ciascun componente nelle miscele impiegate per il trattamento di ciascun filare.

Tabella 1: Composti e relativi dosaggi impiegati nelle miscele per il trattamento di ciascun filare

Composizione e dosaggi			
Filare	zolfo bagnabile	ossicloruro di rame	Trym
A	400 g/hl	400 g/hl	-
AT	400 g/hl	400 g/hl	50 ml
B	400 g/hl	200 g/hl	-
BT	400 g/hl	200 g/hl	50 ml

3.3.1 Biostimolante Trym

Il Trym (Italpollina, Rivoli Veronese, VR, Italia) (Figura 6) è un prodotto in commercio a base di estratti vegetali di piante tropicali arricchito con microelementi, aminoacidi e vitamine.



Figura 6: Fitostimolante Trym, scelto come attivatore delle difese naturali delle piante.

L'azione fitostimolante risiede nel contenuto enzimatico (Proteasi, N-acetyl- β -glucosaminidasi, β -glucosaminasi), in grado di potenziare le difese naturali della pianta nei confronti di virus e funghi patogeni, impedendo quindi, preventivamente, la diffusione di malattie.

Le piante trattate sintetizzano più rapidamente ed in maggiori quantità proteine di resistenza (PR1a, PR1b, PR2, PR3) e Chitinasi. In un primo momento, è quindi indotta una resistenza localizzata e, successivamente, generalizzata in tutta la pianta, che si esplica proprio tramite attività chitinasica ed inspessimento dei tessuti vegetali (attività perossidasi), i quali diventano, pertanto, maggiormente resistenti ai patogeni.

Gli altri componenti del prodotto contribuiscono alla nutrizione della pianta.

Trattandosi di un formulato di origine naturale può essere impiegato in agricoltura biologica ed in sinergia con altri strumenti nei sistemi di lotta integrata.

È miscibile con fitofarmaci e ammendanti e non lascia residui che potrebbero provocare ripercussioni ecologiche. È innocuo nei confronti della comunità edafica, della popolazione di insetti e dell'uomo.

Il suo impiego permette di ridurre le quantità di rame da applicare alle colture.

3.4 Analisi di monitoraggio

Quando un organismo vegetale è sottoposto a condizioni ambientali favorevoli, ottimizza tutti i processi fisiologici.

Al sopraggiungere di un fattore ecologico perturbante (bassa temperatura, infezione, ecc.), i normali processi fisiologici della pianta, come la fotosintesi,

sono compromessi, comportando un abbassamento della produttività. Ciò è dovuto al fatto che vengono investite più risorse nei processi di protezione, per far sì che la pianta possa tollerare maggiormente il fattore anomalo (Bohnert *et al.*, 1998).

Lo stato di salute di un organismo fotoautotrofo può essere determinato utilizzando alcuni parametri che fungono da indicatori indiretti di una condizione di stress fisiologico.

3.4.1 Misure di emissione di fluorescenza della clorofilla a

L'energia luminosa assorbita dalle molecole di clorofilla può andare incontro a tre diversi destini: può essere usata nella fotosintesi (reazioni fotochimiche), dissipata come calore a livello dei complessi antenna o riemessa dalla clorofilla *a* sotto forma di fluorescenza. Questi tre processi sono interconnessi, così che qualsiasi aumento dell'efficienza di uno di essi causerà una diminuzione degli altri due. Di conseguenza, misurare la resa della fluorescenza della clorofilla fornisce informazioni sulle variazioni dell'efficienza delle reazioni fotochimiche e della dissipazione come calore, questo nonostante la quantità totale di fluorescenza della clorofilla sia molto piccola, tra l'1 e il 2% della luce totale assorbita (Bussotti *et al.*, 2012).

Il parametro di fluorescenza più comunemente utilizzato come indicatore di una condizione di stress, è il rapporto F_v/F_m (Lichtenthaler *et al.*, 1988).

Il valore F_m corrisponde al picco di emissione di fluorescenza e si registra quando un campione fotosintetico, precedentemente adattato al buio, è sottoposto ad una luce saturante. In una frazione di tempo minore di un secondo, la fluorescenza aumenta dal valore F_0 (di acclimatamento al buio) fino ad F_m . I valori F_0 e F_m dipendono anche dal contenuto di clorofille del campione, per cui possono essere utilizzati come parametri quantitativi per questi pigmenti. La differenza $F_m - F_0$, indicata come fluorescenza variabile F_v , è indice di stress fotochimico, poiché valori bassi di questo indice indicano una bassa attività del PSII e la dissipazione dell'energia di eccitazione sotto forma di calore.

Il parametro $F_v/F_m = [(F_m - F_0) / F_m]$, in campioni adattati al buio, indica la massima efficienza fotochimica del PSII ed è il parametro maggiormente usato come indicatore dell'attività fotochimica dell'apparato fotosintetico. Il valore ottimale di questo parametro per le piante con metabolismo fotosintetico C3 è 0.83 (Björkman e Demmig, 1987).

Una diminuzione del rapporto F_v/F_m può indicare o un danno all'apparato fotosintetico o una ridotta efficienza dei centri di reazione del PSII nel convertire energia luminosa, eventi causati da uno o più fattori di stress (Bussotti *et al.*, 2012).

In questo studio per monitorare nel tempo gli indici di fluorescenza è stato utilizzato un fluorimetro portatile a luce modulata FluorPen FP100 (Photon System Instruments, CZ) (Figura 7).



Figura. 7: Fluorimetro portatile FluorPen FP100 (Photon System Instruments, CZ).

Il valore di fluorescenza base (F_0) è stato indotto in foglie adattate al buio per 30 minuti da una debole luce di misura blu di circa $1-2 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La fluorescenza massima al buio (F_m) è stata indotta da un pulse di luce saturante di intensità pari a $3.000 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Le misure sono state condotte su $n = 10$ foglie pienamente espanse di piante di vite per ciascun trattamento (A, AT, B e BT) ed il monitoraggio è avvenuto

durante quattro fasi fenologiche della vite: fioritura (giugno), allegagione (luglio), invaiatura (luglio), raccolta (ottobre).

3.4.2 Determinazione del contenuto di pigmenti fotosintetici

I principali pigmenti fotosintetici degli organismi vegetali sono le clorofille ed i carotenoidi. Questi pigmenti si riscontrano a livello dei tilacoidi, tuttavia non sono presenti nelle stesse quantità. Infatti, la clorofilla *a*, in condizioni ottimali, è maggiormente presente rispetto alla clorofilla *b*, in un rapporto di 3 a 1.

La clorofilla *b* e i carotenoidi sono organizzati in complessi antenna per intercettare la luce. Vengono definiti pigmenti accessori poiché, presentando picchi di assorbimento diversi rispetto alla clorofilla *a*, convogliano l'energia luminosa ai centri di reazione, in modo tale da ottimizzare la capacità di utilizzo della luce da parte dell'apparato fotosintetico.

Il contenuto totale di carotenoidi, di clorofille ($a+b$) e il rapporto a/b possono cambiare a seconda della specie considerata e dei fattori di stress, per cui possono essere utilizzati come parametri per risalire alle condizioni fisiologiche dell'organismo (Bussotti *et al.*, 2012).

L'analisi dei pigmenti è stata effettuata in 4 date di campionamento. Ogni campagna di rilievi ha previsto la raccolta di $n = 10$ campioni di foglie pienamente espanse per ciascun trattamento (A, AT, B e BT). Il contenuto di clorofille ($a+b$) e carotenoidi ($x+c$) totali è stato determinato seguendo la procedura riportata da Lichtenthaler *et al.* (1987).



Figura 8: Estrazione di clorofille e carotenoidi da foglia.

L'estrazione dei pigmenti è stata effettuata in ghiaccio, tritutando campioni fogliari di area nota in un mortaio impiegando come solvente di estrazione acetone 100%. La centrifugazione dei campioni per 5 minuti a 5000 r.p.m. ha consentito di separare il particolato grossolano cellulare dal surnatante contenente i pigmenti fotosintetici. Il surnatante è stato infine utilizzato per le letture spettrofotometriche (*UV-VIS Cary 100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*) alle lunghezze d'onda di 470, 645 e 662 nm per la determinazione di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi.

