



**Strategie per la riduzione e possibili alternative  
all'utilizzo del rame in agricoltura biologica -  
ALT.RAMEINBIO**

**Convenzione CRA-MiPAAF del 17/12/2014**

**RELAZIONE DI MONITORAGGIO  
DELLE ATTIVITA' SVOLTE**

**PRIMO SEMESTRE 2015**

**Progetto:** Strategie per la riduzione e possibili alternative all'utilizzo del rame in agricoltura biologica - ALT.RAMEINBIO

**Coordinatore:** Anna La Torre

**Data di avvio del progetto:** 17 dicembre 2014

#### **MONITORAGGIO DELL'ATTIVITA' DI RICERCA**

<b>Work Package</b>	<b>Task</b>	<b>Grado di realizzazione Task (%)</b>	<b>Grado di realizzazione WP (%)</b>
<b>WP1 - SUPPORTO ALLE AUTORITÀ COMPETENTI PER LA RIDUZIONE E/O SOSTITUZIONE DEL RAME UTILIZZATO COME ANTICRITTOGAMICO</b>	1.1 Coordinamento delle attività progettuali (U.O: CRA-PAV)	<u>20</u>	<u>38</u>
	1.2 Analisi della normativa nazionale ed europea in materia di gestione delle avversità in agricoltura biologica con particolare riferimento alla gestione dei patogeni fungini, degli oomiceti e dei batteri per il cui contenimento il rame risulta essere, al momento, l'unica molecola efficace (U.O.: PAV)	<u>80</u>	
	1.3 Individuazione delle sostanze di origine naturale alternative al Cu sulle quali investigare, anche alla luce delle evidenze derivanti da precedenti studi effettuati a livello nazionale ed internazionale (Partecipanti: PAV; Laimburg; FEM, UniTus)	<u>80</u>	
	1.4 Costituzione di un Gruppo Operativo (GO) per dibattere sulle strategie da adottare, in linea con le politiche europee, per la riduzione e/o sostituzione del Cu come anticrittogamico. Il GO prevede una cabina di regia che svolgerà attività di supporto tecnico-consultivo all'Ufficio Agricoltura Biologica del Mipaaf ed un tavolo tecnico che vedrà il coinvolgimento degli operatori biologici, dei produttori di mezzi tecnici e di alcuni esperti europei (in particolare un esperto francese ed uno tedesco) in modo da individuare soluzioni condivise a livello europeo sulla problematica connessa all'utilizzo del rame come anticrittogamico in agricoltura biologica (Partecipanti: PAV; ING; Laimburg; FEM; UniTus; FIRAB)	<u>10</u>	
	1.5 Valutazione dei processi autorizzativi da seguire per rendere utilizzabili, nella pratica agricola, i	<u>0</u>	

	composti rivelatisi efficaci nel corso delle prove (Partecipanti: PAV; UniTus; Laimburg; FEM; FIRAB)		
<b>WP2 - TECNICHE AGRONOMICHE PREVENTIVE DA ADOTTARE PER LA GESTIONE DELL'AGROECOSISTEMA BIOLOGICO E STUDIO DI MOLECOLE DI DERIVAZIONE NATURALE, FORMULAZIONI A BASSO TITOLO CUPRICO E DOSI DI RAME DA UTILIZZARE. SVILUPPO DI UN MODELLO PREVISIONALE PER LA DIFESA ANTIPERONOSPORICA DELLA VITE</b>	2.1 Studio delle tecniche e delle strategie operative atte a prevenire l'insorgenza delle malattie e a ridurre la diffusione (Partecipanti: PAV; Laimburg; FEM; UniTus)	<u>60</u>	<u>25.6</u>
	2.2 Selezione dei prodotti alternativi al Cu, delle formulazioni a basso titolo cuprico sulle quali investigare, dei dosaggi dei composti rameici da utilizzare, in funzione della pressione infettiva, delle dosi minime di rame in grado di difendere le colture e valutazione della loro efficacia nel contenimento di patogeni fungini ed oomiceti.	<u>40</u>	
	2.2.1 <u>in viticoltura</u> nei confronti di <i>Plasmopara viticola</i> (prove di laboratorio, serra e campo) (Partecipanti: PAV; FEM)	<u>30</u>	
	2.2.2 <u>in frutticoltura</u> (melo) nei confronti di <i>Venturia inaequalis</i> e altre avversità del melo (prove di campo) (Partecipante: Laimburg)	<u>30</u>	
	2.2.3 <u>in orticoltura</u> (pomodoro) nei confronti di <i>Phytophthora infestans</i> (prove di laboratorio e serra) (U.O.: PAV)	<u>0</u>	
	2.3 Individuazione, caratterizzazione e valutazione di sostanze di origine naturale e dei loro principali componenti, nella difesa dagli agenti causali della picchiettatura batterica ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ) e della maculatura batterica ( <i>Xanthomonas vesicatoria</i> ) su coltivazioni di pomodoro biologico quale orticola di assoluta rilevanza nazionale (prove di laboratorio, serra e campo) (Partecipanti: UniTus)	<u>25</u>	
	2.4 Studio di sostanze naturali/principi attivi selezionati per valutarne l'efficacia nei confronti di isolati di <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pruni</i> , agente causale del cancro batterico delle drupacee (Partecipanti: UniTus)	<u>0</u>	
	2.5 Validazione di un modello previsionale, già oggetto di valutazione preliminare nel corso di precedenti prove sperimentali, utilizzabile per il corretto posizionamento dei trattamenti fitosanitari contro <i>P. viticola</i> , con conseguente riduzione dei quantitativi	<u>20</u>	

