

**NUOVO BIOFUNGICIDA A BASE DI *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*
CEPPO FZB24: ESPERIENZE NEL CONTENIMENTO DI
OIDIO SU POMODORO E BOTRITE VITE**

M. ZUFFA, A. INFANTINO, M. GALEAZZI
Syngenta Italia S.p.A - Via Gallarate, 139, 20151 Milano
marco.zuffa@syngenta.com

RIASSUNTO

Taegro® è un biofungicida contenente 1×10^{10} CFU/g (13% w/w) di *Bacillus amyloliquefaciens* ceppo FZB24, in formulazione WP, applicabile per via fogliare in serra e in pieno campo su molteplici colture orticole e su vite per il contenimento di numerose malattie fungine quali oidi, *Botrytis* spp., *Alternaria* spp. e *Sclerotinia* spp. Il prodotto può essere usato in agricoltura biologica ma anche in agricoltura integrata, sostituendo nei programmi di difesa alcuni trattamenti normalmente effettuati con prodotti di sintesi, nell'ottica del contenimento dei residui chimici nelle derrate. Sono riportati i risultati sperimentali di prove parcellari condotte in pieno campo e serra su pomodoro e vite in Italia e altri paesi europei, per il contenimento rispettivamente di oidio e botrite. Taegro, utilizzato in pura efficacia e nell'ambito di un programma di difesa integrato chimico + biologico, ha dimostrato un'efficacia comparabile con i migliori standard di mercato e la totale selettività verso le colture trattate.

Parole chiave: difesa integrata, lotta biologica, Taegro

SUMMARY

NEW BIOFUNGICIDE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* STRAIN FZB24: CONTROL EXPERIENCES OF POWDERY MILDEW ON TOMATO AND BOTRYTIS ON GRAPE

Taegro® is a bacterial biofungicide containing 1×10^{10} CFU/g (13% w/w) of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB24 formulated as WP. It is applicable on leaves in greenhouse or in open field on many vegetable crops and grape against powdery mildew, *Botrytis* spp., *Alternaria* spp. and *Sclerotinia*. The product is suitable for organic but also for integrated farming, replacing the traditional chemical treatments, in order to minimize the amount of chemical residues in food. The study presents the results from experimental randomized plot trials carried out in Italy and other EU countries, in open field and green houses on grape and fresh consumption tomato, respectively against *Botrytis* and powdery mildew. Taegro, used alone in full efficacy and combined in an integrated strategy (chemical + biological), showed efficacy levels fully comparable with the best standard products on the market and the total selectivity on the treated crops.

Key words: integrated control, biological control, Taegro

INTRODUZIONE

Taegro® è un biofungicida di natura batterica contenente 1×10^{10} CFU/g (13% w/w) di *Bacillus amyloliquefaciens* ceppo FZB24. Taegro formulato in WP per applicazioni fogliari in serra ed in pieno campo su molteplici colture orticole e su vite. *B. amyloliquefaciens* ceppo FZB24 è un batterio isolato dal suolo e sostanza organica in Germania (Copping LG [ed.], 2004. The Manual of Biocontrol Agents. Alton, UK: BCPC), non geneticamente modificato, e ad oggi non vi sono

differenze genetiche tra il ceppo indigeno e quello contenuto nel prodotto formulato che deriva da processi fermentativi industriali mediante inoculazione del substrato con spore vitali. Il prodotto è stato sviluppato da Novozymes nel 2006, e le prime prove in Europa si sono eseguite nel 2011. Ad oggi Novozymes lo ha registrato in USA e Canada.

La sostanza attiva *B. amyloliquefaciens* ceppo FZB24 è stata approvata a livello europeo (Reg. EU 2017/806) come sostanza a basso rischio per un periodo di 15 anni, considerando il profilo tossicologico ed ecotossicologico favorevole (SANTE/12037/2016 Rev. 1, 23 March 2017). L'esposizione dell'uomo, degli animali e dell'ambiente, attraverso gli impieghi approvati viene considerato trascurabile. Taegro è il formulato rappresentativo utilizzato per la valutazione dell'approvazione della sostanza attiva a livello europeo.

