

Prove preliminari sull'applicazione del naso elettronico per la diagnosi precoce di *Plasmopara viticola*

Andrea Bellincontro*, Alessia Tomassini, Gabriele Chilosi, Andrea Vannini, Anna Maria Vettrano, Fabio Mencarelli

DIBAF, Università della Tuscia, Viterbo

Introduzione

Una delle voci di bilancio che maggiormente incide sui costi del settore vitivinicolo è la spesa sostenuta per la lotta alla peronospora della vite (*Plasmopara viticola*). Nonostante l'intenso uso di prodotti fitosanitari, i danni rilevabili sono decisamente significativi e, d'altro canto, l'elevato impiego di fitofarmaci contrasta con la tendenza della filiera vitivinicola a produrre vini salubri attraverso tecniche agronomiche e di trasformazione ecosostenibili. *Plasmopara viticola* è un patogeno biotrofo, dotato di strettissima affinità con l'acqua, che può dar luogo a danneggiamenti a carico di tutte le parti vegetative della pianta: germogli, foglie e grappoli. Le infezioni di tipo primario (sessuale) sono seguite da cicli secondari (asessuali) e, comunemente, i due cicli possono sovrapporsi nel corso della stagione. È dimostrato che la germinazione delle oospore è scalare durante la stagione vegetativa e l'inoculo derivante dalle oospore è molto virulento e può permanere nel vigneto per più anni (Caffi et al., 2009). La presenza di un patogeno è spesso associabile al rilascio di marcatori volatili (VOCs), derivabili dal metabolismo dello stesso o da una risposta da parte della pianta allo stress biotico subito (Jansen et al., 2009). Il naso elettronico ed i sensori ad esso abbinati hanno una loro funzionalità applicativa come mezzi di rilevazione analitica, relativamente rapida e non-distruttiva, della presenza di composti aromatici (Baietto et al., 2013). Abbinati a tecniche chemiometriche, possono diventare degli strumenti di rilevazione, possibilmente in stadio precoce, dell'infezione, basati sulla rilevazione degli stessi VOCs.

Materiali e metodi

L'identificazione dei VOCs prodotti durante il processo infettivo di *Plasmopara v.* è stata eseguita al GC-MS secondo un metodo in SPME in spazio di

testa ottenuto all'interno di barattoli in vetro opportunamente dotati di setti perforabili. Sono state impiegate foglie prelevate da plantule di *Vitis v.* var. Grechetto (clone G109) allevate in cella climatica ed inoculate con *Plasmopara v.* in momenti diversi: 1) 3 giorni prima delle acquisizioni (inoculo 3gg); 2) una settimana prima delle acquisizioni (inoculo 7gg). Il medesimo spazio di testa è stato contestualmente analizzato mediante un naso artificiale (E-Nose), della tipologia QMB (Quartz Micro-Balance sensors), opportunamente adattando il protocollo riportato in Santonico et al. (2010). Dalle determinazioni GC-MS sono stati desunti alcuni markers volatili non caratterizzati quantitativamente, ma valutati in forma di abbondanza relativa; differenti tempi di accumulo in spazio di testa hanno costituito una significativa variabile sperimentale. Risposta gascromatografica e dati ottenuti dalle misure E-nose sono stati valutati statisticamente in pattern recognition via analisi delle componenti principali (PCA).

Risultati e discussione

Le analisi gascromatografiche hanno evidenziato la presenza di alcuni VOCs che sembrano essere associabili alla presenza di *Plasmopara v.*: l'etilbenzene, più sensibile in foglie inoculate da 7gg e l'acido 2-amino-6-metilbenzoico, senza tuttavia differenze significative tra campioni inoculati e controllo (tab. 1), così come il 2,2-dimetildecano che si presentava molto concentrato nell'inoculo 3gg, mentre praticamente scompariva in campione inoculato 7gg, attestandosi su concentrazioni più basse di quanto osservabile in controllo. Il 6-nitro-triciclo [10.2.2.2(5,8)]octadeca-5,7,12,14,15,17 esano era presente in foglie ad entrambi gli stadi di inoculo (dato non mostrato), sebbene a sostanzialmente basse concentrazioni. Altro composto marcante, particolarmente in foglie inoculate da 3gg, si è rivelato essere il 12,3 D-limonene (tab. 1), VOC che ha manifestato un incremento nel rilascio da parte delle foglie attaccate

* bellin@unitus.it

in stadio giovane di inoculo (3gg), rispetto a quanto osservabile sul controllo costituito da foglie esenti dal fungo. E' nota l'azione dei volatili ascrivibili alla categoria terpenoidi come messaggeri di eventi stressanti (biotici ed abiotici) a carico delle piante (Morath *et al.*, 2012) e si ipotizza, quindi, una risposta istantanea della foglia all'attacco della spora, combinata ad un rilascio del volatile a seguito dello stress da ferita imputabile al distacco fogliare. Le misure al naso artificiale, effettuate sui medesimi spazi di testa analizzati al GC-MS previa normalizzazione e autoscaling del dato, sono state sottoposte alla PCA; i pattern volatili ne risultano discriminati e clusterizzati come differenti tra loro (fig. 1A). Si evidenzia, per altro, una sovrapposibilità con la segregazione campionaria derivante dalle acquisizioni al GC-MS (fig. B). I risultati ottenuti dimostrano la capacità discriminativa delle metalloporfirine costituenti i sensori del nose, tra campioni di controllo e a differente stadio di inoculo, in relazione a VOCs specifici aventi possibile carattere di markers della presenza di *Plasmopara*. Allo stato attuale, è in sede di sperimentazione la trasferibilità dei metodi in pianta, direttamente in situ, con l'obiettivo di rendere i sensori in grado di rilevare la presenza, in stadio precoce, dell'infezione.

