

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

Convenzione CRA-MiPAAF del 17/12/2014

RELAZIONE TECNICO-SCIENTIFICA FINALE

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

Data di conclusione del progetto: 31 marzo 2018

MONITORAGGIO DELL'ATTIVITA' DI RICERCA

Work Package	Task	Grado di realizzazione Task (%)	Grado di realizzazione WP (%)
WP1 - SUPPORTO ALLE AUTORITÀ COMPETENTI PER LA RIDUZIONE E/O SOSTITUZIONE DEL RAME UTILIZZATO COME ANTICRITTOGAMICO	1.1 Coordinamento delle attività progettuali (U.O.: CREA-DC)	100	
	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.: CREA-DC)	100	
	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: CREA-DC; Laimburg; FEM, UniTus)	100	
	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: CREA-DC; CREA-IT; Laimburg; FEM; UniTus; FIRAB)	100	
	1.5 Valutazione dei processi	100	

	autorizzativi da seguire per rendere utilizzabili, nella pratica agricola, i composti rivelatisi efficaci nel corso delle prove (Partecipanti: CREA-DC; UniTus; Laimburg; FEM; FIRAB)		
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	2.1 Studio delle tecniche e delle strategie operative atte a prevenire l'insorgenza delle malattie e a ridurre la diffusione (Partecipanti: CREA-DC; Laimburg; FEM; UniTus)	100	
	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. 2.2.1 <u>in viticoltura</u> nei confronti di <i>Plasmopara viticola</i> (prove di laboratorio, serra e campo) (Partecipanti: CREA-DC; FEM, Laimburg) 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) 2.2.3 <u>in orticoltura</u> (pomodoro) nei confronti di <i>Phytophthora infestans</i> (prove di laboratorio e serra) (U.O.: CREA-DC)	100	
	2.3 Individuazione, caratterizzazione e valutazione di sostanze di origine naturale e dei loro principali componenti, nella difesa dagli agenti causali della picchiatura 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) (Partecipante: UniTus)	100	
	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	100	

	cancro batterico delle drupacee (Partecipante: UniTus)		
	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 di rame utilizzati (UU. OO.: CREA-DC; CREA-IT)	100	
WP3 - REALIZZAZIONE DI UN COLLEGAMENTO COSTANTE TRA MONDO DELLA PRODUZIONE, IMPRESE E MONDO DELLA RICERCA PER LA RISOLUZIONE DELLA PROBLEMATIC RELATIVA ALL'IMPIEGO DEL RAME E SFRUTTAMENTO DEI RISULTATI OTTENUTI	3.1 Coinvolgimento degli stakeholders (FIRAB)	100	
	3.2 - Coinvolgimento del mondo della ricerca applicata (Spin off) per una pronta diffusione delle conoscenze acquisite nell'ambito del progetto presso i produttori (Partecipante: UniTus)	100	
	3.3 Coinvolgimento delle Associazioni di mezzi tecnici	100	
	3.4 Rapido sfruttamento dei risultati progettuali grazie al continuo e costruttivo dialogo con tutti gli stakeholders (Partecipanti: CREA-DC; UniTus; Laimburg; FEM; FIRAB)	100	
WP4-DISSEMINAZIONE DEI RISULTATI	4.1 Pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali per poter comunicare i risultati progettuali a quanti operano nello stesso campo di ricerca	70	
	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	100	
	4.3 Opuscoli e leaflets specifici per i diversi sistemi colturali	100	
	4.4 Organizzazione di un convegno al termine del progetto per presentare i risultati e discutere le possibili applicazioni pratiche	100	
	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.	100	

PARTE DESCRITTIVA

1. Sintesi delle attività svolte per WP
(eventualmente corredata da grafici, tabelle, foto, ecc)

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

Task 1.1 – È stata generata una mailing-list di tutti i soggetti coinvolti nel progetto. È stato creato uno spazio virtuale condiviso (dropbox) ove ciascun partecipante ha potuto inserire documentazione, effettuare modifiche e aggiornamenti ed ha potuto fruire del materiale, in modo da disporre di uno stato d'avanzamento dei lavori progettuali aggiornato in tempo reale. Nel corso delle diverse riunioni che sono state organizzate si è discusso dell'attività realizzata dai diversi partecipanti al progetto e delle criticità riscontrate. Nel corso delle riunioni sono state anche affrontate diverse questioni concernenti il rame quali, ad esempio, il suo futuro come prodotto fitosanitario, l'utilizzo dei concimi rameici il cui impiego può mascherare un vero e proprio trattamento fitosanitario, la presenza di fosfiti nelle formulazioni a base di rame. È stata predisposta una sintesi dei risultati ottenuti nel corso del I e del II anno di attività sotto forma di opuscoli, distinti per sistema colturale: viticolo, frutticolo e orticolo. Gli opuscoli, contenenti l'attività svolta ed i risultati ottenuti nel corso del biennio di attività, sono stati distribuiti ai partecipanti al convegno finale organizzato presso il CREA-DC il 14 giugno 2017.

Task 1.2 – È stata analizzata la normativa nazionale ed europea 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 – È stata effettuata un'attenta ricognizione dei progetti nazionali ed internazionali finanziati sulla tematica rame e sono state esaminate le molecole che avevano evidenziato i migliori risultati. In base alle indagini svolte, sono state selezionate le sostanze di derivazione naturale da utilizzare nelle prove di laboratorio, serra e campo. Sono state altresì individuate le dosi da impiegare e gli intervalli tra i trattamenti. Dalla valutazione dei risultati ottenuti nel corso del I anno di attività sono state selezionate le sostanze da esaminare nel II anno di prove.

Task 1.4 – È stato costituito un Gruppo Operativo (GO) per dibattere sulla problematica dell'impiego del rame in agricoltura biologica coinvolgendo anche esperti stranieri: Marc Chovelon - ITAB/GRAB e Jutta Kienzle – Föko, in modo da definire strategie condivise a livello europeo, in vista del dibattito europeo sul rame. Si sono svolti incontri del GO, in videoconferenza, in modo da consentire la partecipazione degli esperti europei. I contatti con gli esperti stranieri sono proseguiti anche attraverso scambi di e-mail e contatti via skype e telefono.

FIRAB

Task 1.5 – Si è concluso il monitoraggio del dibattito normativo nazionale e comunitario al fine di intercettare eventuali proposte di modifica alle norme vigenti.

WP2 - TECNICHE AGRONOMICHE PREVENTIVE DA ADOTTARE PER LA GESTIONE DELL'AGROECOSISTEMA BIOLOGICO E STUDIO DI MOLECOLE DI DERIVAZIONE NATURALE, DI FORMULAZIONI A BASSO TITOLO CUPRICO E DELLE DOSI DI RAME DA UTILIZZARE. SVILUPPO DI UN MODELLO PREVISIONALE PER LA DIFESA ANTIPERONOSPORICA DELLA VITE

CREA-DC

Task 2.1 - Sono state esaminate le diverse tecniche e le strategie operative in grado di prevenire l'insorgenza delle malattie e ridurre la diffusione.

Task 2.2.1

VITICOLTURA

CAMPO

È stata allestita, in continuità con quanto effettuato nel corso del I anno di attività, anche per il II anno una prova sperimentale presso un vigneto a conduzione biologica situato nei pressi di Roma, al fine di valutare le strategie di difesa preventive da adottare e l'efficacia di diversi prodotti di derivazione naturale nel contenimento di *Plasmopara viticola*. I prodotti saggiati sono riportati nella tabella seguente:

Categoria	Formulato	Principio Attivo	Alternanza al Cu ⁺⁺	Addizionato al Cu ⁺⁺
Estratto di pianta	Saponin	<i>Yucca schidigera</i>		X
	Equiseto	<i>Equisetum arvense</i>	X	
Estratto di alga	Vacciplant	Laminarina	X	
Microrganismo	ALD1901	Parete <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		X
Prodotto inorganico	Armicarb	Bicarbonato di potassio		
	Glutex CU90	Idrossido di rame		
	Bordoflow New (St)	Poltiglia bordolese		
Derivato del chitosano	Chitoplant	Chitosano		

La sperimentazione è stata realizzata suddividendo il vigneto in 4 blocchi, all'interno dei quali sono state collocate, in modo randomizzato, le parcelle afferenti alle diverse tesi a confronto. Per ciascuna tesi sono state considerate 4 ripetizioni, per un totale di 12 piante/tesi. Per evitare fenomeni 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 hanno previsto 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 del CREA-IT con il CREA-DC.

Le condizioni meteorologiche registrate nel corso del II anno di prove, in analogia con quanto verificatosi nel I anno di attività, non hanno però consentito l'insorgenza del patogeno, con conseguente impossibilità di valutare l'attività antiperonosporica dei prodotti oggetto di indagine.

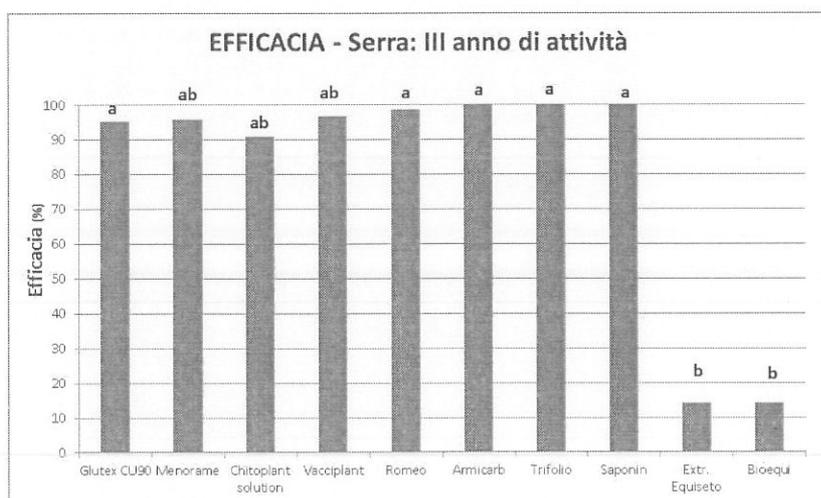
SERRA

Nel corso del III anno di attività, in analogia con quanto effettuato nel I e nel II anno, è stata allestita una prova sperimentale presso le serre del CREA-DC, con la finalità di valutare l'efficacia in ambiente controllato di diversi prodotti di derivazione naturale nel contenimento di *P. viticola*. La prova è stata realizzata utilizzando 3 distinti box, all'interno dei quali sono state collocate, in modo randomizzato, le barbatelle di vite della cv. Malvasia di Candia. Sono stati saggiati i seguenti prodotti:

Categoria	Formulato	Principio Attivo	Addizionato al Cu ⁺⁺
Estratto di pianta	Saponin	<i>Yucca schidigera</i>	
	Trifolio	Foglie di liquirizia	
	Equiseto	<i>Equisetum arvense</i>	
	Bioequi	Borlanda fluida di melasso di barbabietola più estratto di equiseto e timo	
Estratto di alga	Vacciplant	Laminarina	X
Derivato di microrganismo	ALD1901	Parete <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	X
Prodotto inorganico	Armicarb	Bicarbonato di potassio	
	Menorame	Cu ⁺⁺ in microdosi + zeoliti	
	Glutex CU90 (St)	Idrossido di rame	
Derivato del chitosano	Chitoplant solution	Chitosano cloridrato	

Le piantine di vite sono state trattate con i prodotti di derivazione naturale e successivamente inoculate con sporangii prelevati da foglie e grappoli sintomatici, gentilmente forniti dai colleghi del

Laimburg e FEM (a causa della difficoltà di reperimento nei vigneti laziali di materiale vegetale infetto). La concentrazione d'inoculo impiegata è stata pari a 1.2×10^5 sporangi mL^{-1} . L'attività antiperonosporica dei prodotti in studio è stata valutata in confronto al controllo non trattato e inoculato artificialmente, al controllo non trattato e non inoculato e al prodotto di riferimento (Glutex CU 90). I migliori risultati sono stati ottenuti, oltre che con l'impiego del prodotto di riferimento, anche con i seguenti prodotti: il formulato Menorame a base di microdosi di rame e minerali, il bicarbonato di potassio, la laminarina, la parete di *Saccaromyces cerevisiae*, l'estratto di foglie di liquirizia, l'estratto di *Yucca schidigera* ed il chitosano cloridrato. Risultati inferiori e statisticamente differenti dal prodotto di riferimento sono stati ottenuti utilizzando l'estratto di equiseto ed il formulato Bioequi, contenente borlanda fluida di melasso di barbabietola, equiseto e timo.



