

Benefici, limiti e risvolti pratici nell'utilizzo di prodotti fitosanitari a base microbiologica per il controllo di patogeni radicali e fogliari

Ilaria Pertot

Michele Perazzolli, Gerardo Puopolo,
Dario Angeli, Oscar Giovannini

ilaria.pertot@fmach.it



...lasciare la vecchia via o
..cercare una via nuova...



Temi affrontati

- Ragioni del **crescente interesse** per i principi attivi alternativi alle molecole di sintesi chimica
- **Tipologie** e caratteristiche
- **Benefici e vantaggi**
- **Limiti**
- Risvolti pratici nell'utilizzo
- **Prospettive** e prodotti di nuova generazione

Le ragioni

- **Direttiva europea** sulla riduzione dei pesticidi (Dir. 128/2009, recepita D.L. 150, 14/08/2012)
- **Strumenti validi** nella difesa integrata (bassa o nulla tossicità, basso rischio sviluppo resistenze, no residuo)
- **Sicurezza per gli operatori**
- Restrizioni ulteriori su **residuo** (quantità e numero) da parte della distribuzione
- **Pressioni** da parte del consumatore e della società (cibo e ambiente)

Prodotti fitosanitari

- Biopesticida, bioagrofarmaco, ... ma **prodotto fitosanitario in cui la sostanza attiva è un microorganismo**
- **REGOLAMENTO (CE) N. 1107/2009** - Immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari
- **REGOLAMENTO (CE) N. 396/2005** - Livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale



BIOFERTILIZZANTI

PIANTE RESISTENTI

PROMOZIONE
DI CRESCITA

Pianta

Resistenza genetica

Fissazione dell'azoto
Solubilizzazione del fosfato
Chelazione del ferro
Rilascio di nutrienti dalla sostanza organica

Produzione di fitormoni (IAA)
Riduzione stress (ACC deaminasi)

Induzione di resistenza

Patogeni

Microrganismi associati alla pianta

Antibiosi
Enzimi litici
Competizione per spazio
Competizione per nutrienti
Iperparassitismo

BIOPESTICIDI

Biofungicidi microbiologici

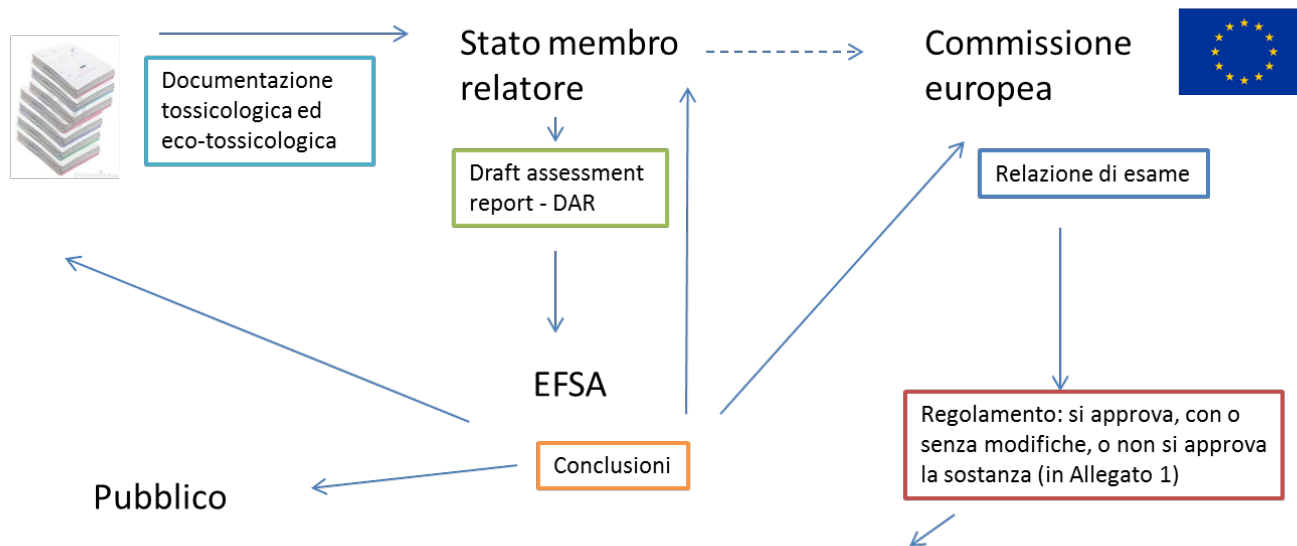
- *Ampelomyces quisqualis*
- ***Aureobasidium pullulans***
- ***Bacillus spp.***
- *Candida oleophila*
- *Gliocladium catenulatum*
- *Coniothyrium minitans*
- *Phlebiopsis gigantea* (ceppi diversi)
- *Pseudomonas spp.*
- *Pseudozyma flocculosa*
- ***Trichoderma spp.***
- *Verticillium albo-atrum* (precedentemente *V. dahliae*)