Di seguito vengono riportate le caratteristiche principali della sostanza attiva:

Nome dell'organismo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB24
Tassonomia	Classe: Bacilli Ordine: Bacillales Famiglia: Bacillaceae Genere: Bacillus Specie: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Ceppo: FZB24
Specie, ceppo:	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB24
Numero di registrazione nella raccolta delle colture di Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ), Germania:	10271
Purezza	Concentrazione minima: 1×10^{10} CFU/g

In Europa, Syngenta sta sviluppando Taegro dal punto di vista tecnico in collaborazione con Novozymes, e sarà l'unico distributore europeo del prodotto una volta in commercio.

B. amyloliquefaciens ceppo FZB24, applicato sulle piante, svolge diverse attività, sia direttamente volte al contenimento dei patogeni che promotrici dello sviluppo vegetativo della pianta:

- produzione di metaboliti secondari con attività antifungina
- competizione per il substrato con i funghi patogeni (interazione ed esclusione)
- induzione di resistenza acquisita locale e sistemica nella pianta (ISR, SAR)

Nell'ambito delle avversità più comuni, Taegro svolge un'importante attività nel contenimento della botrite della vite e dell'oidio del pomodoro in serra.

La botrite o muffa grigia, causata dal fungo polifago e ubiquitario *Botrytis cinerea*, è una delle principali malattie della vite presente in tutte le regioni italiane ed europee. I danni provocati da botrite, oltre alla perdita di produzione quantitativa, per uva da tavola e da vino, sono soprattutto di natura qualitativa, a causa delle alterazioni che questo fungo è in grado di provocare durante i processi di vinificazione e sulla qualità del vino stesso (riduzione della conservabilità e alterazione delle caratteristiche aromatiche).

L'oidio o mal bianco limita fortemente la produzione del pomodoro in svariati areali in Italia e nel mondo. Infezioni severe possono causare la prematura senescenza della pianta e ridurre notevolmente il raccolto. Nel pomodoro i sintomi derivano principalmente da due agenti causali di due specie diverse: *Leveillula taurica* e *Oidium neolycopersici*.

L. taurica dapprima si manifesta con macchie irregolari verde chiaro, che poi si delineano seguendo le nervature delle foglie ricoprendosi, nella pagina inferiore, di micelio biancastro e rendendo i tessuti clorotici ed infine necrotici determinando la successiva filloptosi. I frutti possono essere indirettamente danneggiati in quanto venendo a mancare la copertura fogliare sono facilmente scottabili dai raggi solari.

Il secondo agente causale è *Oidium lycopersici* (*O. neolycopersici*); questa specie si manifesta con miceli biancastri sulla pagina superiore ed inferiore della foglia degli steli e dei piccioli. Le foglie infette, diventano clorotiche poi necrotiche e infine cadono.

Entrambe le specie sono patogeni obbligati e sopravvivono in inverno su ospiti secondari. I conidi sono dispersi dal vento, e la temperatura ottimale di sviluppo è elevata, fino ad un massimo di 30°C in presenza di umidità relativa elevata (ma non di pioggia battente).

Obiettivo di questo lavoro oltre che di presentare il nuovo formulato a base di *B. amyloliquefaciens* FZB24, è quello di dimostrarne la sua efficacia nel contribuire al contenimento di questi patogeni, sia nell'utilizzo in lotta biologica che nell'ambito di un programma di difesa integrato, senza apportare alcun ulteriore residuo chimico sulle derrate.

MATERIALI E METODI

Le prove con Taegro, sono state condotte in Italia ed Europa su vite e su pomodoro da mensa, dai Centri di saggio di Syngenta Crop Protection o da istituti di ricerca e sperimentazione accreditati. Per l'esecuzione delle prove sono state seguite le linee guida EPP/OEPP ove disponibili. Il disegno sperimentale prevedeva parcelle randomizzate secondo lo schema RCB con quattro ripetizioni per ogni tesi.