LABORATORIO

Le prove condotte in laboratorio nel corso dell'attività sono consistite nel *leaf disk bioassay*, volto a valutare l'attività inibitoria esplicata dai prodotti in studio sullo sviluppo miceliare di *P. viticola* e nel test di germinazione per testare l'eventuale capacità inibitoria esplicata dai prodotti sulla germinazione degli sporangi. In tabella sono riportati i prodotti esaminati in entrambe le prove:

Categoria	Formulato	Principio Attivo
<i>Estratto di pianta</i>	Saponin	<i>Yucca schidigera</i>
	Trifolio	Foglie di liquirizia
	Abies	<i>Abies sibirica</i>
	Equiseto	<i>Equisetum arvense</i>
	DF-100	Semi di pompelmo
	Bioequi	Borlanda fluida di melasso di barbabietola più estratto di equiseto e timo
<i>Prodotto inorganico</i>	Armicarb	Bicarbonato di potassio
	Menorame	Cu^{++} in microdosi + zeoliti
	Cuprostar (St)	50% Ossicl. tetraramico e 50% Idrossido di rame
<i>Derivato del chitosano</i>	Chitoplant solution	Chitosano cloridrato

Rispetto al I anno, nel II anno è stato aggiunto il prodotto a base di microdosi di rame e minerali. I risultati ottenuti nel II anno di attività sono riportati nella tabella seguente:

Categoria	Formulato	Principio Attivo	Inibizione	
			sviluppo	germinazione
Estratto di pianta	Saponin	<i>Yucca schidigera</i>	+	+
	Trifolio	Foglie di liquirizia	++	N.L.
	Abies	<i>Abies sibirica</i>	+/-	+
	Equiseto	<i>Equisetum arvense</i>	-	+/-
	DF-100	Semi di pompelmo	+/-	+/-
	Bioequi	Borlanda fluida di melasso di barbabietola più estratto di equiseto e timo	-	+/-
Prodotto inorganico	Armicarb	Bicarbonato di potassio	+	+
	Menorame	Cu ⁺⁺ in microdosi + zeoliti	++	N.L.
	Cuprostar (St)	50% Ossicl. tetraramico e 50% Idrossido di rame	++	++
Derivato del chitosano	Chitoplant solution	Chitosano cloridrato	+/-	+

++ = molto efficace; + = efficace; +/- = discretamente efficace; - = scarsamente efficace; N.L. = non leggibile

Le prove su dischetti fogliari, finalizzate a valutare l'effetto inibitorio dei prodotti sullo sviluppo miceliare di *P. viticola*, hanno evidenziato un effetto di inibizione totale svolto dal formulato Menorame, contenente rame in microdosi e zeoliti, e dall'estratto di foglie di liquirizia. Questi due prodotti hanno esplicato il medesimo effetto inibitorio del formulato rameico di riferimento. Un effetto inibitorio leggermente inferiore è stato svolto dall'estratto di *Yucca schidigera* e dal bicarbonato di potassio che, alle due concentrazioni maggiori, non si sono differenziati statisticamente dal prodotto di riferimento. Su un piano inferiore si sono collocati l'estratto di *Abies sibirica*, il formulato a base di chitosano cloridrato e l'estratto di semi di pompelmo. Scarsa è stata invece l'attività antiperonosporica dell'equiseto e del formulato Bioequi.

Le prove volte a valutare l'effetto dei prodotti sulla germinazione degli sporangi hanno evidenziato una buona attività inibitoria esplicata dall'estratto di *Yucca schidigera*, dal bicarbonato di potassio, dal chitosano cloridrato e dall'estratto di *Abies sibirica*, anche se l'inibizione è risultata inferiore rispetto a quella esplicata dal prodotto rameico di riferimento. Non è stato possibile effettuare le letture al microscopio, per valutare l'effetto inibitorio sulla germinazione degli sporangi, dell'estratto di foglie di liquirizia e del formulato a base di rame e minerali zeolizzati a causa di difficoltà di lettura legate alla torbidità o alla composizione.

Task 2.2.3

ORTICOLTURA

SERRA

Le prove sperimentali sono state allestite presso le serre del CREA-DC con la finalità di valutare l'efficacia, in ambiente controllato, di diversi prodotti di derivazione naturale nel contenimento di *Phytophthora infestans*. Le prove sono state realizzate utilizzando 3 box all'interno dei quali sono state collocate, in modo randomizzato, le piantine di pomodoro. Sono stati considerati i seguenti prodotti:

Categoria	Formulato	Principio Attivo
Estratto di pianta	Saponin	<i>Yucca schidigera</i>
	Trifolio	Foglie di liquirizia
	Abies	<i>Abies sibirica</i>
	DF-100	Semi di pompelmo
	Bioequi	Borlanda fluida di melasso di barbabietola più estratto di equisetto e timo
Microrganismo	Serenade Max	<i>Bacillus subtilis</i> ceppo QST 713
Prodotto inorganico	Armicarb	Bicarbonato di potassio
	Menorame	Cu ⁺⁺ in microdosi + zeoliti
	Cuprostar (<u>St</u>)	50% Ossid. tetraramico e 50% Idrossido di rame
Derivato del chitosano	Chitoplant solution	Chitosano cloridrato

Nel II anno di attività è stato seguito il medesimo protocollo sperimentale utilizzato nel corso del I anno ma, a causa della scarsa patogenicità manifestata dall'isolato di *P. infestans* presente nella collezione del CREA-DC, si è deciso di reperire un isolato maggiormente virulento che è stato richiesto al Dr. David Cooke del James Hutton Institute Scozia - UK. Sulle piantine sono stati effettuati i trattamenti e, successivamente, le inoculazioni artificiali utilizzando il suddetto isolato alla concentrazione di 1.04×10^5 sporangi mL⁻¹. Oltre ai 10 prodotti in studio (vedi tabella), la prova ha previsto la presenza di un controllo non trattato ma inoculato artificialmente e di un controllo non trattato e non inoculato, per un totale di 12 tesi. Per ciascuna tesi sono state considerate 12 ripetizioni. A partire dalla comparsa dei sintomi, è stato stimato l'indice di malattia per ogni foglia, utilizzando una scala a 5 classi di attacco (0-4) (Y. Miyake *et al.*, 2005). La gravità della malattia di ogni pianta è stata calcolata utilizzando l'indice di Mc Kinney. L'efficacia di ogni prodotto è stata valutata in termini di percentuale di gravità di malattia rispetto al controllo non trattato ma inoculato. La prova è stata ripetuta due volte. I risultati ottenuti hanno evidenziato un'ottima capacità di contenimento di *P. infestans* con l'impiego del formulato di riferimento Cuprostar, con il prodotto a base di microdosi di rame e minerali e con l'estratto di foglie di liquirizia. Risultati leggermente inferiori sono stati ottenuti con il bicarbonato di potassio e, a seguire, con l'estratto di *Yucca schidigera* e l'estratto di *Abies sibirica*. Anche tutti gli altri prodotti, però, hanno evidenziato una discreta capacità antiperonosporica.

Bibliografia citata:

Yutaka MIYAKE, Junetsu SAKAI, Masaru SHIBATA, Norihisa YONEKURA, Ichiro MIURA, Kazuo KUMAKURA and Kozo NAGAYAMA, 2005. Fungicidal activity of benthialvalicarb-isopropyl against *Phytophthora infestans* and its controlling activity against late blight diseases. Pestic. Sci., 30(4), 390–396.

LABORATORIO

Le prove volte a valutare l'effetto inibitorio dei prodotti sullo sviluppo miceliare di *P. infestans* hanno evidenziato un effetto di inibizione totale svolto dal formulato a base di rame e minerali zeolizzati, dall'estratto di foglie di liquirizia, dal formulato Armicarb a base di bicarbonato di potassio e dal formulato Serenade Max a base di *Bacillus subtilis* ceppo QST 713. È stata ottenuta un'inibizione lievemente inferiore della crescita del micelio con l'impiego del chitosano cloridrato, dell'estratto di *Yucca schidigera*, dell'estratto di *Abies sibirica* e del formulato Bioequi a base di borlanda fluida da melasso di barbabietola, equisetto e timo. Ha esplicito, invece, una scarsissima attività inibitoria l'estratto di semi di pompelmo.

Le prove volte a valutare l'effetto dei prodotti sulla germinazione degli sporangi hanno evidenziato una notevole attività inibitoria esplicita dal chitosano cloridrato, simile a quella ottenuta con l'impiego del prodotto rameico di riferimento. Risultati molto buoni, anche se leggermente inferiori,

sono stati ottenuti con il bicarbonato di potassio e il formulato Bioequi a base di borlanda fluida da melasso di barbabietola, equisetto e timo. Le saponine estratte da *Yucca schidigera*, hanno evidenziato un effetto inibitorio di poco inferiore al bicarbonato di potassio e al Bioequi. Scarsa è invece risultata la capacità di inibire la germinazione degli sporangi da parte dell'estratto di *Abies sibirica* e del formulato a base di estratto di semi di pompelmo. Non è stato possibile effettuare le letture al microscopio, per valutare l'effetto inibitorio sulla germinazione degli sporangi, dell'estratto di foglie di liquirizia, del formulato a base di rame e minerali zeolizzati e del formulato Serenade Max, a causa di difficoltà di lettura legate alla torbidità o alla composizione.

Categoria	Formulato	Principio Attivo	Inibizione	
			miceliare	germinazione
Estratto di pianta	Saponin	<i>Yucca schidigera</i>	+	+
	Trifolio	Foglie di liquirizia	++	N.L.
	Abies	<i>Abies sibirica</i>	+	+/-
	DF-100	Semi di pompelmo	-	+/-
	Bioequi	Borlanda fluida di melasso di barbabietola più estratto di equisetto e timo	+	+
Microrganismo	Serenade Max	<i>Bacillus subtilis</i> ceppo QST 713	++	N.L.
Prodotto inorganico	Armicarb	Bicarbonato di potassio	++	+
	Menorame	Cu ⁺⁺ in microdosi + zeoliti	++	N.L.
	Cuprostar (St)	50% Ossicl. tetraramico e 50% Idrossido di rame	++	++
Derivato del chitosano	Chitoplant solution	Chitosano cloridrato	+	++

++ = molto efficace; + = efficace; +/- = discretamente efficace; - = scarsamente efficace; N.L. = non leggibile

CS-Laimburg Task 2.1

Task 2.2.1 VITICOLTURA

Collezione varietale, vite bio al CS-Laimburg (25 varietà x 4 ripetizioni): il grado di precipitazioni registrato nei primi cinque mesi dell'anno 2017 è stato particolarmente ridotto (194,7 mm di precipitazione rispetto alla media di 257,1 mm degli ultimi 50 anni), mentre nei successivi 3 mesi (giugno, luglio, agosto) si è avuto un notevole incremento delle precipitazioni con 329,7 mm di pioggia. Le precipitazioni così contenute nel primo periodo hanno ridotto al minimo il pericolo di infezioni primarie di peronospora, mentre nel secondo periodo quest'ultima si è sviluppata molto intensamente. Nel 2017 come prodotto alternativo al rame si è scelto il bicarbonato di potassio formulato (Armicarb 85) alla dose di 500 g /hl, applicato in funzione delle previsioni meteorologiche.

Task 2.2.2 FRUTTICOLTURA

Collezione varietale, melo bio al CS-Laimburg e Val Venosta: confronto tra gestione bio e gestione integrata delle varietà più promettenti per la produzione biologica (campo sperimentale con rinnovo varietale continuo; ca. 20 varietà x 50 alberi per ciascuno dei tipi di gestione). Per le parcelle bio, sono previsti trattamenti con bicarbonato di K formulato (Karma 85) in Val Venosta e con polisolfuro di calcio presso il Centro Laimburg, che verranno effettuati sin dall'inizio delle infezioni secondarie, in accordo con il pericolo di infezione sui frutti che verrà segnalato dal modello previsionale RimPro.

Tecniche per ridurre le bagnature fogliari su diversi fruttiferi: In una prova di campo per contenere la ticchiolatura primaria su melo, su 4 blocchi randomizzati, vengono confrontati nuovi principi attivi naturali ed il telo antiacqua Keep in touch® (www.keepintouchsystem.eu).

Le stesse coperture sono utilizzate in prove specifiche per verificare la loro efficacia anche contro la ticchiolatura secondaria ed i marciumi di *Gloeosporium* su melo e per il contenimento della peronospora sulla vite. Queste prove inizieranno a fine luglio. Sono previste coperture su altri fruttiferi come l'albicocco ed il ciliegio.

Tecniche per ridurre perdite in post-raccolta dovute a marciumi, fumaggini e ticchiolatura secondaria: oltre alla copertura con il sistema anti pioggia (Keep in touch®) sono state effettuate delle prove in pieno campo con prodotti a base di Ulmasud (argille acide), rame a bassi dosaggi, polisolfuro di calcio e bicarbonati di Na e K. In post raccolta sono previsti dei trattamenti per immersione con acqua calda e con acque elettrolitiche (Verdenora).

Per il contenimento delle fumaggini in post raccolta oltre all'utilizzo di prodotti antifungini in pieno campo, quest'anno si è voluto testare anche l'efficacia di una spazzolatrice a doppio rullo per verificare se sia possibile pulire l'epidermide da questi funghi superficiali.

Il progetto EFRE con l'acronimo "HOT APPLES" per effettuare delle prove sperimentali con un prototipo di doccia ad acqua calda che permette di velocizzare notevolmente il processo di bagnatura, a differenza degli attrezzi usati finora che prevedevano l'immersione dei cassoni, non è stato accettato dall'apposita commissione giudicante.

Con la mancata approvazione del progetto viene quindi a mancare la possibilità di verificare l'effetto di questa nuova tecnologia dell'acqua calda, a livello industriale, sulla comparsa di diversi patogeni e malattie fisiologiche da magazzino come *Penicillium* spp., *Botrytis cinerea*, *Gloeosporium album*, *Neofabrea* spp., *Neonectria galligena*, *Monilia fructigena*, ticchiolatura (*Venturia inaequalis*), fumaggini (*Gloeodes pomigena*) ed inoltre l'influenza su malattie fisiologiche come il riscaldamento comune delle mele e l'imbrunimento interno.

Task 2.2.1 e 2.2.2

Nelle prove di confronto di nuovi principi attivi naturali su melo in pieno campo, sono state inserite nuove formulazioni a basso titolo cuprico per il contenimento della ticchiolatura primaria e secondaria.

In viticoltura è stata programmata una prova in campo con trattamenti tempestivi, durante la fase di germinazione delle spore, utilizzando rame e prodotti alternativi al rame. I prodotti sono stati individuati nel laboratorio del CS-Laimburg negli anni passati. La prova è stata effettuata su "piante spia" allevate in vaso, che sono state inserite nelle parcelle sperimentali non trattate in pieno campo, ogni qualvolta si sono presentate le condizioni idonee per possibili infezioni (ad esempio piogge, o elevata umidità dell'aria).