Immissione sul mercato (registrazione)

Richiedente

SOSTANZA ATTIVA



Richiedente



Documentazione
tossicologica ed eco-
tossicologica, uso ed
efficacia

Stato membro

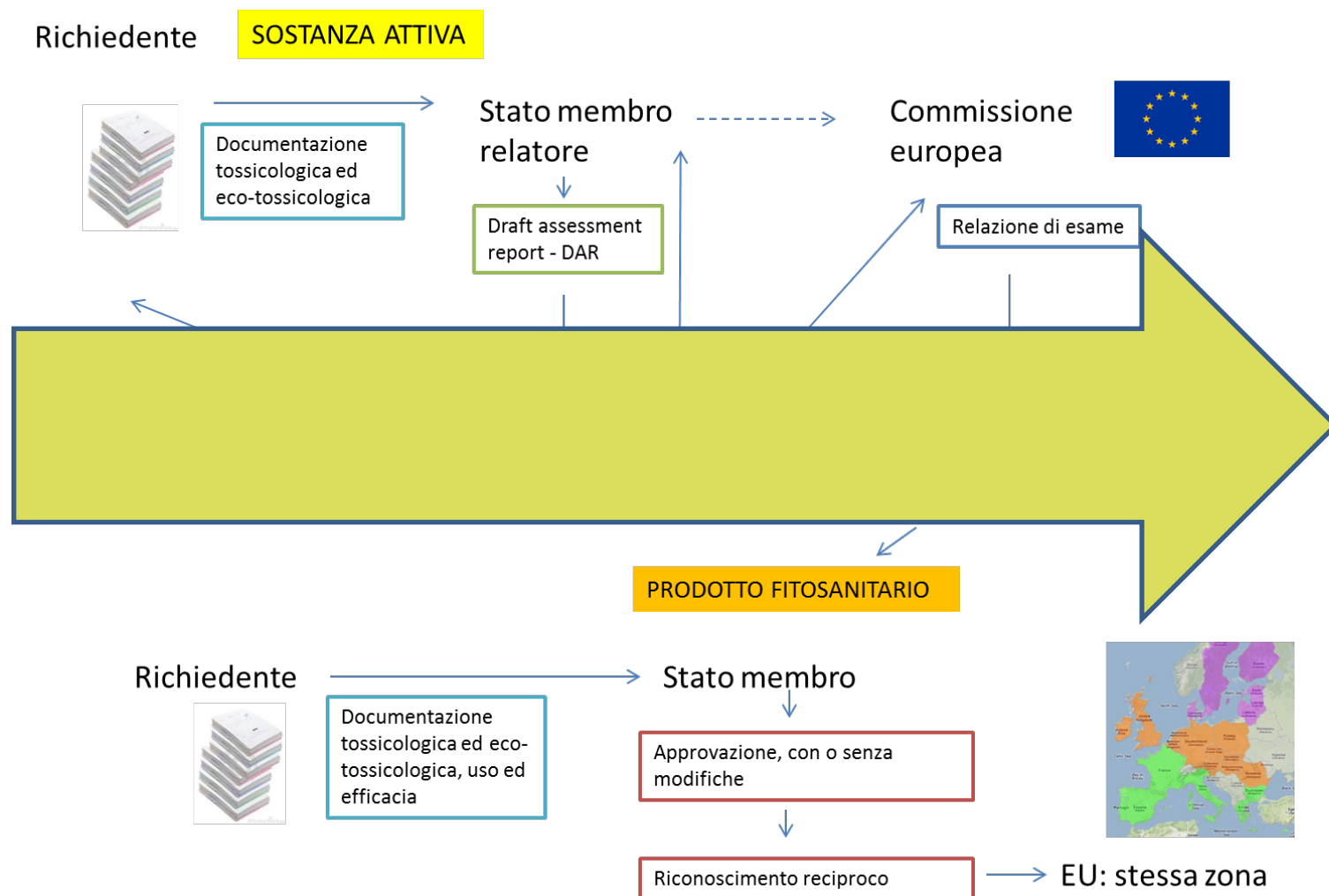
Approvazione, con o senza
modifiche

Riconoscimento reciproco



EU: stessa zona

Immissione sul mercato (registrazione)





Immissione sul mercato (registrazione)

- **Garanzia per l'operatore:**
EFFICACIA, QUALITÀ (vitalità, concentrazione minima, data di scadenza, contaminanti, ecc.)
- **Garanzia per il consumatore:**
RESIDUI, SICUREZZA (assenza patogeni umani, tossine, ecc.)
- **Garanzia per l'ambiente:**
VALUTAZIONE RISCHIO

Difesa integrata, Dir. 128/2009

- Non solo prodotti fitosanitari di sintesi chimica, ma **altre opzioni**:
 - rotazione colturale,
 - utilizzo di tecniche colturali adeguate
 - utilizzo, ove appropriato, di «cultivar» resistenti/tolleranti e di sementi e materiale di moltiplicazione standard/ certificati,
 - utilizzo di pratiche equilibrate di fertilizzazione, e di irrigazione/drenaggio,
 - prevenzione della diffusione di organismi nocivi mediante misure igieniche
 - protezione e accrescimento di popolazioni di importanti organismi utili, per esempio attraverso adeguate misure fitosanitarie o l'utilizzo di infrastrutture ecologiche all'interno e all'esterno dei siti di produzione
