

● PROVE DI DIFESA SU CULTIVAR SANTA MARIA

Pero: consorzi microbici contro il colpo di fuoco

di E. Verzelloni, V. Catalano,
D. Giovanardi, L. Dondini,
E. Stefani

Da anni, ormai, l'attenzione e la consapevolezza degli agricoltori e dei consumatori sulle tematiche inerenti alla salute e alla sana alimentazione è alta, così come quella dell'importanza sempre crescente della salvaguardia degli agro-ecosistemi.

L'ottimizzazione delle pratiche colturali che prevedono, *in primis*, l'uso di agrofarmaci a basso impatto ambientale appare come il metodo più naturale, sicuro ed economico per migliorare la qualità delle produzioni ortofrutticole, permettendo, inoltre, di mettere in relazione i temi della salute umana e della corretta alimentazione con i concetti di ecologia e salvaguardia ambientale.

Una corretta applicazione di agrofarmaci biologici, poi, oltre che a migliorare la resa delle colture, può consentire anche una naturale stimolazione delle difese endogene della pianta nei



LA LOTTA al colpo di fuoco delle pomacee è oggi basata sulla scelta di materiale di propagazione certificato, su corretti interventi agronomici e sull'uso di prodotti a base rameica. Sul mercato sono disponibili alcuni prodotti a base microbica, classificati come fertilizzanti naturali, contenenti un ampio consorzio microbico utili per migliorare la produttività di numerose colture. Le prove condotte in un triennio di sperimentazione in campo e attraverso uno studio di espressione genica in pero hanno indagato le potenzialità che il consorzio microbico offre nella lotta alla grave batteriosi evidenziando un'ottimale capacità di contenere il batterio e una possibile induzione di resistenza.

confronti dei propri patogeni, riducendo in tal modo anche la spesa annua per l'acquisto degli agrofarmaci.

In questo contesto si riporta uno studio triennale per la valutazione di una formulazione commerciale a base di un ampio consorzio microbico (Micosat F®) nella lotta al colpo di fuoco del pero causato dal batterio *Erwinia amylovora*.

Tale valutazione ha preso in considerazione non solo l'efficacia del prodotto in campo, ma anche la possibilità che i consorzi microbici presenti nel prodotto potessero stimolare l'espressione di sequenze geniche in pero coinvolte in fenomeni di resistenza indotta ai patogeni.

Tali prove hanno avuto una durata complessiva di tre anni (dall'autunno 2012 a fine estate 2015), al fine di comprovare l'attività del prodotto nel contrastare il colpo di fuoco in campo e,

La sperimentazione

La sperimentazione con consorzi microbici ha previsto sia prove di lotta in campo, in un frutteto commerciale e sotto la supervisione del Consorzio fitosanitario provinciale di Reggio Emilia, sia prove di laboratorio inerenti allo studio della espressione genica in pero.

Tali prove hanno avuto una durata complessiva di tre anni (dall'autunno 2012 a fine estate 2015), al fine di comprovare l'attività del prodotto nel contrastare il colpo di fuoco in campo e,



Foto 1 Foto aerea del pereto, cultivar Santa Maria, presso Rubiera (Reggio Emilia) dove è evidenziata la porzione di circa un ettaro nella quale si sono svolte le prove sperimentali. Fonte: Google Earth.

parallelamente, saggiare la capacità di tali consorzi microbici di stimolare fenomeni di resistenza alla batteriosi in pianta.

Caratteristiche del frutteto

Per le prove in campo è stato scelto un frutteto con gravi problemi di colpo di fuoco, segnalato dal Consorzio fitosanitario provinciale di Reggio Emilia, con un'incidenza della malattia di oltre il 30% e numerose piante abbattute. L'impianto scelto ha un'estensione di oltre 5 ha nel comune di Rubiera (Reggio Emilia) e un'età di 4 anni all'inizio delle prove (foto 1).

La cultivar presente nell'impianto è Santa Maria, notoriamente molto suscettibile al colpo di fuoco. La prova con consorzi microbici ha interessato una porzione di circa 1 ha del frutteto in questione, quella più duramente colpita dalla malattia.

Prove di laboratorio

La sperimentazione di laboratorio ha avuto lo scopo di individuare eventuali sequenze geniche differenzialmente espresse nelle piante di pero a seguito di trattamento fogliare con il consorzio microbico, al fine di chiarire una possibile induzione, nelle piante trattate, di resistenza sistemica acquisita (Sar).

