

EFFICACIA DI SERENADE, NUOVO BIOFUNGICIDA A BASE DI *BACILLUS SUBTILIS*, NEL CONTENIMENTO DI MICRORGANISMI PATOGENI DELLE COLTURE

M. BENUZZI, E. LADURNER, F. FIORENTINI

Intrachem Bio Italia S.p.A., Servizio Tecnico – Via Calcinaro 2085/7, 47023 Cesena
sti@intrachem.com

RIASSUNTO

Serenade è un nuovo biofungicida a base del ceppo QST 713 del batterio *Bacillus subtilis* presente in natura e ubiquitario. Nelle prove effettuate nel biennio 2004-05 si è valutata l'efficacia del formulato commerciale, impiegato da solo e in strategia integrata, nel contenere il danno da botrite e marciume acido su vite, da botrite su fragola e da *Sclerotinia* spp. su lattuga, a confronto con linee di difesa convenzionali di riferimento e un testimone non trattato. I risultati ottenuti confermano l'efficacia di *B. subtilis* contro botrite e marciume acido su vite, e allargano il ventaglio delle possibilità applicative a nuove colture (fragola e lattuga) e avversità (*Sclerotinia* spp.). Le applicazioni di *B. subtilis* sono perciò un valido strumento non solo per l'agricoltore biologico, ma anche per le applicazioni in convenzionale, in quanto l'introduzione di *B. subtilis* nei calendari di produzione integrata consente di ridurre il rischio sia dello sviluppo di ceppi resistenti ai prodotti fitosanitari convenzionali sia di inadeguati livelli di residui nella produzione finale.

Parole chiave: *Bacillus subtilis*, biofungicida, difesa microbiologica

SUMMARY

EFFICACY OF SERENADE, NEW *BACILLUS SUBTILIS*-BASED BIOFUNGICIDE, IN CONTROLLING THE PATHOGENIC MICRORGANISMS OF CROPS

Serenade is a new biofungicide, containing the naturally occurring ubiquitous bacterium *Bacillus subtilis* strain QST 713. In the trials conducted in 2004-05, the efficacy of the formulated product in reducing the damage of grey mould and sour rot on grapevine, of grey mould on strawberries, and of *Sclerotinia* spp. on lettuce was evaluated, in comparison to that of conventional reference treatments and an untreated control. The obtained results confirm the efficacy of *B. subtilis* against grey mould and sour rot on grapevine, and extent the range of its possible applications to new crops (strawberries and lettuce) and other plant diseases (*Sclerotinia* spp.). Applications of *B. subtilis* are therefore an important tool not only for organic growers, but also for conventional growers, because the inclusion of *B. subtilis* in integrated pest management strategies allows to reduce the risk of both the development of strains resistant to conventional plant protection products and the presence of inadequate levels of residues in the final produce.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biofungicide, microbial control

INTRODUZIONE

Serenade è un nuovo biofungicida a base del ceppo QST 713 di *Bacillus subtilis*; si tratta di un ceppo presente in natura e scoperto dai ricercatori Agraquest in California. *B. subtilis* è ubiquitario nel suolo di tutti i continenti e non manifesta alcuna patogenicità per le piante e gli animali, uomo compreso (US EPA, 2005). In natura il batterio compete con altri microrganismi secernendo all'esterno della cellula alcune sostanze: si tratta di un meccanismo che si è evoluto in modo da proteggere la nicchia ecologica del batterio inibendo lo sviluppo di potenziali competitori, sottraendo loro le fonti nutritive o anche eliminando altri

microrganismi direttamente e utilizzandoli come fonte di cibo. Serenade è stato registrato come fungicida microbiologico nel 2000 negli Stati Uniti, ma ha ottenuto l'omologazione anche in altri paesi, tra cui l'Italia nel 2005.

Nelle prove effettuate nel biennio 2004-05 si è voluto valutare l'efficacia del formulato commerciale Serenade a base di *Bacillus subtilis* ceppo QST 713 (5×10^9 ufc/g di prodotto formulato), impiegato da solo e in strategia integrata, nel contenere il danno da botrite e marciume acido su vite, da botrite su fragola e da *Sclerotinia* spp. su lattuga, a confronto con linee di difesa convenzionali di riferimento e un testimone non trattato.