3.4.3 Determinazione delle caratteristiche fogliari funzionali

Le caratteristiche fogliari funzionali sono parametri facilmente misurabili che consentono di definire la strategia adattativa messa in atto da una specie nel suo habitat di crescita (Pierce *at al.*, 2013). In questo studio sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: *area fogliare* (LA), *area fogliare specifica* (SLA), *contenuto fogliare di materia organica secca* (LDMC) e *contenuto idrico relativo* delle foglie (RWC).

LA, SLA e LDMC forniscono indicazioni sullo status nutrizionale dell'organismo vegetale e sulla sua capacità di utilizzare le risorse dell'habitat (Ordonñez *et al.*, 2010). Trattandosi di caratteri costitutivi, l'allontanamento dai caratteristici valori può fornire informazioni sulla risposta dell'organismo ad un fattore ambientale o ad altro tipo di perturbazione.

Area fogliare

L'area fogliare (LA, Leaf Area), espressa in cm², è stata effettuata acquisendo immagini digitali tramite fotocamera (Figura 9) ed effettuando una successiva analisi tramite il software Image J (Rasband W.S., Bethesda, Maryland, USA, 1997-2012). L'area della foglia è un indice ecologico di produttività, utile per il calcolo di altri indici, come riportato di seguito.

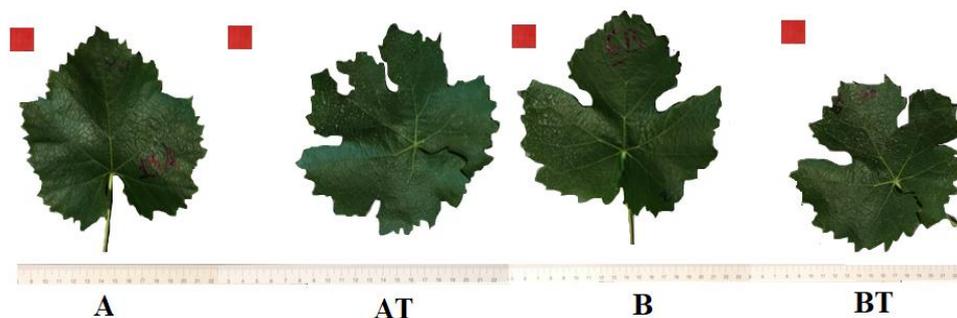


Figura 9: Acquisizione immagini digitali per il calcolo dell'area fogliare di campioni di piante di *V. vinifera* L. cv Aglianico sottoposte a 4 diversi trattamenti (A, AT, B e BT) raccolte in fase di allegagione.

Area fogliare specifica e Contenuto fogliare di materia organica secca

L'area fogliare specifica (SLA, Specific Leaf Area), corrisponde al rapporto tra l'area fogliare in cm² e il relativo peso secco espresso g⁻¹ (Cornelissen *et al.*, 2003).

$$SLA \text{ (cm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)} = \text{area fogliare (cm}^2\text{)} / \text{peso secco (g)}$$

Il contenuto fogliare di materia organica secca (LDMC, Leaf Dry Matter Content), è dato dal rapporto tra peso secco e peso a turgore ed è espresso in g g⁻¹ (Cornelissen *et al.*, 2003).

$$LDMC \text{ (g g}^{-1}\text{)} = \text{peso secco (g)} / \text{peso a turgore (g)}$$

SLA e LDMC sono indici che riflettono il bilancio nelle piante tra una rapida produzione di biomassa (alto SLA e basso LDMC) ed una efficiente conservazione delle sostanze nutritive (alto LDMC e basso SLA) (Garnier *et al.*, 2001; 2001b). L'indice SLA influenza la capacità fotosintetica e la respirazione fogliare ed indica la capacità di adattamento alle condizioni ambientali (Shipley *et al.*, 2005); la sua plasticità è correlata alla strategia utilizzata per aumentare l'efficienza di assimilazione della luce e/o l'utilizzo delle risorse ed è molto utile per indagare le variazioni intra-specifiche legate ai gradienti ambientali (Cornelissen *et al.*, 2003).

Contenuto idrico relativo

Il contenuto idrico relativo (RWC, Relative Water Content) di una foglia esprime la percentuale di acqua contenuta nella foglia al momento del campionamento, rispetto alla quantità di acqua trattenuta dalla foglia completamente satura. Esso viene calcolato con la seguente formula (Turner, 1981):

$$\text{RWC (\%)} = [(\text{peso fresco (g)} - \text{peso secco (g)}) / (\text{peso a turgore (g)} - \text{peso secco (g)})] \times 100$$

È un parametro correlato all'attività fisiologica della pianta, risponde alle condizioni ambientali, come temperatura, luce, umidità e disponibilità idrica ed è quindi sfruttato per comprendere, ad esempio, la tolleranza allo stress idrico in un determinato ambiente (Tanentzap *et al.*, 2015).

Per procedere alla determinazione dei suddetti parametri, al momento del campionamento le foglie sono state pesate, in modo da poter annotare il loro peso fresco e, successivamente, per ciascuna di esse è stata determinata la rispettiva aerea fogliare. Le foglie campionate sono state sottoposte ad un periodo di imbibizione di 48 ore a 4°C e, dopo tale periodo, pesate per ottenere il loro peso a turgore. Infine, i campioni sono stati riposti in stufa per 48 ore a 72°C così da determinare il loro peso secco.

Le misure sono state condotte su n=10 campioni fogliari di piante di vite per ciascun trattamento in esame (A, AT, B e BT), selezionando foglie pienamente espanse, esposte al sole e prive di danni causati da erbivori e/o patogeni. Il campionamento è stato svolto in fase di allegagione (periodo erbaceo) durante la quale i fiori che completano la fecondazione, dando origine ad una bacca verde fotosintetizzante, vengono definiti "allegati". La scelta è ricaduta su questa fase poiché questi parametri costitutivi dipendono dallo stato di adattamento della specie stessa al proprio habitat e l'allegagione risulta molto delicata essendo fortemente influenzata dalle condizioni ambientali e dal generale stato di salute della pianta. Le condizioni che permettono una efficiente fioritura, e quindi fecondazione ed allegagione sono infatti la temperatura, la radiazione luminosa, una buona attività fotosintetica (per assicurare agli organi riproduttivi un giusto apporto di carboidrati), una buona resistenza agli agenti patogeni (come la peronospora), un ottimale equilibrio tra attività vegetativa e riproduttiva della pianta, e idonee pratiche colturali (Marenghi, 2005).

3.4.5 Determinazione dei polifenoli in acini d'uva

Durante la fase di invaiatura, si osserva la transizione del frutto da organo verde a frutto in maturazione, in cui si accumulano zuccheri ed altri metaboliti secondari, importanti nel determinare la qualità alla raccolta (Garrido e Borges, 2013). Tra questi ultimi, i polifenoli sono composti che influenzano significativamente la qualità dei vini rossi sia dal punto di vista organolettico che salutistico grazie alle loro proprietà antiossidanti e di “spazzini” dei radicali liberi (De Nisco *et al.*, 2013). Essi, inoltre, determinano colore, astringenza, amarezza, corposità e aroma di frutto e vino (Pardo-Garcia *et al.*, 2014).

La misura del contenuto di polifenoli totali in frutti è stata effettuata su n=10 campioni d'uva di piante di vite per ciascun trattamento in esame (A, AT, B e BT). Per ciascun campione, 0,2g di uva sono stati tritati e sospesi in una soluzione estraente di metanolo puro; il materiale così trattato è stato poi centrifugato per 5' a 11000 rpm; ad ogni surnatante sono state aggiunte una soluzione 10% di Folin Cicalteu (1:1 v/v) ed una soluzione 700mM di Na₂CO₃ (1:5 v/v). I campioni sono stati incubati per 2h a temperature ambiente ed infine analizzati con uno spettrofotometro UV-VIS Cary 100, Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA, alla lunghezza d'onda di 765nm. La concentrazione di polifenoli totali è stata determinata attraverso una retta di taratura costruita con acido gallico e quindi espressa in mg equivalenti di acido gallico per grammo di peso fresco (mg AGE g⁻¹ FW).

3.5 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati sperimentali è stata effettuata mediante Test T di Student (Sigma-Stat 12.0 package, Jandel Scientific, USA). Le differenze tra le classi ‘trattate’ e ‘non trattate’ con biostimolante, sono state considerate statisticamente significative per P≤0,05. I dati riportati corrispondono alla media ± errore standard per ciascun trattamento.