Il prodotto è stato valutato in due modalità: in pura efficacia con applicazioni fogliari in presenza di un testimone non trattato e uno o più prodotti standard di riferimento. Nell'ambito di una strategia integrata Taegro è stato valutato mediante l'utilizzo del testimone parziale. Il suo contributo in termini di efficacia si è reso visibile confrontandolo con il testimone parziale, sul quale si sono eseguiti un ridotto numero di applicazioni chimiche (1 o 2). A seguito di questi primi trattamenti chimici sono avvenute, nelle parcelle relative ai prodotti biologici, con cadenza settimanale applicazioni con i diversi formulati biologici a seconda delle tesi. L'eventuale mantenimento ed incremento di efficacia rispetto al testimone parziale è da imputarsi al contributo di efficacia al programma di difesa, apportato dal solo prodotto biologico.

I trattamenti sono sempre stati effettuati in maniera preventiva, distribuendo i prodotti con pompa a spalla a motore con volumi di acqua variabili tra 500 e 1000 L/ha. I rilievi sono stati eseguiti

valutando l'incidenza % della malattia e la sua severità % sui diversi organi vegetali. Sono stati osservati 50 grappoli di uva e 50 foglie di pomodoro in ciascuna parcella ad ogni rilievo.

I risultati ottenuti nelle singole prove sono stati sottoposti ad analisi della varianza e confrontati con il test di Student-Newman-Keuls (SNK) con $p \leq 0,05$.

Nelle tabelle relative ai risultati, sono state inserite le tesi più rappresentative, per cui le lettere indicanti la significatività statistica possono risultare non contigue.

Tabella 1. Prodotti utilizzati nelle prove

Nome commerciale	Sostanze attive	Concentrazione	Formulazione	Dose/ha
Serenade Max	<i>B. subtilis</i> QST 713	15,67% 5×10^{10} CFU/g	WP	4000 g
Taegro	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24	13% 1×10^{10} CFU/g	WP	185 / 370 g
AQ10	<i>A. quisqualis</i> M10	58% 5×10^9 spore/g	WG	70 g
Reflect	Isopyrazam	13,1%	EC	1000 mL
Topas 10EC	Penconazolo	100 g/L	EC	500 mL
Switch	Cyprodinil + fludioxonil	37,5 + 25%	WG	1000 g
Geoxe	Fludioxonil	50%	WG	1000 g

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono riportati i risultati di una serie di prove sperimentali (2013-17) eseguite in Italia ed Europa su pomodoro e vite per il controllo rispettivamente di oidio e botrite.

Sperimentazione su pomodoro in "pura efficacia"

I prodotti in prova, sono stati applicati sempre in maniera preventiva, ad intervalli di sette giorni per tutto il ciclo, in serra.

Tabella 2. Pomodoro 2013: prove di pura efficacia con Taegro nei confronti di *L. taurica* e *O. neolycopersici*. Efficacia (Abbott) sulla severità fogliare della malattia (espressa in % nel testimone)

Tesi/Principio attivo	Dose Formulato kg/ha	Eboli (SA) cv. San Marzano	Scieli1 (RG) cv. Pixel	Scieli2 (RG) cv. Pixel
		% efficacia (sev. Foglie %)		
Testimone non trattato		(5,7) a	(41) a	(62,25) a
<i>B. subtilis</i> QST 713	4	70 b	90 bc	86 cd
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24	0,185	76 b	90 bc	37 b
<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24	0,370	86 b	96 cd	51 bc

*In tutte le tabelle dei risultati, a lettere uguali corrispondono differenze non significative per $p \leq 0,05$ test SNK.

Sperimentazione su pomodoro in strategia

I prodotti in prova sono stati applicati sempre in maniera preventiva, ad intervalli di 5-7 giorni, in serra su colture verticali, a seguito di due applicazioni chimiche standard eseguite ad inizio ciclo

colturale. Queste, erano costituite da isopyrazam (125 g/L EC) ad 1 L/ha seguito a 7-10 giorni da penconazolo (100 g/L EC) a 0,5 L/ha.

Il contributo dei prodotti biologici è stato valutato confrontandoli con il testimone parziale, sul quale sono state eseguite solo le due applicazioni chimiche e nient'altro dopo. L'eventuale incremento di efficacia rispetto al testimone parziale è da intendersi come contributo in % di efficacia nel programma di difesa, apportato dal prodotto biologico.

Tabella 3. Pomodoro 2013: prove di strategia con Taegro nei confronti di *L. taurica* e *O. neolyopersici*. Efficacia (Abbott) sulla severità fogliare della malattia (espressa in % nel testimone).