 -
- Ai metodi chimici **devono essere preferiti metodi biologici sostenibili, mezzi fisici e altri metodi non chimici** se consentono un adeguato controllo degli organismi nocivi
- ...

Meccanismi d'azione dei fungicidi microbiologici

Generalmente **coesiste più di un meccanismo**

Importante **conoscere** il meccanismo del biofungicida e la dinamica delle infezioni del patogeno

- **Azione diretta:** concetto simile a quello dei fungicidi di sintesi chimica
- **Induzione di resistenza:** max 40-50% efficacia
- **Iperparassitismo:** mai eliminazione del patogeno, riduzione inoculo
- **Competizione:** riduzione inoculo e prevenzione

Azione diretta (antibiosi)

- **Persistenza del metabolita(i)/enzima(i) attivo (i)** su foglia o in suolo (se presente nel prodotto formulato); caso frequente in *Bacillus* spp.; difficoltà nell'iter registrativo (identificazione dei metaboliti attivi); degradazione microbica
- **Persistenza del microrganismo in stadio attivo** (spora > germinazione > produzione); condizioni ambientali
- **Produzione metaboliti/enzimi in pianta** (efficacia coltura duale $\neq$ efficacia in campo); metaboliti indotti da patogeno, effetto substrato, ecc.

Importanza della specie e del ceppo

- Produzione enzimi litici da parte di specie e ceppi di *Trichoderma* spp.