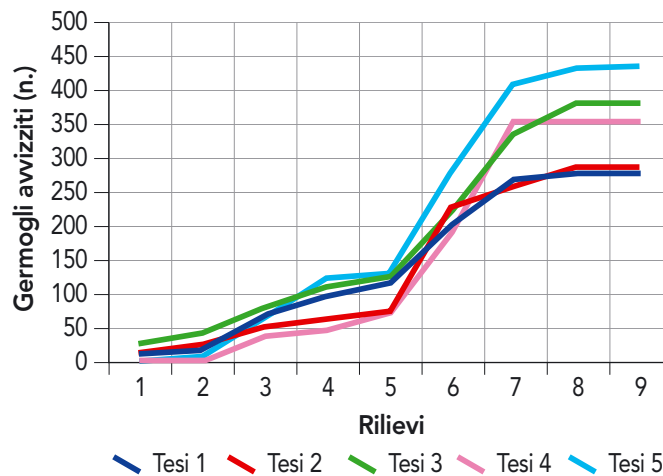
In questo caso il trattamento su Santa Maria è stato effettuato in ambiente controllato presso il Servizio fitosanitario regionale di Bologna.

Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare la capacità dei consorzi microbici contenuti nel prodotto testato non solo di proteggere la coltura in pieno campo dalla grave batteriosi, ma anche di agire come prodotto in grado di attivare e far esprimere alla coltura uno stato di resistenza indotta di durata sufficiente a proteggerla dalla malattia.

Tesi in prova

Lo schema sperimentale seguito durante le prove era composto di cinque tesi, ciascuna delle quali composta da cinque repliche di 20 piante. Tra una replica e l'altra erano presenti bloc-

GRAFICO 1 - Incremento del colpo di fuoco in un pereto reggiano, cv. Santa Maria



I dati mostrati nel grafico sono riferibili alla prima stagione sperimentale. **Tesi 1:** trattamento con prodotto a base di un consorzio microbico (Micosat F). **Tesi 2:** trattamento con un fungicida/battericida microbiologico a base di *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (Amylo-X). **Tesi 3:** trattamento con poltiglia bordolese al 20% di rame metallo (Selecta Disperss®). **Tesi 4:** trattamento aziendale. **Tesi 5:** testimone non trattato.

La tesi 1 e 2 sono paragonabili per quanto riguarda la capacità di contenere il colpo di fuoco batterico.

chi di 20 piante non trattate, per un numero totale di piante, trattate e di controllo, pari a 1.000.

La scelta delle tesi è stata fatta considerando i prodotti e le strategie comunemente seguite nella lotta al colpo di fuoco batterico del pero nel Reggiano. In ciascuna delle tesi 1, 2 e 3 veniva saggiato un solo prodotto contro la batteriosi.

Le tesi incluse nella sperimentazione erano le seguenti.

● **Tesi 1: trattamento con prodotto a base di un consorzio microbico** (Micosat F) secondo il seguente protocollo: applicazione radicale del prodotto a dicembre, distribuendolo lungo il solco formato da un assolcatore, in quantità di 50-60 kg/ha; 5 trattamenti fogliari per aspersione, da aprile a luglio e con cadenza di 15-18 giorni, iniziando dopo la caduta petali fino a circa tre settimane dalla raccolta, nella quantità di 4-5 kg/ha.

● **Tesi 2: trattamento con un fungicida-battericida microbiologico a base di *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*** (Amylo-X). È stato distribuito secondo le raccomandazioni descritte in etichetta.

● **Tesi 3: trattamento con poltiglia bordolese al 20% di rame metallo** (Selecta Disperss®), impiegata alla dose di 400 g/hL in prossimità di forti piogge,

con o senza grandine.

● **Tesi 4: trattamento aziendale**, come da disciplinare Regione Emilia-Romagna per il controllo delle avversità del pero.

● **Tesi 5: testimone**, nessun trattamento specifico per le avversità biotiche.

Monitoraggio della batteriosi

Il monitoraggio della malattia è stato eseguito settimanalmente, dal giorno del primo trattamento fogliare fino alla raccolta del frutto.

Durante il monitoraggio venivano ispezionate le piante una a una, ricercando e numerando i germogli che sviluppavano sintomi di colpo di fuoco: tali germogli (foto 2) venivano annotati e potati via.

Per ogni replica di ogni singola tesi il numero dei germogli sintomatici è stato calcolato e sommato a quello dei

rilievi precedenti, in modo da ottenere, a fine periodo ispettivo, una quantità totale di malattia per replica e una incidenza della stessa.