	di rame utilizzati (UU. OO.: PAV; ING)		
<b>WP3 - REALIZZAZIONE DI UN COLLEGAMENTO COSTANTE TRA MONDO DELLA PRODUZIONE, IMPRESE E MONDO DELLA RICERCA PER LA RISOLUZIONE DELLA PROBLEMATICA RELATIVA ALL'IMPIEGO DEL RAME E SFRUTTAMENTO DEI RISULTATI OTTENUTI</b>	3.1 Coinvolgimento degli stakeholders (FIRAB)	<u><b>30</b></u>	<u><b>20</b></u>
	3.2 - Coinvolgimento del mondo della ricerca applicata (Spin off) per una pronta diffusione delle conoscenze acquisite nell'ambito del progetto presso i produttori (UniTus)	<u><b>10</b></u>	
	3.3 Coinvolgimento delle Associazioni di mezzi tecnici	<u><b>30</b></u>	
	3.4 Rapido sfruttamento dei risultati progettuali grazie al continuo e costruttivo dialogo con tutti gli stakeholders (Partecipanti: PAV; UniTus; Laimburg; FEM; FIRAB)	<u><b>10</b></u>	
<b>WP4 - DISSEMINAZIONE DEI RISULTATI</b>	4.1 Pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali per poter comunicare i risultati progettuali a quanti operano nello stesso campo di ricerca	<u><b>0</b></u>	<u><b>0</b></u>
	4.2 Giornate dimostrative di campo per i diversi sistemi colturali oggetto di indagine (viticolo, frutticolo ed orticolo) in modo da presentare i risultati ottenuti e l'approccio olistico con cui gestire l'agroecosistema	<u><b>0</b></u>	
	4.3 Opuscoli e leaflets specifici per i diversi sistemi colturali	<u><b>0</b></u>	
	4.4 Organizzazione di un convegno al termine del progetto per presentare i risultati e discutere le possibili applicazioni pratiche	<u><b>0</b></u>	
	4.5 Risultati disponibili su siti web e piattaforme del settore (SINAB, RIRAB, CREA, FIRAB) per consentire agli operatori un facile reperimento delle informazioni. Nella disseminazione dei risultati la FIRAB svolgerà un ruolo chiave.	<u><b>0</b></u>	

## **PARTE DESCRITTIVA**

### **SINTESI DELLE ATTIVITÀ SVOLTE PER WP**

#### **WP1 - SUPPORTO ALLE AUTORITÀ COMPETENTI PER LA RIDUZIONE E/O SOSTITUZIONE DEL RAME UTILIZZATO COME ANTICRITTOGAMICO:**

##### Task 1.1 - Coordinamento delle attività progettuali

E' stato organizzato un incontro start-up con tutti i partecipanti al progetto nel quale si è fatto il punto sulle attività da realizzare. E' stata generata una mailing-list di tutti i soggetti coinvolti per ciascuna azione del progetto ed è stato creato uno spazio virtuale condiviso (dropbox) ove poter generare, correggere, aggiornare e fruire del materiale di ciascun partecipante, in modo da disporre di uno stato d'avanzamento dei lavori progettuali aggiornato in tempo reale.

Task 1.2 – Analisi della normativa nazionale ed europea in materia di gestione delle avversità in agricoltura biologica con particolare riferimento alla gestione dei patogeni fungini, degli oomiceti e dei batteri per il cui contenimento il rame risulta essere, al momento, l'unica molecola efficace

**CREA - Centro di ricerca per la patologia vegetale** - E' stata analizzata la normativa nazionale ed europea vigente in materia di gestione delle avversità in agricoltura biologica con particolare riferimento alla gestione dei patogeni fungini e degli oomiceti per il cui contenimento il rame risulta essere, al momento, l'unica molecola efficace.

Task 1.3 – Individuazione delle sostanze di origine naturale alternative al Cu sulle quali investigare, anche alla luce delle evidenze derivanti da precedenti studi effettuati a livello nazionale ed internazionale

**CREA - Centro di ricerca per la patologia vegetale** - E' stata effettuata un'attenta ricognizione dei progetti nazionali ed internazionali finalizzati ad individuare alternative al rame e sono state esaminate le molecole che hanno evidenziato i migliori risultati. Sono state selezionate le sostanze, da utilizzare nelle prove di campo, serra e laboratorio. Sono state altresì individuate le dosi da impiegare e gli intervalli tra i trattamenti.

Task 1.4 - Costituzione di un Gruppo Operativo (GO) per dibattere sulle strategie da adottare, in linea con le politiche europee, per la riduzione e/o sostituzione del Cu come anticrittogamico. Il GO prevede una cabina di regia che svolgerà attività di supporto tecnico-consultivo all'Ufficio Agricoltura Biologica del MiPAAF ed un tavolo tecnico che vedrà il coinvolgimento degli operatori biologici, dei produttori di mezzi tecnici e di alcuni esperti europei (in particolare un esperto francese ed uno tedesco) in modo da individuare soluzioni condivise a livello europeo sulla problematica connessa all'utilizzo del rame come anticrittogamico in agricoltura biologica

**CREA - Centro di ricerca per la patologia vegetale** - E' stato costituito un Gruppo Operativo, coinvolgendo anche esperti stranieri, in modo da poter definire strategie condivise a livello europeo, in vista dell'imminente dibattito sul rame che si svolgerà in ambito comunitario.

#### **WP2 - TECNICHE AGRONOMICHE PREVENTIVE DA ADOTTARE PER LA GESTIONE DELL'AGROECOSISTEMA BIOLOGICO E STUDIO DI MOLECOLE DI DERIVAZIONE**

## **NATURALE, FORMULAZIONI A BASSO TITOLO CUPRICO E DOSI DI RAME DA UTILIZZARE. SVILUPPO DI UN MODELLO PREVISIONALE PER LA DIFESA ANTIPERONOSPORICA DELLA VITE**

### Task 2.1. - Studio delle tecniche e delle strategie operative atte a prevenire l'insorgenza delle malattie e a ridurre la diffusione

Si riportano di seguito le Unità Operative che partecipano al task e le attività svolte

**CREA - Centro di ricerca per la patologia vegetale** - Sono state prese in esame ed applicate le diverse tecniche e le strategie operative atte a prevenire l'insorgenza delle malattie e a ridurre la diffusione.

**CS-Laimburg** - Collezione varietale, vite bio al CS-Laimburg (25 varietà x 4 ripetizioni): L'andamento climatico dei primi quattro mesi dell'anno 2015 è stato particolarmente asciutto (80 mm di precipitazione rispetto ai 180 mm in media degli ultimi 50 anni). Lunghe esperienze maturate al Centro di Sperimentazione e in altre zone vicine ci indicano una pressione ridotta delle infezioni primarie di peronospora. Strategia adottata per la stagione 2015: trattamenti senza rame in funzione delle previsioni di pioggia con Ulmasud (argilla acida) + zolfo bagnabile.

Collezione varietale, melo bio al CS-Laimburg e Val Venosta: confronto tra gestione bio e gestione integrata delle varietà promettenti per la produzione biologica (campo sperimentale con rinnovo varietale continuo; ca. 20 varietà x 50 alberi per ogni tipo di gestione). Dall'inizio delle infezioni secondarie le parcelle bio sono trattate con bicarbonato di Na su foglia asciutta, quando il modello RimPro segna un pericolo di infezione sui frutti.

