

# Approfondimento su: **Maculatura Bruna del pero**

M. Collina



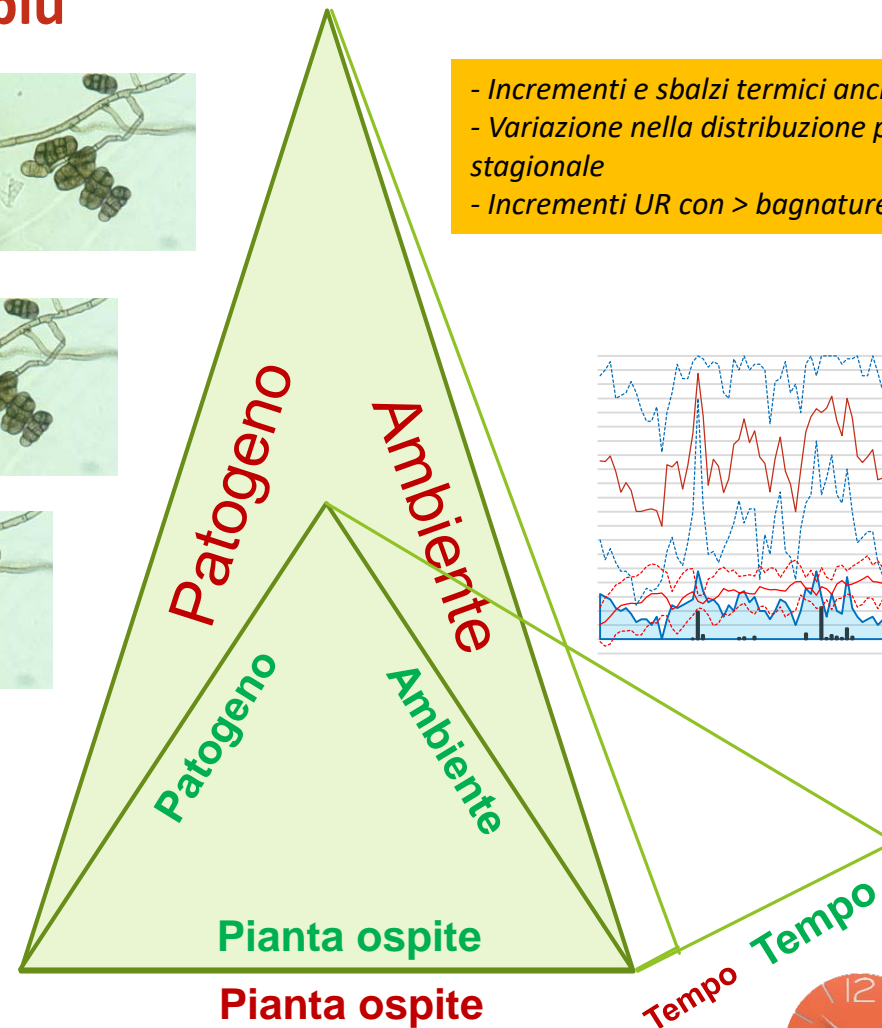
ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
DIPARTIMENTO DI  
SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

# Potenziale infettivo accresciuto grazie alle più

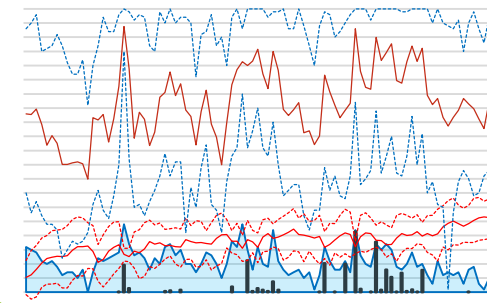
## favorevoli condizioni climatiche

Il contributo di numerosi attori pubblici e privati ha, specialmente nell'ultimo biennio (20-21), consentito di delineare uno scenario molto ampio sui numerosi aspetti fitoiatrici ed epidemiologici:

- ❑ **EFFICACIA** di vecchi e nuovi p.f. fino alla verifica di prodotti «alternativi» che potrebbero coadiuvare la difesa
- ❑ Analisi **SENSIBILITÀ** dei fungicidi
- ❑ **RIDUZIONE INOCULO** con la gestione del cotico erboso
- ❑ **IDENTIFICAZIONE E RUOLO** degli eventuali nuovi **AGENTI CAUSALI**
- ❑ Approfondimenti sui **SINTOMI CALICINI**
- ❑ Rivalutazione del **CORREDO TOSSIGENO** del patogeno primario e indagine di eventuali legami di quest'ultimo con le variazioni climatiche (incrementi termici)



- Incrementi e sbalzi termici anche repentini
- Variazione nella distribuzione pluviometrica stagionale
- Incrementi UR con > bagnature fogliari