Risultati delle prove in campo

Le prove in campo hanno evidenziato risultati ottimali in merito al controllo della malattia: già dopo il primo anno la malattia era regredita rispetto agli anni precedenti.

In particolar modo, la gravità della malattia era sensibilmente calata nelle parcelle della tesi 1, con una somma di 257 germogli avvizziti al termine della prima stagione vegetativa, rispetto alla tesi controllo non trattato, che evidenziava 408 germogli avvizziti in totale: pertanto, la quantità di malattia era diminuita del 37% durante la prima stagione del trattamento (grafico 1).

Durante la seconda stagione vegetativa, i sintomi di colpo di fuoco comparivano sporadicamente, non superando la quindicina di germogli avvizziti per la tesi più colpita.

Durante il terzo anno della sperimentazione non è stato rilevato nel pereto alcun sintomo associabile al colpo di fuoco.

Le differenze di quantità di malattia

tra la **tesi 1** (trattate con il consorzio microbico) e le tesi trattate con il prodotto rameico (**tesi 3**) o che hanno seguito il disciplinare aziendale (**tesi 4**) sono state rilevanti e statisticamente significative. La **tesi 2** ha avuto una performance simile a quella evidenziata nella **tesi 1**.

I dati raccolti durante i tre anni di sperimentazione in campo hanno messo in luce l'efficacia del prodotto a base di un consorzio microbico in un contesto produttivo commerciale.

Chiaramente, avendo monitorato il pereto settimanalmente per tre stagioni produttive e tagliato ogni parte sintomatica visibile, alla fine del terzo anno di sperimentazione la malattia era praticamente scomparsa da tutto l'impianto.

Tale intensa attività di monitoraggio e potatura, però, spesso non viene effettuata con sufficiente accuratezza e intensità dal frutticoltore che, in primo luogo, ricerca e si affida a un prodotto antibatterico affidabile ed efficace nella lotta alla malattia.

Attivazione resistenza indotta

L'efficace controllo del colpo di fuoco ottenuto con il prodotto a base di un consorzio microbico in un pereto commerciale ha stimolato una ricerca che aiutasse a comprendere alcune pos-

sibili modalità di azione dei consorzi microbici contenuti.

Pertanto, si sono svolte alcune prove in ambiente controllato per verificare se il prodotto commerciale avesse un'attività stimolante l'espressione genica di sequenze presenti in pero, in gran parte già note, coinvolte in fenomeni di resistenza indotta ai patogeni.

Questo aspetto è stato studiato su piante di pero della varietà S. Maria, di tre anni di età e poste in ambiente controllato.

Tesi in prova

Le tesi considerate per le prove in ambiente controllato sono state due.

● **Tesi 1: trattamento con prodotto a base di un consorzio microbico** (Micosat F) alla concentrazione di 6 g/L, distribuito per aspersione sovrachio-ma durante il pieno sviluppo vegetativo (inizio luglio).

● **Tesi 2: trattamento per aspersione con acqua** di fonte come tesi di controllo.

Rilievi e test effettuati

Per ciascuna tesi sono stati considerati tre blocchi randomizzati, ciascuno di 3 piante (repliche). Il campione prelevato per le analisi molecolari era composto di 3 foglie per replica. Le foglie sono state raccolte a tempi

diversi: immediatamente dopo il trattamento (tempo 0) e dopo 2, 4, 8, 24, 48, 120 ore.

I campioni raccolti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido (-195°C) per bloccare ogni tipo di reazione fisiologica e biochimica del tessuto fogliare e, in seguito, posti in congelatore a -85°C fino al momento dell'analisi di espressione genica.

La tecnica usata per lo studio trascrittomico è stata quella del cDNA-AFLP, che ha permesso di ottenere sequenze di DNA di pero, di seguito purificate in cromatografia liquida (dHPLC), come alcuni autori avevano precedentemente descritto (Vos et al., 1995; Breyne et al., 2003; Hazen et al., 2002).

Con questo approccio è stato raccolto un certo numero di frammenti di DNA rappresentanti sequenze geniche differenzialmente espresse tra i campioni trattati con il prodotto a base del consorzio microbico e quelli non trattati. Infine, questi frammenti di DNA di pero ottenuti e purificati sono stati sequenziati e sottoposti ad analisi bioinformatica allo scopo di correlare tali sequenze a geni putativamente coinvolti nell'induzione di resistenza al colpo di fuoco batterico.

Risultati delle prove di laboratorio

L'amplificazione e l'analisi del DNA differenzialmente espresso a seguito di trattamenti fogliari con il prodotto a base di consorzi microbici ha dato risultati di grande interesse.

Si è visto che alcune dozzine di geni sono stimolati a seguito del trattamento effettuato: questa stimolazione porta, a volte, alla sovraespressione di singoli geni, come pure alla sottoespressione di altri geni.

Nel complesso, tale azione di stimolo dei consorzi microbici sul tessuto di pero è risultata veramente molteplice.

L'analisi bioinformatica delle sequenze ha permesso di individuare almeno 14 geni differenzialmente espressi che codificano alcune proteine certamente coinvolte in risposte di resistenza indotta ai patogeni.

Esperimenti con piante in cui il fattore di trascrizione EIF, che è un elemento chiave nella via di trasduzione del segnale che porta alla morte cellulare programmata, è stato soppresso, hanno mostrato una mar-



Foto 2 Tipico sintomo di colpo di fuoco rinvenuto durante la sperimentazione di campo

TABELLA 1 - Strategia di lotta al colpo di fuoco batterico del pero con l'impiego di consorzi microbici

Epoca di intervento	Tipo di intervento	Sostanza attiva	Dosaggio	Commenti
Dicembre	Distribuzione al terreno con l'ausilio di un assolcatore	Consorzi microbici - Micosat F®	50-60 kg/ha	Nel caso non sia possibile usare un assolcatore, allora eseguire il trattamento scalzando il terreno col badile in prossimità di ogni singola pianta e spargere 50-60 grammi di prodotto nel foro. Poi ricoprire con la terra scalzata
Dalla fioritura fino a fine estate	Potatura e asportazione delle parti colpite			Eseguire regolari monitoraggi accurati ogni 2 settimane per individuare sintomi della malattia. Asportare le parti sintomatiche, avendo cura di disinfettare accuratamente gli attrezzi da taglio
Dalla fioritura fino in piena estate	Trattamenti fogliari con Micosat mediante irrorazione della chioma	Consorzi microbici - Micosat F®	4-5 kg/ha	Eseguire 5 trattamenti a cadenza di 15-20 giorni. Per le varietà medio-tardive eseguire anche un sesto trattamento
Durante la stagione vegetativa	Asportazione delle seconde fioriture			Intensificare il monitoraggio nel caso di varietà con fioriture secondarie, che vanno tempestivamente asportate
In caso di grandinate	Trattamenti fogliari con prodotti rameici	Rame		Intervenire con sollecitudine dopo una grandinata, come indicato dal disciplinare di produzioni integrate
Alla caduta delle foglie	Trattamenti con prodotti rameici	Rame		Eseguire almeno due trattamenti se in azienda è presente il colpo di fuoco. Seguire le indicazioni fornite dai Bollettini provinciali, qualora disponibili

Nel rispetto e in applicazione del dm n. 356 del 10-9-1999 di lotta obbligatoria.

cata resistenza alla morte cellulare indotta da batteri patogeni e una corrispondente riduzione della crescita del patogeno e dei sintomi della malattia nei tessuti delle piante (Hopkins et al., 2008).

Il fatto che tale proteina sia sottoespressa e scompaia nelle piante trattate con il prodotto a base di un consorzio microbico indica una capacità di risposta positiva al trattamento con consorzi microbici.

Controllo del colpo di fuoco e possibile induzione di resistenza

Attraverso la ricerca e l'analisi delle sequenze differenzialmente trascritte si è potuta individuare la presenza di diversi geni differenzialmente espressi nelle piante trattate con il prodotto a base di un consorzio microbico rispetto alle piante non trattate.

Le funzioni delle proteine codificate in questi geni stimolati sono varie e molte di esse sono coinvolte direttamente in fenomeni di resistenza della pianta nei confronti di attacchi da parte di patogeni.

Ad esempio, sono state trovate sequenze codificanti enzimi per la sintesi di nuovi componenti della parte cellulare, oppure codificanti enzimi coinvolti in fenomeni che inducono la morte cellulare programmata.

In molti casi, quel che si può notare

è che questi geni sono maggiormente espressi nel tessuto trattato con il prodotto a base del consorzio microbico, a dimostrazione del fatto che la pianta risponde al trattamento, attivando delle sequenze geniche coinvolte in fenomeni di resistenza, repressi invece nel non trattato.