MATERIALI E METODI

Botrite e marciume acido su vite. Le prove sono state condotte nel 2004 dal Servizio Tecnico Intrachem Bio Italia S.p.A. a Granarolo Faentino (RA) e nel 2005 dal Consorzio Agrario di Ravenna (Centro di Saggio) a Godo di Russi (RA) in vigneti di Trebbiano allevati a casarsa. Gli interventi sono stati effettuati a fine fioritura (A=BBCH 69), chiusura grappolo (B=BBCH 77), invaiatura (C=BBCH 83) e in pre-raccolta (D=BBCH 85) (tabella 1).

Tabella 1 - Tesi a confronto nelle prove eseguite su vite nel biennio 2004-2005

Tesi	Principio attivo (p.a.)	% p.a.	Prodotto commerciale	Dose/hl	Fase trattamenti *
Anno 2004 - Prova di Granarolo Faentino (RA)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	300 g	A, B, C, D
2	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
	Pyrimethanil	37,4	Scala	200 ml	C
	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	300 g	D
3	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
	Pyrimethanil	37,4	Scala	200 ml	C
4	Testimone non trattato	-	-	-	-
Anno 2005 - Prova di Godo di Russi (RA)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g	B, C, D
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g	B, C, D
3	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g	C, D
4	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
5	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B, C
6	Testimone non trattato	-	-	-	-

* volume di distribuzione: 850 l/ha in A e 1.100 l/ha in B, C, D nel 2004; 1.000 l/ha nel 2005.

In entrambe le prove è stato realizzato un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con 4 ripetizioni da 8 viti nel 2004 e da 10 viti nel 2005, effettuando i rilievi sui grappoli delle viti centrali di ogni parcella. In prossimità della raccolta è stata valutata la diffusione (% grappoli colpiti) e l'intensità del danno da botrite e marciume acido su 100 grappoli per parcella nel 2004 e su 50 grappoli per parcella nel 2005. Per valutare l'intensità del danno, ciascun grappolo è stato classificato utilizzando una scala con 5 classi (0=nessun danno; 1=1-10% superficie del grappolo colpita dalla malattia; 2=11-25%; 3=26-50%; 4=51-75%; 5=76-100%) e trasformando successivamente i dati secondo la formula di Townsend-Heuberger (Intensità danno= $\frac{\sum(n*v)}{V*N} \times 100$, dove: n=numero di grappoli osservati per ogni classe; v=valore

della classe; N=numero totale di grappoli osservati; V=valore della classe più elevata). I valori di diffusione e intensità del danno registrati nelle tesi a confronto sono poi stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA a una via), seguita dal test di Duncan nel 2004 e dal LSD test nel 2005 per la separazione delle medie.

Botrite su fragola. Le prove sono state eseguite in pieno campo nel 2005 da ProAGRI S.r.l. (Centro di Saggio) a Trentola Ducenta (CE) su fragola cv Ventana e da AGRI 2000 S.c.r.l. (Centro di Saggio) a San Giorgio di Cesena (FC) su fragola cv Marmolada. I trattamenti sono stati applicati in pre-fioritura (A=BBCH 58), a inizio fioritura (B=BBCH 61), in piena fioritura (C=BBCH 65), a fine fioritura (D=BBCH 67-71), ingrossamento frutti (E=BBCH 81) e a 3-5 giorni dalla raccolta (F=BBCH 85) (tabella 2).

Tabella 2 - Tesi a confronto nelle prove eseguite su fragola nel 2005

Tesi	Principio attivo (p.a.)	% p.a.	Prodotto commerciale	Dose/hl	Fase trattamenti *
Anno 2005 - Prova di Trentola Ducenta (CE)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g	A, C, D, E
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g	A, C, D, E
3	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	A
	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g	C, D, E
4	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B, D, E
5	Testimone non trattato	-	-	-	-
Anno 2005 - Prova di San Giorgio (FC)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g	A, C, D, E
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g	A, C, D, E
3	Cyprodinil+fludioxonil	37,5+25	Switch	80 g	B
	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g	C, D, E
4	Procymidone	50	Sumisclex50WG	100 g	B
	Pyrimethanil	37,4	Scala	200 ml	D
	Fenhexamid	50	Teldor	1,5 kg	F
5	Testimone non trattato	-	-	-	-

* volume di distribuzione: 1.000 l/ha.