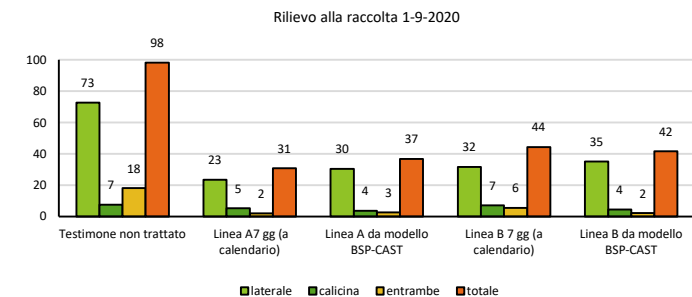
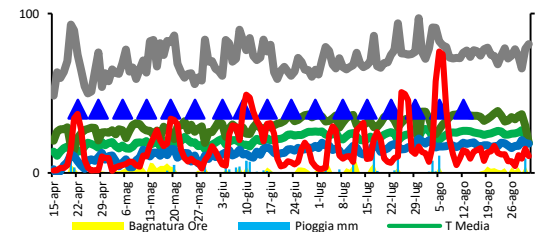
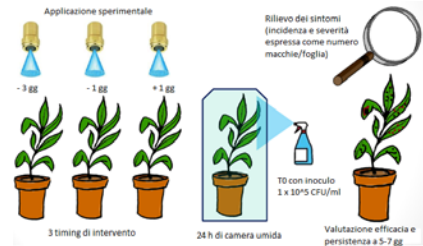
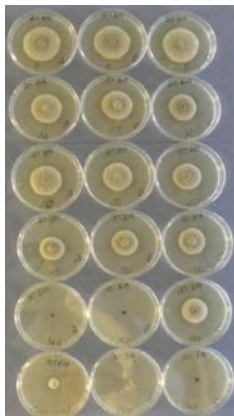
**SUSCETTIBILITA' OSPITE E RUOLO FAVORENTE DELLE TECNICHE CULTURALI**



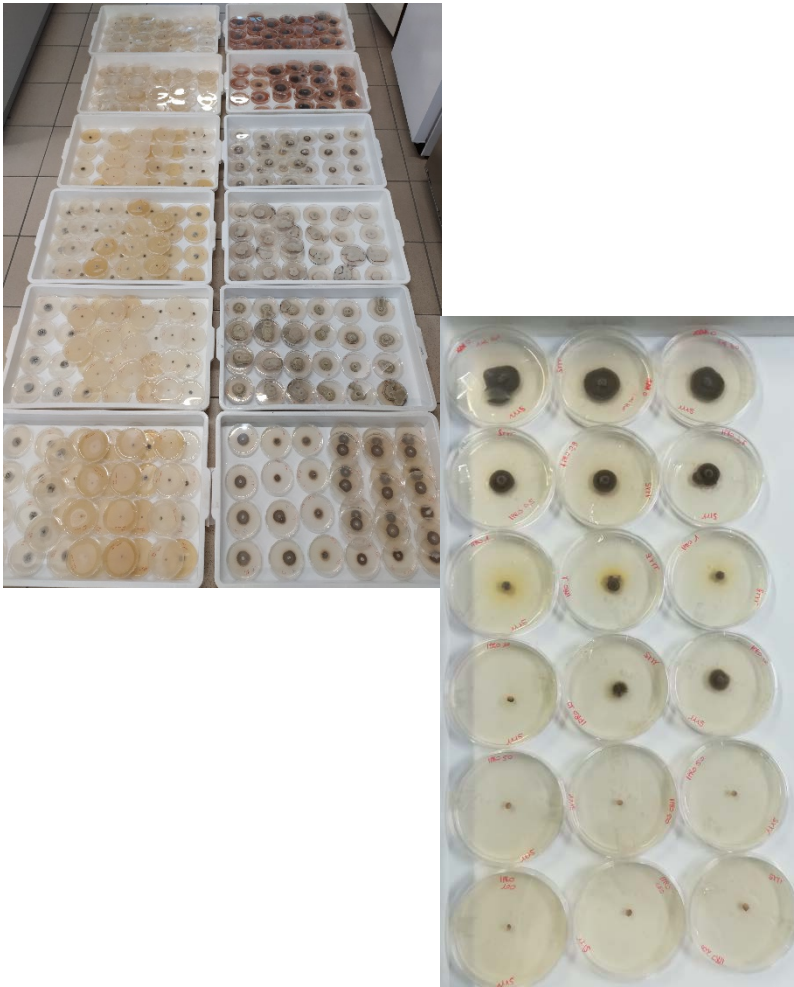
# Studi in corso (novembre 2020)

Valutazione della **efficacia e persistenza di principi attivi** già consolidati, di nuovi principi attivi, anche a minore impatto ambientale, e **strategie** da utilizzare nella difesa diretta in campo