FEM

Task 2.1 e 2.2.1

Nel semestre sono state completate le sperimentazioni condotte in laboratorio e campo per testare l'efficacia dell'estratto naturale di equisetto (*Equisetum arvense*) nel contenimento di *Plasmopara viticola* su vite.

I risultati emersi dalle sperimentazioni sono stati riassunti nei seguenti punti:

- L'efficacia antiperonosporica dell'estratto di equisetto risulta significativamente diversa dal confronto rameico sia in laboratorio che in pieno campo.
- Nelle prove di laboratorio il dosaggio dell'estratto di equisetto non modifica significativamente l'effetto antiperonosporico.
- Nelle condizioni delle prove descritte l'estratto di equisetto manifesta un'azione non compatibile con una adeguata protezione di foglie e grappoli.
- La prova ha consentito di verificare l'efficacia di dosaggi ridotti di rame (200 e 400 g/ha) rispetto alla media dei dosaggi consigliati in etichetta (1570 g/ha su 30 formulati a base di

potiglia bordolese). Utilizzando i quantitativi indicati risulta problematico rispettare il limite dei 6 kg/ha*anno previsto per l'agricoltura biologica (Reg. CEE 354/2014).

- Rimane fondamentale la ricerca di alternative al rame che anche in ambienti difficili possano contribuire alla riduzione di utilizzo di questo metallo.
- La riduzione dei dosaggi, rispetto ai quantitativi consigliati, nel breve periodo risulta essere una via praticabile per limitare l'impiego di rame.
- E' importante valutare l'effetto sinergico del rame a basso dosaggio (200 g Cu/ha) con l'equiseto o altri prodotti alternativi.

Queste informazioni sono state oggetto di divulgazione a favore di viticoltori biologici in occasione di incontri pubblici di aggiornamento e sono state inserite in una specifica relazione tecnica presentata lo scorso 14 giugno nell'ambito del convegno "E' possibile un'agricoltura biologica senza l'impiego del rame?" organizzato dal CREA-DC.

Di seguito alcuni grafici che sintetizzano il lavoro svolto:

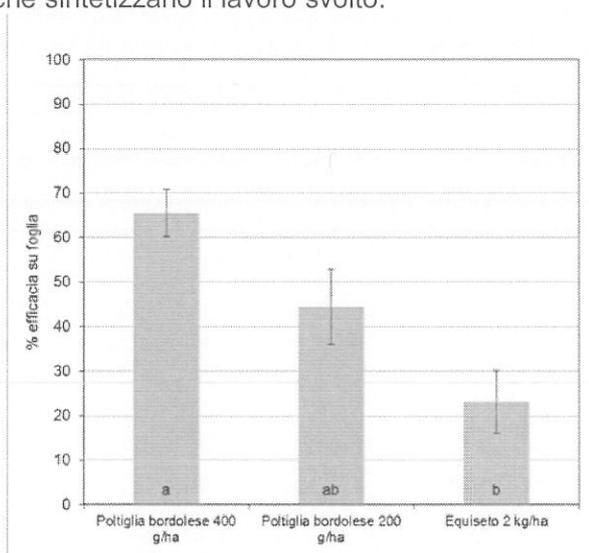


Grafico 1: efficacia su foglia dei prodotti testati in pieno campo

Le prove condotte in pieno campo rappresentano l'effettiva efficacia dei prodotti testati in annate con pressioni di peronospora differenti. Infatti il livello di danno sul grappolo rilevato sul testimone nel 2016 è stato di oltre 6 volte superiore a quello riscontrato nel 2015, passando da 15% a 91%. Sulle foglie l'effetto dell'annata è stato meno evidente con un +33% nel 2016 rispetto all'anno precedente. Le tesi trattate manifestano una efficacia relativamente costante come si nota dalle barre che rappresentano l'errore standard.

I rilievi finali sono stati eseguiti a metà luglio, in coincidenza con la massima diffusione del danno, prima che gli organi colpiti da peronospora disseccino o si stacchino dalla pianta.

Su foglia il rame impiegato a 400 g/ha nei due anni di prove manifesta un'efficacia (65%) statisticamente superiore all'equiseto mentre il dosaggio inferiore si colloca su valori intermedi (44%). L'equiseto sulla vegetazione si attesta su valori di efficacia di poco superiori al 20%.

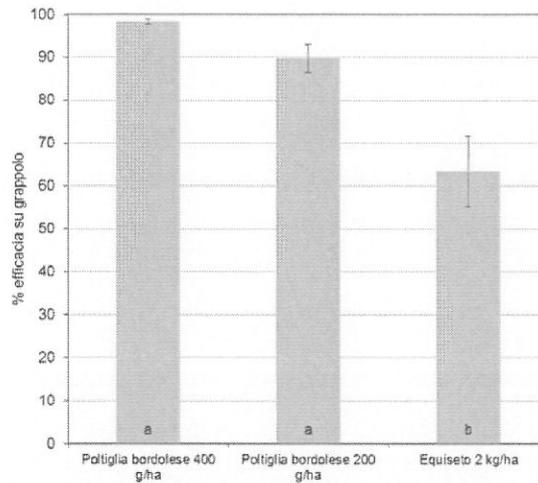


Grafico 2: efficacia su grappolo dei prodotti testati in pieno campo

Su grappolo l'effetto dose del prodotto rameico non è significativo. La dose più bassa si attesta su valori di efficacia del 90% rispetto al 98% del dosaggio più elevato. L'estratto di equiseto si differenzia statisticamente dai due dosaggi di rame presentando valori di efficacia di poco superiori al 60%.

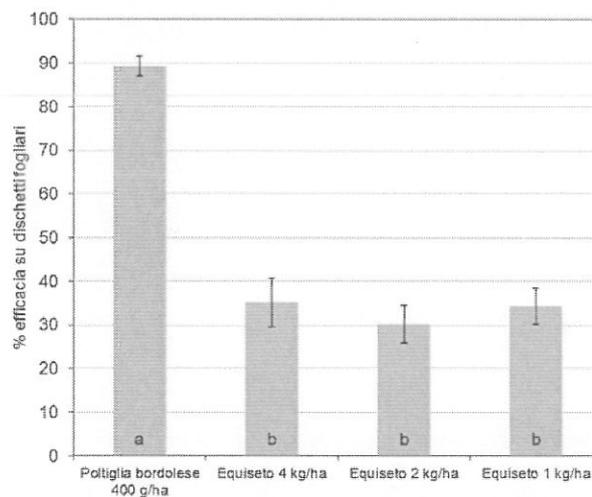


Grafico 3: efficacia su dischetti fogliari dei prodotti testati

Le prove di laboratorio volte a valutare l'efficacia antiperonosporica dell'estratto di equiseto hanno evidenziato una efficacia statisticamente inferiore rispetto al prodotto rameico a 400 g/ha. L'effetto dosaggio dell'estratto di equiseto (1, 2 e 4 kg/ha) non risulta significativo e l'efficacia media si attesta sul 33% rispetto all'89% rilevato sulla poltiglia bordolese. Si evidenzia che la concentrazione media dell'inoculo nelle 6 prove condotte è stata di $5 \cdot 10^5$ sporangi/mL, valore normalmente impiegato per rilievi di questo tipo e prossimo al valore massimo utilizzabile senza incorrere in fenomeni di competizione che riducono l'efficacia dell'inoculo.

UniTus

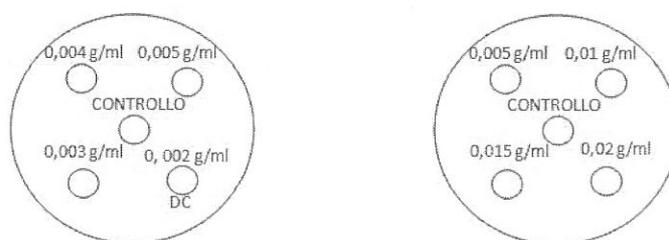
Task 2.3 e 2.4

ORTICOLTURA

- Valutazione *in vitro* della suscettibilità di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e di *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) ai sali di rame utilizzati in orticoltura Bio;
- Valutazione *in vitro* dell'efficacia di principi attivi di origine vegetale sul contenimento di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) e di *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav);
- Valutazione *in planta* di sostanze/principi attivi di origine naturale nei confronti di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst)
- Valutazione *in planta* di sostanze/principi attivi di origine naturale nei confronti di *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav);
- Valutazione *in vivo* di sostanze/principi attivi di origine naturale nei confronti di Pst;

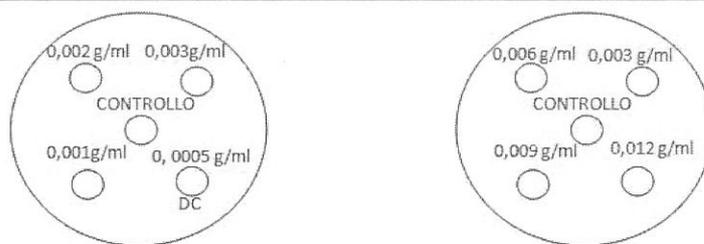
Gli isolati batterici utilizzati sono provenienti entrambi da collezione internazionale; nello specifico si tratta di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* - CFBP 1323 – Pst e di *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* – CFBP 3274 - Xav.

Le prove di suscettibilità degli isolati batterici noti di Pst e di Xv rispetto ai composti di rame solitamente impiegati in agricoltura biologica per il controllo di patogeni di natura batterica, sono state effettuate impiegando come sali di rame idrossido, ossicloruro e solfato. Le prove *in vitro* sono state svolte adottando due tecniche note: metodo dei dischetti e test dei substrati incorporati. La prima tecnica ha permesso di determinare i differenti aloni d'inibizione rispetto alla crescita dei patogeni, in funzione delle concentrazioni batteriche impiegate e dei differenti composti di rame. La seconda, al contrario, era una prova quantitativa pertanto permetteva di determinare la riduzione della crescita del batterio a differenti concentrazioni del sale di rame incorporate nel substrato. 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 H₂O 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 (per gli isolati di Pst e di Xv), di 1×10^8 UFC/mL e di 1×10^6 UFC/mL. Da un'analisi delle formulazioni commerciali ammesse in agricoltura biologica a base di idrossido di rame è emerso come questo sale di rame sia contenuto mediamente con una percentuale prossima al 22%. Oltre alla sua concentrazione media nel formulato, si è calcolata la dose di impiego media (DC: Dose di campo media) consigliata per controllare le batteriosi sul pomodoro (0.005 g/mL). Ad essa si sono poi determinate delle dosi di idrossido maggiori in quanto non si registrava inibizione alla DC; di seguito si riporta una schematizzazione dei dosaggi impiegati.



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

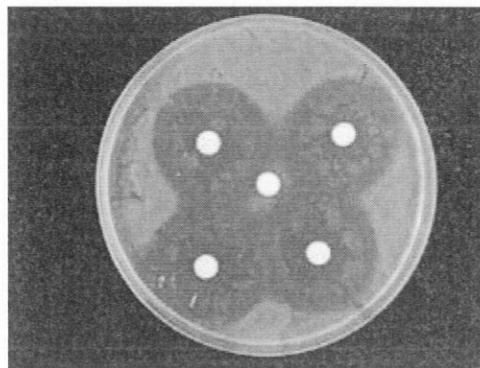
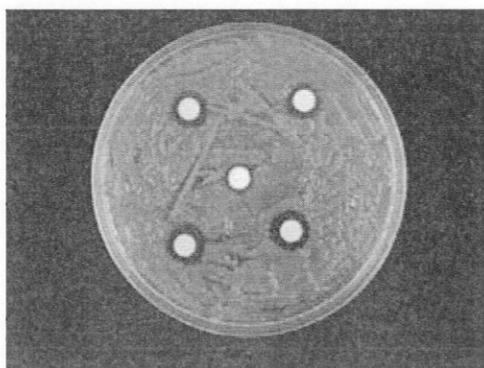
Similarmente si è proceduto per il sale di rame ossicloruro (0.002 mg/mL).



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

Dalle prove effettuate con l'idrossido di rame per entrambe i batteri (Pst e Xv) ed a tutte e due le concentrazioni utilizzate (1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL) la dose di impiego media consigliata nelle etichette di agrofarmaci ammessi in agricoltura biologica non inibiva la crescita delle popolazioni batteriche. Lievi inibizioni (aloni) sono state misurate quando la concentrazione di idrossido utilizzata era sei volte maggiore la dose di impiego (0.005 g/mL). A tale concentrazione si misuravano aloni medi d'inibizione di 1.46 mm ed 1.51 mm per Pst e di 0.11 mm e 1.02 mm per Xv. Gli aloni maggiori sono stati misurati con la dose massima utilizzata di idrossido di rame (0.012 g/mL) ed alla concentrazione di 1×10^6 UFC/mL; rispettivamente 5.35 mm e 3.63 mm per Pst e Xv. Analogamente a quanto riscontrato con il sale di rame idrossido, uno scenario simile è stato registrato a seguito delle prove effettuate impiegando il sale di rame ossicloruro. La dose di campo media (DC: 0.002 g/mL) consigliata sulle etichette di agrofarmaci ammessi in agricoltura biologica non inibiva la crescita di entrambi i batteri (Pst e Xv) a nessuna delle due concentrazioni (1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL) utilizzate. L'attività inibente dell'ossicloruro iniziava a manifestarsi quando la sua quantità superava di 2,5 volte la dose di campo (DC) media, pari quindi a 0.005 g/mL. A questa dose gli aloni registrati erano rispettivamente per le concentrazioni 1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL, rispetto a Pst, di 0.58 mm e di 1.03 mm e, rispetto a Xv, di 0.80 mm e di 0.99 mm. Anche in questo caso, gli aloni maggiori si sono registrati con l'impiego della dose massima di ossicloruro di rame, utilizzata alla concentrazione dei patogeni di 1×10^6 UFC/mL, di 5.40 mm e di 2.39 mm, rispettivamente per Pst e Xv.