CAPITOLO 4. RISULTATI

4.1 Effetto dell'applicazione di fitostimolante sulla fotosintesi e sui pigmenti fotosintetici nelle diverse fasi fenologiche della vite

La valutazione dell'efficienza fotosintetica delle viti sottoposte ai diversi trattamenti è stata effettuata attraverso misure di emissione di fluorescenza della clorofilla *a*, monitorando, nelle fasi di fioritura, allegazione, invaiatura e raccolta, la massima efficienza fotochimica del PSII, ovvero l'indice F_v/F_m (Figura 9).

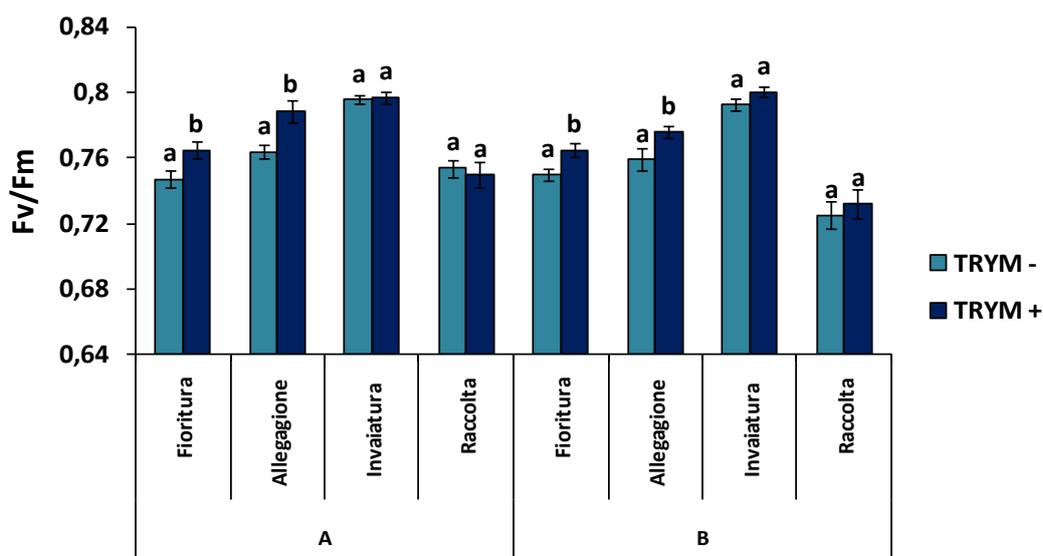


Figura 9: Indice fotochimico F_v/F_m misurato in foglie completamente espanse in piante di *V. vinifera* L. cv Aglianico sottoposte a 4 diversi trattamenti (A, AT, B e BT) nelle fasi fenologiche fioritura, allegazione, invaiatura e maturazione. Ciascuna istogramma indica il valore medio \pm ES di n=10 campioni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti. ($P \leq 0,05$).

I filari A e AT, trattati con dose aziendale di ossicloruro di rame, rispettivamente in assenza e in presenza del biostimolante *Trym*, manifestano differenze statisticamente significative ($P \leq 0,05$) del valore F_v/F_m nelle fasi di fioritura e allegazione. In particolare, i filari sottoposti a fitostimolazione manifestano valori maggiori rispetto ai filari privi di biostimolante, in entrambe le fasi fenologiche.

Analogo risultato è stato ottenuto per i filari B e BT: anche a dosi dimezzate del suddetto fungicida, nelle fasi di fioritura ed allegagione, i filari BT sottoposti a fitostimolazione presentano valori di F_v/F_m più alti ($P \leq 0,05$) rispetto ai filari B.

Per quanto riguarda le fasi di invaiatura e maturazione, sia i filari a dosi complete che quelli a dosi dimezzate di fungicida, non hanno mostrato variazioni significative di questo indice in risposta all'utilizzo del *Trym*.

L'aggiunta della biostimolante influenza la sintesi di pigmenti fotosintetici. Nei grafici seguenti sono rappresentati la quantità totale di clorofille ($a+b$), il rapporto tra il contenuto di clorofilla a e quello di clorofilla b e la quantità totale di carotenoidi ($x+c$).

I risultati riportati in Fig. 10(A), mostrano un andamento costante del contenuto totale di clorofille nelle foglie appartenenti a piante di vite dei filari trattati e non trattati con *Trym*. Le piante del filare AT mantengono in tutte le fasi del ciclo riproduttivo valori di clorofille totali ($a+b$) più alti ($P < 0,05$) rispetto a quelli riscontrati nelle foglie delle piante appartenenti al filare A. Lo stesso risultato è stato ottenuto per i filari sottoposti a metà dose aziendale di fungicida rameico (B), ad eccezione delle foglie campionate in fase di raccolta, dove l'aggiunta del biostimolante (filare BT) ha comportato una riduzione ($P < 0,05$) del contenuto di clorofille rispetto ai filari (B) non sottoposti al trattamento con *Trym*.

In figura 10(B) sono riportati i valori medi, per ciascun trattamento, del rapporto tra clorofilla a e clorofilla b . Sia per i filari A che per i filari B, si può osservare che la biostimolazione, non ha prodotto differenze statisticamente significative in nessuna delle fasi fenologiche in esame.