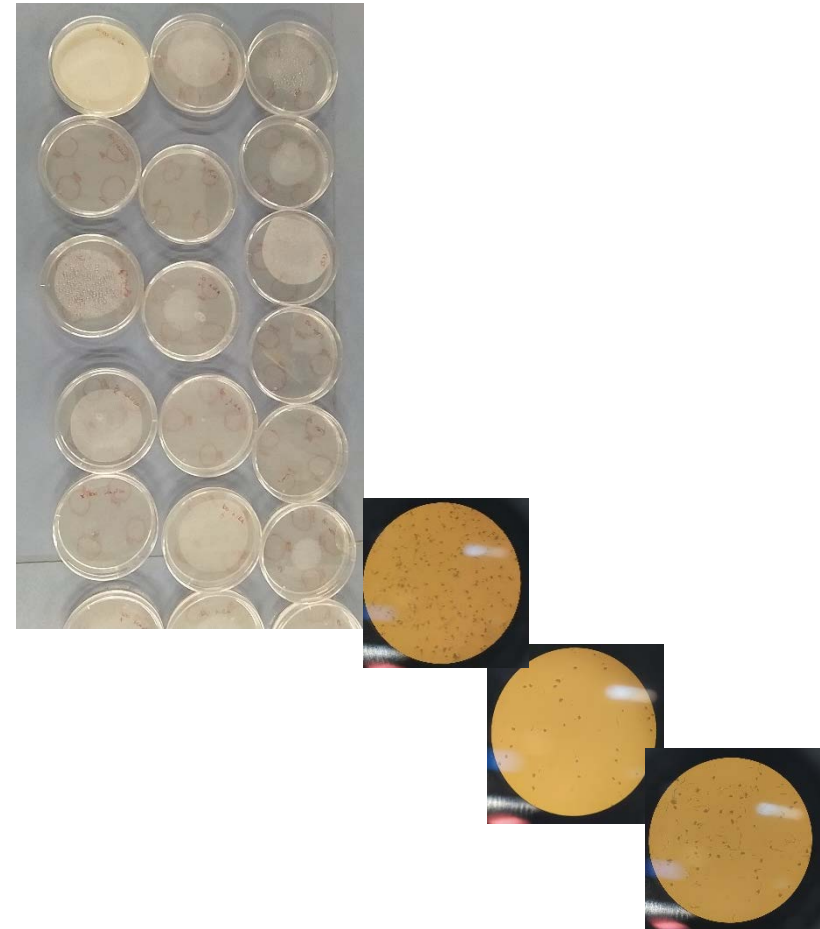
- Saggi *in vitro* e *in vivo* sulla efficacia e meccanismo di azione di prodotti nei confronti di *S. vesicarium* e *Alternaria* spp.
- Validazione in pieno campo di prodotti e strategie nei confronti della malattia
- Verifica dell'efficacia in funzione dell'espressione della dose
- Verifica dell'efficacia in funzione del rischio epidemico
- Prova di valutazione persistenza e resistenza al dilavamento dei fungicidi con intervalli applicativi in funzione del Modello BSP / SPOR



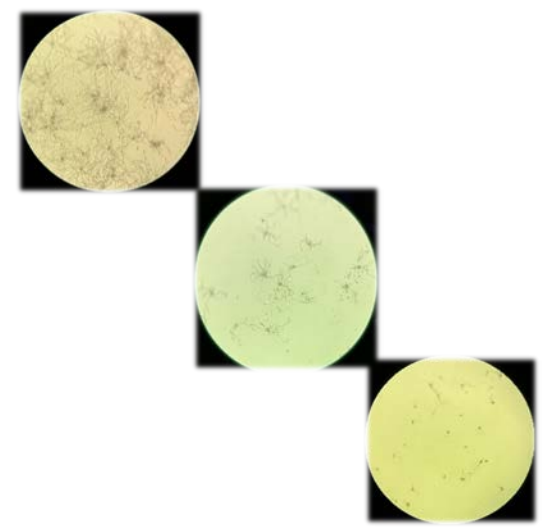
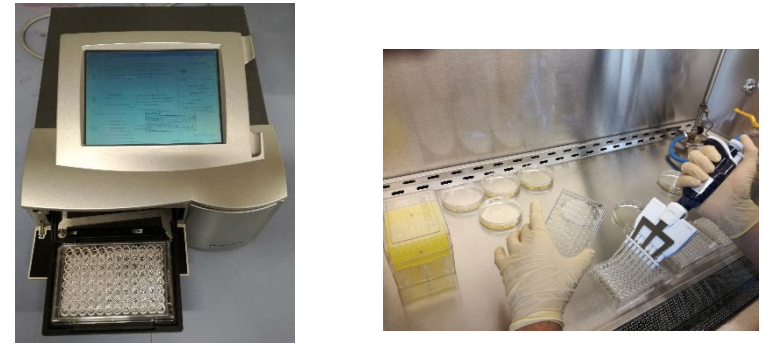
# Inibizione crescita miceliare



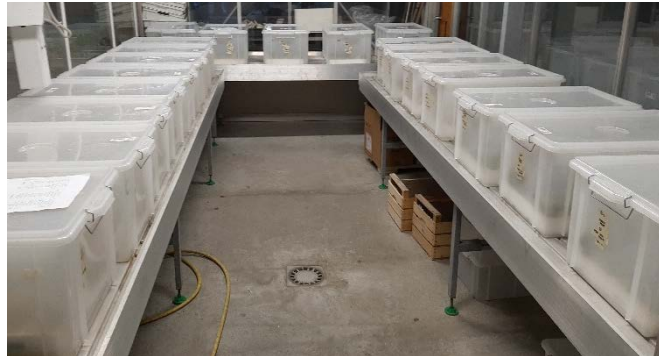
# Inibizione crescita conidica (in piastra)