Tecniche per ridurre le bagnature fogliari su diversi fruttiferi: In una prova di campo con 4 blocchi randomizzati nella quale vengono confrontati nuovi principi attivi naturali ([www.co-free.eu](http://www.co-free.eu)) sono state inserite 4 parcelle con il telo Keep in touch® antiacqua ([www.keepintouchsystem.eu](http://www.keepintouchsystem.eu)) per contenere la ticchiolatura primaria su melo.

Le stesse coperture sono previste in prove per contenere la ticchiolatura secondaria e marciumi di *Gloeosporium* su melo. Queste prove devono partire entro giugno. Per il prossimo anno sono previste coperture su altri fruttiferi (albicocco, pesco e ciliegio) e su vite.

Tecniche per ridurre perdite in post – raccolta dovute a marciumi, fumaggini e ticchiolatura secondaria.

Sono in fase progettuale ed organizzativa prove sperimentali con un prototipo di doccia ad acqua calda ([www.moestl-anlagenbau.com](http://www.moestl-anlagenbau.com)), che a differenza degli attrezzi usati finora che prevedevano la immersione dei cassoni, permettono di controllare meglio le temperature in tutte le zone del cassone e possono gestire centinaia di cassoni per ora.

**FEM** - Predisposizione e avvio prova prodotti rameici e alternativi al rame (equiseto arvense) in vigneto sperimentale con parcelle randomizzate. Esecuzione trattamenti tempestivi in funzione delle previsioni meteorologiche. Monitoraggio ed evoluzione peronospora nel corso della stagione. Individuazione piogge infettanti e valutazione efficacia formulati rameici e prodotti alternativi rispetto a parcelle non trattate. Al 30/6 sono stati effettuati 9 trattamenti nelle parcelle sperimentali in pieno campo.

### 2.2.1 in viticoltura nei confronti di *Plasmopara viticola* (prove di laboratorio, serra e campo)

Si riportano di seguito le Unità Operative che partecipano al task e le attività svolte

**CREA - Centro di ricerca per la patologia vegetale** - E' stata allestita una prova sperimentale presso un vigneto a conduzione biologica per valutare, oltre alle strategie di difesa preventive, anche l'efficacia di diversi prodotti di derivazione naturale, accuratamente selezionati, nel contenimento di *Plasmopara viticola*. La sperimentazione è stata realizzata suddividendo il vigneto in 4 blocchi all'interno dei quali sono state collocate, in modo randomizzato, le parcelle per ognuna delle tesi a confronto. Per ciascuna tesi sono state considerate 4 ripetizioni. Per evitare effetti di deriva, ciascuna parcella è stata separata da quella adiacente da una fila di piante non trattate. Presso l'azienda sperimentale è presente una centralina meteo in grado di monitorare, in continuo, diverse variabili meteorologiche quali precipitazioni, temperatura dell'aria, bagnature fogliari, radiazione solare, umidità relativa dell'aria, direzione e velocità del vento. Le prove di campo includono anche la validazione di un modello previsionale statistico-deterministico (Partial Least Squares Discriminant Analysis -PLSDA), messo a punto nel corso di un precedente progetto dalla collaborazione dell'*Unità di ricerca per l'ingegneria agraria* con il *Centro di ricerca per la patologia vegetale*. Le condizioni meteorologiche dell'annata in corso non sono purtroppo favorevoli all'insorgenza e allo sviluppo del patogeno, pertanto, a tutt'oggi la malattia non si è manifestata in campo. Non è stato, conseguentemente possibile, dal momento che *P. viticola* è un patogeno obbligato, neanche effettuare sinora le prove in serra su barbatelle di vite e le prove in laboratorio su dischetti fogliari.

**CS-Laimburg** - In viticoltura è in fase preparatoria una prova in campo con trattamenti tempestivi, utilizzando prodotti alternativi al rame, in fase di germinazione delle spore. I prodotti sono stati individuati in laboratorio negli anni passati. In questo momento vengono preparate le piante spia in vaso che vengono inserite nelle parcelle sperimentali ogniqualevolta si verificano le infezioni in campo.

**FEM** - Predisposizione di piante di vite in vaso per l'allevamento in ambiente protetto da piogge al fine di ottenere vegetazione priva di trattamenti da utilizzarsi nelle prove di laboratorio.

Esecuzione di prove di efficacia in laboratorio su dischetti fogliari con inoculo artificiale di peronospora al fine confrontare infezioni naturali ed artificiali. Le prove sono in corso, l'elaborazione dati verrà eseguita al termine delle sperimentazioni stagionali.

#### 2.2.2 in frutticoltura (melo) nei confronti di *Venturia inaequalis* e altre avversità del melo (prove di campo)

**CS-Laimburg** - Nelle prove di confronto di nuovi principi attivi naturali in pieno campo su melo ([www.co-free.eu](http://www.co-free.eu)) sono state inserite nuove formulazioni a basso titolo cuprico per il contenimento della ticchiolatura primaria e secondaria.

#### 2.3 Individuazione, caratterizzazione e valutazione di sostanze di origine naturale e dei loro principali componenti, nella difesa dagli agenti causali della picchiettatura batterica (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) e della maculatura batterica (*Xanthomonas vesicatoria*) su coltivazioni di pomodoro biologico quale orticola di assoluta rilevanza nazionale (prove di laboratorio, serra e campo)

#### 2.4 Studio di sostanze naturali/principi attivi selezionati per valutarne l'efficacia nei confronti di isolati di *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, agente causale del cancro batterico delle drupacee

**UNITUS** - Per i task 2.3 e 2.4 sono state svolte le seguenti attività:

- Individuazione ed approvvigionamento di isolati batterici noti di *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst), *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria (Xv) e di *Xanthomonas arboricola* pv. pruni (Xp);
- Valutazione del grado di virulenza degli isolati batterici noti;
- Valutazione della sensibilità ai composti di rame degli isolati batterici noti.
- Ricerche bibliografiche inerenti l'individuazione di sostanze/principi attivi di origine naturale con attività microbica per la valutazione in vitro, in planta ed in vivo nei confronti di *P. syringae* pv. tomato (Pst) e *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Xv), ed in vitro nei confronti di *X. arboricola* pv. pruni (Xp);

Gli isolati batterici utilizzati sono provenienti da collezione internazionale; nello specifico si tratta di *P. syringae* pv. tomato CFBP 1323 e di *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Xv) CFBP 3274. E' stato inoltre individuato un isolato noto di *X. arboricola* pv. pruni (CFBP 3894), ancora non inserito nella collezione.