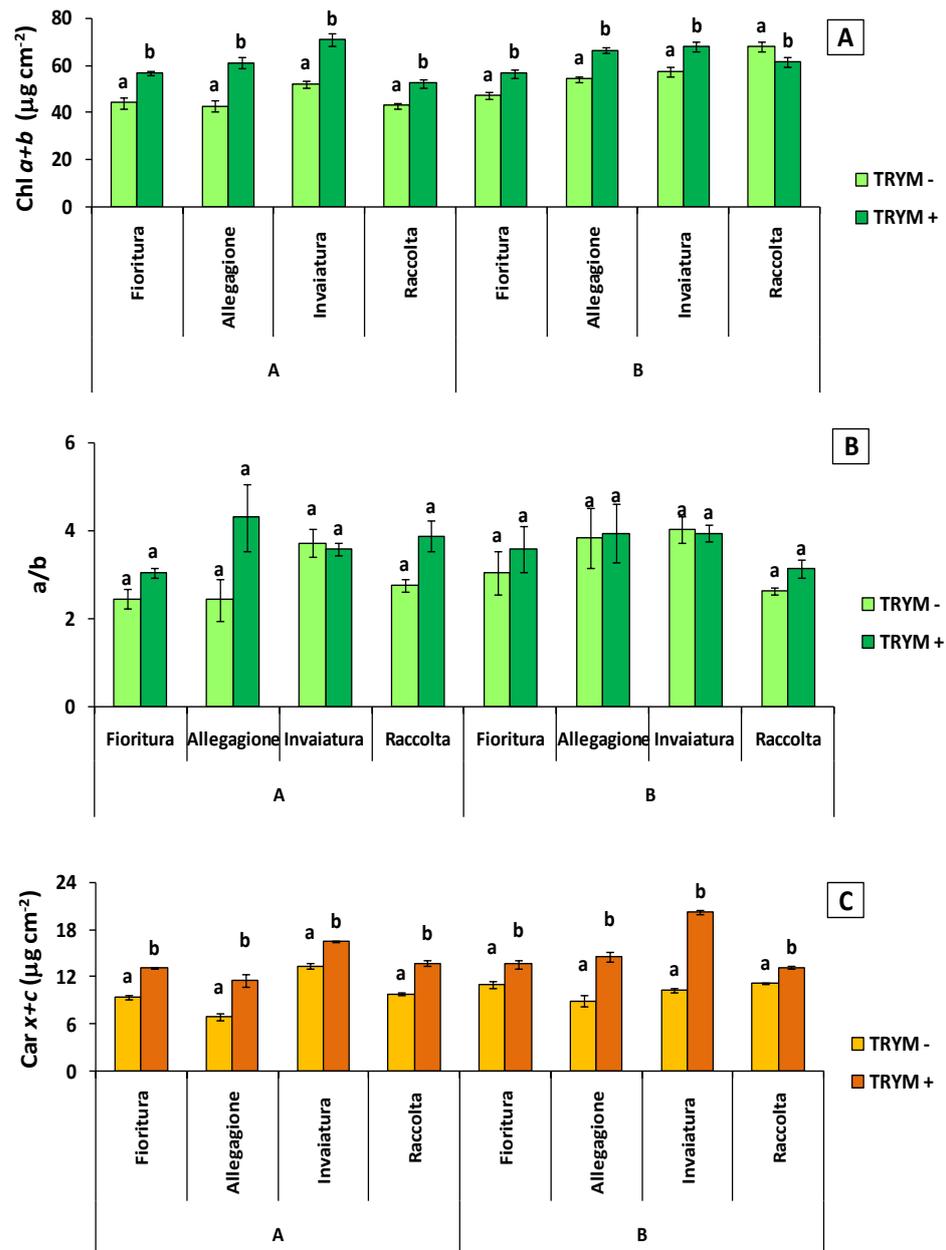


Figura. 10: Analisi pigmentaria condotta su foglie completamente espanse in piante di *V. vinifera* L. cv Aglianico sottoposte a 4 diversi trattamenti (A, AT, B e BT) in ognuna delle 4 fasi fenologiche (fioritura, allegagione, invaiatura e maturazione). **(A)** contenuto di clorofilla totali ($a+b$) espresso in $\mu\text{g cm}^{-2}$; **(B)** rapporto tra clorofilla a e clorofilla b (a/b); **(C)** contenuto di carotenoidi totali ($x+c$) espresso in $\mu\text{g cm}^{-2}$. Ciascun istogramma rappresenta il valore medio \pm ES di $n=10$ campioni. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti ($P \leq 0,05$).

Per quanto riguarda i carotenoidi totali, figura 10(C), si osserva nei filari A e B, non interessati dall'aggiunta di TRYM una concentrazione di carotenoidi totali nelle foglie più bassa ($P < 0.05$) rispetto a quella riscontrata nelle foglie appartenenti ai filari AT e BT sottoposti al trattamento con fitostimolante.

4.2 Influenza dell'applicazione di fitostimolante sulle caratteristiche fogliari funzionali nelle diverse fasi fenologiche della vite

Come si osserva in Fig.11(A), l'area fogliare (LA) delle foglie appartenenti ai filari trattati con dose completa di ossicloruro di rame (A e AT), non presentano variazioni significative. Viceversa, nel caso dei filari sottoposti a dosi dimezzate di fungicida, l'area fogliare delle piante non trattate con *Trym* (B) è risultata maggiore ($P < 0,05$) rispetto all'area delle foglie del filare trattato con *Trym* (BT). Diversamente, l'area fogliare specifica (SLA), ed il contenuto fogliare di materia organica secca (LDMC) non hanno mostrato differenze significative in funzione del fitostimolante (Figure 11B e 11C).

Per quanto riguarda il contenuto idrico relativo (RWC), esso è risultato più basso ($P < 0,05$) nelle foglie del filare BT, sottoposto a biostimolazione, rispetto al rispettivo filare non trattato con *Trym*. I filari sottoposti a dose aziendale completa di anticrittogamico non hanno mostrato, invece, alcuna variazione di questo parametro.

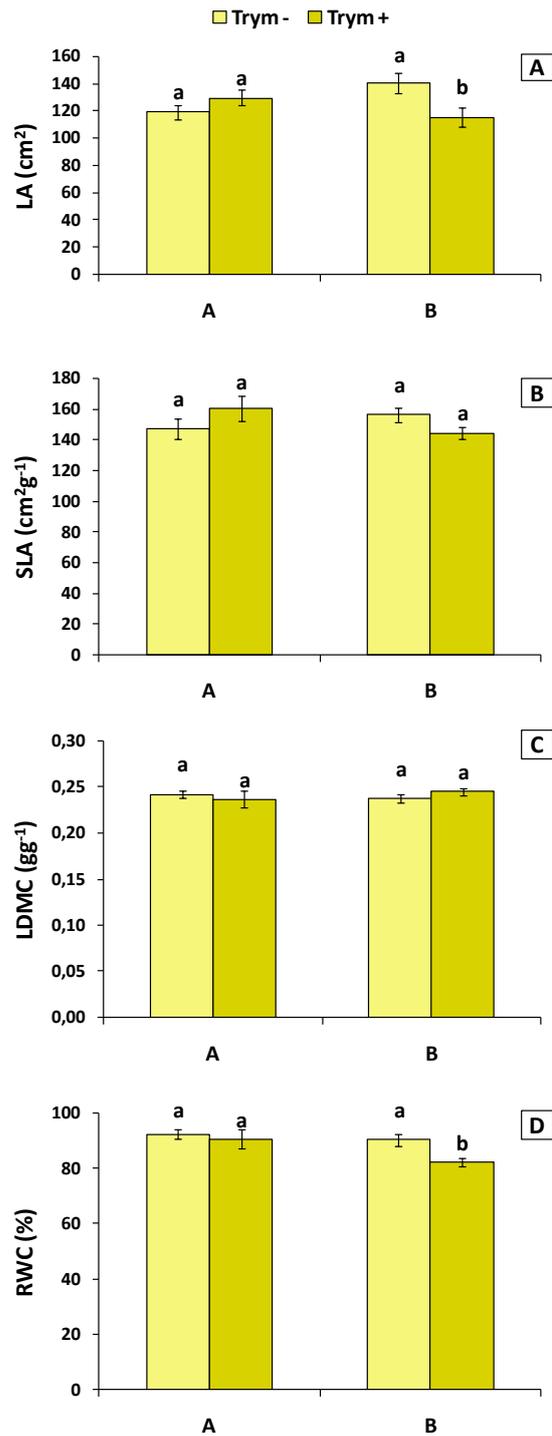


Figura 11: Analisi delle caratteristiche fogliari funzionali condotte su foglie completamente espanse in piante di *V. vinifera* L. cv Aglianico sottoposte a 4 diversi trattamenti (A, AT, B e BT). (A) Area fogliare, LA (cm²); (B) Area fogliare specifica SLA (cm² g⁻¹); (C) Contenuto fogliare di materia organica secca LDMC (g g⁻¹); (D) Contenuto idrico relativo RWC (%). Ciascun istogramma rappresenta il valore medio ±ES di n=10. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P≤0,05).

4.3 Effetto dei diversi trattamenti sul contenuto di polifenoli totali nei frutti

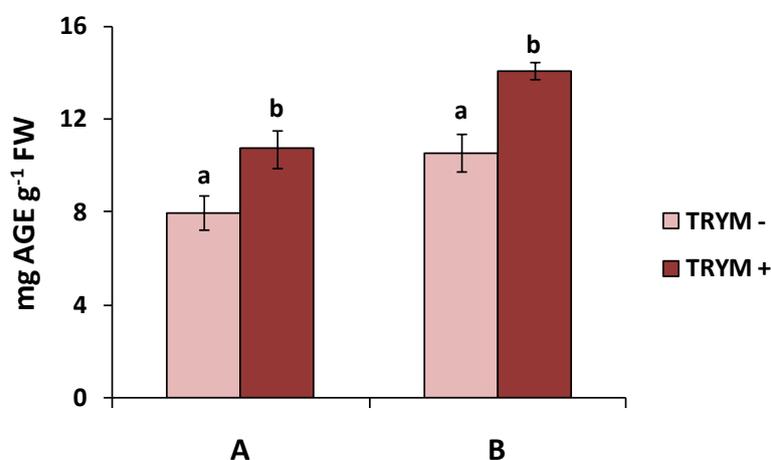


Figura 12: Analisi del contenuto di polifenoli in campioni acini d'uva di piante di *V. vinifera* L. cv Aglianico sottoposte a 4 diversi trattamenti (A, AT, B e BT). Ciascun istogramma rappresenta il valore medio \pm ES di n=10. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i diversi trattamenti. ($P \leq 0,05$).

L'analisi del contenuto di polifenoli negli acini di *V. vinifera* L. cv Aglianico ha dato risultati significativi sia nei filari trattati a dose completa di fungicida rameico che in quelli sottoposti a dose dimezzata. In particolare, entrambi i filari trattati con il Trym manifestano un corredo polifenolico significativamente più alto ($P < 0,05$) rispetto ai relativi filari controllo non sottoposti a biostimolazione.

CAPITOLO 5. DISCUSSIONE

Il parametro F_v/F_m è largamente impiegato come indicatore di una condizione di stress della pianta che influisce sull'efficienza del fotosistema II e quindi, sulla fotosintesi (Lichtenthaler *et al.*, 1988).