Trichoderma isolates	Protease	Glucanase	Chitinase	Cellulase	Siderophore
T. afroharzianum CCTUT1	-	+	+++	+	+
T. harzianum CCTUT2	+	+	+++	+	+
T. virens CCTUT4	+++	+	++++	-	+
T. pleuroticola CCTUT5	++	+	++	-	+
T. harzianum CCTUT9	++	+	++	+	+++
T. pleuroticola CCTUT10	++	+	++	-	++
T. harzianum CCTUT11	+	+	++	-	+++
T. harzianum CCTUT12	+	+	+++	-	++
T. virens CCTUT14	+++	+	++++	-	+
T. harzianum CCTUT16	+	+	+	+	++
T. harzianum CCTUT17	+	+	+	+	++
T. harzianum CCTUT18	+	+	+++	+	+
T. harzianum CCTUT19	++	+	++	+	+++
T. virens CCTUT20	+++	+	++++	+	+++
T. pleuroticola CCTUT21	+	+	+++	+	+++
T. asperellum CCTUT22	+	+	++	+	++
T. pleuroticola CCTUT24	+	+	+++	-	+++
T. pleuroticola CCTUT26	-	+	+++	+	+++
T. harzianum CCTUTK1	+	+	++	+	++
T. harzianum CCTUTK2	+	+	++	-	+++
T. atroviride SC1	+	+	+++	+	-
Control	-	-	-	-	-

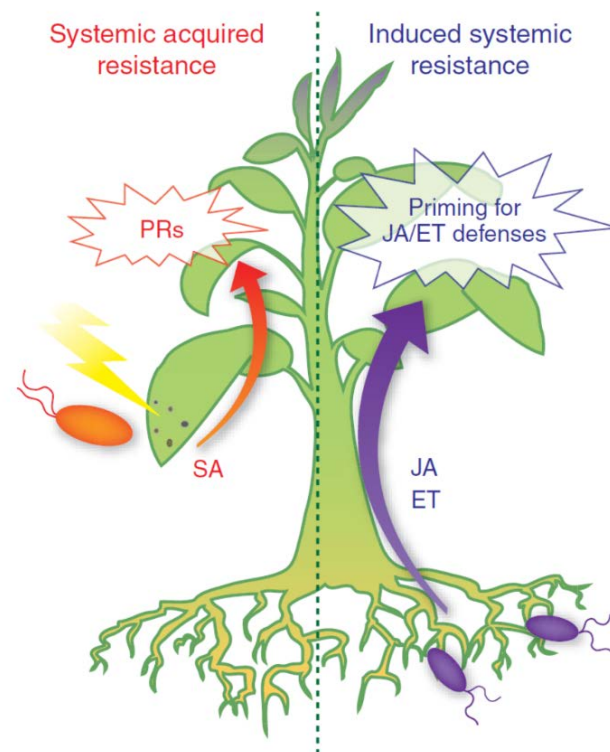
Chi può indurre resistenza

- *Bacillus* spp.
- *Trichoderma* spp.
- *Pseudomonas* spp.
- Estratto di salice
- Laminarina
- *Reynoutria sachalinensis*
- Proteine...

ISR: indotta da microrganismi, parti di essi, alcune molecole naturali; 'pre-attivazione' più rapida risposta della pianta in caso di attacco, non ha costi metabolici