In entrambe le prove è stato realizzato un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con 4 ripetizioni da 26 piante. Ad ogni raccolta, in ciascuna parcella sono stati controllati i frutti maturi e contati quelli colpiti da botrite. Si riportano i dati relativi alla raccolta principale (a 14 giorni dall'ultimo trattamento nella prova di Trentola Ducenta e a 4 giorni dall'ultimo trattamento nella prova di San Giorgio). Per la prova di Trentola Ducenta è stata calcolata la diffusione del danno da botrite (% di frutti attaccati), mentre nella prova di San Giorgio è stato rilevato il numero totale di frutti colpiti da botrite nelle diverse tesi. In entrambe le prove è stata calcolata l'efficacia secondo Abbott delle tesi a confronto nel contenere il danno da botrite (Abbott, 1925). I valori di diffusione nella prova di Trentola Ducenta e di frutti colpiti nella prova di San Giorgio sono stati confrontati tramite analisi della varianza (ANOVA a una via), seguita da test di Student-Newman-Keuls per la separazione delle medie.

Sclerotinia spp. su lattuga. Le prove sono state condotte da G.Z. Srl (Centro di Saggio) nel 2004 a Osimo (AN) su lattuga cv Limax tipologia Lattuga, e nel 2005 a Lusia (RO) su lattuga

cv Fani tipologia Gentile. Gli interventi sono stati eseguiti durante il ciclo colturale dopo il trapianto (data trapianto: 15 ottobre nel 2004; 3 ottobre nel 2005) (tabella 3).

In entrambe le prove è stato realizzato un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con 4 ripetizioni da 40 piante nel 2004 e da 100 piante nel 2005, effettuando i rilievi sulle piante centrali di ogni parcella. In prossimità della raccolta, a 7-8 giorni dall'ultimo ultimo trattamento (25 novembre nel 2004, 10 novembre nel 2005), è stata valutata la diffusione del danno da *Sclerotinia* spp., determinando la percentuale di piante colpite in ogni parcella, ed è stata calcolata l'efficacia secondo Abbott delle tesi a confronto nel contenere la diffusione di *Sclerotinia* spp.. I valori di diffusione di *Sclerotinia* spp. registrati sono stati confrontati tramite analisi della varianza (ANOVA a una via), seguita dal test di Student-Newman-Keuls per la separazione delle medie.

Tabella 3 - Tesi a confronto nelle prove eseguite su lattuga nel biennio 2004-05

Tesi	Principio attivo (p.a.)	% p.a.	Prodotto commerciale	Dose	Date interventi*
Anno 2004 - Prova di Osimo (AN)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g/hl	29/10, 5/11, 12/11, 18/11
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g/hl	29/10, 5/11, 12/11, 18/11
3	Cyprodinil+ fludioxonil	37,5+ 25	Switch	600 g/ha	29/10, 12/11
4	Procymidone	50	Sumisclex 50WG	2 kg/ha	29/10, 12/11
5	Testimone non trattato	-	-	-	-
Anno 2005 - Prova di Lusia (RO)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	350 g/hl	13/10, 19/10, 25/10, 2/11
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	1,46	Serenade	250 g/hl	13/10, 19/10, 25/10, 2/11
3	Cyprodinil+ fludioxonil	37,5+ 25	Switch	600 g/ha	13/10, 25/10
4	Procymidone	50	Sumisclex 50WG	2 kg/ha	13/10, 25/10
5	Testimone non trattato	-	-	-	-

* volume di distribuzione: 1.000 l/ha.

RISULTATI

Botrite e marciume acido su vite. Fatta eccezione per la diffusione (% grappoli colpiti) del danno da marciume acido nel 2005, per tutti gli altri parametri analizzati le differenze tra le tesi sono sempre risultate significative (tabella 4).

I trattamenti con *B. subtilis* impiegato da solo sono risultati efficaci nel ridurre significativamente l'intensità del danno da botrite e da marciume acido rispetto al testimone non trattato, con un'efficacia spesso comparabile a quella delle linee di difesa di riferimento. Nel 2004, per la diffusione del danno da botrite, non sono emerse differenze significative tra il testimone e la tesi 1 (*B. subtilis*), probabilmente a causa dell'elevata variabilità nella

percentuale di grappoli colpiti nelle parcelle non trattate. Non è emerso alcun effetto dose-risposta per *B. subtilis* (prova di Godo di Russi).

Sia nel 2004 che nel 2005, l'impiego di *B. subtilis* in strategia integrata ha portato a valori di diffusione e intensità del danno da botrite e da marciume acido più bassi, in alcuni casi significativamente diversi da quelli registrati per le linee di difesa convenzionali: nel 2005 l'intensità del danno da marciume acido nella strategia integrata (cyprodinil+fludioxonil a chiusura grappolo; *B. subtilis* all'invaiaura e in pre-raccolta) era significativamente inferiore a quella della tesi 4 (cyprodinil+fludioxonil a chiusura grappolo) e comparabile a quella della tesi 5 (cyprodinil+fludioxonil a chiusura grappolo e all'invaiaura).