In questo studio condotto su piante di *V. vinifera* L. cv Aglianico, il monitoraggio di F_v/F_m ha consentito di valutare se l'applicazione del biostimolante *Trym*, in combinazione con diverse dosi di ossicloruro di rame, potesse incidere positivamente sull'efficienza del fotosistema II, e quindi sulla fase luminosa della fotosintesi delle piante di vite.

I risultati ottenuti mostrano che la somministrazione del fitostimolante *Trym* ha sortito, sia nel trattamento a dose completa che in quello a dose dimezzata, un miglioramento della massima efficienza fotochimica del fotosistema II esclusivamente nelle prime fasi del ciclo riproduttivo di *V. vinifera*, ovvero in fioritura ed allegagione. In queste fasi fenologiche, il *Trym* può aver stimolato le difese fisiologiche della vite, rendendola più tollerante contro fattori di stress, come le infezioni fungine provocate dall'oomicete *Plasmopara Viticola*, limitando quindi eventuali disturbi sull'attività fotosintetica provocati dall'infezione peronosporica. È noto infatti che infezioni indotte da patogeni quali *Plasmopara Viticola*, fitoplasma e virus, provocano una riduzione dell'efficienza del PSII durante la fotosintesi (Sebela *et al.*, 2012; Bertamini *et al.*, 2002; 2004) e che il parametro F_v/F_m può essere utilizzato come indicatore molto sensibile per la diagnosi precoce di queste infezioni (Csefalvay *et al.*, 2009).

Una riduzione del parametro F_v/F_m può essere inoltre associata ad un rallentamento del flusso di elettroni lungo la catena di trasporto (Sebela *et al.*, 2012) e può dipendere dalla riduzione del contenuto di clorofilla nei tessuti fogliari infettati dal fungo. Un decremento del contenuto di clorofille totali associato ad infezioni patogene, è stato infatti riportato da Gonzalez *et al.*, (1997) in studi condotti su vite infettata da virus e, da Lebeda *et al.*, (2008), in studi su *Lactuca sativa*, parassitata dall'oomicete *Bremia lactucae*. È altresì vero che in *Solanum lycopersicon*, *Hordeum vulgare* e *Triticum* sp., così come in ortaggi a foglia larga, l'applicazione fogliare di biostimolanti, ha determinato un significativo aumento di clorofille e carotenoidi totali (Blunden *et al.*, 1997;

Vernieri *et al.*, 2005; Spinelli *et al.*, 2010). In questo studio, l'incremento di F_v/F_m può essere correlato al potenziamento del pool di pigmenti, sia in fase di fioritura che allegagione, indicando una buona stabilità del sistema antenna e dei centri di reazione. Non solo in queste due prime fasi, ma anche in invaiatura e raccolta, sia in viti sottoposte a dose completa che dimezzata di ossicloruro di rame, l'uso del fitostimolante ha garantito un aumento del contenuto totale di clorofille e carotenoidi. La sola eccezione è stata riscontrata in fase di raccolta per i filari BT che hanno mostrato un contenuto di clorofille totali inferiore rispetto ai filari B non trattati con il biostimolante, risultato che tuttavia non ha inciso sulla corretta funzionalità del fotosistema II, come dimostrano i valori di F_v/F_m .

Accanto alle variazioni indotte dall'azione del *Trym* nel contenuto di clorofille totali, non sono stati riscontrati cambiamenti significativi nel rapporto a/b , indipendentemente sia dalla dose di anticrittogamico impiegata che dalla fase fenologica considerata. Questo rapporto risulta positivamente correlato al rapporto tra centri di reazione del PSII e i complessi di raccolta della luce LHCII (Kitajima *et al.*, 2003). L'aumento del rapporto a/b è indice di una minor concentrazione di clorofilla b e quindi di complessi antenna; ciò, associato ad una riduzione nel contenuto di clorofille e carotenoidi rappresenta un importante meccanismo per evitare danni all'apparato fotosintetico, suggerendo una migliore acclimatazione del sistema in toto in condizioni di elevata irradianza (Chaves *et al.*, 2003; Mouthino-Pereira *et al.*, 2007). I dati ottenuti in questo studio dunque sembrano suggerire l'assenza di una condizione di stress dovuta ad elevate irradianze.

La benefica azione del TRYM nell'indurre il potenziamento del contenuto di carotenoidi inoltre, assume ruolo chiave nel migliorare la capacità di intercettazione della radiazione luminosa a livello dei complessi antenna, e ruolo preventivo, per le note proprietà antiossidanti, nel caso in cui il pool di clorofille dovesse andare incontro a fotossidazione (Mouthino-Pereira *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2015).

Per monitorare le differenze nel potenziale di crescita, eventualmente riconducibili al trattamento con biostimolante, sono state prese in esame alcune caratteristiche fogliari funzionali, che la pianta adotta in risposta ai fattori ambientali caratterizzanti l'habitat di crescita.

Studi precedenti dimostrano che la fitostimolazione su *Impatiens wallerana*, in condizioni controllate, ovvero in serre mantenute a temperature tra i 18°C e i 25 °C, ha portato all'aumento di area fogliare, peso fresco e peso secco delle foglie (Vernieri *et al.* 2006). Nel nostro caso, l'area fogliare (LA) non ha mostrato differenze significative nel trattamento a dose completa di ossicloruro di rame, così come non sono emerse differenze significative per quanto riguarda l'area fogliare specifica, il contenuto di materia organica secca, e il contenuto idrico relativo. Una maggiore area fogliare implica una migliore capacità da parte della foglia di intercettare luce ed una maggiore efficienza fotosintetica, affiancata da valori di SLA generalmente alti, mentre una riduzione dello SLA con aumento di LDMC può indicare un maggior investimento in difese fogliari da parte della pianta (Cornelissen *et al.*, 2003). Non essendo state registrate variazioni nell'espansione fogliare della lamina fogliare, la miglior capacità di captare luce per le piante trattate con dose aziendale di anticrittogamico, risulta ascrivibile al solo aumento di pigmenti fotosintetici indotti dall'utilizzo del *Trym*. Viceversa, nell'ambito dei filari sottoposti a dose dimezzata di ossicloruro di rame, l'applicazione del biostimolante ha determinato una riduzione significativa dell'area fogliare e del contenuto idrico relativo, affiancati da un aumento, seppur non significativo, dell'area fogliare specifica e del contenuto di sostanza organica secca. Generalmente l'LDMC è un tratto fogliare funzionale poco plastico rispetto allo SLA nell'ambito di un'analisi intraspecifica (Wilson *et al.*, 1999). Tuttavia, la riduzione di LA a parità di LDMC registrato per i filari BT potrebbe suggerire, un inizio d'azione del fitostimolante verso una migliore gestione delle sostanze nutritive (Ryser and Urbans, 2000; Garnier *et al.*, 2001; Ordoñez *et al.*, 2010) e, in virtù di una dose inferiore di anticrittogamico, un potenziamento delle difese fogliari (Cornelissen *et al.*, 2003), caratteristiche che rientrano nello spettro d'azione del prodotto utilizzato. Questa ipotesi può trovare riscontro nell'analisi del contenuto idrico relativo (RWC) che ha fatto registrare, solo nei filari sottoposti a dose dimezzata di fungicida ed applicazione del *Trym*, una riduzione significativa rispetto a quelli non sottoposti a fitostimolazione. L'indice RWC è strettamente correlato allo status idrico della pianta e al tasso di traspirazione. L'applicazione fogliare di biostimolanti a piante di *Vitis vinifera* L. può aumentare il potenziale idrico fogliare e la conduttanza stomatica in condizioni di siccità (Mancuso *et al.*, 2006). Il biostimolante *Trym* potrebbe aver agito aumentando la

conduttanza stomatica e determinando una maggiore traspirazione, inducendo una maggiore perdita di acqua a livello fogliare. Ciò spiegherebbe la riduzione di LA poiché il tasso di espansione fogliare può subire riduzione a causa di lievi deficit idrici che, tuttavia, non hanno ripercussioni sul processo fotosintetico (Tardieu *et al.*, 1999) e, sulla riduzione, anche se non significativa di SLA, generalmente inferiore in specie maggiormente tolleranti a carenza idrica (Tanentzap *et al.*, 2015).