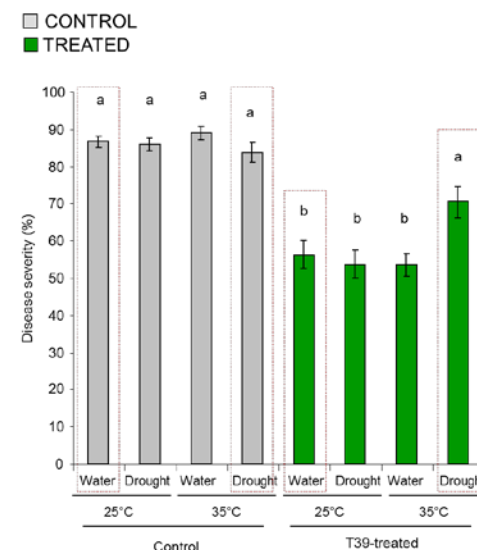
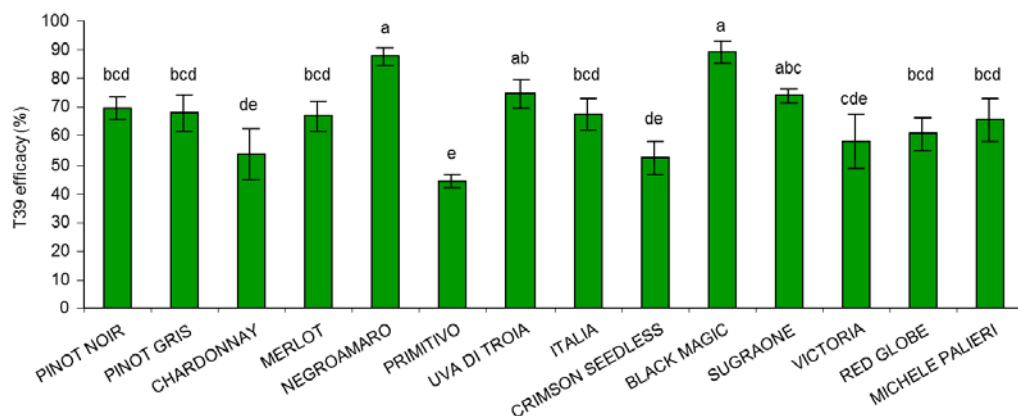
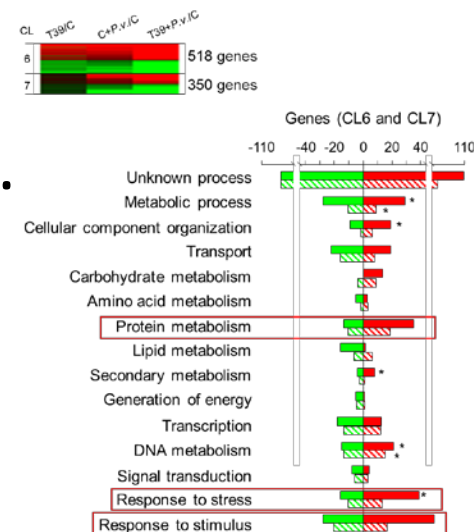
SAR: attivazione risposte di difesa, costi metabolici

ISR o SAR in campo possono solo ridurre la malattia (fino a 40-50%), in genere la pianta è già attivata in natura se non in condizioni molto pulite (es. coltura idroponica)



L' «auto-protezione» della pianta: sogno o realtà?

- Resistenza sistemica acquisita (SAR) vs. Resistenza sistemica indotta (ISR)
- Interconnessione dei pathways
- Stato fisiologico della pianta, specie e varietà, ecc.



Iperparassitismo

- L'antagonista cresce sul o nel patogeno, invade i tessuti, si nutre di esso e lo uccide (lentamente), ma mai completamente
- Riduzione delle infezioni
- Riduzione dell'inoculo svernante o nel suolo
- Esempio: *Ampelomyces quisqualis* (su oidio su varie colture) o *Trichoderma* spp. (su vari)

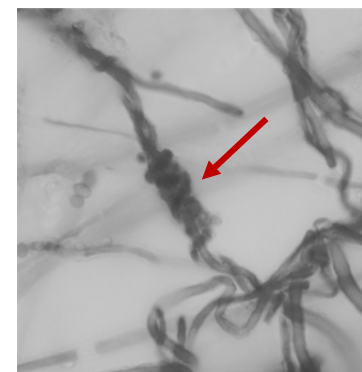
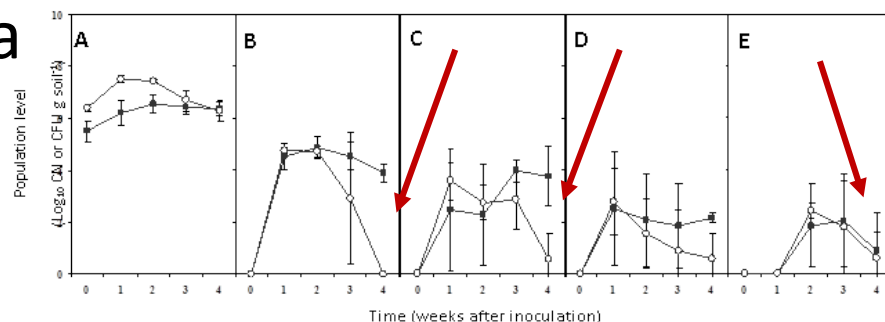