# Inibizione crescita conidica (spettrofotometro)











## SINTESI SAGGI IN VITRO

### *S. vesicarium*

### *Alternaria* spp.

I più efficaci sul micelio	I più efficaci sui conidi
boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, penthiopyrad isopyrazam difenoconazole, tebuconazole, mefentrifluconazole (Revysol) mancozeb metiram fluazinam, fludioxonil iprodione olio essenziale di arancio  polisolfuro di calcio bicarbonato di K	boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, penthiopyrad isopyrazam pyraclostrobin, trifloxystrobin  difenoconazole, tebuconazole, mefentrifluconazole captan folpet mancozeb ziram dodine, fluazinam, fludioxonil iprodione  polisolfuro di calcio bicarbonato di K

I più efficaci sul micelio	I più efficaci sui conidi
fluopyram, fluxapyroxad penthiopyrad, isopyrazam difenoconazole, mefentrifluconazole (Revysol) metiram  fluazinam, fludioxonil iprodione olio essenziale di arancio  polisolfuro di calcio bicarbonato di K  <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. Plantarum D747 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ceppo FZB24 <i>Bacillus subtilis</i> ceppo QST 713	fluopyram, fluxapyroxad penthiopyrad, isopyrazam pyraclostrobin, trifloxystrobin  difenoconazole, mefentrifluconazole captan folpet mancozeb ziram dodine, fluazinam, fludioxonil iprodione  polisolfuro di calcio bicarbonato di K

# SINTESI SAGGI *IN VIVO* su frutto

*S. vesicarium*

*Alternaria* spp.

FRUTTO NON FERITO (attività BUONA)	FRUTTO FERITO (attività DISCRETA)
fluopyram+tebuconazole	pyrimethanil
fluopyram+fosetyl	dithianon + pyrimethanil
fluxapyroxad, penthiopyrad	fluazinam
isopyrazam + difenoconazole	mefentrifluconazole
pyraclostrobin	
pyraclostrobin + boscalid	
pyrimethanil	
dithianon + pyrimethanil	
folpet	
dodine	
fluazinam, fludioxonil	
iprodione	
zolfo liquido (Thiopron), Poltiglia bordolese (Bordoflow new)	
tebuconazole, mefentrifluconazole	

FRUTTO NON FERITO	FRUTTO FERITO
Testimone non trattato con assenza di sintomi  L'assenza di patogenicità impedisce di stilare qualunque tipo di classifica dei prodotti efficaci	Nessun prodotto risulta efficace in presenza di ferite



## IN SINTESI: Risultati saggi *in vitro* e *in vivo* su frutto

- ❑ Validità confermata dei principi attivi (p.a.) attualmente registrati contro la maculatura bruna del pero
- Sui **frutti non feriti** l'efficacia dei prodotti attualmente utilizzati nei confronti di *S. vesicarium* (sempre in assenza di fenomeni di resistenza) evidenziano efficacia diversa (da media ad alta) seppure non totale.
- Sui **frutti danneggiati** l'attività di tutti i prodotti è in larga misura annullata o fortemente ridotta nei confronti di *S. vesicarium*, risulta invece completamente annullata verso *Alternaria* spp.
- ❑ Ruolo secondario di *Alternaria* spp., sulla quale hanno comunque buona efficacia gli stessi p.a. che agiscono contro *S. vesicarium*

## IN SINTESI: Risultati saggi *in vivo* su astoni in vaso

- ❑ Efficacia di p.a. autorizzati o non contro maculatura bruna o su pero (es. dithianon, dodine, bicarbonato di K, ossido di rame, folpet)
- ❑ Effetto sinergico tra rame e olio essenziale di arancio dolce
- ❑ Efficacia di mefentrifluconazole (limitata resistenza incrociata con tebuconazole)
- ❑ **Corroboranti** (estratti di tannini, estratti di equisetto, polisaccaridi, olii vegetali ozonizzati) e alcuni **concimi** contenenti rame, zinco, boro e silicio: in generale non riducono l'incidenza della malattia ma possono ridurre la severità dei sintomi
  - Occorre fare attenzione ad eventuali **problemi legati alla fitotossicità**
  - Non disponibili dati di efficacia in pieno campo (alcuni prodotti sono in prova nella stagione 2022)

## IN SINTESI: Risultati indagini di campo

- ❖ PRODOTTI DI COPERTURA: captan e dithianon da soli hanno mostrato un'attività medio-scarso. Metiram e dodine hanno mostrato attività superiori. Fluazinam si è dimostrato un p.a. dalla efficacia costante e dall'impiego versatile. L'impiego in miscela con altri p.a. aumenta il grado di efficacia e diminuisce il rischio di resistenze.
- ❖ FOSFONATI: Fosetyl AI anche quando impiegato da solo fornisce un'attività non trascurabile, quindi si riconferma l'utilità di inserirlo in miscela con vari p.a.
- ❖ SDHI: Non vi sono sostanziali differenze fra i due SDHI saggiati. Fluxapyroxad da solo fornisce un risultato analogo alla miscela fluopyram + fosetyl AI
- ❖ IBS: si conferma una lieve migliore efficacia di difenoconazole rispetto a tebuconazole