Infine, è noto che l'impiego di biostimolanti possa indurre un aumento del contenuto di polifenoli in uva (Pardo-Garcia *et al.*, 2014). In questo studio, l'applicazione del fitostimolante *Trym* ha garantito un maggior accumulo di polifenoli nelle bacche di *V. vinifera* L. cv Aglianico, a prescindere dalla quantità di ossicloruro di rame utilizzato. Lo studio del contenuto di polifenoli fornisce informazioni utili sull'apporto del biostimolante sia in termini di produttività dei filari in esame sia in termini di qualità poiché i polifenoli influenzano significativamente il gusto dell'uva e del vino, nonché le proprietà organolettiche grazie alle loro note proprietà antiossidanti (De Nisco *et al.*, 2013; Pardo-Garcia *et al.*, 2014).

CAPITOLO 6. CONCLUSIONI

L'applicazione di strategie agricole non ecosostenibili sta provocando un deterioramento degli ecosistemi. Ciò comporta inevitabilmente una diminuzione della qualità dei servizi ecosistemici.

Negli ultimi tempi si è cercato di limitare l'utilizzo di pesticidi e fertilizzanti tramite l'applicazione di sostanze organiche di varia origine, i biostimolanti.

In viticoltura l'impiego di fitostimolanti potrebbe diminuire l'input dei principali fungicidi impiegati in questo campo che, essendo a base di rame, possono arrecare danni a vari comparti ambientali.

Questa tesi ha analizzato le eventuali conseguenze che l'uso di fitostimolanti (*Trym*, nel nostro caso) comporta su filari di *V. vinifera* L. cv Aglianico trattate con diverse dosi di ossicloruro di rame. Se da un lato si osserva un incremento dei pigmenti fotosintetici e dell'efficienza fotochimica per entrambe le tesi, dall'altro il biostimolante, non ha sortito significativi effetti sulle caratteristiche fogliari funzionali nelle piante nei diversi trattamenti.

È utile sottolineare che non esiste una composizione oggettiva di biostimolanti, i quali, al contrario, risultano essere molto eterogenei a seconda della loro composizione chimica e, quindi, degli effetti in grado di garantire. A ciò si aggiunge che la sensibilità nei confronti del biostimolante utilizzato può variare a seconda della specie, dello stadio di sviluppo, delle condizioni fisiologiche e ambientali così come dalle dosi e dai tempi di somministrazione. I risultati hanno mostrato un incremento di F_v/F_m e di pigmenti fotosintetici, come pure un arricchimento nel contenuto di polifenoli in uva sia nei filari trattati a dose completa di fungicida rameico che in quelli sottoposti a dose dimezzata. Questa conclusione ha importanti ripercussioni ecologiche, poiché indica che l'impiego di biostimolanti a base di estratti vegetali è in grado di ridurre l'input di pesticidi cuprici e garantire una maggior sostenibilità degli agroecosistemi ad uso viticolo del Mezzogiorno.

BIBLIOGRAFIA

Abdalla M. M. (2013) The potential of *Moringa oleifera* extract as a biostimulant in enhancing the growth, biochemical and hormonal contents in rocket (*Eruca vesicaria subsp. Sativa*) plants. International journal of plant physiology and biochemistry, 5 (3): 42-49.

Angeli D., Pertot I. (2007) L'oidio della vite.

Aquino S., D'Orefice M., Esposito L., Valletta M., Vitale V. (2008) Geologia e produzione vitivinicola: un contributo preliminare per la definizione dei terroir del comprensorio irpino (provincia di Avellino). Atti del Convegno internazionale "I paesaggi del vino" – Perugia, 8-10 Maggio 2008.

Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bézier A., Lambert B., Joubert J, Pugin A. (2003) Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Molecular plant-microbe interactions, 16 (12): 1118-1128.

Bernetti I., Menghini S., Marinelli N., Sacchelli S., Alampi Sottini V. (2012) Assessment of climate change impact on viticulture: Economic evaluations and adaptation strategies analysis for the Tuscan wine sector. Wine Economics and Policy, 1: 73–86.

Bertamini M., Nedunchezian N., Tomasi F., Grando M.S. (2003) Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments ribulose-1,5- biphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitisvinifera L. cv Chardonnay*) leaves. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61(6):357-366.

Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N. (2004) Effect of Grapevine Leafroll on the Photosynthesis of Field Grown Grapevine Plants (*Vitis vinifera* L. cv Lagrein). *Journal of Phytopathology*, (152):145-152.

Bhardwaj J. D., Ansari M. W., Sahoo R. K., Tuteja N. (2014) Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, 13: 66.

Björkman O., Demming B. (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170 (4): 489-504.

Blunden G., Jenkins T., Liu Y. (1997) Enhanced leaf chlorophyll levels in plants treated with seaweed extract. *Journal of applied phycology*, 8: 535-543.

Bohnert H. J., Sheveleva E. (1998) Plant stress adaptations – making metabolism move. *Current opinion in plant biology*, 1 (3): 267-274.

Bonfante A., Agrillo A., Albrizio R., Basile A., Buonomo R., De Mascellis R., Gambuti A., Giorio P., Guida G., Langella G., Manna P., Minieri L., Moio L., Siani T., Terribile F. (2015) Functional homogeneous zones (fHZs) in viticultural zoning procedure: an Italian case study on Aglianico vine. *Soil*, 1: 427-441.

Boubakri H., Ali Wahab M., Chong J., Bertsch C., Mliki A., Soustre-Gacougnolle I. (2012) Thiamine induced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine and elicited host-defence responses, including HR like-cell death. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 120-133.

Boubakri H., Poutauraud A., Wahab M. A., Clayeux C., Baltenweck-Guyot R., Steyer D., Marcic C., Mliki A., Soustre-Gacougnolle I. (2013) Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant biology*, 13: 31.

Brattsten L. B., Holyoke Jr. C. W., Leeper J. R., Raffa K. F. (1986) Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. *Science*, 231 (4743): 1255-1260.

Brown P., Saa S. (2015) Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 6: 671.

Bruggisser O. T., Schmidt-Entling Martin H., Bacher S. (2010) Effects of vineyard management on biodiversity at three trophic levels. *Biological Conservation*, 143: 1521–1528.

BS Coalition - <http://www.biostimulantcoalition.org/>.

Bulgari R., Cocetta G., Trivellini A., Vernieri P., Ferrante A. (2015) Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture*, 31 (1) 1–17.

Burney J. A., Davis S. J., Lobell D. B. (2010) Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. *PNAS*, 107 (26): 12052-12057.

Bussotti F., Kalaji M. H., Desotgiu R., Pollastrini M., Łoboda T., Bossa K. (2012) Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofilla. strumenti per la didattica e la ricerca. Firenze University Press.

Calvo P., Nelson L, Kloepper J.W. (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383 (1-2): 3-41.

Canellas L. P., Olivares F. L., Aguiar N. O., Jones D. L., Nebbioso A., Mazzei P., Piccolo A. (2015) Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196: 15-27.

Caputo A. R., Brini M. L., Gasparro M., Pepe R., Coletta A., Antonacci D. (2009) Recupero della biodiversità ampelografica dell'aglianico a tutela della qualità del paesaggio viticolo. Conference paper.

Catalogo generale delle varietà e dei cloni ad uva da vino e da tavola (2011)
Pubblicazione a cura di: Vivai Cooperativi Rauscedo sca.
www.vivairauscedo.com.

Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. (2003) Understanding plant response to drought – from genes to the whole plant – *Functional Plant Biology*, 30: 239-264.

Csefalvay L., Di Gaspero G., Matous K., Bellin D., Ruperti B., Olejnickova J. (2009) Pre-symptomatic detection of *Plasmopara viticola* infection in grapevine leaves using chlorophyllfluorescence imaging. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 291–302.

Chuan M. C., Shu G. Y., Liu J. C. (1996) Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potential and pH. *Water, air and soil pollution*, 90 (3-4): 543-556.

Cohen J. E. (2003) Human population: the next half century. *Science*, 302 (5648): 1172-1175.

Colla G., Rouphael Y., Canaguier R., Svecova E., Cardarelli M. (2014) Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in plant science*, 5, 448.

Cornelissen J. H. C., Lavorel S., Garnier E., Diaz S., Buchmann N., Gurvich D. E., Reich P. B., ter Steege H., Morgan H. D., van der Heijden A., Pausas J.G., Poorter H. (2003) A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 51: 335-380.