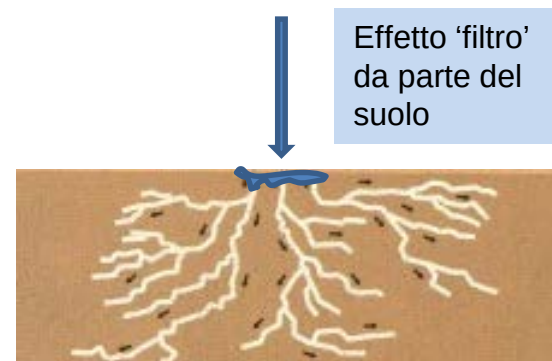
Foto: www.pure-ipm.eu

Applicazioni al suolo

- **Competizione** del ceppo introdotto con la microflora nativa del suolo (persistenza limitata)



- Necessità di raggiungere **concentrazioni sufficienti** (10^7 UFC/g, per *Trichoderma* spp.) e uniformità di distribuzione nel terreno nello strato che ospita il patogeno per ridurre l'inoculo
- Iniezioni al suolo, trattamento radici in pre-trapianto: **inefficaci**

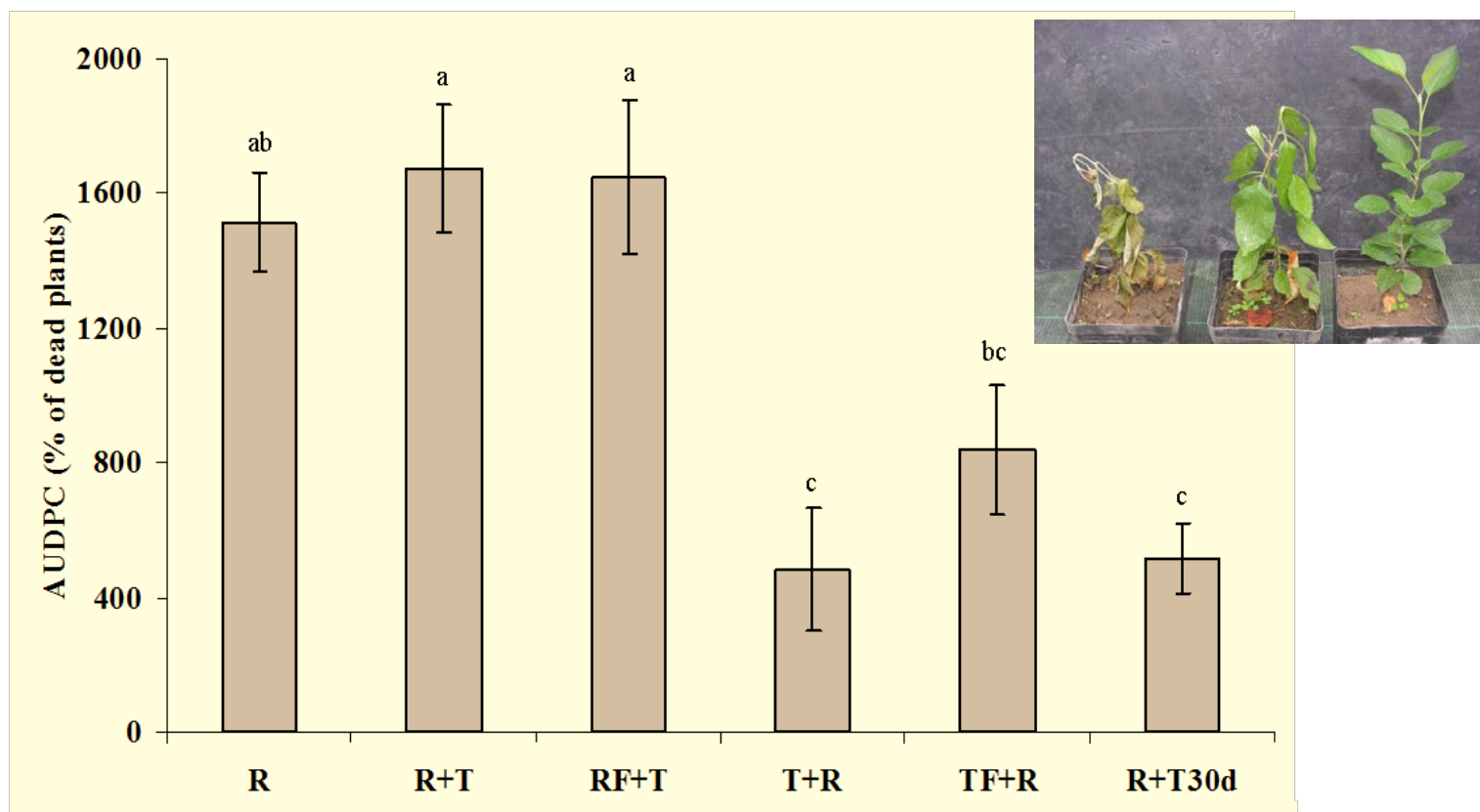


Rosellinia necatrix: patogeno radicale del melo



Inoculo persiste a lungo nel suolo,
fumigazioni inefficaci o
controproducenti

Rosellinia necatrix e riduzione inoculo da parte di *Trichoderma atroviride* SC1