Gli isolati batterici noti di *P. syringae* pv. tomato (Pst) e di *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Xv) sono stati preliminarmente saggiati in ambiente controllato (fitotrone) per verificare il loro grado di virulenza su piante di pomodoro di cv. certificate per l'agricoltura biologica.

Le prove hanno previsto lo sviluppo di piante di pomodoro della cv. Pullrex Bio. Le stesse piante allo stadio di 4° foglia sono state quindi sottoposte ad inoculazioni artificiali con i batteri fitopatogeni selezionati.

Gli inoculi contenenti gli isolati batterici di cui sopra sono stati effettuati mediante nebulizzazione attraverso due differenti esperimenti mantenendo i parametri di temperatura, luce ed umidità relativa (%), consoni allo sviluppo delle piante di pomodoro come alla moltiplicazione ed alla colonizzazione da parte dei patogeni di natura batterica. Sono state impiegate due differenti concentrazioni batteriche (105 UFC/ml e 108 UFC /ml).

Successivamente all'inoculo batterico, quotidianamente è stata osservata, per un periodo di 4 settimane, l'eventuale comparsa dei sintomi.

Entrambi gli inoculi batterici entro il periodo programmato per ognuna delle prove hanno determinato sintomi riconducibili a Pst e Xv a livello fogliare.

L'inoculo con l'isolato di Pst (CFBP 1323), alla concentrazione di 105 UFC/ml, a partire dal 14° giorno successivo all'inoculazione artificiale, ha determinato sintomi classici sulle foglie (necrosi con alone clorotico con  $\varnothing \geq 3\text{mm}$ ); l'inoculo con lo stesso isolato batterico ma, a concentrazione di 108 UFC/ml, ha evidenziato gli stessi sintomi (necrosi con alone clorotico), ma a partire dal 9° giorno successivo all'inoculazione artificiale. Risultati simili sono stati ottenuti impiegando alle due differenti concentrazioni batteriche (105 UFC/ml e 108 UFC/ml), l'isolato noto di *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Xv) CFBP 3274.

Dal 20° giorno successivo alla comparsa dei sintomi, per ognuno dei due differenti esperimenti (Pst e Xv alle due concentrazioni batteriche), venivano effettuati campionamenti fogliari al fine di reisolare i batteri noti inoculati.

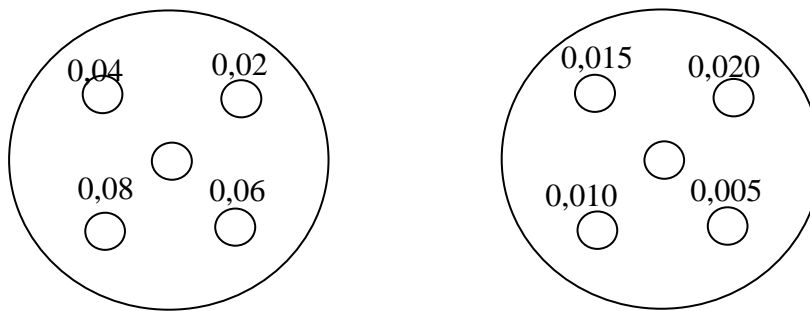
In tutte e 4 le combinazioni (Pst e Xv, 105 UFC/ml e 108 UFC/ml) venivano reisolati gli stessi ceppi batterici precedentemente inoculati. La conferma di tale risultato veniva 'certificata' mediante analisi fitobatteriologiche classiche (LOPAT, morfologiche, genetico-molecolari) a conferma che i ceppi batterici reisolati, erano identici a quelli noti utilizzati nelle prove di inoculazione artificiale. Entrambi gli isolati batterici impiegati (*P. syringae* pv. tomato (Pst) CFBP 1323 e *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Xv) CFBP 3274) hanno quindi evidenziato un elevato grado di virulenza indipendentemente dalla concentrazione impiegata.



Per quanto riguarda le prove di suscettibilità degli isolati batterici di Pst e di Xv rispetto ai composti di rame solitamente impiegati in agricoltura biologica per il controllo di patogeni di natura batterica, sono stati impiegati idrossido, ossicloruro e solfato di rame. Le prove *in vitro* sono state svolte adottando una tecnica nota (metodo dei dischetti). Questa tecnica ha permesso di determinare i differenti aloni d'inibizione, in funzione delle concentrazioni batteriche impiegate e dei differenti composti di rame. Per la misura dell'alone di inibizione (raggio dello stesso), venivano effettuate tre misurazioni, ottenendo 15 valori (5 dischetti per piastra Petri di cui 1 come controllo imbibito con H<sub>2</sub>O distillata sterile). Il valore R ottenuto, era quindi il risultato della differenza tra il raggio dell'alone d'inibizione (A) ed il raggio del dischetto (B) nel quale veniva depositata la concentrazione nota dei differenti composti di rame.

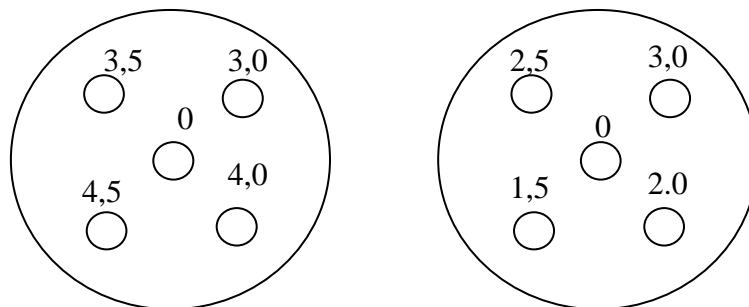
Al fine di poter valutare i differenti composti di rame a differenti concentrazioni venivano utilizzate due concentrazioni batteriche, 10<sup>8</sup>UFC/ml e 10<sup>5</sup> UFC/ml per gli isolati di Pst e di Xv.

Per il Solfato di Rame, in considerazione delle dosi di campo solitamente impiegate, rapportate ad un valore corrispondente per le prove *in vitro* (0,02 g/ml), sono state impiegate diverse concentrazioni, maggiori e minori, rispetto alla stessa dose di campo.