Costantini L., Monaco A., Vouillamoz J. F., Forlani M., Grandi M. S. (2005) Genetic relationships among local *Vitis vinifera* cultivars from Campania (Italy). *Vitis*, 44 (1): 25-34.

Craige J. S. (2011) Seaweed extracts stimuli in plant science and agriculture. *Journal of applied phycology*, 23 (3): 371-393.

Cropper M., Griffiths C. (1994) The interaction of population growth and environmental quality. *The American economic review*, 84 (2): 250-254.

D'Oronzio A. M., Verrascina M. (2012) Agrobiodiversità e produzioni di qualità in Basilicata. Attività di studio e di supporto metodologico per la realizzazione della Progettazione Integrata e del Programma di Sviluppo Rurale della Regione Basilicata 2007/2013.

Dagostin S., Schärer H., Pertot I., Tamm L. (2011) Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection*, 30 (7) 776-788.

Dagostin S., Formolo T., Giovannini O., Pertot I., Schmitt A. (2010) *Salvia officinalis* Extract Can Protect Grapevine Against *Plasmopara viticola*, *Plant disease*, 94 (5): 575-580.

De Lorenzis G., Imazio S., Biagini B., Failla O., Scienza A., (2013), Pedigree reconstruction of the Italian Grapevine Aglianico (*Vitis vinifera* L.) from Campania, *Molecula Biotechnology*, 54 (2): 634-642.

De Nisco M., Manfra M., Bolognese A., Sofò A., Scopa A., Tenore G., Pagano F., Milite C., Russo M.T. (2013) Nutraceutical properties and polyphenolic profile of berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. (c. Aglianico). *Food Chemistry*, 140(4): 623-629.

Deluisa A., Giandon P., Aichner M., Bortolami P., Bruna L., Lupetti A., Stringari G. (2007) Copper pollution in Italian vineyard soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1537-1548.

Devecchi M., Gullino P., Larcher F. (2016) Landscape and food: a mutualistic

simbiosi to be valued. Landscape Values, Place and praxis, Conference, Galway, 29th june – 2nd july, 90-93.

Dìaz-Leguizamòn J. J., Chingatè-Cruz O. F., Sàncnez-Reinoso A. D., Restrepo-Dìaz H. (2016) The effect of foliar applications of a biostimulant derived from algae extract on the physiological behavior of lulo seedlings (*Solanum quitoense* cv. Septentrionale). *Ciencia e investigacion agrarian*, 43 (1): 25-37.

Dinham B. (1993) The pesticide hazard: a global health and environmental audit.

Dirzo R., Raven P. H. (2003) Global state of biodiversity and loss. *Annual review of environment and resources*, 28: 137-167.

du Jardin P. (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196: 3-14.

EBIC - European Biostimulants Industry Council (2011)

<http://www.biostimulants.eu/>

Ertani A., Schiavon M., Muscolo A., Nardi S. (2013) Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant soil*, 364: 145-158.

Ertani A., Pizzeghello D., Francioso O., Tinti A., Nardi S. (2016) Biological activity of vegetal extracts containing phenols on plant metabolism. *Molecules*, 21 (2): 205.

Faretra F., Di Tonno A.P. (1991) Osservazioni sulla sensibilità di cultivar di Vite alla peronospora nell'ambiente dell'Italia meridionale. *Phytopathologia Mediterranea*, 30 (3): 173-176.

Garrido J. e Borges F. (2013) Wine and grape polyphenols – a chemical perspective. *Food Research International*, 54: 1844-1858.

Garnier E., Laurent G., Bellman A., Debain S., Berthelie P., Ducout B., Roumet C., Navas M.L. (2001) Consistency of species ranking based on functional traits. *New Phytologist*, 152: 69-83.

Garnier E., Shipley B., Roumet C., Laurent G. (2001b) A standardization protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Functional Ecology*, 15: 688-695

Gerland P., Raftery A. E., Sevcikova H., Li N., Gu Danan., Spoorenber T. (2014) World population stabilization unlikely this century. *Science*, 346, (6206): 234-237.

Gonzalez E., Mosquera M.V., San Josè M.C., Diaz T. (1997) Influence of Virus on the Chlorophyll, Carotenoid and Polyamine Contents in Grapevine Microcuttings. *Journal of Phytopathology* (145): 185-187.

Gutiérrez-Gamboa G., Romanazzi G., Garde-Cerdàn T., Pérez-Alvaréz E. P. (2018) A review of the use of biostimulants in the vineyard for improved grape and wine quality: effects on prevention of grapevine diseases. *Journal of the Science food and Agroculture*.

Hardwood R. R. (1990) A history of sustainable agriculture. *Sustainable agricultural systems*, 1: 3-19.

Helling B., Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2000) Effects of the Fungicide Copper Oxychloride on the Growth and Reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46 (1): 108-116.

Iacono F. (2005) Escursione termica giornaliera durante la maturazione dell'uva. *Terra Trentina*, 50 (1): 41-45.

Juang K. W., Yung-I Lee, Hung-Yu Lai, Chiung-Huei Wang, Bo-Ching Chen (2012) Copper accumulation, translocation, and toxic effects in grapevine cuttings. *Environmental Science and Pollution Research*, 19 (4): 1315-1322.

Khan W., Rayirath U. P., Subramanian S., Jithesh M. N., Rayorath P., Hodges D. M., Critchley A. T., Craige J. S., Norrie J., Prithiviraj B. (2009) Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of plant growth regulation*, 28 (4): 286-399.

Kitajima K., Hogan K. P. (2003) Increases of chlorophyll *a/b* ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, cell and environment*, 26: 857-865.

Kremen C., Williams N. M., Thorp R. W. (2002) Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *PNAS*, 99 (26): 16812-16816.

Lebeda A., Sedlarová M., Petrivalsky M., Prokopová J. (2008) Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. And *Bremialactucae*. *European Journal of Plant Pathology* (122):71-89.

Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148: 350-382.

Lichtenthaler H. K. (1988) In Vivo Chlorophyll Fluorescence as a Tool for Stress Detection in Plants. In: Lichtenthaler H. K. (eds) *Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing*. Springer, Dordrecht. pp: 129-142.

Lichtfouse E., Navarrete M., Debaeke P., Souchère V., Alberola C., Menassieu J. (2009) Agronomy for sustainable agriculture: a review. *Sustainable agriculture* 1-7.

Liu S., Zhang G., Li X., Wu P., Zhang J. (2015) Enhancement of *Rhodobacter sphaeroides* growth and carotenoid production through biostimulation. *Journal of environmental sciences*, 33 (1): 21-28.

Lucchi N. (2008) Il dibattito transatlantico sulla tutela delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine. *Rivista di diritto agrario*, 86: 49-76.

Mackie K.A., Müller T., Kandeler E. (2012) A Remediation of copper in vineyards - A mini review. *Environmental Pollution*, 167: 16-26

Mancuso S, Azzarello E, Mugnai S, Briand X. (2006) Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. *Advances in Horticultural Science*, 20 (2): 156–61.

Marenghi M. (2005) Manuale di viticoltura: impianto, gestione e difesa del vigneto. Il Edagricole-New Business Media, Icedata srl, Italy. Pagine 248.

Meynard J., Doré T., Lucas P. (2003) Approche agronomique: systèmes de culture et maladies des plantes. *Biologie et pathologie végétales*, 326: 37–46.

Misso R., Paola Borrelli I. (2013) *Wine system* e identità territoriale. *Economia & Diritto Agroalimentare*, 18: 97-113.

Moio L. (2014) L'Aglianico e la ricerca enologica. *L'enologo* 1.

Morando A., Guerico P. (1984) La peronospora della vite. *Vignevini* 4: 33-48.

Moutinho-Pereira J., Magalhaes N., Goncalves B., Bacelar E., Brito M., Correia C. (2007). Gas exchange and water relations of three *Vitis vinifera* L. cultivars growing under Mediterranean climate. *Photosynthetica*, 45(2): 202-207.

Mugnai S., Azzarello E., Pandolfi C., Salamagne S., Briand X., Mancuso S. (2008) Enhancement of ammonium and potassium root influxes by the application of marine bioactive substances positively affects *Vitis vinifera* plant growth. *Journal of applied Phycology*, 20 (2): 177-182.