In conclusione è stata evidenziata una maggiore suscettibilità di Pst rispetto a Xv ad entrambe le concentrazioni utilizzate (1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL). Di seguito, esempio di aloni d'inibizione ottenuti mediante la tecnica *in vitro* del saggio dei dischetti, l'utilizzando l'isolato di Xv a differenti concentrazioni (1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL) in presenza di un idrossido di rame a differenti concentrazioni (dose di campo e superiori alla stessa).

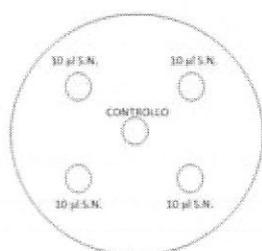


Xv (1×10^8 (sin) e 1×10^6 (ds) UFC/mL): inibizione con idrossido di rame mediante dose di campo e quindi dosi crescenti (DC: dose di campo nel dischetto in alto a sin. - dose maggiore nel dischetto in basso a sin.; dischetto centrale di controllo).

In riferimento alle ricerche bibliografiche inerenti all'individuazione di sostanze naturali con attività antimicrobica, queste si sono indirizzate alla selezione di sostanze di origine naturale (vegetale) potenzialmente efficaci in prove *in vitro*, *in planta* ed *in vivo* nei confronti di *P. syringae* pv. *tomato*

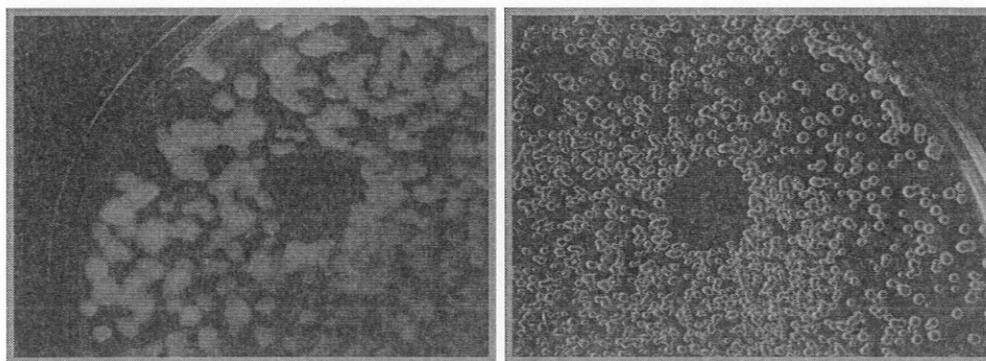
(Pst) e *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xv), e per effettuare prove in vitro nei confronti di *X. arboricola* pv. *pruni* (Xp).

Le prove di suscettibilità degli isolati batterici di Pst e di Xv rispetto alle sostanze naturali di origine vegetale sono state condotte alla concentrazione di 1×10^6 UFC/mL. Queste prevedevano uno screening iniziale su entrambi i batteri con le stesse provate singolarmente e poi in combinazione fra loro. Questo ha permesso di determinare se la miscela di più sostanze poteva determinare un effetto sinergico antimicrobico rispetto alla crescita di Pst, Xav e di Xp. Il metodo con cui sono state effettuate le prove era il "saggio degli spot", il quale analogamente al precedente, prevedeva la disposizione di micro-soluzioni di 10 μ L ciascuna della sostanza naturale singola/in combinazione, ai vertici di una disposizione a quadrato. Al centro dello stesso veniva distribuita la stessa quantità di acqua distillata sterile, avente funzione di controllo. La differenza con il "metodo dei dischetti" era che in questo caso i 10 μ L venivano disposti direttamente a contatto con il substrato nutritivo agarizzato.



Rappresentazioni della distribuzione delle sostanze naturali di origine vegetale impiegate nelle prove *in vitro*.

Dallo screening iniziale, il quale prevedeva di saggiare differenti sostanze di origine naturale singolarmente, venivano evidenziati interessanti risultati rispetto a Pst ed a Xv mediante l'Ac. Gallico alla concentrazione dell'1% mentre, riducendo questa concentrazione, gli aloni di inibizione maggiori si misuravano utilizzando alcuni oli essenziali. Successivamente, venivano effettuati ulteriori saggi utilizzando le differenti sostanze naturali in combinazione fra loro. I risultati più interessanti al momento conseguiti su entrambi i ceppi batterici (Pst, Xv) sono derivati dall'impiego della combinazione Ac. Gallico 1% + Oli essenziali 0.1% e per una miscela di oli essenziali al 2%.



Esempi di aloni d'inibizione su Pst (1×10^6 UFC/ml) (sin) e Xv (1×10^6 UFC/mL) (ds) mediante l'impiego di una miscela costituita da Ac. Gallico 1% + Oli essenziali 0.1%.

Mediante il saggio dell'incorporazione dei sali di rame nel substrato, emergevano risultati molto interessanti. Il Pst rispetto allo Xav risultava esser più suscettibile al solfato e all'ossicloruro di rame, infatti all'applicazione di metà delle DC lo *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* ricominciava la sua crescita, mostrando una riduzione di circa 3 unità logaritmiche. All'utilizzo di $\frac{1}{4}$ della DC di solfato e di ossicloruro, entrambi i batteri presentavano una riduzione rispetto al controllo (1×10^6 UFC/mL) pari a circa 3 unità logaritmiche. L'idrossido di rame risultava esser il sale più efficace, infatti, a tutte e tre le concentrazioni utilizzate (DC, $\frac{1}{2}$ DC e $\frac{1}{4}$ DC) non si registravano crescite batteriche per entrambi i patogeni testati.

Le prove *in planta* sono state sviluppate in serra ed hanno previsto lo sviluppo di piante di pomodoro della cv. Pullrex Bio. Le stesse piante appena raggiunto il quarto palco sono state quindi sottoposte preventivamente a trattamenti con idrossido di rame, a vari dosaggi, e con le sostanze naturali selezionate. Dopo 24 ore è stata effettuata l'inoculazione artificiale con il batterio fitopatogeno *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) (CFBP 1323).

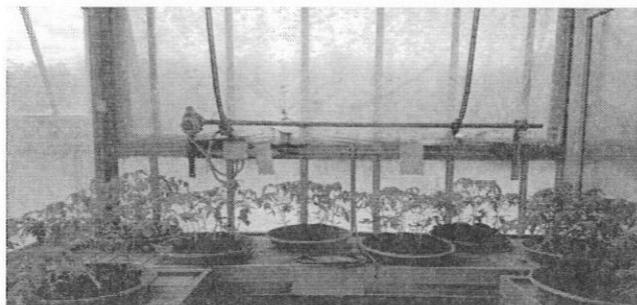


Figura 1. Le piante di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* M.) suddivise in 8 tesi.

L'inoculo in soluzione acquosa contenente l'isolato batterico (1×10^8 UFC /mL) di cui sopra, è stato effettuato mediante nebulizzazione all'interno della serra. Qui si sono mantenuti i parametri di temperatura, luce ed umidità relativa (%), ideali allo sviluppo ottimale delle piante di pomodoro e della moltiplicazione e colonizzazione del batterio inoculato (Fig. 1).

Successivamente all'inoculo batterico, quotidianamente, è stata osservata per un periodo di 14 giorni, l'eventuale comparsa dei sintomi e la sopravvivenza epifitica delle rispettive popolazioni.

Le piante (80 in totale), sono state suddivise in 8 tesi:

- Controllo positivo: Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0.1% vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Composti fenolici 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 + Composti fenolici 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/4 + Composti fenolici 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Controllo negativo: Acqua.

Precedentemente a questa prova sono stati effettuati dei saggi preliminari che hanno permesso di determinare la dose massima di oli essenziali da utilizzare nella miscela finale dei trattamenti, al fine di evitare effetti fitotossici. La quantità massima che non evidenziava fitotossicità sulle piante di pomodoro era lo 0.1%. Le prove preliminari, oltre che per gli oli essenziali, sono state effettuate anche per i composti fenolici e per l'Ac. Gallico, che risultavano non essere fitotossici rispettivamente alla dose di 1 g/L e di 0.1% della soluzione.

La valutazione delle popolazioni batteriche presenti sul filloplano delle piante di pomodoro è stata effettuata mediante la tecnica del conteggio delle colonie batteriche sviluppatesi su substrato agarizzato inoculato a seguito di appropriate diluizioni dell'acqua di lavaggio delle foglie (Babelegoto *et al.*, 1988). Oltre alla sopravvivenza epifitica durante la durata del test, si è voluto considerare anche la gravità (n° necrosi/pianta) relativa alla singola pianta e l'incidenza (n° necrosi tesi e riduzione percentuale) della patologia relativa all'intera tesi oggetto di studio.

A distanza di 1,7 e 14 giorni dalla contaminazione batterica sono state prelevate 4 foglie per ogni pianta (40 foglie totali per ogni tesi) e sono state poste all'interno di sacchetti sterili, dove sono stati aggiunti 10 mL di acqua deionizzata sterile. Mediante uno Stomacher® Lab-Blender 80 (International PBI) è stato effettuato il lavaggio delle foglie di pomodoro (3 minuti per 200 g/m).

Dall'acqua di lavaggio di ciascun sacchetto sono state effettuate 5 diluizioni decimali e da ognuna di queste sono state prelevate 2 aliquote di 100 μ L ciascuna. Queste sono poi state distribuite uniformemente in altrettante Piastre Petri contenenti KB.

Le piastre sono state poste in termostato alla temperatura di $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Al termine delle 48 h si è proceduto al conteggio delle colonie mediante l'utilizzo di uno stereoscopio. Per il conteggio del

numero di colonie batteriche è stata utilizzata la diluizione decimale da cui si era sviluppato un significativo numero di colonie batteriche (tra 30 e 300). I valori ottenuti sono stati utilizzati per il calcolo del numero di unità formanti colonie batteriche presenti nella sospensione iniziale (UFC/mL). Contemporaneamente, è stata calcolata anche l'area fogliare (cm²) mediante l'uso di uno specifico software (APS Assess). Infine, i dati relativi alle UFC/mL del patogeno presenti nella sospensione iniziale sono stati rapportati alle superfici delle foglie di pomodoro utilizzate nei lavaggi così da poter risalire al numero di unità formanti colonie per cm² di superficie fogliare (UFC/cm²).

Dalla sopravvivenza epifitica (Fig. 3) sono emersi risultati interessanti, infatti al giorno uno la concentrazione batterica sul filloplano per ogni tesi (tranne il controllo negativo) era di poco superiore a 1×10^3 UFC/cm² circa. Al giorno 7 la concentrazione batterica permaneva pressoché inalterata nella tesi A (controllo positivo). La tesi D, ossia quella che vedeva l'utilizzo dell'idrossido di rame alla DC (dose di campo), mostrava la riduzione maggiore; la concentrazione batterica, infatti, ha subito un decremento superiore all'unità logaritmica. Risultati molto simili si sono individuati con la tesi C (composti fenolici 1g/L) ove si vedeva una concentrazione batterica di 1×10^3 UFC/cm². Buoni risultati sono stati ottenuti anche con le tesi E, F ed H, rispettivamente idrossido di rame alla concentrazione di metà della DC, stesso dosaggio di rame in soluzione con i composti fenolici e idrossido di rame utilizzato ad un quarto della dose di campo insieme ai composti fenolici. Le tre tesi mostravano una concentrazione batterica pari a circa 3×10^2 UFC/cm², anche se il risultato migliore si registrava quando il rame era utilizzato alla metà della sua concentrazione di campo in soluzione con la Cumarina (1g/L).

Infine al 14° giorno, ossia al terzo ed ultimo prelievo, si notava una notevole ricrescita della popolazione batterica; per le tesi B,C,D, E e F, infatti, si misurava una concentrazione di 1×10^4 UFC/cm². La tesi di controllo positivo, A, mostrava una concentrazione pressoché inalterata rispetto ai prelievi precedenti. Al contrario la tesi che ha mostrato dei buoni risultati, ossia dove la popolazione batterica è comunque cresciuta ma in maniera più contenuta rispetto a quanto visto nelle altre tesi, è la F (Idrossido di Rame a metà della DC in soluzione con i composti fenolici).

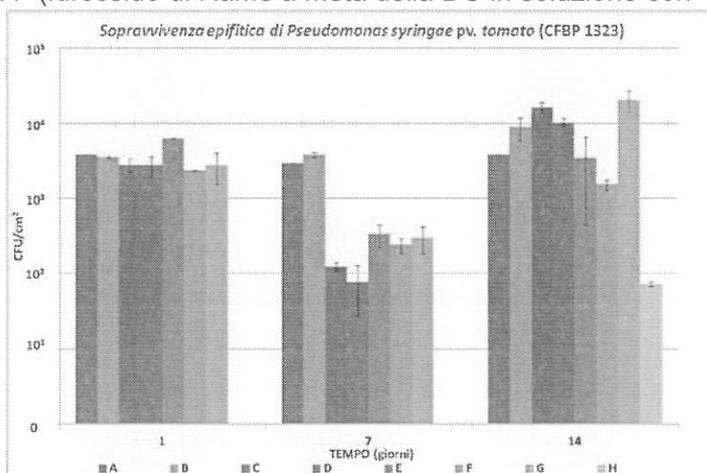


Figura 2. Sopravvivenza epifitica di Pst nei 14 giorni del saggio.