Botrite su fragola. In entrambe le prove e ad entrambe le dosi saggiate (350 e 250 g/hl), il prodotto a base di *B. subtilis* impiegato da solo ha portato a una riduzione significativa del danno da botrite rispetto al testimone non trattato (tabella 5). In entrambe le prove si è inoltre potuto osservare un evidente effetto dose-risposta: mentre alla dose più alta (350 g/hl) il prodotto ha mostrato un'efficacia comparabile a quella della strategia integrata (tesi 3) e alla linea di difesa convenzionale di riferimento, l'efficacia del prodotto alla dose più bassa (250 g/hl) era inferiore di quella delle tesi 3 e 4.

Sclerotinia spp. su lattuga. In entrambe le prove si sono registrate differenze significative tra le tesi nel contenere la diffusione di *Sclerotinia* spp. su lattuga (tabella 6): tutte le tesi trattate hanno significativamente ridotto la percentuale di piante colpite dai patogeni bersaglio rispetto al testimone non trattato, mentre non sono emerse differenze significative tra le tesi trattate.

Tabella 4 – Diffusione e intensità del danno da botrite e da marciume acido nelle tesi a confronto nel 2004 e 2005*

Tesi		Danno da botrite		Danno da marciume acido	
		% diffusione (m±d.s.)	% intensità (m±d.s.)	% diffusione (m±d.s.)	% intensità (m±d.s.)
Anno 2004 - Prova di Granarolo Faentino (RA)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	21,8±3,9 b	11,8±2,2 b	28,0±7,8 a	11,4±4,4 a
2	Cyprodinil+fludioxonil Pyrimethanil <i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	9,3±2,4 a	4,4±1,1 a	27,3±3,5 a	8,9±2,0 a
3	Cyprodinil+fludioxonil Pyrimethanil	10,5±2,1 a	4,9±1,1 a	27,3±1,7 a	10,5±1,6 a
4	Testimone non trattato	30,0±11,3 b	18,1±7,6 c	38,5±3,7 b	18,5±4,6 b
Anno 2005 - Prova di Godo di Russi (RA)					
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	18,5±9,9 ab	8,0±4,9 b	33,0±8,4 a	8,0±1,2 bc
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	21,5±5,0 b	6,3±1,2 ab	28,0±9,9 a	6,3±2,0 ab
3	Cyprodinil+fludioxonil <i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	13,5±3,0 ab	5,0±1,5 ab	20,5±4,7 a	4,9±0,7 a
4	Cyprodinil+fludioxonil	19,0±5,8 b	8,0±2,2 b	31,5±14,8 a	8,1±2,7 c
5	Cyprodinil+fludioxonil	8,5±3,4 a	3,2±2,0 a	20,5±10,1 a	5,2±1,7 a
6	Testimone non trattato	37,5±10,0 c	14,1±4,4 c	38,0±7,1 a	8,6±0,7 c

* Per ciascuna prova, lettere diverse all'interno della stessa colonna indicano differenze statisticamente significative ($P \leq 0,05$; test di Duncan nel 2004 e LSD test nel 2005).

Tabella 5 – Diffusione del danno da botrite (prova di Trentola Ducenta) e numero di frutti colpiti da botrite (prova di San Giorgio) ed efficacia delle tesi a confronto*

Tesi	Principio attivo (p.a.)	% diffusione (media)	N. frutti colpiti (media)	% Efficacia
Anno 2005 – Prova di Trentola Ducenta (CE)				
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	13,8 c	-	76,3
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	23,2 b	-	60,8
3	Cyprodinil+fludioxonil <i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	14,8 c	-	75,1
4	Cyprodinil+fludioxonil	12,8 c	-	78,6
5	Testimone non trattato	59,5 a	-	-
Anno 2005 - Prova di San Giorgio (FC)				
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	-	187,5 bc	56,0
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	-	229,5 b	46,2
3	Cyprodinil+fludioxonil <i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	-	111,5 c	73,9
4	Procymidone Pyrimethanil Fenhexamid	-	136,3 c	68,0
5	Testimone non trattato	-	426,5 a	-

* Per ciascuna prova, lettere diverse all'interno della stessa colonna indicano differenze statisticamente significative (Student-Newman-Keuls test: $P \leq 0,05$).