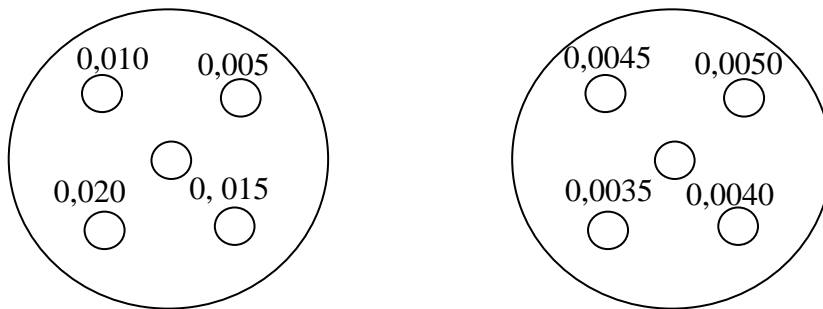
**Rappresentazione delle concentrazioni impiegate del solfato di rame nelle prove *in vitro*.**

Stessa metodologia veniva adottata per l'idrossido di rame.



**Rappresentazione delle concentrazioni impiegate dell'idrossido di rame nelle prove *in vitro*.**

Similarmente per ossicloruro di rame (0,005 mg/ml).



**Rappresentazione delle concentrazioni con l'ossicloruro di rame  
impiegate nelle prove *in vitro*.**

La sviluppo dell'isolato di Xv alla concentrazione di 108 UFC/ml, veniva inibito anche alla minima concentrazione (0,05 g/ml) utilizzata di Solfato di Rame, con un alone d'inibizione (B) medio di 0,4 mm; la concentrazione maggiore impiegata (0,8 g/ml) evidenziava un alone d'inibizione medio di 6,7 mm. Rispetto all'impiego dell'idrossido di rame, alla concentrazione minore si riscontravano risultati simili a quanto registrato mediante l'impiego del solfato di rame e, alla concentrazione maggiore, l'alone medio d'inibizione era di 3,5 mm. Alla dose di campo, l'alone medio d'inibizione era di 1,2 mm, inferiore rispetto a quanto registrato con l'impiego del solfato di rame (valore medio di 1,7 mm). Rispetto all'ossicloruro di rame, alla dose di campo, l'inibizione media dell'isolato di Xv è stata piuttosto ridotta (0,4 mm). Valori maggiori venivano registrati nelle prove con la concentrazione maggiore, con un alone medio d'inibizione di 1,3 mm. In questo caso, alle concentrazioni inferiori della dose di campo non è stata registrata alcuna inibizione dello sviluppo dell'isolato batterico.

Alla concentrazione di 108 UFC/ml, Xv è risultato maggiormente sensibile all'attività del solfato, quindi all'idrossido ed in misura minore all'ossicloruro.

Alla concentrazione più bassa (105 UFC/ml), Xv mostrava una maggiore sensibilità a tutti i composti di rame utilizzati. Con l'impiego del solfato di rame, alla concentrazione minore (0,005 mg/ml), Xv evidenziava un alone d'inibizione medio di 0,7 mm, alla concentrazione equivalente alla dose di campo un alone d'inibizione medio di 2,2 mm, mentre alla dose di 0,8mg/ml un alone d'inibizione medio di 9,6 mm. Riguardo alle prove con l'idrossido la sua sensibilità è risultata maggiore; alla dose di campo, infatti veniva registrato un alone d'inibizione medio di 5,6 mm rispetto a 1,2 mm, ottenuto con una concentrazione di 108 CFU/ml.

L'altro isolato batterico esaminato in queste prove *in vitro*, *P. syringae* pv. *tomato* (Pst - CFBP 1323), alla concentrazione di 108 UFC/ml in presenza di solfato di rame mostrava un'inibizione media di 7,8 mm impiegando la concentrazione di 0,8 mg/mm mentre alla dose di campo mostrava un'inibizione media di 1,9 mm. La capacità inibitoria del solfato di rame era evidente anche alle concentrazioni inferiori alla dose di campo e l'isolato di Pst a parità di concentrazione batterica, risulta maggiormente inibito con questo composto di rame rispetto all'attività espressa nei confronti di Xv. Impiegando l'idrossido di rame, i risultati sono stati piuttosto simili; Pst è risultato

maggiormente inibito impiegando una concentrazione di 4,5 µl/ml mentre, alla dose di campo (3µl/ml), l'inibizione media è stata di 4,2 mm.

Confrontando questi risultati con quelli determinati sull'isolato di Xv si evince come il Pst evidenzi una maggiore sensibilità al solfato di rame, ed i valori di R registrati siano in ogni caso significativamente maggiori.

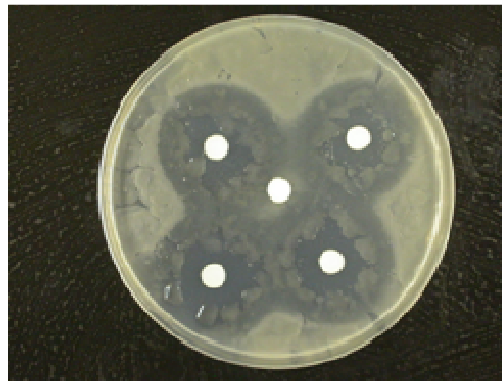
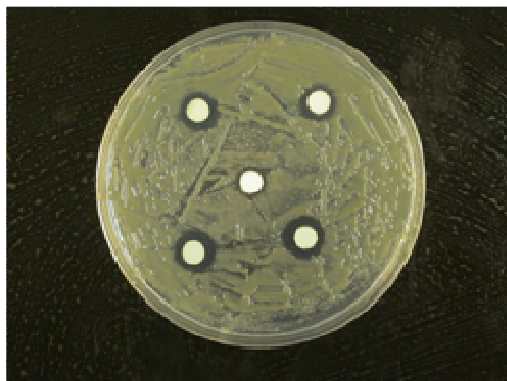
Mediante l'impiego dell'ossicloruro di rame non si evidenzia per Xv (108 UFC/ml) alcuna attività inibitoria a concentrazioni inferiori alla dose di campo mentre, alla dose di campo (0,005mg/ml), i valori medi registrati per Pst sono stati pari a 1,4 mm.

Pst alla concentrazione di 105 UFC/ml, in presenza di ossicloruro di rame non ha evidenziato una suscettibilità simile a quella registrata nei confronti di Xv. I risultati ottenuti alle concentrazioni più basse, sono stati maggiori rispetto a quelli ottenuti con lo stesso isolato ma a 108 UFC/ml.