Tesi/Principio attivo	Dose formulato kg/ha	Pagani (SA) cv. Sir Elyan	Cañada de Gallego ES cv. Jawara	Demokwekerij NL cv. Jalila	Horst-Meterik NL cv. Cindel
		% efficacia (sev. foglie%)			
Testimone non trattato	-	(15,8) a	(35,1) a	(39,1) a	(89,5) a
Testimone parziale: 1 isopyrazam 1 penconazolo	1 0,5	61 c	53 b	34 b	64 b
1 isopyrazam 1 penconazolo <i>B. myloliquefaciens</i> FZB24 ogni 5-7 giorni.	1 0,5 0,37	96 e	73 b	78 d	75 bc
1 isopyrazam 1 penconazolo <i>A. quisqualis</i> M10 ogni 5-7giorni.	1 0,5 0,07	94 e	63 b	82 d	79 c

B. amyloliquefaciens ceppo FZB24 nelle prove sperimentali di campo ha evidenziato un livello di efficacia nel contenimento dell'oidio del pomodoro, se usato da solo in sequenza a breve cadenza applicativa (pura efficacia, tabella 2), paragonabile ai migliori standard commerciali.

Come mostrato in tabella 3, Taegro alla dose di 0,37 kg/ha di prodotto formulato, applicato a cadenza di 5-7 giorni dopo un'applicazione con isopyrazam a (1 L/ha di prodotto formulato) ed una applicazione con penconazolo a (0,5 L/ha di prodotto formulato) cadenziate tra loro 7-10 giorni, ha mostrato di contribuire nel contenimento dell'oidio del pomodoro. Tale attività si è resa visibile paragonando l'efficacia ottenuta nel testimone parziale con l'efficacia ottenuta nella tesi integrata. Dai dati di campo si evince che Taegro ha contribuito nella strategia integrata incrementando l'efficacia delle sole applicazioni chimiche, per un valore variabile dal 11% al 44% (in media 27,5%) in linea con lo standard commerciale in prova.

Sperimentazione su vite

I prodotti in prova, sono stati applicati sempre in maniera preventiva a partire dalla fase fenologica di pre chiusura grappolo indicata con la lettera (B). La tesi 2 era costituita da cinque applicazioni di Taegro: a pre-chiusura grappolo, sette giorni dopo, invaiatura, sette e quattordici giorni dopo (tesi BIO). La tesi 3 era un testimone parziale con una sola applicazione di Geoxe in pre chiusura grappolo. La tesi 4 prevedeva una sola applicazione di Geoxe in pre chiusura grappolo e Taegro ad

invaiaura, sette e quattordici giorni dopo. La tesi 5 prevedeva due applicazioni di Switch, una in pre chiusura grappolo ed una ad invaiatura.

Tabella 4. Vite 2014: prove di pura efficacia e strategia con Taegro nei confronti di *B. cinerea*. Efficacia (Abbott) sulla severità nei grappoli della malattia (espressa in % nel testimone).

Tesi/Principio attivo	Dose Formulato kg/ha	Bagnacavallo (RA) cv. Trebbiano	Unterfranken DE cv. Domina	Trelou sur marne FR cv. Pinot meunier	Chemin des Landes FR cv. Chardonnay	Kenzingen-nordweil DE cv. Grauburgunder
		% efficacia (sev. Grappoli%)				
1/ Testimone n. t.		(41,6) a	(18,3) a	(13,4) a	(7,1) a	(31,5) a
2/ <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24 13WP (B + 7 + C + 7 + 14)	0,37	81,4 d	55,9 b	0 a	0 a	65,4 cd
3/ Testimone parziale: 1 fludioxonil 50% (B)	1	86 d	47,8 b	10,6 b	12,1 b	50,8 c
4/ fludioxonil 50% (B) <i>B. amyloliquefaciens</i> FZB24 13WP (C+7+14)	1 0,37	86,2 d	68,4 b	45 b	43,5 b	70,7 d
5/ ciprodinil+fludioxonil 62,5% (B+C)	1	97,3 f	70,7 cd	18,4 b	25,1 b	58,9 cd

Il contributo del prodotto biologico è stato valutato confrontandolo con il testimone parziale, sul quale è stato eseguito solo un'applicazione chimica a pre chiusura grappolo e nient'altro dopo. L'eventuale incremento di efficacia rispetto al testimone parziale è da intendersi come contributo in % di efficacia nel programma di difesa, apportato dal prodotto biologico.