Conclusioni

Sono stati rilevati composti volatili a cui è potenzialmente attribuibile il ruolo di marcatori di *Plasmopara v.* anche in stadio precoce di inoculo. I sensori di un naso artificiale di nuova generazione per dimensioni e maneggevolezza di impiego, sono in grado di detectare le molecole aromatiche rilasciate in tali contesti e possono diventare strumenti funzionali all'individuazione della presenza di un potenziale rischio di inoculo.

Bibliografia

- CAFFI T., ROSSI V., BUGIANI R., SPANNA F., FLAMINI L., COSSU A., NIGRO C., 2009. *A model predicting primary infections of Plasmopara viticola in different grapevine-growing areas of Italy.* J. Plant Pathol. 91: 535–548.
- JANSEN R.M.C., MIEBACH M., KLEIST E., VAN HENTEN E.J., WILDT J., 2009. *Release of lipoxygenase products and monoterpenes by tomato plants as an indicator of Botrytis cinerea-induced stress.* Plant Biol. 11: 859-868.
- BLASIOLI S., BIONDI E., BRASCHI I., MAZZUCCHI U., BAZZI C., GESSA C.E., 2010. *Electronic nose as an innovative tool for the diagnosis of grapevine crown gall.* Anal. Chim. Acta 672: 20–24.
- SANTONICO M., BELLINCONTRO A., DE SANTIS D., DI NATALE C., MENCARELLI F., 2010. *Electronic Nose to study postharvest dehydration of wine grapes.* Food Chem. 121(3): 789-796.
- MORATH S.U., HUNG R., BENNETT J.W., 2012. *Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential.* Fungal Biol. Rev. 26: 73-83.

Tab. 1 - Principali VOCs presenti nei profili dei campioni fogliari analizzati al GC-MS e riportati come abbondanza relativa. (T.A. = tempo di accumulo in spazio di testa; T.E. = tempo esposizione fibra).

Tab. 1 - Main VOCs detected by GC-MS in the head space of leaf samples and reported as relative abundance. (T.A. = accumulation time in head space; T.E. = time of fiber exposition).

Parametri	Controllo			Inoculato 3gg			Inoculato 7gg		
	1 + 1	2 + 1	5 + 1	1 + 1	2 + 1	5 + 1	1 + 1	2 + 1	5 + 1
Etilbenzene	0	0	0	55938	8361	0	90812	0	0
Acido 2-Amino-6-metilbenzoico	38336	0	0	42908	0	0	54083	0	0
2,2-Dimetildecano	54566	58787	47606	286248	296574	170798	13130	9090	57225
D-Limonene	71547	84015	101616	155087	158178	127697	0	0	0

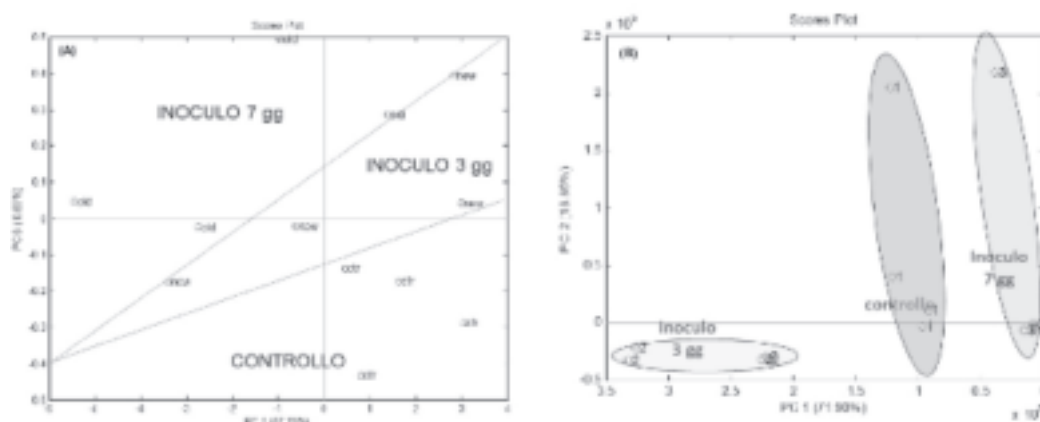


Fig. 1 - Score plots delle PCA delle misure all'E-nose (A) e dei VOCs al GC-MS (B). Controllo=ctr; inoculo 3 gg=new; inoculo 7 gg=old.
Fig. 1 - PCA score plots calculated on E-nose detections (A) and on VOCs detected by GC-MS (B). Control = ctr; inoculum at 3 days=new; inoculum at 7 days = old.