Da questa prima parte di prove in vitro si evidenzia come, il composto di rame maggiormente attivo nell'inibire lo sviluppo dei batteri saggiati (Pst e Xv) sia il solfato, seguito dall'idrossido e dall'ossicloruro. La suscettibilità è risultata maggiore quando la concentrazione degli isolati batterici è stato pari a 105 UFC/ml e, a parità di concentrazione batterica, Pst è stato il batterio fitopatogeno maggiormente inibito nel suo sviluppo.

A completamento di questo tipo di esperimenti (sensibilità ai composti di rame) sono in fase di allestimento e di realizzazione altri esperimenti simili impiegando l'ossido di rame per Pst e per Xv e il solfato, l'idrossido, l'ossicloruro e l'ossido di rame nei confronti di Xp.

Esempio di aloni d'inibizione ottenuti mediante la tecnica in vitro del saggio dei dischetti, l'utilizzando l'isolato di Xv a differenti concentrazioni (108 UFC/ml e 105 UFC/ml) in presenza di un idrossido di rame a diverse concentrazioni (dose di campo e superiori alla stessa).



**Xv (10<sup>8</sup> (sin) e 10<sup>5</sup> (ds) UFC/ml): inibizione con idrossido di rame mediante dose di campo e quindi dosi crescenti (dose di campo nel dischetto in alto a sin. - dose maggiore nel dischetto in basso a sin.; dischetto centrale di controllo).**

In riferimento alle ricerche bibliografiche inerenti l'individuazione di sostanze naturali con attività microbica, queste si sono indirizzate alla selezione delle sostanze potenzialmente efficaci in prove in vitro, in planta ed in vivo nei confronti di *P. syringae* pv. tomato (Pst) e *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Xv) e per effettuare prove in vitro nei confronti di *X. arboricola* pv. pruni (Xp).

Al momento sono stati selezionati differenti principi attivi di origine naturale appartenenti a composti aromatici, fenolici, flavonoidi, antociani e si stanno valutando le concentrazioni/eventuali combinazioni, da impiegare nelle prove di prossima attuazione.

Nel prossimo semestre di attività si prevede di completare le prove in vitro con i composti di rame e le sostanze naturali nei confronti di *P. syringae* pv. tomato (Pst), *X. axonopodis* pv. vesicatoria (Xv)

e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xv) e, per le prove in pianta nei confronti di *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xv).

2.5 Validazione di un modello previsionale, già oggetto di valutazione preliminare nel corso di precedenti prove sperimentali, utilizzabile per il corretto posizionamento dei trattamenti fitosanitari contro *P. viticola*, con conseguente riduzione dei quantitativi di rame utilizzati

**CREA - Unità di ricerca per l'ingegneria agraria** - Obiettivi generali dell'attività della UO riguardano:

- i. supportare la politica italiana ed europea, che richiede fortemente la limitazione o l'eliminazione del rame utilizzato come anticrittogamico in agricoltura biologica
- ii. supportare e coadiuvare il *Centro di ricerca per la patologia vegetale* e il MiPAAF nell'attività di analisi della normativa nazionale ed europea in materia di gestione delle avversità in agricoltura biologica
- iii. supportare il Gruppo Operativo (GO), che svolgerà attività di supporto giuridico e tecnico-consultivo all'Ufficio Agricoltura Biologica del MiPAAF, anche al fine di disporre di importanti informazioni per una migliore gestione degli output del modello predittivo realizzato e applicato dall'*Unità di ricerca per l'ingegneria agraria* (obiettivo specifico).

Obiettivo specifico della ricerca dell'UO è quello di provvedere allo sviluppo e all'applicazione di un sistema previsionale generalizzabile (dati sensoristici + modello predittivo) in merito allo sviluppo e alla diffusione degli attacchi peronosporici (*Plasmopara viticola*) su vite facendo riferimento alle prove sperimentali precedentemente sviluppate. Viene utilizzato un modello misto statistico-deterministico, che stima la risposta quantitativa del patogeno in termini di disease incidence e disease severity, a partire da informazioni meteorologiche (precipitazioni, temperatura dell'aria, bagnatura fogliare, radiazione solare, velocità e direzione del vento) e deterministiche (fase fenologica e classe di rischio di infezione), attraverso modellistica multivariata: Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLSDA).

Al fine di monitorare il normale decorso della patologia, al netto di eventuali trattamenti, viene utilizzata una tesi relativa al testimone non trattato, considerando i valori di attacco di peronospora su testimone come valore incrementale giornaliero. Solo quando tale valore risulta superiore ad una certa soglia prefissata (PathogenThresh), nel modello sarà considerata la presenza significativa giornaliera del patogeno. Questa soglia è stata determinata empiricamente come valore minimo giornaliero (0.4% per la incidence e 0.02% per la severity; Menesatti et al., 2013) che ha permesso una differenza statisticamente significativa tra le due valutazioni di incidenza della malattia in due momenti successivi. Altri parametri considerati nello sviluppo modellistico sono: la differenza di tempo (TimeLag) di 3 gg tra l'evento climatico e l'insorgenza visibile della malattia e la possibilità che l'evento patologico può essere relazionato anche alle variabili di alcuni giorni (n) antecedenti (TimeSeries). Con i dati delle attività svolte nel progetto passato, l'attività modellistica prevede la fase di calibrazione dei modelli previsionali sui dati storici (dal 2006 al 2010). In questo anno di ricerca si sta svolgendo il field-test, e cioè l'applicazione dei modelli più performanti risultanti dalla fase di calibrazione in prove di campo per l'anno 2015. Al fine di migliorare la predizione nelle due fasi, è stata adottata la seguente strategia modellistica: 1) un modello utilizzato solo per stimare il giorno della prima comparsa della malattia (assoluto); 2) un secondo modello (adattativo) per la stima del decorso dell'infezione dopo il primo attacco. Le analisi e i modelli sono sviluppati con procedure automatizzate sviluppate in ambiente MATLAB 7.1 R14.

Per quanto riguarda l'avanzamento dei risultati di questi primi mesi di progetto dal 1 Aprile sono stati acquisiti i dati dalla centralina meteo-climatica posizionata nel vigneto in analisi e sono stati rilevati, in collaborazione con il CREA-PAV, i rilievi fitopatologici, l'eventuale rischio di infezione della malattia e le fasi fenologiche della pianta [scala di Baggiolini (1952) modificata] (Tab. 1)

Data	Fase fenologica	Rischio infezione
1-16 Aprile 2015	4	0
17-27 Aprile 2015	5	0
28 Aprile-3 Maggio 2015	6	2
4-6 Maggio 2015	7	2
7-24 Maggio 2015	8	2
25 Maggio-2 Giugno 2015	9	2
3-10 Giugno 2015	10	2
11-14 Giugno 2015	11	2
15-in corso Giugno 2015	12	1

Tabella 1: Fase fenologica di sviluppo della vite [scala di Baggiolini (1952) modificata] con il relativo rischio di infezione e data.