Tabella 6 - Diffusione del danno da *Sclerotinia* spp. nelle prove effettuate nel biennio 2004 e 2005 ed efficacia delle tesi a confronto*

Tesi	% diffusione (m±d.s.)	% Efficacia secondo Abbott	
Anno 2004 - Prova di Osimo (AN)			
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	19,4±7,5 b	59,7
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	19,4±5,9 b	59,7
3	Cyprodinil+fludioxonil	15,6±5,5 b	67,5
4	Procymidone	28,1±9,4 b	41,6
5	Testimone non trattato	48,1±13,4 a	-
Anno 2005 - Prova di Lusia (RO)			
1	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	2,8±1,7 b	60,7
2	<i>B. subtilis</i> ceppo QST 713	2,8±2,1 b	60,7
3	Cyprodinil+fludioxonil	2,3±2,2 b	67,9
4	Procymidone	2,0±1,4 b	71,4
5	Testimone non trattato	7,0±2,9 a	-

* Per ciascuna prova, lettere diverse all'interno della stessa colonna indicano differenze statisticamente significative (Test di Student-Newman-Keuls: $P \leq 0,05$).

CONCLUSIONI

Le prove condotte nel biennio 2004-05 confermano la buona efficacia del prodotto a base di *B. subtilis* nel contenere diverse avversità crittogamiche e batteriche su svariate colture (Dedej

et al., 2004; Holliger *et al.*, 2004; Everett e Machin, 2005). I nuovi risultati ottenuti su botrite e marciume acido sulla vite confermano quello che già era stato dimostrato in altre prove sperimentali (Benuzzi *et al.*, 2006), mentre allargano il ventaglio delle possibilità applicative anche a nuove colture (come la fragola) o ad avversità fungine simili (*Sclerotinia* spp.). A riprova dell'ampio spettro di attività, si consideri che *B. subtilis* ha già manifestato risultati interessanti anche contro alcune batteriosi, sia in Europa contro il colpo di fuoco batterico (Holliger *et al.* 2004; Biondi *et al.*, 2006) che all'estero per altre batteriosi (Edgecomb e Manker, 2006).

Le applicazioni di *B. subtilis* possono quindi essere considerate un valido strumento non solo per l'agricoltore biologico, ma anche per le applicazioni in convenzionale; infatti, l'introduzione di *B. subtilis* nei calendari di produzione integrata ha l'obiettivo di ridurre i rischi di sviluppo di ceppi resistenti di alcune avversità crittogamiche, in quanto il meccanismo d'azione è totalmente innovativo, e assume un ruolo fondamentale nelle scelte fitoiatriche soprattutto in prossimità della raccolta, quando il rispetto del periodo di sicurezza e del conseguente potenziale inadeguato livello di residui.

LAVORI CITATI

- Abbott W. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Biondi E., Bini F., Lancioni P., Brunelli A., Bazzi C., 2006. Biological control agents as tools against some emerging bacterial plant diseases in Italy: a concrete perspective? *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Diseases*, Darmstadt (Germany), 23-26 October 2005, in stampa.
- Benuzzi M., Albonetti E., Fiorentini F., 2006. Serenade, nuovo fungicida a base di *Bacillus subtilis* per la difesa contro *Botrytis cinerea* e marciume acido su vite: risultati di alcune sperimentazioni. *Atti 2° Convegno sulla difesa delle colture in agricoltura biologica*, Cesena (Italy), 23-25 novembre 2004, in stampa.
- Dedej S., Delaplane K. S., Scherm H., 2004. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. *Biological control*, 31, 422-427.
- Edgecomb D. W., Manker D., 2006. *Bacillus subtilis* strain QST 713, bacterial disease control in fruit vegetable and ornamental production. *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Diseases*, Darmstadt (Germany), 23-26 October 2005, in stampa.
- Everett K. R., Machin T., 2005. The efficacy of fungicides and biocontrol agents for control of *Glomerella cingulata* on Satsuma mandarins. *New Zealand Plant Protection*, 58, 84-88.
- Holliger E., Vogelsanger J., Schoch B., Duffy B., Bünter M., 2004. Das Feuerbrandjahr 2004. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau*, 23, 6-9.
- US EPA, 2005. *Bacillus subtilis* strain QST 713 (006479) biopesticide registration action document. http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006479.htm, 29 pp.