Come mostrato nella tabella 4, *B. amyloliquefaciens* ceppo FZB24 nelle prove sperimentali in vigneto ha evidenziato un buon livello di efficacia nel contenimento della botrite del grappolo, se usato a 0,37 kg/ha di prodotto formulato da solo in sequenza a breve cadenza applicativa a partire dalla pre-chiusura grappolo, sebbene non sempre paragonabile all'efficacia ottenuta con due applicazioni del più comune ed efficace antibotritico chimico in commercio.

Taegro alla dose di 0,37 kg/ha di prodotto formulato, applicato ad invaiatura, sette e quattordici giorni dopo, seguendo un'applicazione di Geoxe a 1 kg/ha eseguita a chiusura grappolo, ha mostrato un'elevata attività di contenimento della botrite del grappolo. Paragonando l'efficacia ottenuta nel testimone parziale (tesi 3) con l'efficacia ottenuta nella tesi integrata (tesi 4) si evince che Taegro ha contribuito nella strategia integrata ad incrementare l'efficacia rispetto la singola applicazione chimica in chiusura grappolo, per un valore variabile dal 11,9% al 34,5%, in media 24,6% (esclusa la prova di Bagnacavallo, RA in cui il testimone parziale aveva già una elevata efficacia da solo). In questo modo, nelle prove sperimentali, si è apportato ai grappoli un solo principio attivo per la difesa antibotritica, con un'efficacia paragonabile allo standard chimico bi-componente.

CONCLUSIONI

Bacillus amyloliquefaciens ceppo FZB24 (Taegro) nelle prove di campo alle dosi di 185 e 370 g/ha su pomodoro in serra, ha evidenziato un livello di efficacia nei confronti di oidio pari ai migliori formulati biologici commerciali, sia se usato da solo in lotta biologica, che se usato ad integrazione di un programma chimico ridotto volto alla diminuzione dei residui chimici nelle derrate.

B. amyloliquefaciens ceppo FZB24 nelle prove di campo alle dosi di 370 g/ha di formulato su vite, ha mostrato una buona efficacia nel contenimento della botrite se applicato da solo a cadenza settimanale a partire dalla fase di chiusura grappolo. Un'ottima efficacia si è notata nella strategia integrata, usando Taegro a cadenza settimanale dalla fase di invaiatura a seguito di un'applicazione chimica fatta in chiusura grappolo; in questo caso si è ottenuta un'eccellente protezione del grappolo apportando un solo principio attivo in vigneto per la difesa antibotritica, totalmente in linea con una strategia volta ad ottimizzare l'utilizzo di prodotti chimici per la difesa delle piante.

Il formulato 13WP non ha mai evidenziato alcun fenomeno di fitotossicità sulle colture saggiate e sui principali insetti utili rendendosi uno strumento particolarmente utile nei disciplinari di produzione integrata e biologica.

Ringraziamenti

Si ringraziano sentitamente tutti i tecnici sperimentatori che hanno contribuito attivamente agli studi di campo.

LAVORI CITATI

- Fravel D. R., Connick Jr & W. J.; Lewis J. A.. 1998. Formulation of microorganisms to control plant diseases. In *Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*, H D Burges (ed.), pp. 187-202, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Paau A. S.. 1998. Formulation of beneficial microorganisms applied to soil. In *Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments*, H D Burges (ed.), pp. 235-54, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Schmiedeknecht G., Bochow & H.; Jung H. 1997. Biologische Kontrolle knollen- und bodenbürtiger Erkrankungen der Kartoffel, *Med. Fac. Landbouww. Gent*, 62/3b, 1055-62.
- Kilian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmiedeknecht & G.; R. Hain. 2000. FZB24 *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 1, 72-93.
- COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT 1, *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB24 SANTE/12037/2016 Rev. 1 23 March 2017.
- REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2017/806 DELLA COMMISSIONE dell'11 maggio 2017; Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea.