



Progetto di ricerca: Efficacia di prodotti fitosanitari di sintesi e a base di BCA contro *Stemphylium vesicarium*, agente causale della maculatura bruna del pero

Proponenti

Regione Veneto – Unità Organizzativa Fitosanitario
Università di Padova - Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali (UNIPD – TESAF)

Responsabile scientifico

Luca Sella (UNIPD – TESAF)

Durata del progetto

6 mesi

Stato dell'arte

La principale malattia fungina delle varietà autunnali di pero europeo (*Pyrus communis* L.) è la maculatura bruna, in grado di causare danni produttivi rilevanti in annate con condizioni climatiche o in situazioni ambientali favorevoli. Le varietà più suscettibili coltivate nella Pianura padana sono, in ordine di importanza per superfici coltivate: Abate Fetel, Conference, Kaiser, Decana, Angelys. Il fungo responsabile della maculatura bruna è stato identificato come *Stemphylium vesicarium* Wallr. Simm., forma agamica dell'ascomicete *Pleospora allii*. *S. vesicarium* è riportato nella letteratura fitopatologica anche come agente responsabile di malattia su diverse altre colture (aglio, cipolla, asparago, mango). Per quanto riguarda il pero, è stato dimostrato che la patogenicità del fungo è legata all'azione di tossine di tipo ospite-specifico, che giocano un ruolo chiave nelle prime fasi del processo infettivo. Queste tossine agiscono sulla membrana plasmatica vegetale inducendo una rapida perdita di elettroliti, con conseguente necrosi localizzata delle cellule degli organi verdi della pianta: foglie, rametti, frutti.

A differenza di altri importanti funghi fitopatogeni di interesse agrario, *S. vesicarium* è in grado di crescere e moltiplicarsi anche come saprofita su residui vegetali ed altro materiale organico di specie erbacee, come ad esempio il materiale in decomposizione che deriva dalla periodica trinciatura del cotico erboso presente nelle interfila del frutteto. Durante i mesi primaverili ed estivi, le spore asexuate del fungo si diffondono nell'ambiente: quando raggiungono gli organi dell'ospite suscettibile innescano, se vi sono le condizioni favorevoli di temperatura e bagnatura, il processo infettivo. Le infezioni possono avvenire di continuo, anche in assenza di piogge, in condizioni di 6-8 ore di bagnatura notturna e temperature attorno ai 20 °C.

Attualmente, il controllo di questo patogeno è basato sostanzialmente sulla difesa chimica, che comporta un numero elevato di interventi fungicidi nel periodo che va dalla fioritura fino alla raccolta. Fino a qualche anno fa, grazie alle conoscenze tecniche e alla buona efficacia dei prodotti a disposizione, la maculatura del pero è stata ben controllata. Negli ultimi anni la situazione è cambiata, presumibilmente per andamenti stagionali che hanno favorito un progressivo aumento dell'inoculo. Nel 2018 sono aumentate nettamente le segnalazioni di danni importanti sui frutti, che risultavano colpiti già verso la fine di maggio; nel 2019 si è avuto un ulteriore incremento delle aziende interessate e della percentuale di danno. Nel corso del 2020, negli appezzamenti interessati l'anno precedente, in molti casi sono state adottate soluzioni agronomiche quali la rottura del cotico erboso oppure tecniche di sanificazione del cotico stesso (pirodiserbo o distribuzione di funghi antagonisti, calciocianamide o solfato ferroso). Inoltre si è cercato di adottare una strategia di difesa mirata, usando al meglio i prodotti a disposizione. Nonostante ciò, la maculatura, apparentemente ben contenuta nella prima fase della stagione, ha fatto la sua ricomparsa in estate, interessando in particolare la varietà Abate. La malattia si è manifestata in prevalenza nella forma di marciume calicino. Con l'avvicinarsi dell'epoca di raccolta, il sintomo è andato rapidamente aumentando, con perdite spesso sopra il 30%.



2519b7e2



La problematica ha interessato tutte le principali aree di coltivazione della pianura padana, con situazioni più meno gravi a seconda delle condizioni climatiche dei diversi areali, in particolare legate alla durata complessiva delle ore di bagnatura e alle piogge.

Le principali attività di ricerca sul comportamento e sul controllo della maculatura sono state condotte dal Servizio Fitosanitario della Regione Emilia-Romagna e dal gruppo di ricerca in Patologia vegetale del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna.

Nel biennio 2021-2022 è stato avviato un progetto in collaborazione tra Regione Veneto - Unità Organizzativa Fitosanitario e Università di Padova - Dipartimento Territorio e Sistemi Agroforestali (TESAF) con l'obiettivo di migliorare le conoscenze relative all'agente causale della maculatura bruna del pero, *Stemphylium vesicarium*, al fine di contribuire ad individuare le cause della recrudescenza della malattia e le possibili soluzioni, anche di carattere agronomico.

In particolare, il piano sperimentale aveva l'obiettivo di i) valutare l'effetto della diversa gestione del cotico erboso sulla quantità di spore fungine afferenti ai generi *Stemphylium* e *Alternaria* presenti in campo e sull'incidenza dei sintomi di maculatura bruna laterale e calicina e ii) di isolare i funghi presenti nei marciumi dei frutti sintomatici.

Le attività di ricerca svolte nel corso del biennio hanno confermato il ruolo primario di *Stemphylium vesicarium* nello sviluppo dei sintomi di maculatura bruna su pere della cv. Abate Fetel, anche se dai frutti sintomatici sono stati a volte isolati altri potenziali agenti di marciumi, tra cui *Alternaria* spp.

I risultati del biennio hanno inoltre messo in risalto l'influenza della gestione del cotico erboso sull'incidenza dei sintomi di maculatura bruna. In particolare, la lavorazione del cotico, se applicata correttamente nel corso della stagione, è risultata una strategia agronomica molto efficace nel ridurre l'incidenza della malattia.

I dati raccolti sul numero di spore presenti nelle tesi a diversa gestione del cotico non hanno evidenziato correlazioni tra gestione del cotico e densità di inoculo fungino. Con la metodologia utilizzata non è possibile stabilire se le spore di *Stemphylium* spp. catturate siano o meno della specie *S. vesicarium* e se siano o meno virulente. Inoltre, non si può escludere che l'inerbimento del cotico possa influenzare l'umidità relativa micro-ambientale con conseguenze dal punto di vista epidemiologico.

Come evidenziato da precedenti ricerche svolte dalla Prof. Collina (UniBo), l'isolamento da frutti sintomatici di ceppi di *S. vesicarium* resistenti o con minore sensibilità ad alcuni prodotti fitosanitari mono-sito correntemente utilizzati su pero contro la maculatura bruna suggerisce la necessità di limitare l'uso di questi principi attivi o di utilizzarli in miscela con altri principi attivi a minor rischio di resistenza.

Prove preliminari con prodotti a base di agenti di biocontrollo (BCA) hanno dimostrato un potenziale effetto antagonista svolto dai batteri *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens* contro numerosi ceppi di *S. vesicarium* e *Alternaria* spp. isolati da frutti sintomatici.

Obiettivo/Attività

Data la scarsità di frutti in campo causata da fenomeni di gelate tardive e grandinate che hanno colpito le aree di coltivazione del pero nella Regione Veneto, il progetto, in collaborazione con l'U.O. Fitosanitario, mira a valutare l'efficacia anti-maculatura bruna di prodotti fitosanitari a base di microrganismi antagonisti sia in vitro che in vivo al fine di mettere a punto il prossimo anno un efficace approccio di difesa integrata in campo. Inoltre, il progetto si propone di acquisire ulteriori informazioni sull'eventuale presenza e frequenza di ceppi di *Stemphylium vesicarium* e *Alternaria* spp. tolleranti o resistenti ai prodotti fitosanitari mono-sito attualmente utilizzati su pero per poter valutare efficaci misure di gestione del rischio resistenze.

Le attività proposte nel corso del 2023 sono le seguenti:

- 1) Prove di efficacia antagonista in vitro e in vivo di prodotti fitosanitari a base di BCA batterici nei confronti di ceppi di *S. vesicarium* e *Alternaria* isolati in campo da frutti sintomatici.



2519b7e2



- 2) Prove di efficacia in vitro contro *S. vesicarium* e *Alternaria* dei principali fungicidi mono-sito attualmente autorizzati su pero contro la maculatura bruna del pero

Metodiche di lavoro

Il lavoro si articola in 4 Working Packages (WP), come di seguito descritto:

1) Analisi fitopatologiche

I ceppi fungini patogeni verranno isolati da frutti sintomatici entro 48 ore dalla raccolta. Frammenti di tessuto sintomatico verranno sterilizzati e posti in piastre Petri contenenti un substrato a base di patata-destrosio-agar (PDA) addizionato con antibiotici per consentire la crescita e l'isolamento dei funghi presenti nel tessuto sintomatico. L'identità di tutte le specie fungine isolate verrà stabilita attraverso osservazioni al microscopio delle strutture riproduttive dei funghi e mediante l'utilizzo di metodiche molecolari. In particolare, si procederà all'estrazione del DNA genomico degli isolati fungini e alla successiva amplificazione mediante PCR delle sequenze ITS1 e ITS2 del DNA ribosomiale. Gli ampliconi ottenuti verranno quindi sequenziati presso BMR Genomics e le sequenze ottenute saranno sottoposte ad analisi "blast" presso il database di NCBI per l'identificazione a livello di genere e specie.

2) Valutazione dell'efficacia di BCA batterici in vitro contro *S. vesicarium* e *Alternaria* spp.

Si effettueranno delle prove di efficacia antagonista in vitro nei confronti di ceppi di *S. vesicarium* e *Alternaria* isolati da frutti sintomatici come descritto al punto 1). In particolare, si testeranno prodotti fitosanitari a base di BCA batterici *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens* registrati per la difesa contro la maculatura bruna del pero. A tal fine, sulla superficie di piastre Petri contenenti terreno di coltura PDA verranno distribuiti 100 µl di sospensione contenenti circa 200 spore di *S. vesicarium* e *Alternaria* spp. e 100 µl di sospensione dell'agente di bio-controllo a diverse dosi. Dopo 3 giorni di incubazione in termostato a 23 °C si valuterà la crescita del micelio fungino.

3) Prove dell'efficacia di BCA batterici in vivo contro *S. vesicarium* e *Alternaria* spp.

Il prodotto a base di BCA identificato come più efficace in vitro verrà utilizzato per trattare foglie e/o frutti della cv. Abate Fetel 24 ore prima dell'inoculo con ceppi patogeni di *S. vesicarium* al fine di verificarne l'efficacia in vivo nell'ottica di un suo futuro utilizzo in pieno campo.

4) Prove dell'efficacia dei fungicidi in vitro contro *S. vesicarium* e *Alternaria* spp.

I ceppi fungini di *S. vesicarium* e *Alternaria* spp. isolati da frutti sintomatici come descritto al punto 1) verranno saggiati per la loro sensibilità ai principali fungicidi mono-sito attualmente autorizzati su pero (a titolo di esempio, Fluazinam, Fludioxonil, Cyprodinil Pyrimethanil, Trifloxystrobin, Pyraclostrobin, Boscalid, Fluopyram, Fluxapyroxad, Tebuconazolo). In particolare, verranno eseguiti dei saggi di crescita in vitro utilizzando sia spore che frammenti di agar colonizzato con micelio al fine di calcolare la percentuale di germinazione delle spore e la crescita di micelio rispetto ad un testimone allevato in piastre di controllo senza fungicidi.

Risultati attesi

Grazie alle attività in programma nel 2023 verranno acquisite informazioni relative all'efficacia antagonista di prodotti fitosanitari a base di BCA nei confronti di ceppi di *S. vesicarium* e *Alternaria* spp. isolati da frutti sintomatici della cv. Abate Fetel. Inoltre, si otterranno informazioni sull'eventuale presenza e frequenza di ceppi tolleranti o resistenti ai prodotti fitosanitari mono-sito attualmente utilizzati su pero. Questi risultati consentiranno di identificare i prodotti fitosanitari potenzialmente più efficaci nel bloccare lo sviluppo delle infezioni e forniranno quindi utili indicazioni per la messa a punto di strategie di gestione fitosanitaria del pereto in grado di ridurre l'incidenza della maculatura bruna.



2519b7e2



Cronoprogramma

Attività	2023											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1) Analisi fitopatologiche												
2) Valutazione efficacia di BCA batterici in vitro contro S. vesicarium e Alternaria spp.												
3) Prove efficacia di BCA batterici in vivo contro S. vesicarium e Alternaria spp.												
4) Prove efficacia fungicidi in vitro contro S. vesicarium e Alternaria spp.												

Impegno Finanziario biennale

Obiettivo/Azione	UniPd – TESAF	Importo €
1) Analisi fitopatologiche	<ul style="list-style-type: none"> Analisi frutti sintomatici Isolamento ceppi patogeni e identificazione molecolare Elaborazione dati e produzione report 	5.000
2) Valutazione efficacia di BCA batterici in vitro	<ul style="list-style-type: none"> Analisi efficacia BCA batterici nei confronti di ceppi fungini di S. vesicarium e Alternaria mediante saggi in piastra Elaborazione dati e produzione report 	2.500
3) Prove efficacia di BCA batterici in vivo	<ul style="list-style-type: none"> Analisi efficacia BCA batterici nei confronti di ceppi fungini di S. vesicarium e Alternaria mediante trattamenti e inoculi di foglie e frutti (cv. Abate Fetel) Elaborazione dati e produzione report 	2.500
4) Prove efficacia fungicidi in vitro	<ul style="list-style-type: none"> Analisi sensibilità di ceppi fungini di S. vesicarium e Alternaria spp. a diversi fungicidi Elaborazione dati e produzione report 	5.000
Totale		15.000



2519b7e2