## IN SINTESI: Risultati indagini di campo

### ❖ Verifica dell'efficacia in funzione dell'ESPRESSIONE DELLA DOSE:

- **Captano** soffre di un effetto dose (consigliabile impiegarlo al dose massima di etichetta e abbinato ad un partner)
- **Fluazinam** non soffre di un effetto dose ai dosaggi attuali

### ❖ Verifica dell'efficacia in funzione dei MODELLI PREVISIONALI:

- L'uso dei modelli previsionali permette, in alcune situazioni, di ridurre le applicazioni dal 20% al 30%

### ❖ Verifica dell'efficacia in funzione del momento di intervento (PRE- O POST-PIOGGIA):

- Ditiocarbammati (**mancozeb**, **metiram**) efficacia lievemente maggiore trattando in post-infezione; **fluxapyroxad**: l'efficacia è maggiore trattando in pre-infezione; **difenoconazole** e **dodine**: efficacia analoga con trattamenti pre- o post-infezione

## Studi in corso (novembre 2020) – Sanitazione cotico

Valutazione delle nuove e/o migliori tecniche da utilizzare per **la sanitazione del cotico erboso in grado di abbassare l'inoculo svernante del patogeno** e contrastare le sue potenzialità di infezione durante la stagione estiva

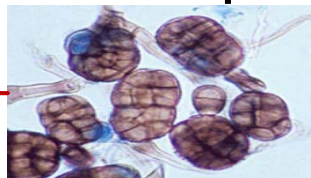
- Riduzione dell'inoculo svernante di *S. vesicarium* sul cotico erboso con diverse tecniche agronomiche a confronto
- Validazione di strategie agronomiche combinate per la riduzione dell'inoculo svernante di *S. vesicarium* sul cotico erboso



ascospore rilasciate precocemente e in seguito anche i conidi

in presenza d'acqua le spore germinano sulla vegetazione e causano infezione

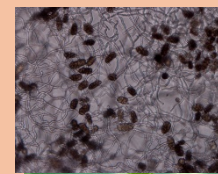
## Fase parassitaria



Rilascio ascospore di *P. allii* e conidi di *S. vesicarium*



durante l'inverno si differenziano gli pseudoteci



conidi infettano i tessuti di pero svariate volte nella stagione

ascospore e conidi vengono prodotti nel cotico erboso

Le foglie e i frutti infetti cadono al suolo



il fungo sverna su foglie e frutti di pero ma anche su erbe del cotico

## Fase saprofitaria





## Presenza di *P. allii* e *S. vesicarium* nelle erbe del cotico

*Poa pratensis*\*, *Festuca rubra*, *Festuca ovina*, *Lolium perenne*\*,  
*Digitaria sanguinalis*, *Setaria glauca*\*, *Trifolium repens*

\* Maggiore densità pseudotecii *Pleospora allii*



Nelle erbe del cotico i conidi vengono prodotti più abbondantemente rispetto alle foglie infette del pero cadute a terra

## IN SINTESI: Risultati delle esperienze sulla sanificazione del cotico

- ✓ Gli interventi di sanificazione primaverili contribuiscono alla riduzione dell'inoculo svernante di *S. vesicarium* quando eseguiti con idonee tempistiche e modalità
- ✓ La sanificazione va integrata con la difesa della chioma.
- ✓ Per mantenere l'effetto sul contenimento dei danni é opportuno ripetere le pratiche di sanificazione nel corso della stagione.
- ✓ I risultati delle tecniche applicate possono variare in funzione delle realtà aziendali e delle condizioni ambientali che si verificano.



## IN SINTESI: Risultati delle esperienze sulla sanificazione del cotico

- **ROTTURA DEL COTICO (intervento agronomico)**

- ✓ Importante riduzione del danno
- ✓ Tempistica e frequenza degli interventi flessibile
- ✓ Tecnica molto invasiva per la portanza del terreno (integrabile con semine controllate)

- **PIRODISERBO (intervento termico)**

- ✓ Importante riduzione del danno
- ✓ Tecnica costosa e non di semplice gestione

Con elevata entità di danno nella stagione/i precedenti

- **TRATTAMENTI (interventi con diverse sostanze)**

es. *Trichoderma spp\**, Solfato di Ferro, Calce idrata, Calciocianamide, etc.

- ✓ Risultati variabili anche in funzione dell'andamento meteorologico
- ✓ Esecuzione complessivamente semplice e flessibile
- ✓ Costi variabili

Con medio-bassa entità di danni nella stagione/i precedenti



# NUOVI STUDI IN CORSO

## Quantificazione dell'inoculo presente nel cotico

Eur J Plant Pathol (2009) 124:151–162  
DOI 10.1007/s10655-008-9402-2

### Pathogenicity of *Stemphylium vesicarium* from different hosts causing brown spot in pear

Jürgen Köhl · Belja Groenboom-de Haas ·  
Helen Goossen-van de Geijn ·  
Adrianus Speksnijder · Pieter Kastelein ·  
Sybren de Hoog · Bert Gerrits van den Ende



Eur J Plant Pathol (2013) 137:409–419  
DOI 10.1007/s10655-013-0276-4

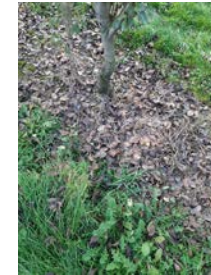
### Dynamics of pear-pathogenic *Stemphylium vesicarium* in necrotic plant residues in Dutch pear orchards