Nicòtina M. (2003) Side effects of some fungicides on the population of *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Phytoseius finitimus* Ribaga sensu

Denmark (1966) (Parasitiformes, Phytoseiidae) on grapevines in Tuscany. *Advances in Horticultural Science*, 17 (2): 72-76.

Novara A., Gristina L., Saladino S.S., Santoro A., Cerda A. (2011) Soil erosion assessment on tillage and alternative soil managements in a Sicilian vineyard. *Soil & Tillage Research*, 117:140-147.

Núñez-Trujillo G., Cabrera R., Burgos-Reyes R. L., Silva E., Giménez C., Cosoveanu, A., Brito N. (2012) Endophytic fungi from *Vitis vinifera* L. isolated in Canary Islands and Azores as potential biocontrol agents of *Botrytis cinerea* Pers. *Fr. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16 (1): 1-6.

Nuzzo V., D'Onofrio C., Dell'Aglio M., Rotundo A. (2015) Aglianico. In: Italian Vitis Database, www.vitisdb.it, ISSN 2282-006X.

Oerke E. (2006) Crop losses to pests. *The journal of agricultural science*, 144 (1): 31-43.

Ordoñez J. C., Van Bodegom P. M., Witte J. P. M., Bartholomeus R. P., Van Hal J. R., Aerts R. (2010) Plant strategies in relation to resource supply in mesic to wet environments: does theory mirror nature? *American Naturalist* 175, 225–239.

Pardo-García A. I., Martínez-Gil A. M., Cadahía E., Pardo F., Alonso G. L., Salinas M. R. (2014) Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols. *Food research International*, 55: 150-160.

Pertot I., Dagostin S., Ferrari A., Gobbin D., Prodorutti D., Gessler C. (2007) *La peronospora della vite*, 2. ed.

Pertot I. (2012) Il progetto europeo co-free: Nuove strategie e prodotti per sostituire il rame in agricoltura. *Tecnica, ricerca e sperimentazione, Terra trentina* 1: 44-45.

Petit A. N., Fontaine F., Vatsa P., Clément C., Vaillant-Gaveau N. (2012) Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. *Photosynthesis Research*, 111 (3): 315–326.

Pierce S., Brusa G., Vagge I., Cerabolini L. (2013) Allocating plant functional types: the use of leaf economics and size traits to classify woody and herbaceous vascular plants. *Functional ecology*.

Pimentel D. (1996) Green Revolution agriculture and chemical hazards. *The science of the total environment*, 188 (1): S86-S98.

Portillo I., Berardi R., Flori P., Brunelli A. (2006) Attività antiperonosporica su pomodoro e vite di biostimolanti a base minerale, vegetale e animale. *Atti: Giornate Fitopatologiche*, 2: 417-422.

Provenzano M.R., El Bilali H., Simeone V., Baser N. (2006) Influenza delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo e della gestione fitosanitaria sulla concentrazione di solfati in oliveti e vigneti biologici della puglia, *Atti del XXIV Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria – Alghero*. 120-129.

Przybysz A., Gawronska H., Gajc-Wolska J. (2014) Biological mode of action of a nitrophenolates-based biostimulant: case study. *Frontiers in plant science*, 5: 713.

Robinson G. M. (2018) Globalization of agriculture. *Annual review of resource economics*, 10: 133-160.

Ruttan V. W. (1999) The transition to agricultural sustainability. *PNAS*, 96 (11): 5960-5967.

Scarpato D., Ardeleanu M. P., Borrelli I. P., Ianuario S., Misso R., Viola I. (2012) The italian agri-food system between competitiveness and territorial

sustainability: the case of Campania region. *Ekonomika Poljoprivrede*, 59 (3): 246-251.

Sebela D., Olejnicková J., Zupčanová A., Sotolar R. (2012) Response of grapevine leaves to *Plasmopara Viticola* infection by means of measurement of reflectance and fluorescence signals. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 60 (8): 229-238.

Sellers R. (2016) Would you pay a price premium for a sustainable wine? The voice of the Spanish consumer. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8: 10-16.

Serra S., Peretto R. (2015) La difesa del vigneto dalle malattie crittogamiche. Programma di Sviluppo Rurale 2007-2013 della Regione Sardegna Misura 111 – Progetto esecutivo STDR/PSR/111/2013/10 "Azioni informative per l'innovazione del comparto vitivinicolo in Sardegna".

Shipley B., Vile D., Garnier E., Wright J., Poorter H. (2005) Functional linkages between leaf traits and net photosynthetic rate: reconciling empirical and mechanistic models. *Functional Ecology* 19, 4, 602–615.

Sivčev B. V., Sivčev I. L., Ranković Vasić Z. Z. (2010) Natural process and use of natural matters in organic viticulture. *Journal of Agricultural Sciences*, 5 (2): 195-215.

Spinelli F., Fiori G., Noferini M., Sprocatti M., Costa G. (2010) A novel type of seaweed extract as a natural alternative to the use of iron chelates in strawberry production. *Scientia horticultrae*, 125 (3): 263-269.

Sulpizio R., Bonasia R., Dellino P., Mele D., Di Vito M. A., La Volpe L. (2010) The Pomici di Avellino eruption of Somma–Vesuvius (3.9 ka BP). Part II: sedimentology and physical volcanology of pyroclastic density current deposits. *Bull Volcanol*, 72:559–577.

Tanentzap F.M., Stempel A., Ryser P. (2015) Reliability of leaf relative water content (RWC) measurements after storage: consequences for in situ measurements. *Botany*, 93(9):535-541.

Tardieu F., Granier C., Muller B. (1999) Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are change in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?

Tempesta T., Arboretti G. R., Corain L., Salmaso L., Tomasi D., Boatto V. (2010) The importance of landscape in wine quality perception: An integrated approach using choice-based conjoint analysis and combination-based permutation tests. *Food Quality and Preference*, 21: 827–836.

Tweedy B. G. (1981) Inorganic sulfur as a fungicide. *Residue Reviews* 78: 43-68.

Terral J. F., Tabard E., Bouby L., Ivorra S., Pastor T., Figueiral I., Picq S., Chevance J. B., Jung C., Fabre L., Tardy C., Compan M., Bacilieri R., Lacombe T., This P. (2010) Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105 (3): 443-455.

Tilman D., Cassman K. G., Matson P. A., Naylor R., Polasky S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418: 671-677.

Tilman D., Balzer C., Hill J., Befort B. L. (2011) Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *PNAS*, 108 (50): 20260-20264.

Turner N. C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurements of plant water status. *Plant Soil*, 58(1-3): 339-366.

Valagara R. (1880) Relazione su l'agricoltura, la pastorizia e l'economia rurale del Principato Ulteriore da servire per l'inchiesta agraria governativa. (casa ed edizione)

Van Oosten M. J., Pepe O., De Pascale S., Silletti S., Maggio A. (2017) The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4: 5.

Vernieri P., Borghesi E., Ferrante A., Magnani G. (2005) Application of biostimulants in floating system for improving rocket quality. *Journal of food, agriculture e environment*, 3 (3-4): 86-88.

Vernieri P. Ferrante A., Borghesi E., Mugnai S. (2006) I biostimolanti: uno strumento per migliorare la qualità delle produzioni. *Fertilitas agrorum*, 1 (1): 17-22.

Vitousek P. M., Aber J. D., Howarth R. W., Likens G. E., Matson P. A., Schindler D. W., Schlesinger W. H., Tilman D. G (1997) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological society of America*, 7 (3): 737-750.

Wilson P. J., Thompson K., Hodgson J. G. (1999) Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New phytologist*, 143 (1): 155-162.

Xu C., Leskovar D. I. (2015) Effects of *A. nodosum seaweed* extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Scientia horticulturae*, 183: 39-47.

Yakhin O. I., Lubyantsev A. A., Yakhin I. A., Brown P. H. (2017) Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in plant science*, 7: 2049.

Zanzotto A., Morroni M., Patriarca E. R., Trevisiol F. (2012) Difesa antiperonosporica della vite con prodotti rameici e “penetranti” in strategia in zone ad alta incidenza di malattia. Atti: Giornate Fitopatologiche, 2: 459-466.

Zodape S. T., Gupta A., Bhandari S. C., Rawat S. C., Chaudhary D. R., Eswaran K., Chikara J. (2011) Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Journal of scientific & industrial research, 70: 215-219.