Dai nostri studi emerge che l'attivazione di queste sequenze geniche è un fenomeno non immediato: infatti, non avviene prima delle 24 ore dal trattamento e si conclude entro le 48 ore.

Dopo un triennio di studi si può affermare che il trattamento con i consorzi microbici presenti nel prodotto commerciale testato è efficace non solo nel contrastare il colpo di fuoco batterico causato dal batterio *Erwinia amylovora* in campo, ma gli studi con metodi di trascrittomico hanno permesso di individuare sequenze differenzialmente espresse nelle piante di pero a seguito di trattamento con consorzi microbici, che fanno pensare ad una possibile induzione di resistenza endogena sistemica (Sar) in pero.

Tale resistenza non è specifica, ma di carattere generale. Ciò indica che un trattamento con consorzi microbici può attivare uno stato di protezione indotta anche verso altri patogeni, sia batterici sia fungini. Quindi possiamo affermare che il prodotto testato è in grado non solo di proteggere la coltura dal colpo di fuoco, com'è chiaramente

emerso dalla sperimentazione di campo, ma presenta delle grandi potenzialità d'uso nel contrastare altri patogeni, come evidenziato dai risultati di analisi di espressione genica.

Pertanto, l'inserimento di questo prodotto nella gestione del pereto in aree d'insediamento di *Erwinia amylovora* può garantire da un lato un successo nel controllo del colpo di fuoco, dall'altro un minore impatto sull'ambiente di una strategia basata su continui trattamenti cuprici (tabella 1).

Elena Verzelloni

Valentina Catalano

CCS Aosta srl, Olleyes, Aosta

Dipartimento di scienze della vita

Università di Modena e Reggio Emilia

Davide Giovanardi

Emilio Stefani

Dipartimento di scienze della vita

Università di Modena e Reggio Emilia

Luca Dondini

Dipartimento di scienze agrarie

Università di Bologna

Per commenti all'articolo, chiarimenti o suggerimenti scrivi a: redazione@informatoreagrario.it

Per consultare gli approfondimenti e/o la bibliografia: www.informatoreagrario.it/rdLia/16ia28_8453_web

Pero: consorzi microbici contro il colpo di fuoco

BIBLIOGRAFIA

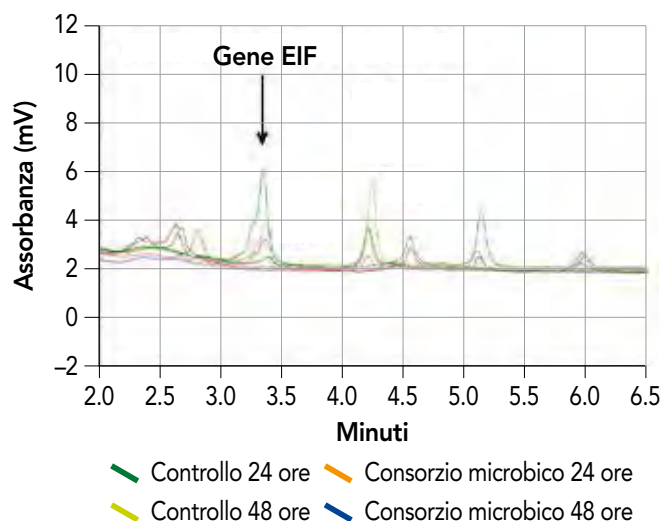
Breyne P., Dreesen R., Cannoot B., Rombaut D., Vandepoele K., Rombauts S., Vanderhaeghen R., Inzé D., Zabeau, M. (2003) - Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(2): 173-179.

Hazen S.P., Leroy P., Ward R. (2002) - AFLP in *Triticum aestivum* L.: patterns of genetic diversity and genome distribution. *Euphytica* 125(1): 89-102.

Hopkins M.T., Lampi Y., Wang T.W., Liu Z., Thompson J.E. (2008) - Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 148: 479-489.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijers A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. (1995) - AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

GRAFICO A - Densitogramma rappresentante la corsa ai tempi 24 e 48 ore del non trattato e del trattato con il prodotto a base di un consorzio microbico ⁽¹⁾



⁽¹⁾ Micosat F.

Dal grafico appare che il gene coinvolto EIF (elemento chiave nella via di trasduzione del segnale che porta alla morte cellulare programmata) viene inibito nella sua espressione dal prodotto a base di consorzio microbico.

L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.