Jürgen Köhl · Peter Frans de Jong · Pieter Kastelein ·  
Belja B. Groenboom-de Haas · Jean H. N. Asherogen ·  
Henny Balkhoven · Jan P. Wubben

Accepted: 8 August 2013 / Published online: 22 August 2013  
© KNPV 2013

**Abstract** Brown spot disease on pear caused by *Stemphylium vesicarium* may affect leaves and fruits. Inoculum sources present on orchard floors play an important role in the epidemiology of pear brown spot. The pathogen can overwinter on plant residues and multiply and spread on the residues during the growing season. In the Netherlands, brown spot characteristically

results of pear leaves, grasses occasionally in summer and pe population dynamics showed 10 inoculum dead pear leaves during pathogen populations developed during the growing season on r grasses. Based on DNA concen

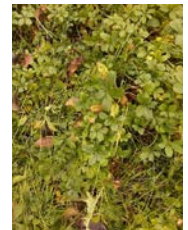


Ecology and Epidemiology

### Quantitative Detection of Pear-Pathogenic *Stemphylium vesicarium* in Orchards

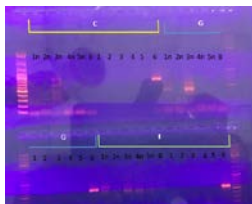
J. Köhl, B. H. Groenboom-de Haas, P. Kastelein, V. Rossi, and C. Waalwijk

First, second, third, and fifth authors: Business unit BioInteractions and Plant Health, Plant Research International, PO Box 69, 6700 AB Wageningen, The Netherlands; and fourth author: Institute of Entomology and Plant Pathology, Sacco Caoro Catholic University, Via Emilia Parmense 84, 29100 Piacenza, Italy. Accepted for publication 20 July 2009.



## Saggio molecolare qualitativo

PCR qualitativa per l'individuazione di *S. vesicarium* con l'utilizzo di 3 geni, già identificati in letteratura da Hay *et al* (2019): CALM, GAPD, ITS



## Saggio molecolare quantitativo

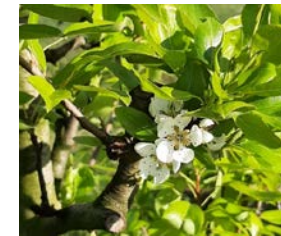
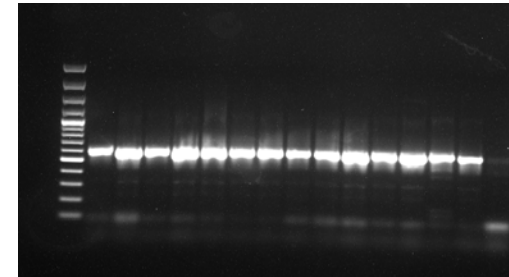
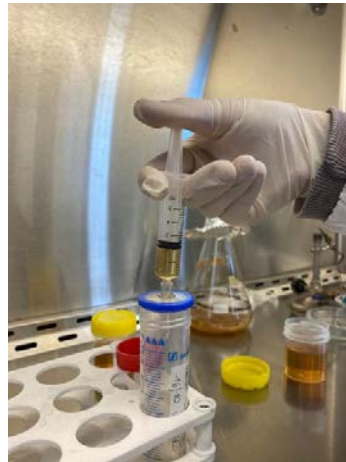
Utilizzo di una tecnica molecolare molto sensibile quale la ddPCR



# Studi in corso (novembre 2020)

Approfondire le **conoscenze epidemiologiche dell'agente/i vettore/i della malattia**

- Ruolo di *Alternaria* spp.
- Diagnosi molecolari degli agenti eziologici
- Approfondimenti sul corredo tossigeno dei ceppi più aggressivi di *S. vesicarium*
- Sintomatologia calcicina



Disponibile il genoma sequenziato di *S. vesicarium*

# SEI DOMANDE E LINEE DI RICERCA

## DOMANDE

1. Qual'è il ruolo di *Alternaria* spp. in campo ?
2. Le popolazioni di *Alternaria* spp. sono patogene sul pero?
3. La specie *S. vesicarium* è l'unica presente in campo?
4. Qual'è la fase fenologica nella quale è più probabile che avvenga l'infezione che causa il sintomo calicino?
5. Le tossine di *S. vesicarium* sono sempre le stesse ?
6. Il cambiamento climatico, in particolare quello dei livelli termici, contribuisce all'aumento della pericolosità di *S. vesicarium*?