Legenda:

- Controllo positivo: Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0.1% vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Composti fenolici 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 + Composti fenolici 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/4 + Composti fenolici 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Controllo negativo: Acqua.

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica (ANOVA).

I dati relativi alla gravità ed incidenza della batteriosi sono stati considerati e calcolati a partire dal 5° giorno successivo all'inoculazione, ossia dal momento in cui le necrosi erano ben visibili. Successivamente al primo conteggio effettuato come sopra, si sono fatti ulteriori rilievi al 7°, 10° e 14° giorno. Ad ogni rilievo venivano conteggiate tutte le necrosi presenti su ogni pianta così da ottenere a fine campionamento il dato unico per pianta e per tesi (Figg. 3 – 4).



Figura 3. Diffusione della patologia al 10° giorno nella tesi G (Idrossido di Rame DC/4 + Cumarina)

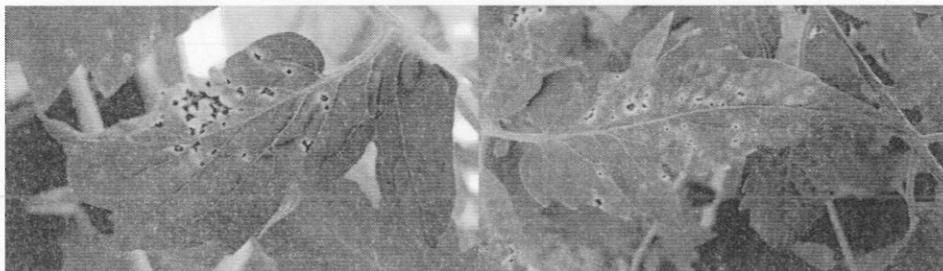


Figura 4. Sintomi di attacco di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* riscontrati al 14° e al 10° giorno sulla tesi I

I dati ottenuti evidenziavano dei risultati che confermavano quanto detto sopra a seguito della sopravvivenza epifitica. I risultati di gravità della patologia (Fig. 5), dati riferiti alla singola pianta al termine dei 14 giorni di test, evidenziavano la buonissima attività di contenimento della tesi F e della tesi D, rispettivamente idrossido di rame alla concentrazione di metà della dose di campo in soluzione con i composti fenolici (1g/L) e idrossido di Rame alla dose di campo. Al contrario le altre tesi mostravano tutte una quantità di necrosi maggiore al 14° giorno, con il risultato più alto registrato sulla tesi G, ossia quella che vedeva l'utilizzo dell'idrossido di rame alla dose di campo in soluzione con i composti fenolici (1g/L).

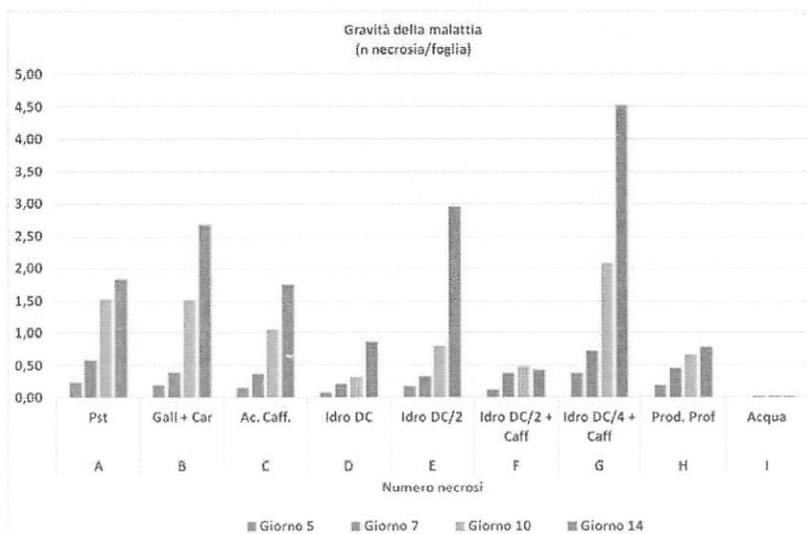


Figura 5. Gravità della malattia da Pst.

Relazione progetto ALT.RAMEinBIO

Dall'esame dei dati relativi alla diffusione della patologia (Fig. 6) emergevano le buone attività di contenimento delle tesi D e F, rispettivamente idrossido di rame utilizzato alla dose di campo e utilizzato a metà di questa concentrazione in soluzione con i composti fenolici (1g/L), le quali determinavano una riduzione percentuale della quantità di necrosi per tesi superiore al 50%.

La tesi G, idrossido di rame ad un quarto della dose di campo in soluzione con i composti fenolici (1g/L), si è mostrata nuovamente la tesi con minor capacità di ridurre la patologia infatti in tutti e quattro i rilievi non si è mai registrata una riduzione delle necrosi rispetto al controllo, tesi A. Le prove *in vivo* sono state condotte nel campo dell'Az. Agr. Didattico-Sperimentale "N. Luppoli" dell'Università della Tuscia e prevedevano l'utilizzo di piante di pomodoro della cv. Pullrex Bio. Queste venivano disposte in 3 blocchi ognuno composto da 5 file di 12 piante.

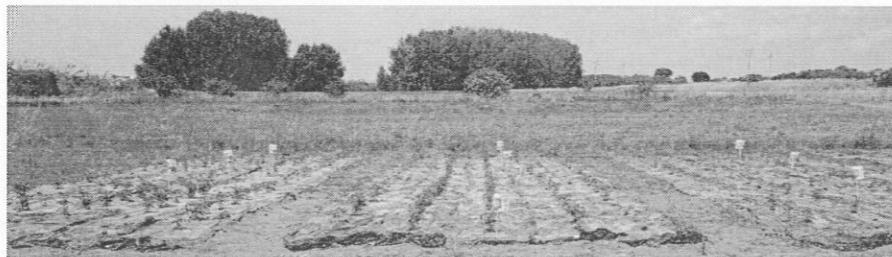


Figura 6. Particolare delle parcelle sperimentali nelle quali erano disposte le piante per le prove in pieno campo.

La disposizione delle piante era random e comprendeva 30 piante per ogni tesi, ognuna di queste veniva poi replicata. Pertanto, all'interno dei 3 blocchi iniziali si venivano a determinare 6 "gruppi", ognuno composto da 30 piante e sottoposti allo stesso trattamento. Al fine di evitare l'eventuale effetto bordo e di deriva, e che durante l'esecuzione dei trattamenti il vento o altri agenti atmosferici successivi all'esecuzione dei trattamenti potesse inficiare i risultati, i rilievi venivano effettuati non considerando le n° 18 piante perimetrali al gruppo individuato.

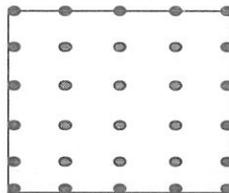


Figura 7. Rappresentazione grafica del gruppo di piante soggette allo stesso trattamento. Quelle colorate di verde erano conteggiate rispetto alle rosse, le quali erano soggette all'effetto bordo e deriva.

Le stesse piante, appena raggiunto il quarto palco, sono state quindi sottoposte preventivamente a trattamenti con idrossido di rame, a vari dosaggi, e con le sostanze naturali selezionate. Dopo 24h è stata effettuata l'inoculazione artificiale con il batterio fitopatogeno Pst (CFBP 1323). Le sostanze naturali e le combinazioni utilizzate in quest'ultima prova erano scelte fra quelle testate precedentemente e che avevano evidenziato i risultati migliori.

L'inoculo in soluzione acquosa contenente l'isolato batterico (1×10^8 UFC /mL) di cui sopra, è stato effettuato mediante nebulizzazione manuale. Le temperature per lo sviluppo e la proliferazione batterica erano ideali allo sviluppo dello stesso. Successivamente all'inoculo batterico, per un periodo di 25 giorni, è stata osservata quotidianamente la comparsa dei sintomi. I primi si presentavano al 10° giorno ed i rilievi con il conteggio degli stessi veniva effettuato ogni 5 giorni, fino all'ultimo giorno di prova. Attraverso la conta delle necrosi è stato possibile stimare due parametri molto importanti: la gravità della malattia e la riduzione dell'incidenza della malattia (Fig. 3). Al fine di determinare l'effettiva presenza del batterio pur se i sintomi della picchiettatura batterica sono molto chiari, dalle foglie veniva re-isolato *P. syringae* pv. *tomato*.

Le piante (180 in totale), sono state suddivise in 3 tesi:

- Controllo positivo: Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC vs Pst (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 + Cumarina 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL)

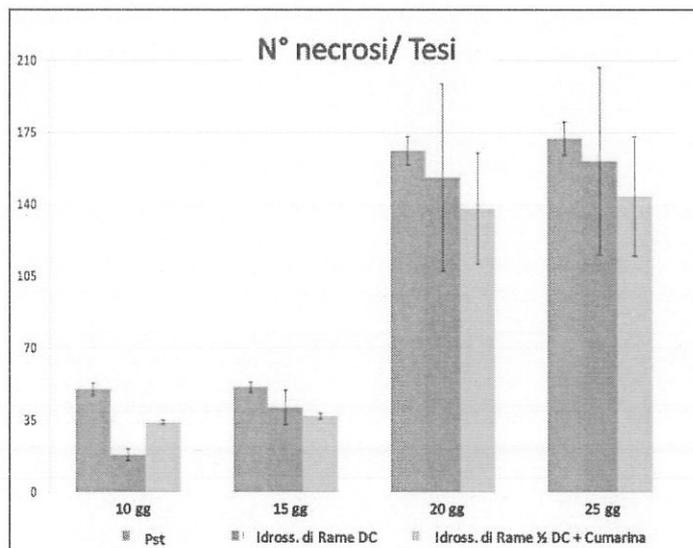


Figura 8. Gravità della picchiettatura batterica (Pst).

Legenda:

DC: Dose di Campo (valore medio relativo agli agrofarmaci a base di rame ad oggi registrati in biologico per questa problematica);

DC/2: 1/2 della dose di campo.

Oltre al parametro oggetto della precedente rappresentazione, mediante la conta dei sintomi manifestatesi è stato possibile determinare anche la riduzione percentuale dell'incidenza della patologia. Tale parametro ha pertanto permesso di confrontare la capacità di ridurre la moltiplicazione batterica.

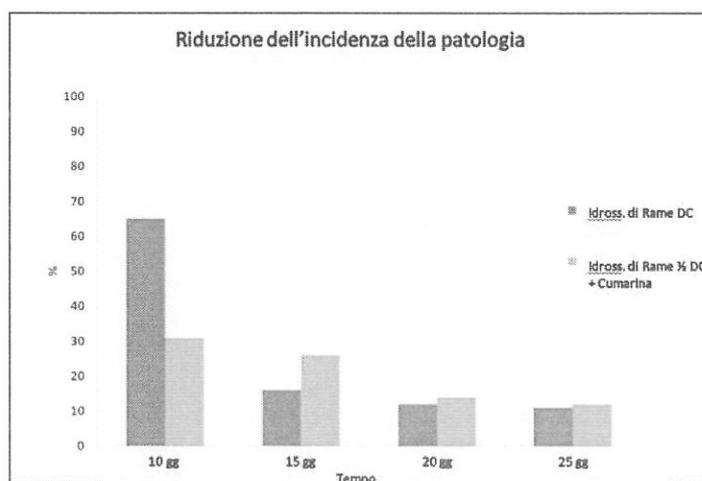


Figura 9. Riduzione % dell'incidenza della patologia.

Legenda:

DC: Dose di Campo (valore medio relativo agli agrofarmaci a base di rame ad oggi registrati in biologico per questa problematica);

DC/2: 1/2 della dose di campo.

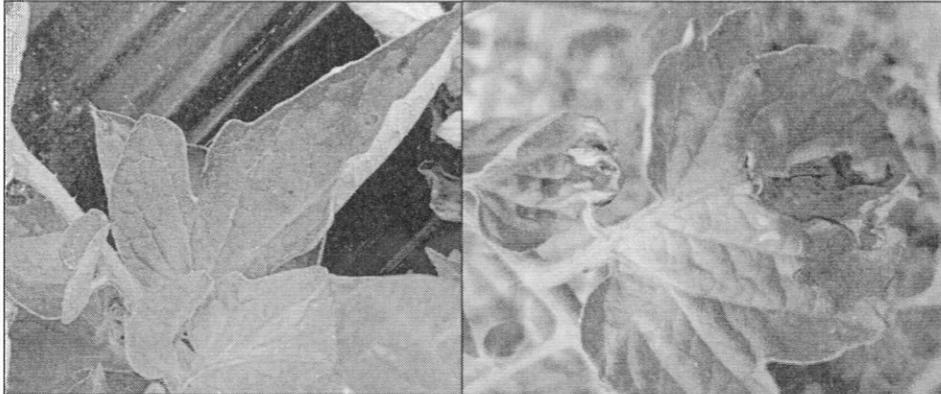


Figura 10. Particolare dei sintomi riscontrati sulla superficie fogliare; necrosi con alone clorotico.

Dalla prova effettuata in campo è stata confermata la prontezza d'azione dell'Idrossido di Rame nel rilasciare ioni rameici nel breve periodo; dopo 7-10 giorni la tesi preventivamente trattata con il sale rameico mostrava una quantità di necrosi significativamente inferiore alle altre due. Il rilievo del 15° giorno mostrava una capacità maggiore di riduzione % dell'incidenza della patologia della miscela di Idrossido di Rame utilizzato a metà della dose di campo e Cumarina, rispetto al solo Idrossido di Rame. Dopo 20 giorni i dati mostravano la riduzione dell'efficacia per entrambi i trattamenti preventivi effettuati con un progressivo aumento dei sintomi.

Successivamente al Pst, è stata la volta dell'altro isolato batterico. Anch'esso è proveniente da collezione internazionale e nello specifico si tratta di Xav (CFBP 3274). Questo è stato preliminarmente saggiato *in vitro* per verificare il suo grado di virulenza e quindi *in planta*.

Le prove *in planta* sono state sviluppate nel fitotrone ed hanno previsto anch'esse lo sviluppo di piante di pomodoro della cv. Pullrex Bio. Queste appena raggiunto il quarto palco sono state sottoposte preventivamente a trattamenti con idrossido di rame, a vari dosaggi, e con le sostanze naturali selezionate. Dopo 24h è stata effettuata l'inoculazione artificiale con il batterio fitopatogeno Xav (CFBP 3274).

L'inoculo in soluzione acquosa contenente l'isolato batterico (1×10^8 UFC/mL) di cui sopra, è stato effettuato mediante nebulizzazione all'interno di un fitotrone, poiché il batterio oggetto della prova è un patogeno da quarantena. Nel fitotrone sono stati mantenuti i parametri ideali allo sviluppo ottimale delle piante di pomodoro e della moltiplicazione e colonizzazione del batterio inoculato. Successivamente all'inoculo batterico, per un periodo di 25 giorni, veniva osservata quotidianamente la comparsa dei sintomi e studiata la sopravvivenza epifitica delle popolazioni (Fig.6). Le prove nel fitotrone venivano ripetute 3 volte e di seguito si riporta il dato medio delle 3 repliche.

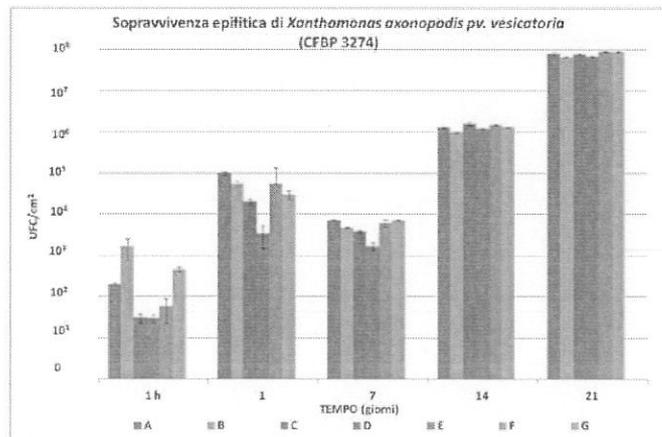


Figura 11. Sopravvivenza epifittica del batterio nei 21 giorni di prova.

Le piante (70 in totale), sono state suddivise in 7 tesi:

- Controllo positivo: Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC vs Xav (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 vs Xav (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 + Cumarina 1 g/L vs Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Cumarina 1 g/L vs Xav (1×10^8 UFC/mL)
- Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0.1% vs Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Controllo negativo: Acqua.

Legenda:

DC: Dose di Campo (valore medio relativo agli agrofarmaci a base di rame ad oggi registrati in biologico per questa problematica);

DC/2: $\frac{1}{2}$ della dose di campo;

DC/4: $\frac{1}{4}$ della dose di campo.

Precedentemente a questa prova venivano effettuati saggi preliminari che hanno permesso di determinare la dose massima di oli essenziali da utilizzare nella miscela finale dei trattamenti, al fine di evitare effetti fitotossici. La quantità massima che non ha evidenziato fitotossicità sulle piante di pomodoro era lo 0.1%. Le prove preliminari, oltre che per gli oli essenziali, sono state effettuate anche per la Cumarina e per l'Ac. Gallico i quali, risultavano non fitotossici rispettivamente alla dose di 1 g/L e di 0.1% della soluzione. La valutazione delle popolazioni batteriche presenti sul filloplano delle piante di pomodoro è stata attuata mediante la tecnica del conteggio delle colonie batteriche sviluppatesi su substrato agarizzato inoculato a seguito di appropriate diluizioni dell'acqua di lavaggio delle foglie (Babelegoto *et al.*, 1988). Oltre alla sopravvivenza epifitica durante la durata del test sono stati considerati la gravità e l'incidenza della patologia. La gravità è relativa alla singola pianta (n° necrosi/pianta) mentre l'incidenza individua un valore relativo a tutta la tesi (n° necrosi/tesi e riduzione percentuale). A distanza di 1h, 1, 7, 14 e 21 giorni dalla contaminazione batterica sono state prelevate 4 foglie per ogni pianta (40 foglie totali per ogni tesi) e sono state poste all'interno di sacchetti sterili, dove sono stati aggiunti 10 mL di acqua deionizzata sterile. Mediante uno Stomacher® Lab-Blender 80 (International PBI) è stato effettuato il lavaggio delle foglie di pomodoro (3 minuti per 200 g/m).

Dall'acqua di lavaggio di ciascun sacchetto sono state effettuate 5 diluizioni decimali e da ognuna di queste sono state prelevate 2 aliquote di 100 μ L ciascuna. Queste sono poi state distribuite uniformemente in altrettante Piastre Petri contenenti KB. Le piastre sono state poste in termostato alla temperatura di $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Al termine delle 48h si è proceduto al conteggio delle colonie mediante l'utilizzo di uno stereoscopio. Per il conteggio del numero di colonie batteriche è stata utilizzata la diluizione decimale da cui si era sviluppato un significativo numero di colonie batteriche (tra 30 e 300).

I valori ottenuti sono stati utilizzati per il calcolo del numero di unità formanti colonie batteriche presenti nella sospensione iniziale (UFC/mL). Contemporaneamente è stata calcolata anche l'area fogliare (cm^2) mediante l'uso di uno specifico software per PC (APS Assess).

Infine, i dati relativi alle UFC/mL del patogeno presenti nella sospensione iniziale sono stati rapportati alle superfici delle foglie di pomodoro utilizzate nei lavaggi, così da poter risalire al numero di unità formanti colonie per cm^2 di superficie fogliare (UFC/ cm^2).

Dall'analisi della sopravvivenza epifitica di Xav sono emersi risultati interessanti (Fig. 6); infatti al giorno 1, la concentrazione batterica sul filloplano in media era prossima ad 1×10^4 UFC/ cm^2 con i valori più alti registrati nel controllo positivo. Al giorno 7° la concentrazione batterica misurata era inferiore in tutte le tesi, con il valore minimo registrato nella tesi D, ossia quella trattata preventivamente con la miscela di Idrossido di Rame 22% utilizzato alla metà della DC con Cumarina (1g/L). Risultati interessanti ma con valori batterici comunque superiori, venivano misurati nelle tesi B e C (trattamenti preventivi rispettivamente alla DC ed a metà della stessa).

Al contrario la sola Cumarina (1g/L) e la miscela di Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0.1% mostravano dati simili al controllo positivo, pertanto l'attività delle stesse era pressoché minima o nulla.

Al giorno 14, si registrava una ripresa della moltiplicazione batterica; infatti in tutte le tesi si

misurava una concentrazione media prossima a 1×10^8 UFC/mL. Le tesi che permettevano di misurare una popolazione batterica significativamente inferiore al controllo positivo (tesi A) erano le due tesi B e D, rispettivamente Idrossido di Rame 22% alla DC e Idrossido di Rame 22% DC/2 + Cumarina (1 g/L). All'ultimo prelievo, 21 giorni dopo l'inoculazione, la situazione era simile in tutte le tesi con una popolazione media pari a 1×10^8 UFC/mL. Questo evidenziava che le popolazioni in tutte le tesi confermavano il trend di moltiplicazione già registrato al precedente rilievo e che l'attività di contenimento dell'idrossido di rame e della miscela dello stesso con la Cumarina era ridotta. I dati relativi alla gravità ed all'incidenza della batteriosi sono stati considerati e calcolati a partire dal 15° giorno successivo all'inoculazione, ossia da quando le necrosi erano visibili. Successivamente al primo conteggio effettuato, come sopra, sono stati effettuati ulteriori rilievi al 20° e 25° giorno. Ad ogni rilievo sono state conteggiate tutte le necrosi presenti su ogni pianta così da ottenere, a fine campionamento, il dato unico per pianta e per tesi. I dati ottenuti hanno confermato quanto sopra riportato in riferimento alla sopravvivenza epifitica di Xav. I risultati della gravità della patologia (Fig. 12), al termine dei 25 giorni di test evidenziavano l'ottima attività di contenimento di Xav nelle tesi B e D, rispettivamente, con idrossido di rame alla dose di campo ed idrossido di rame alla concentrazione di $\frac{1}{2}$ della dose di campo in soluzione con la Cumarina. Interessanti risultati venivano ottenuti con la Cumarina distribuita da sola e con l'utilizzo dell'idrossido alla concentrazione di $\frac{1}{2}$ della dose di campo, registrando però sempre dati superiori alle tesi B e D. La tesi F (Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0.1%) confermava quanto già evidenziato nel grafico in fig. 6; infatti in ogni rilievo venivano conteggiate un numero di necrosi maggiori del controllo positivo.

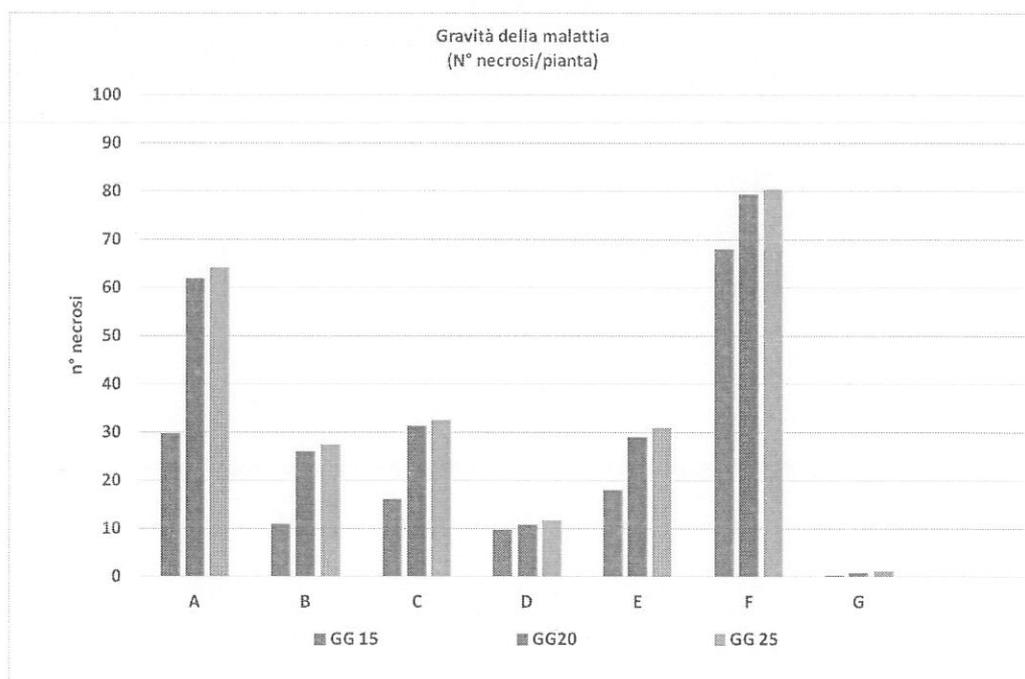


Figura 12. Gravità della maculatura batterica (Xav).

Legenda:

- Controllo positivo: Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC vs Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC/2 vs Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC/2 + Cumarina 1 g/L vs Xav (1×10^8 UFC /mL);
- Cumarina 1 g/L vs Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0,1% vs Xav (1×10^8 UFC /mL);
- Controllo negativo: Acqua.



Figura 13. Sintomi rilevati al 15° giorno (sx) e al 20° giorno (dx).

Dall'esame dei dati relativi alla incidenza della patologia (Fig. 13) emerge un'interessante attività di contenimento della maculatura batterica del pomodoro nelle tesi B ed D, rispettivamente idrossido di rame utilizzato alla dose di campo e, soprattutto, quando utilizzato a metà di questa concentrazione in soluzione con la Cumarina (1g/L), determinando una riduzione percentuale (%) delle necrosi per tesi superiore al 60%. Anche mediante la distribuzione della sola Cumarina e dell'Idrossido alla concentrazione di ½ della dose di campo, si otteneva un buon contenimento di Xav, infatti la riduzione % era prossima al 50%. La miscela di Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0.1% non mostrava alcuna riduzione.

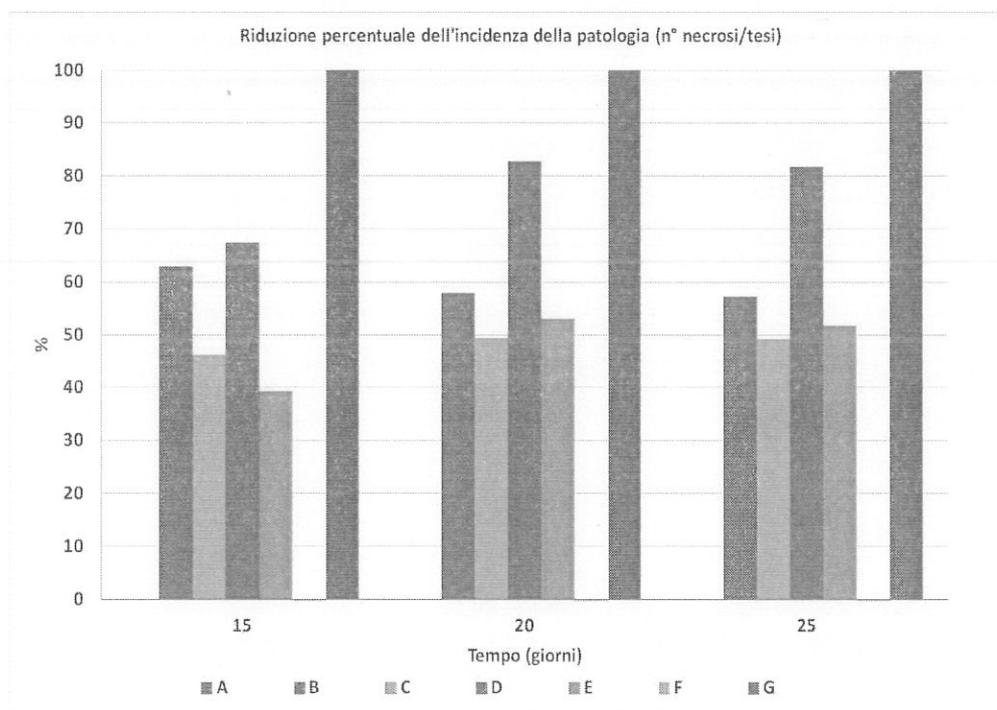


Figura 14. Riduzione % dell'incidenza della patologia.

Legenda:

- Controllo positivo: Xav (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC vs Xav (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 vs Xav (1×10^8 UFC/mL)
- Idrossido di Rame 22% DC/2 + Cumarina 1 g/L vs Xav (1×10^8 UFC /mL);
- Cumarina 1 g/L vs Xav (1×10^8 UFC/mL)
- Ac. Gallico 1% + Carvacrolo 0.1% vs Xav (1×10^8 UFC /mL);
- Controllo negativo: Acqua.

Mediante il software APS Assess è stato possibile misurare l'area fogliare. Dai risultati di questi test (Fig. 15) si nota come l'attività di contenimento di Xav da parte del sale di rame è accompagnata da una riduzione di sviluppo della superficie fogliare rispetto alle tesi non trattate preventivamente con il solo rame metallo. In relazione a quanto si evince dai risultati sulla

sopravvivenza epifitica di Xav, è di notevole interesse il risultato registrato nelle tesi D (soluzione con ½ della concentrazione di campo di idrossido di rame e Cumarina); qui, l'area fogliare media delle foglie registra un'estensione superiore di circa 3 cm² rispetto a quelle trattate con il solo idrossido di rame alla concentrazione di campo (DC).

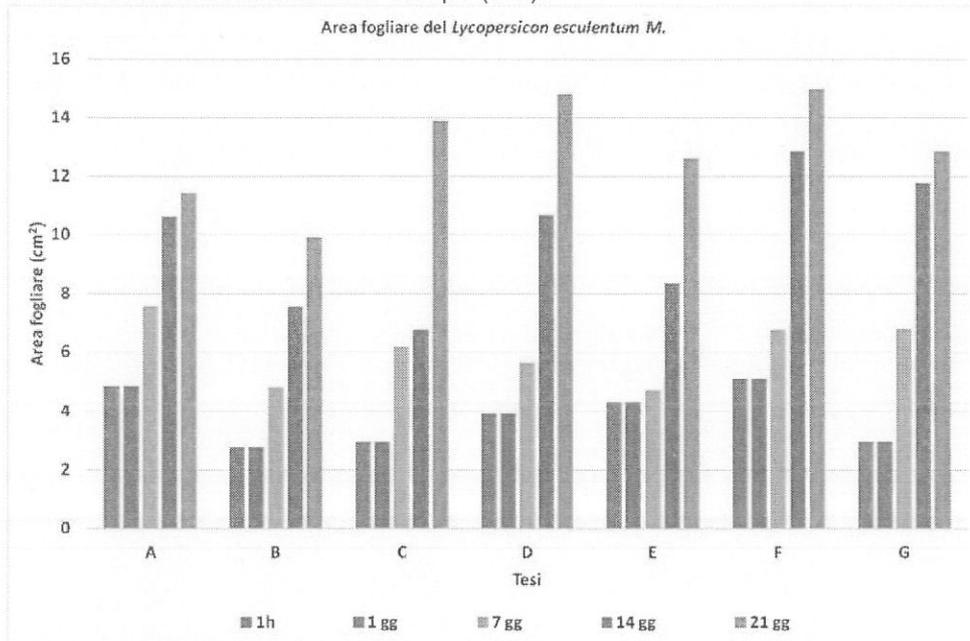


Figura 15. Area media fogliare di ogni pianta di pomodoro (*Lycopersicon esculentum* M.).

Legenda:

- Controllo positivo: Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Ac. Gallico 0.25% + Carvacrolo 0.25% vs Pst (1×10^8 UFC /mL);
- Cumarina 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC /mL);
- Idrossido di Rame 22% DC vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC/2 vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC/2 + Cumarina (comp. fen.) 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Idrossido di Rame 22% DC/4 + Cumarina (comp. fen.) 1 g/L vs Pst (1×10^8 UFC/mL);
- Controllo negativo: Acqua.

In tutte le combinazioni è stato re-isolato il ceppo batterico (Xav CFBP 3274) precedentemente inoculato. La conferma di tale risultato veniva ulteriormente validata mediante analisi fitobatteriologiche classiche (LOPAT, morfologiche, genetico-molecolari) a conferma che i ceppi batterici re-isolati, erano identici a quelli noti utilizzati nelle prove di inoculazione artificiale.

Dalle attuali sperimentazioni emerge come l'attività dell'idrossido di rame utilizzato alla concentrazione di campo (dose media di quanto riportato in etichetta per i formulati rameici registrati in biologico) sia la sostanza con maggiore efficacia insieme alla soluzione dello stesso ione metallo ad ½ della concentrazione di campo consigliata, associato alla Cumarina (1g/L).

Quanto detto sopra veniva confermato anche dall'analisi della riduzione percentuale della patologia (n° necrosi/tesi). Infatti le tesi B e D (trattate con idrossido di rame alla dose di campo e con lo stesso ione metallo ad ½ della concentrazione di campo consigliata, associato alla Cumarina 1g/L) evidenziavano l'attività migliore per ridurre la patologia.

Si evidenzia come nelle tesi D (idrossido di rame ad ½ della concentrazione di campo consigliata associato alla Cumarina, 1g/L) si registra un ottimo contenimento della batteriosi al 14° giorno dall'inoculazione, mostrando un interessante effetto sinergico tra i due composti impiegati, senza alcun effetto fitotossico, ed andando nella giusta direzione di una marcata riduzione dell'impiego dei sali di rame nel contenimento di patologie di natura batterica.

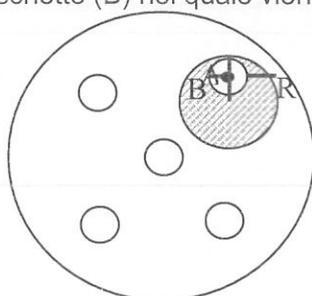
FRUTTICOLTURA

- Valutazione *in vitro* della suscettibilità di *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xp) ai sali di rame utilizzati in frutticoltura;
- Valutazione *in vitro* dell'efficacia di principi attivi di origine vegetale sul contenimento di *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Xp).

Per quanto riguarda le prove *in vitro* inerenti a *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (CFBP 3894), analogamente a quanto effettuato in ambito orticolo, il batterio anche qui è stato testato mediante il saggio dei dischetti, il saggio degli spot ed il saggio dell'incorporazione.

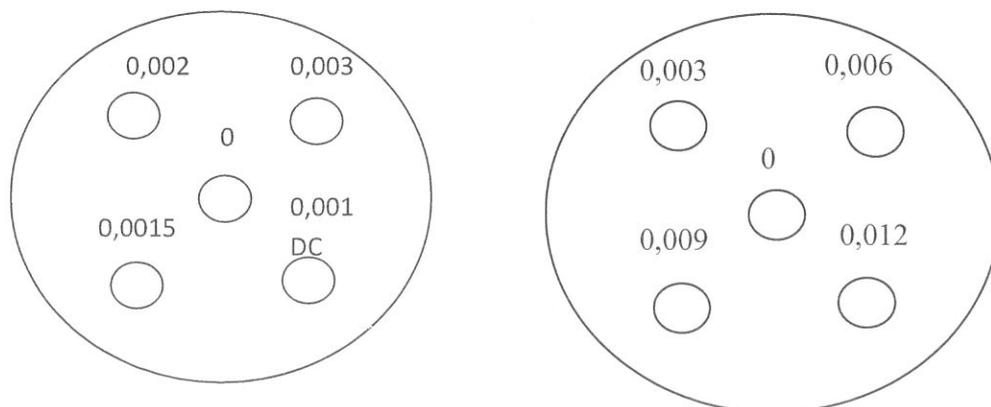
I vari composti rameici sono stati valutati mediante il saggio dei dischetti ed il saggio dell'incorporazione. Per lo svolgimento delle prime prove si sono scelte due concentrazioni, 1×10^8 CFU/mL e 1×10^5 CFU/mL, con le quali sono stati piastrati i batteri stessi. Le prove sono state svolte in piastre Petri contenenti KB, nelle quali sono stati inseriti 5 dischetti. Di questi, uno al centro aveva la funzione di controllo, pertanto su di esso venivano versati 10 μ L di acqua sterile mentre, nei restanti 4, 10 μ L di ciascun composto rameico, contenenti concentrazioni differenti. Questa tecnica ha permesso di determinare, nella stessa piastra Petri, differenti anelli di inibizione creatisi a concentrazioni differenti. Per la misura dell'anello di inibizione, o meglio del raggio dello stesso, si sono effettuate tre misurazioni per anello, ottenendo quindi 20 misurazioni per piastra Petri. Il valore riportato R, è quindi il risultato della differenza tra il raggio dell'anello di inibizione (A) ed il raggio del dischetto (B) nel quale viene iniettato il composto rameico.

 = Anello di inibizione

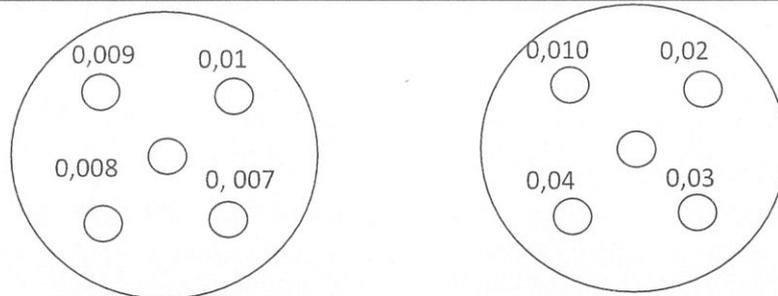


Rappresentazione grafica della piastra Petri con evidenziato il calcolo di R.

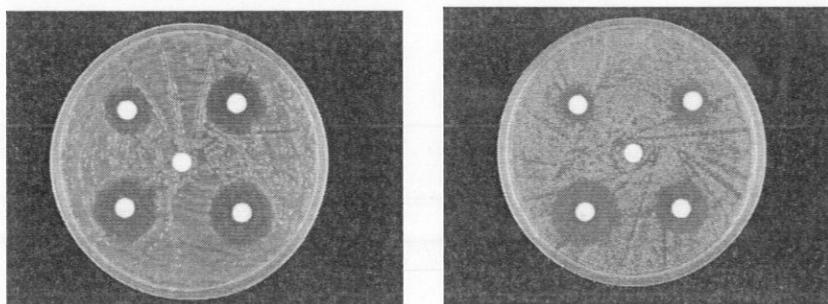
Da un'analisi delle etichette dei formulati commerciali ammessi in agricoltura biologica a base di idrossido di rame è emerso come quest'ultimo sia contenuto mediamente con una percentuale prossima al 22%. Oltre alla sua concentrazione media nel formulato, si è ulteriormente calcolata la dose di impiego (DC: Dose di campo media) consigliata per controllare le batteriosi sul pomodoro (0.001g/mL). Ad essa si sono poi determinate delle dosi di idrossido maggiori.



Rappresentazione grafica delle piastre Petri con dischetti imbibiti con idrossido di rame. Si evidenzia la disposizione dei dischetti a differente concentrazione collocati all'interno della stessa piastra



Rappresentazione grafica delle piastre Petri con dischetti imbibiti con ossicloruro di rame. Si evidenzia la disposizione dei dischetti a diverse concentrazioni collocati all'interno della piastra Petri.



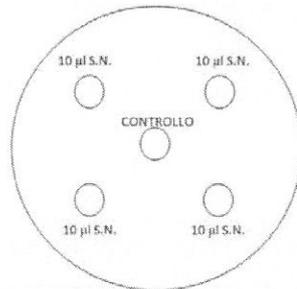
Esempi di aloni d'inibizione ottenuti mediante la tecnica in vitro del saggio dei dischetti. Utilizzando l'isolato Xp CFBP 3894 a differenti concentrazioni (1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL) in presenza di idrossido di rame a diverse concentrazioni (DC: dose di campo in alto a sin.; dose maggiore nel dischetto in basso a sin.; dischetto centrale di controllo, imbibito con acqua distillata sterile).