Dal 1 Aprile al 3 Giugno (giorno in cui è stato effettuato il primo trattamento) è stato utilizzato, sia per la incidence che per la severity, il modello assoluto considerando i parametri nella Tabella 2A. Nei giorni seguenti è stato utilizzato, a livello precauzionale, ancora il modello assoluto che ha suggerito ancora di trattare. Per questi motivi, dopo la fine della copertura del 1° trattamento (7-10 giorni) e cioè il giorno 11 Giugno, è stato effettuato il secondo trattamento. Dal 18 giugno (fine copertura del 2° trattamento), come da procedura, si è passati al modello adattativo (Tabella 2B) che, considerando anche i dati del presente anno, ha considerato la non presenza del fungo. Tale modello ha suggerito di effettuare il 3° trattamento il giorno 19 giugno.

Ad oggi, la presenza dell'oomicete nella tesi di controllo è ancora allo 0%, sia per la incidence che per la severity.

Parametri	A	B
TimeLag	3	3
PathogenThresh	0	0.4 (incidence) 0.02 (severity)
Latent Vectors	2	2
TimeSeries	1	0
Numero repliche	0	5
TestModel	Assoluto	Adattativo

Tabella 2: Parametri descrittivi (TimeLag: differenza di tempo di 3 gg tra l'evento climatico e l'insorgenza visibile della malattia; PathogenThresh: soglia prefissata che considera la presenza significativa giornaliera del patogeno; Latent Vectors: variabili latenti; TimeSeries: possibilità che l'evento patologico può essere relazionato anche alle variabili di alcuni giorni (n) antecedenti; Numero repliche; TestModel: A) tipologia modello "assoluto" utilizzato solo per stimare il giorno della prima comparsa della malattia e B) "adattativo" per la stima del decorso dell'infezione dopo il primo attacco) dei modelli utilizzati nella sperimentazione per la predizione dell'insorgenza del fungo (*Plasmopara viticola*).

### *Bibliografia*

Baggiolini M., 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture 8(1), 4-6.

Menesatti P, Antonucci F, Costa C, Mandalà C, Battaglia V, La Torre A, 2013. Multivariate forecasting model to optimize management of grape downy mildew control. *Vitis*, 52(2), 141-148

## **WP3 - REALIZZAZIONE DI UN COLLEGAMENTO COSTANTE TRA MONDO DELLA PRODUZIONE, IMPRESE E MONDO DELLA RICERCA PER LA RISOLUZIONE DELLA PROBLEMATICHE RELATIVA ALL'IMPIEGO DEL RAME E SFRUTTAMENTO DEI RISULTATI OTTENUTI**

### 3.1 Coinvolgimento degli stakeholders (FIRAB)

### 3.3 Coinvolgimento delle Associazioni di mezzi tecnici

**FIRAB** – Incontro con i Partner del progetto svolto in data 16 MARZO 2015 a Roma e successivamente ci sono stati incontri con i soggetti portatori di interesse del settore biologico per verificare lo stato dell'arte e le esigenze del settore.

ATTIVAZIONE collaborazione tra mondo produttivo, ricercatori, industria e Amministrazione pubblica:

- INCONTRI CON STAKEHOLDER:
  - FEDERBIO;
  - IFOAM UE;
  - AIAB;
- INCONTRI CON PRODUTTORI MEZZI TECNICI E ASSOCIAZIONI:
  - IBMA ITALIA;
  - UPL E TASK FORCE EUROPEA
- INCONTRO CON PRODUTTORI AGRICOLI
  - APOFRUIT;
  - PROBER SOC. COOP
- INCONTRO CON ISTITUZIONI
  - REGIONE EMILIA-ROMAGNA
  - INTERFACCIA CON UFFICIO BIO MIPAAF
- INCONTRO CON MONDO RICERCA
  - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

- POLITECNICO DELLE MARCHE
- UNIVERSITÀ DELLA TUSCIA

Come da progetto sono state avviate le collaborazioni con il mondo produttivo per verificare lo stato dell'arte e le esigenze/necessità del settore biologico.

Incontri con i produttori: in agricoltura biologica già da diversi anni c'è la limitazione d'impiego a 6 kg/ha/anno, con la possibilità per le colture perenni di poter dividere il quantitativo di 30kg/ha nei 5 anni. Quantitativo che non sempre può essere sufficiente al controllo delle malattie, soprattutto in certi anni con particolari avverse condizioni climatiche (patata e pomodoro 2014 ad esempio), o su alcune colture perenni in conseguenza delle nuove patologie, soprattutto batteriosi, rilevate in questi ultimi anni (pesco, albicocco e noce). Pertanto vedono l'eventuale esclusione della quota cumulativa (30 kg nei 5 anni) come un problema.

Associazioni: condividono le problematiche dei propri produttori, ma hanno maggiormente posto l'accento sull'applicazione della normativa e nell'impiego del rame sotto le diverse categorie di mezzi tecnici (Fitosanitaria e fertilizzante). Hanno posto anche l'attenzione su questioni commerciali che chiedono interesse non solo alla residualità del rame, ma anche di alcuni "inquinanti" presenti in diversi formulati commerciali, tanto da chiederne l'esclusione nei propri disciplinari privati.

Istituzioni: Guardano e aspettano gli sviluppi della revisione, in quantità annua, ma anche di fasce e aree di rispetto.

Ricerca: Con grande interesse vede la possibilità di mettere in prova nuove strategie, e nuovi prodotti fitosanitari e corroboranti destinati a ridurre e alcuni fin tanto eliminare l'impiego del rame. Strategie perché non è possibile rintracciare sul mercato una "sostanza attiva" altrettanto efficace duttile e versatile come il rame.

Produttori di mezzi tecnici e associazioni di produttori: Stanno lavorando per difendere i fitosanitari a base di rame, così come per cercare di arginare l'impiego del rame come fertilizzante. Il lavoro è stato svolto principalmente con incontri frontali, ma alcuni con supporto informatico e tematico.

Fatta questa prima indagine conoscitiva il lavoro proseguirà nell'approfondimento degli argomenti fin qui individuati.

#### **WP4 - DISSEMINAZIONE DEI RISULTATI**

Al momento non è stata realizzata alcuna attività.