## LINEE DI RICERCA

1. Valutazione comportamento con inoculazioni artificiali di *S. vesicarium* e *Alternaria* spp.
2. Verifica della patogenicità di popolazioni di *Alternaria* spp. prelevate in campo attraverso biosaggi
3. Verifica della eventuale presenza di altre specie appartenenti al genere *Stemphylium*
4. Valutazione con inoculazioni artificiali in pieno campo in prove sperimentali ad hoc
5. Valutazione dell'eventuale cambiamento qualitativo del corredo tossigeno di *S. vesicarium*
6. Ruolo dell'innalzamento delle temperature sullo sviluppo di *S. vesicarium*

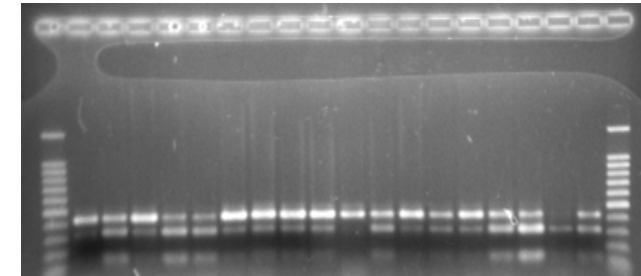


## IN SINTESI: Risultati delle ricerche epidemiologiche

Circa la presenza di altre specie di *Stemphylium* oltre a *S. vesicarium*, si conferma la esclusiva presenza della specie *S. vesicarium* nei campioni di frutti con sintomi da maculatura bruna raccolti nel 2019 e 2020

*S. vesicarium* risulta l'agente causale primario della maculatura bruna del pero pur essendo presente *Alternaria* spp. che riesce ad interessare il frutto

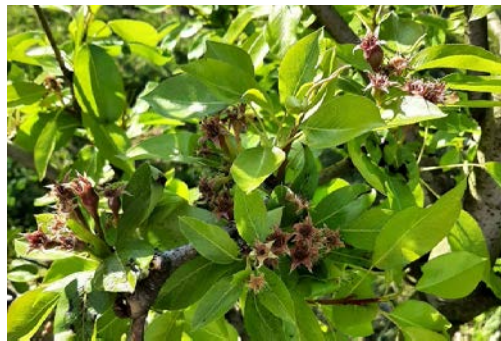
Si conferma che *Alternaria* spp. non è in grado di causare sintomi su frutti sani, ma solo in corrispondenza di ferite o micro-ferite



## IN SINTESI: Risultati delle ricerche epidemiologiche

Le indagini effettuate dimostrano che il danno da maculatura calicina può essere determinato da infezioni che iniziano dalle prime fasi dopo l'allegagione del frutticino (2° anno di verifiche in corso)

Non è emerso nessun ruolo dei fitoregolatori nel causare la maculatura calicina





# IN SINTESI: ciò che sapevamo sul corredo tossigeno



## CORREDO TOSSIGENO

1999

Biochemistry and Cell Biology

### Purification and Biological Characterization of Host-Specific SV-Toxins from *Stemphylium vesicarium* Causing Brown Spot of European Pear

P. Singh, R. Bugiani, P. Cavanni, H. Nakajima, M. Kodama, H. Otani, and K. Kohmoto

J. Phytopathology 148, 87–93 (2000)  
© 2000 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin  
ISSN 0931-1785

Laboratory of Plant Pathology, Tottori University, Japan

### Effects of Host-Selective SV-Toxin from *Stemphylium vesicarium*, the Cause of Brown Spot of European Pear Plants, on Ultrastructure of Leaf Cells

P. SINGH<sup>1</sup>, P. PARK<sup>2</sup>, R. BUGIANI<sup>3</sup>, P. CAVANNI<sup>3</sup>, H. NAKAJIMA<sup>4</sup>, M. KODAMA<sup>5</sup>, H. OTANI<sup>1</sup> and K. KOHMOTO<sup>3</sup>

2000

Journal of Phytopathology

2017

J. Phytopathol

ORIGINAL ARTICLE

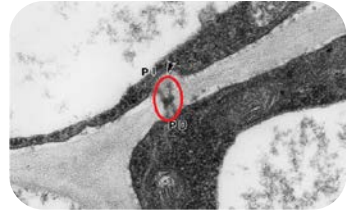
### Production of Host-selective SV-toxins by *Stemphylium* sp. Causing Brown Spot of European Pear in Japan

Megumu Tanabashi<sup>1</sup>, Sakae Okuda<sup>2</sup>, Eri Miyazaki<sup>2</sup>, Roxana Y. Parada<sup>2</sup>, Atsushi Ishihara<sup>2</sup>, Hiroshi Otani<sup>2</sup> and Kumiiko Osaki-Oka<sup>2</sup>

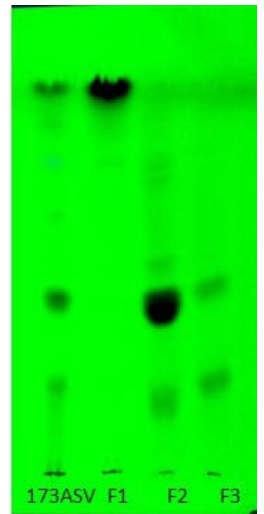
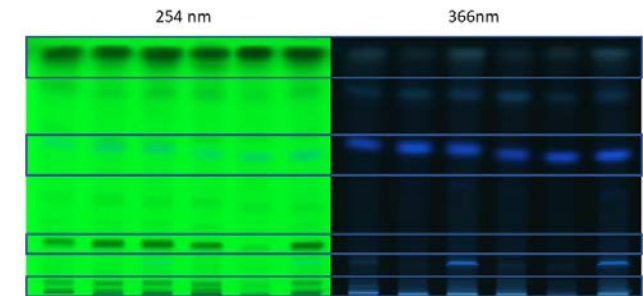
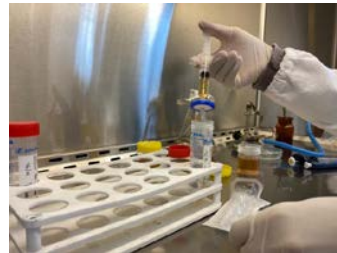
<sup>1</sup> Horticultural Research Center, Nigata Agricultural Research Institute, Serri, Nigata 951-0111, Japan  
<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyama-Minami, Tottori 680-8553, Japan