Il ceppo Xp CFBP 3894 presentava comportamento differente rispetto alle due concentrazioni, 1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL, saggiate. L'attività inibente dell'idrossido di rame non si misurava alla dose media di impiego consigliata sulle etichette di agrofarmaci di rame ammessi in agricoltura biologica, bensì mediante una quantità pari al doppio del dosaggio indicato (0.002 g/mL). Quando Xp veniva saggiato alla concentrazione di 1×10^6 UFC/mL, la sua attività di inibizione si registrava con la dose di impiego (0.001 g/mL) con un alone di inibizione pari a 0.89 mm. I risultati migliori si sono ottenuti per tutte e due le concentrazioni con la massima quantità di idrossido utilizzata (0.012 g/mL) rispettivamente di 6.53 mm e di 7.05 mm, rispettivamente con 1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL. Scenario differente si è determinato a seguito dell'utilizzo dell'ossicloruro di rame. La dose di impiego (DC) consigliata sulle etichette di agrofarmaci ammessi in biologico inibiva la crescita batterica, facendo registrare aloni rispettivamente di 4.25 mm e di 6.49 mm rispettivamente per 1×10^8 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL. Gli aloni venivano misurati quando la quantità di ossicloruro utilizzata era massima (0.04 g/mL), e si misuravano aloni medi di 7.19 mm ad 1×10^8 UFC/mL e di 9.66 mm ad 1×10^6 UFC/mL.

Dalle prove mediante il saggio dell'incorporazione si evidenziava come l'ossicloruro di rame garantiva risultati importanti, risultando l'unico sale ad inibire completamente la proliferazione del batterio. Al contrario idrossido e solfato di rame inibivano completamente il batterio alla dose di campo mentre facevano registrare soltanto una riduzione ai dosaggi più bassi utilizzati ($1/2$ DC e $1/4$ DC). Nello specifico, quando il dosaggio utilizzato era pari alla metà di quello medio indicato come dose di campo nelle etichette dei formulati commerciali per l'idrossido ed il solfato, si registrava una riduzione rispetto al controllo (1×10^6 UFC/mL) di circa 3 unità logaritmiche contro le 2 unità logaritmiche misurate all'utilizzo di un quantitativo del sale di rame pari ad $1/4$ DC.

Le prove di suscettibilità degli isolati batterici di Xp rispetto alle sostanze naturali di origine vegetale sono state condotte alla concentrazione di 1×10^6 UFC/mL. Queste prevedevano uno screening iniziale su entrambi i batteri con le stesse sostanze naturali saggiate singolarmente e poi in combinazione fra loro. Questo ha permesso di determinare se la miscela di più sostanze di

origine naturale poteva evidenziare un effetto sinergico inibendo maggiormente la crescita di Xp. Il metodo con cui sono state effettuate le prove era il "saggio degli spot" il quale, analogamente al precedente, prevedeva la disposizione di una micro-soluzione di 10 µL della sostanza naturale singola/in combinazione ai vertici di un quadrato in piastre Petri contenenti KB. Al centro dello stesso veniva distribuito in eguale quantità l'acqua distillata sterile avente funzione di controllo. La differenza con il "saggio dei dischetti" era che in questo caso i 10µL venivano disposti direttamente a contatto con il substrato nutritivo agarizzato.



Rappresentazioni della concentrazione di sostanza naturale di origine vegetale impiegata nelle prove *in vitro*.

Dallo screening iniziale, il quale prevedeva di saggiare le sostanze singolarmente, sono stati evidenziati interessanti risultati sull'inibizione della crescita di Xp con gli oli essenziali e con l'Ac. Gallico alla concentrazione dell'1%. Mentre, riducendo la concentrazione utilizzata, gli aloni di inibizione più importanti si misuravano soltanto con l'utilizzo di oli essenziali. Successivamente sono stati effettuati altri saggi di suscettibilità utilizzando le sostanze naturali in combinazione fra loro. Risultati interessanti sono stati ottenuti con la combinazione di Ac. Gallico 1% + Oli essenziali 1% e con una combinazione di oli essenziali con concentrazione finale del 3%.

CREA-IT

Task 2.5 - Obiettivi generali dell'attività della U.O. hanno riguardato 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 CREA-DC 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), per dibattere sulla problematica dell'impiego del rame in agricoltura biologica.

Obiettivo specifico della ricerca dell'U.O. è stato 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 (*P. viticola*) su vite facendo riferimento alle prove sperimentali sviluppate nel corso di un precedente progetto di ricerca. 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 (*Pathogen Thresh*), 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 possa 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 questa 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 e 2016. 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.

Anno di analisi 2015

Dal 9 Aprile al 5 Agosto 2015 sono stati acquisiti i dati dalla centralina meteo-climatica posizionata nel vigneto in analisi e sono stati effettuati, in collaborazione con il CREA-DC, i rilievi fitopatologici e valutato il rischio di infezione della malattia e le fasi fenologiche della pianta [scala di Baggiolini (1952) modificata] (Tab. 1).

Tabella 1: Fase fenologica di sviluppo della vite [scala di Baggiolini (1952) modificata] con il relativo rischio di infezione e data (anno di analisi 2015).

Data	Fase fenologica	Rischio infezione
9-16 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
15-23 Giugno 2015	12	1
24 Giugno-5 Agosto 2015	13	1

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 dell'oomicete. Tale modello ha suggerito di effettuare il 3° trattamento il giorno 19 Giugno. Il 4° ed ultimo trattamento è stato suggerito, ed effettuato, il 30 Giugno.

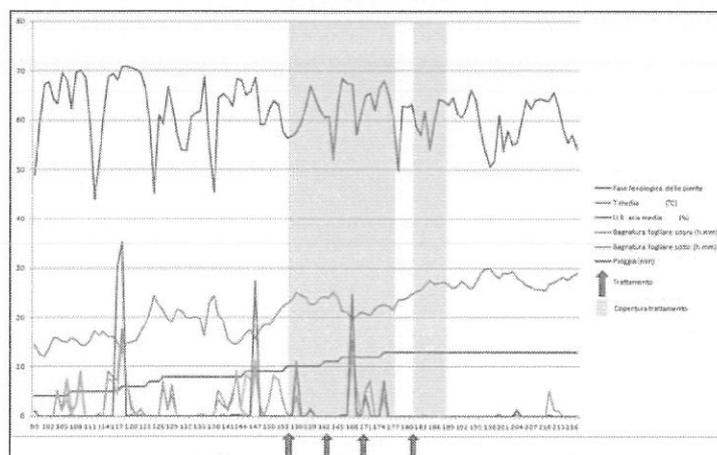
Per questo anno di analisi (2015), la presenza dell'oomicete nella tesi di controllo non si è mai manifestata, pertanto non è stato possibile effettuare i rilievi fitopatologici in termini di *incidence* e *severity*.

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 di *P. viticola*.

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

La Figura 1 mostra gli andamenti di fase fenologica, temperatura media dell'aria (°C), umidità media dell'aria (%), bagnatura fogliare (sopra e sotto; h.mm), pioggia (mm), trattamenti e copertura trattamenti di tutta la stagione di analisi che va dal 9 aprile (data giuliana 99) al 5 agosto (data giuliana 217).

Figura 1: Andamenti di fase fenologica, temperatura media dell'aria (°C), umidità media dell'aria (%), bagnatura fogliare (sopra e sotto; h.mm), pioggia (mm), trattamenti e copertura trattamenti di tutta la stagione di analisi che va dal 9 aprile (data giuliana 99) al 5 agosto (data giuliana 217).



Anno di analisi 2016

Dal 10 Aprile al 21 Giugno 2016 sono stati acquisiti i dati dalla centralina meteo-climatica posizionata nel vigneto in analisi e sono stati effettuati, in collaborazione con il CREA-DC, i rilievi fitopatologici e valutato il rischio di infezione della malattia e le fasi fenologiche della pianta [scala di Baggiolini (1952) modificata] (Tab. 3).

Tabella 3: Fase fenologica di sviluppo della vite [scala di Baggiolini (1952) modificata] con il relativo rischio di infezione e data (anno di analisi 2016 in corso).

Data	Fase fenologica	Rischio infezione
10-19 Aprile 2016	6	2
20-25 Aprile 2016	7	2
26 Aprile-25 Maggio 2016	8	2
26-29 Maggio 2016	9	2
30 Maggio-2 Giugno 2016	10	2
3-14 Giugno 2016	11	2
15 Giugno-in corso	12	1

Dal 10 Aprile al 6 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. Dal 7 Giugno (giorno in cui è stato effettuato il secondo trattamento), come da procedura adottata nell'anno di analisi 2015, si è passati al modello adattativo (Tabella 2B) che, considerando anche

i dati del presente anno, ha considerato la non presenza dell'oomicete. Tale modello ha suggerito di effettuare il 3° trattamento il giorno 17 Giugno. Il 4° trattamento è stato suggerito, ed effettuato, il 23 Giugno.

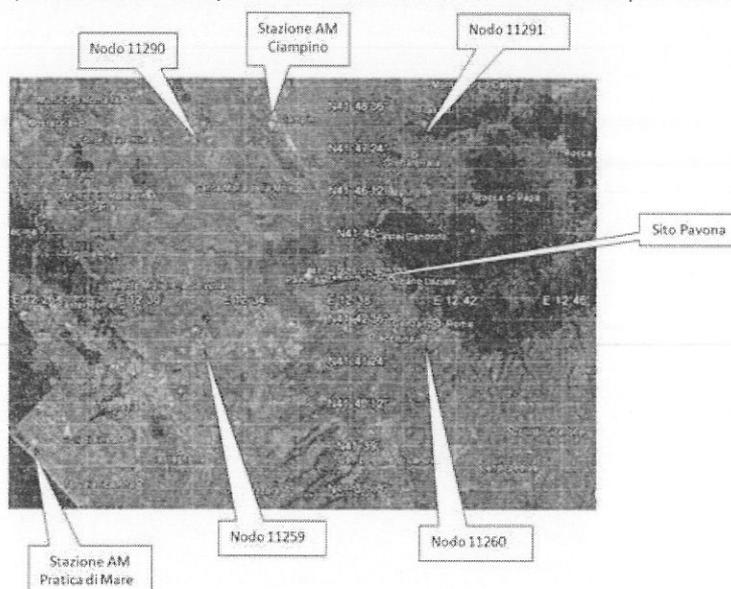
Anche per il 2016 non sono stati evidenziati sintomi di malattia sulle piante e pertanto non è stato possibile effettuare i rilievi fitopatologici in termini di *incidence* e *severity*.

Altre analisi

Sono in corso di svolgimento le analisi sui database forniti da Laimburg su vitigni di Cabernet cortis, Merlot e Pinot grigio per gli anni 2013, 2014 e 2015.

E' in corso di svolgimento la generazione di modelli previsionali di nuova generazione, ibridi, basati su rilievi in campo e su previsioni meteorologiche da 1 a 6 giorni fornite dal CREA-CMA.

La Figura 2 rappresenta i punti della griglia di previsione del modello meteorologico DALAM in prossimità del sito di Pavona (Via Casette 24, Albano Laziale - 41.727609, 12.605389). I 4 nodi in blu rappresentano le posizioni di interpolazione dei dati meteoroclimatici previsionali.



Nella Tabella 4 sono riportate le 11 variabili che verranno considerate per lo sviluppo del modello previsionale basato sulle previsioni meteorologiche da 1 a 6 giorni.

Codice parametro	Descrizione parametro	Unità di misura
2008	Precipitazione giornaliera - Previsione	mm
2012	Umidità relativa aria a 2 m - Previsione	%
2013	Vento a 10 m (comp. zonale) - Previsione	m/sec
2014	Vento a 10 m (comp. meridionale) - Previsione	m/sec
2015	Temperatura terreno livello -20 cm - Previsione	°C
2017	Temperatura terreno livello -40 cm - Previsione	°C
2016	Contenuto acqua del terreno - livello -20 cm - Previsione	mm
2018	Contenuto acqua del terreno - livello -40 cm - Previsione	mm
2084	Radiazione solare giornaliera - Previsione	MJ/m2
2085	Temperatura minima giornaliera - Previsione	°C
2086	Temperatura massima giornaliera - Previsione	°C

Tale approccio, una volta validato potrebbe consentire di estendere la capacità previsionale da 3 a 7 giorni.

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

FIRAB

Task 3.1; 3.3 e 3.4

FIRAB, nel rispetto del mandato da assolvere nell'ambito del progetto ALT.RAME.inBIO, ha particolarmente investito nel rapporto con attori e stakeholder del mondo dell'agricoltura biologica e della produzione e commercializzazione di fattori di produzione per il settore biologico, promuovendo fino alla fine delle attività progettuali, alcuni incontri con i soggetti portatori di interesse per verificare le esigenze del settore e informare sulla problematica. A tal fine è stato perfezionato un contratto con una figura tecnica junior per svolgere ruolo di interfaccia con le aziende produttrici bio e il tema è stato trattato nel corso di un incontro informale con organizzazioni del biologico in tema di interventi colturali e mezzi tecnici (Roma, 6 febbraio 2018).

WP4 - DISSEMINAZIONE DEI RISULTATI

- 2 agosto 2017 giornata divulgativa FEM + LAIMBURG (TRASMESSA ANCHE IN DIRETTA)
- Il 14 giugno 2017 si è tenuto presso il Centro di ricerca Difesa e Certificazione (CREADC), il convegno dal titolo «È POSSIBILE UN'AGRICOLTURA BIOLOGICA SENZA L'IMPIEGO DEL RAME?» LA RICERCA RISPONDE E SI CONFRONTA CON IL SETTORE. Il convegno ha visto la partecipazione attiva di tutti i partner coinvolti nel progetto e di altri relatori quali il dott. Pasquale Cavallaro (Ministero della Salute) e il dott. Matthias Weidenauer (Chairman European Task Force Copper). Proficuo ed interessante è stato il confronto con gli operatori del comparto biologico previsto nella I sessione del convegno. Al dibattito hanno partecipato: Albero Aldini - APOFRUIT Italia; Agatino Castorina - Agronomo consulente – Sicilia; Luca Molinari - Consorzio Agrario Adriatico; Marino Morrone - FEDERBIO; Stefano Vergnani – OROGEL; Vincenzo Vizioli – AIAB; Massimo Benuzzi – IBMA.