#### **Task 4.1 e 4.5 –**

**FIRAB** - Per la disseminazione si procederà:

- ATTIVAZIONE PAGINA WEB FIRAB DEDICATA
- ARTICOLO PER LA RIVISTA BIOAGRICOLTURA

## **DESCRIZIONE DEI SINGOLI RISULTATI/INNOVAZIONI OTTENUTI NELL'ESPLETAMENTO DELLE ATTIVITÀ SVOLTE**

### **UNITUS**

#### **1. Contesto in cui si è svolta la prova/sperimentazione per l'ottenimento del risultato**

Le prove in vitro ad oggi effettuate, sono state svolte presso i Lab dello spin off accademico/start up innovativa PhyDia srl, del DAFNE UniTuscia, riconosciuto in ottemperanza al D.lgs. n. 214/2005 "Titolo X - Introduzione e trasferimento di materiale per prove o scopi scientifici e prove di selezione varietale", dal SFC MIPAAF e dal SFR (Lazio) per la gestione ed attività di ricerca inerenti Organismi nocivi da Quarantena.

#### **2. Caratteristiche del risultato**

I risultati evidenziano come, a differenti concentrazioni batteriche, i composti di rame solitamente impiegati in agricoltura biologica (idrossido, ossicloruro, solfato) a protezione del pomodoro dai principali patogeni di natura batterica, esplicano una differente inibizione dello sviluppo di questi patogeni.

#### **3. Possibili utilizzazioni del risultato**

I dosaggi dei composti di rame impiegati ed i relativi risultati permettono d'indirizzare le prossime sperimentazioni in vitro come le successive in pianta ed in vivo, rispetto alle concentrazioni da utilizzare delle sostanze di origine vegetale/principi attivi di origine naturale con attività antimicrobica in fase di selezione e quindi in grado di sostituire del tutto o in parte i composti di rame.

#### **4. Livello di maturità del risultato (ad esempio se è immediatamente trasferibile o ha ancora bisogno di collaudo)**

I risultati attualmente conseguiti necessitano di ulteriori prove e collaudi prima di essere trasferiti.

### **CREA - Unità di ricerca per l'ingegneria agraria**

#### **1. Contesto in cui si è svolta la prova/sperimentazione per l'ottenimento del risultato**

Per la parte di rilievi informativi di campo l'attività si svolge presso un vigneto biologico. L'approccio modellistico potrà essere applicato anche in altre aree laddove siano presenti i dati meteo-climatici e quelli legati alla fenologia della pianta e alla patologia del patogeno.

Per la parte di modellistica è stata collocata nel sito di prova per registrare i dati meteo-climatici una centralina (Davis Vantage Pro 2, modello wireless). I dati sono acquisiti tramite il modem GSM che è a bordo della centralina per la trasmissione a distanza ad alcuni software di gestione dati (WeatherLink). I dati vengono raccolti da un'unità di trasmissione remota (RTU) sul campo ogni 15 minuti. Si lavora su un modello misto o meglio definito come statistico-deterministico. La variabile di risposta (Y) è rappresentata dal valore differenziale giornaliero di disease incidence e di disease severity. Le variabili indipendenti (X) sono rappresentate dai dati meteo-climatici (temperatura del Goidanich, precipitazioni, temperatura e umidità relativa dell'aria, bagnatura fogliare, radiazione solare, velocità e direzione del vento) e da quelli fisiologici-funzionali deterministici [fase fenologica in accordo con la chiave di identificazione di Baggiolini (Baggiolini, 1952) modificata e relativa classe di rischio di infezione].

#### **2. Caratteristiche del risultato**

Predizione quantitativa del grado di attacco peronosporico primario (modello assoluto) e di attacco secondario (modello adattativo) sia utilizzando la variabile di risposta di incidence che di severity. La predizione è rilevata come percentuale. Al di sopra del 30% di probabilità di attacco, si suggerisce di trattare la tesi PLSDA.



### 3. Possibili utilizzazioni del risultato:

a) istituzioni politiche e amministrative di livello nazionale e internazionale (Ufficio Agricoltura Biologica del Mipaaf), Gruppo Operativo;

b) data la natura "digitale" dell'informazione prodotta, l'utilizzazione è particolarmente vocata per sistemi web based di divulgazione: siti web e piattaforme del settore (es. SINAB, RIRAB, CREA, FIRAB) che potranno essere aggiornate, anche attraverso l'interfaccia dell'Istituzione Ministeriale di coordinamento (Ufficio Agricoltura Biologica del Mipaaf), mettendo a disposizione rapidamente i risultati agli operatori;

c) Informazione agricoltori, centri di divulgazione e disseminazione sviluppando valutazioni sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari al fine di ottimizzare l'azione di distribuzione di tali prodotti anche a seguito dell'uso di modelli previsionali dell'insorgenza della peronospora e dell'utilizzo di molecole protettive innovative a basso impatto.

### 4. Livello di maturità del risultato (ad esempio se è immediatamente trasferibile o ha ancora bisogno di collaudo)

Immediatamente trasferibile a patto dei necessari investimenti.

### 5. Definizione delle attività/caratteristiche necessarie per far adottare il risultato (ad esempio: azioni, tecniche, strumenti, impianti, competenze, ecc)

a) Riunioni con Mipaaf, Ufficio Agricoltura Biologica del Mipaaf);

b) Riunioni UUOO e Gruppo Operativo;

c) Aggiornamento informativo siti web;

d) Workshops e pubblicazioni.

## EVENTUALI SCOSTAMENTI DAGLI OBIETTIVI INTERMEDI DEL PROGETTO

**CREA - Centro di ricerca per la patologia vegetale** - Le condizioni climatiche registrate in campo (elevate temperature e scarse precipitazioni) non hanno consentito, a tutt'oggi, la comparsa della peronospora sulle piante di vite e ciò può comportare l'impossibilità di valutare l'efficacia antiperonosporica dei prodotti di origine naturale in studio.

### FEM

In pieno campo la stagione 2015 si sta rivelando poco favorevole allo sviluppo di peronospora ma la parallela conduzione di prove su dischetti fogliari con infezioni artificiali in condizioni controllate renderà comunque possibile la valutazione dell'efficacia delle tesi in confronto

### UNITUS

Per problematiche di natura burocratica non dipendenti dall'UO 4, si è in attesa di ricevere un isolato noto di X. arboricola pv. pruni per svolgere con lo stesso patogeno le programmate prove in vitro.