- ✓SV-toxin I e II
- ✓Causano un incremento della perdita elettrolitica dalle membrane cellulari dei tessuti suscettibili, alterazione dei processi di scambio (pompe protoniche), lisi cellulare
- ✓Altamente solubili in acqua, stabili alle alte temperature, struttura chimica ancora parzialmente sconosciuta
- ✓Vengono rilasciate in fase di germinazione delle spore a contatto con l'ospite
- ✓I frutti risultano suscettibili in tutti gli stadi di accrescimento (anche se è stata osservata una maggiore s. nelle prime fasi di accrescimento e sul frutto vicino alla raccolta) e la sensibilità varia in dipendenza delle cvs (tossine ospite-specifiche)

## IN SINTESI: nuove acquisizioni sul corredo tossigeno



- ✓ Identificate e verificate le tossine di *S. vesicarium* (forse qualche novità!)
- ✓ E' in corso la messa a punto della metodologia estrattiva delle tossine dai filtrati colturali fungini per poi quantificarne la presenza nei ceppi raccolti nei diversi anni di indagine





## IN SINTESI: Influenza dell'aumento dei livelli termici sulla produzione di tossine

Il fungo *S. vesicarium* si è probabilmente adattato al mutamento termico riuscendo a causare danni sui frutti anche con le più alte temperature (30-35°C), pertanto il periodo di pericolosità e di rischio si è esteso.



TNT



Ceppo 173 – 35°C



Ceppo 1115 – 35°C

# IN SINTESI: Influenza dell'aumento dei livelli termici sulla produzione di tossine

Le verifiche proseguono .....

15°C

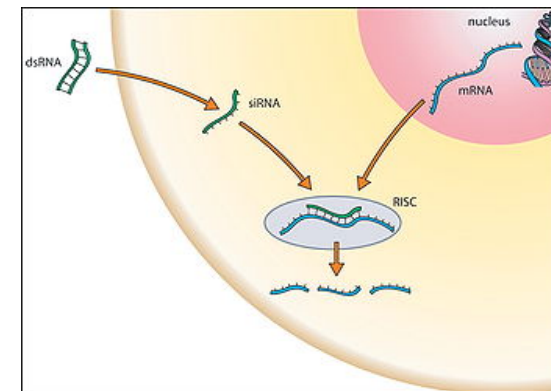
25°C

35°C

## NUOVE FRONTIERE

L'**RNA interefrente (RNAi)** o silenziamento genico, si basa su un meccanismo naturale, evolutivamente conservato nella maggior parte degli organismi eucarioti, in cui molecole di RNA a doppio filamento (dsRNAs) inibiscono l'espressione di geni o la loro traduzione neutralizzando molecole target di RNA messaggero (mRNA) in modo sequenza-specifico.

E' in fase di studio presso i reparti di Ricerca e Sviluppo (RD) delle più grandi multinazionali agrofarmaceutiche e alcuni centri di ricerca pubblici, l'applicazione di tecniche basate su RNAi sia nel miglioramento genetico delle colture (trans-genico) sia nella messa a punto di prodotti fitosanitari capaci di stimolare temporaneamente la produzione di dsRNA (RNA a doppio filamento) da parte delle piante.






# RNAi - HIGS

I sistemi basati sull'RNAi si possono attivare in modo stabile in pianta tramite trasformazione genetica, che permette l'espressione di costrutti genici RNAi nel genoma dell'ospite ("Silenziamento Genico Indotto nell'Ospite" - **HIGS**). Tale approccio sembra offrire maggiori opportunità rispetto all'introggressione di geni di resistenza in quanto, come è stato dimostrato sia in specie orticole sia in specie arboree, anche solo con il portinnesto trasformato è possibile una traslocazione del segnale molecolare capace di conferire resistenza nei tessuti innestati, garantendo quindi la produzione di frutti non geneticamente modificati e non infetti dalla malattia.

Le applicazioni  
dell'RNA interference  
nella difesa delle  
piante

### RNAi - SIGS

L'RNAi può essere attivato anche attraverso l'applicazione esogena ("Silenziamento Genico Indotto da Spray" - **SIGS**) di molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) ritenute attivatrici di questo meccanismo. Numerosi studi hanno dimostrato che i dsRNA applicati esogenamente su tessuti vegetali possono indurre il silenziamento di geni target di insetti o patogeni.



Le applicazioni  
dell'RNA interference  
nella difesa delle  
piante

**Marina Collina**

**DISTAL**

*marina.collina@unibo.it*