R: *R. necatrix*-controllo positivo;

(Pasini *et al.*, 2016)

R+T: *T. atroviride* SC1 applicato dopo il patogeno (1 settimana);

RF+T: SC1 applicato una settimana dopo il patogeno, con aggiunta di substrato (chitina da esoscheletro di gamberi);

T+R: SC1 applicato una settimana prima del patogeno;

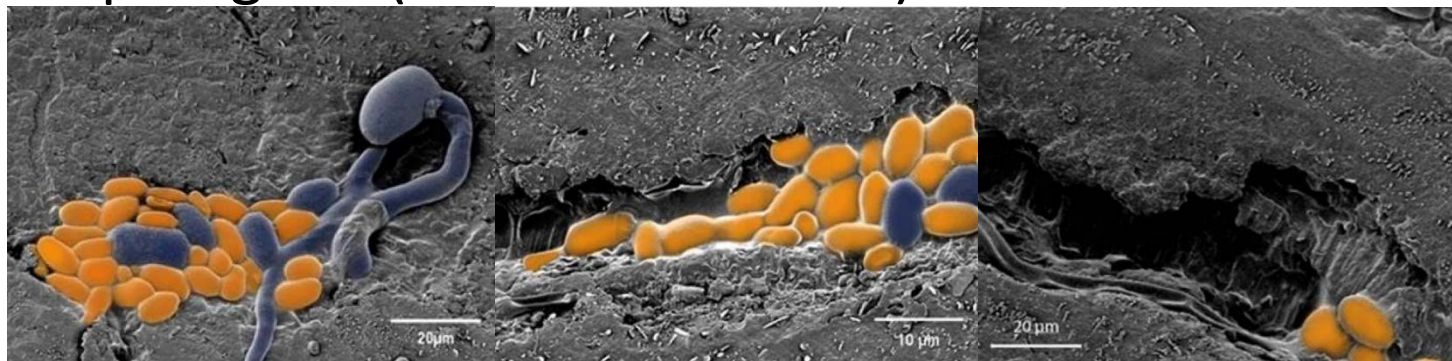
TF+R: SC1 applicato una settimana prima del patogeno con substrato;

R+T30d: SC1 applicato assieme a *R. necatrix*, 30 giorni prima del trapianto delle piantine.

Different letters within each panel: significant differences according to the Tukey's test at $\alpha=0.05$. Bars: standard error of the mean.

Competizione di spazio e nutrienti

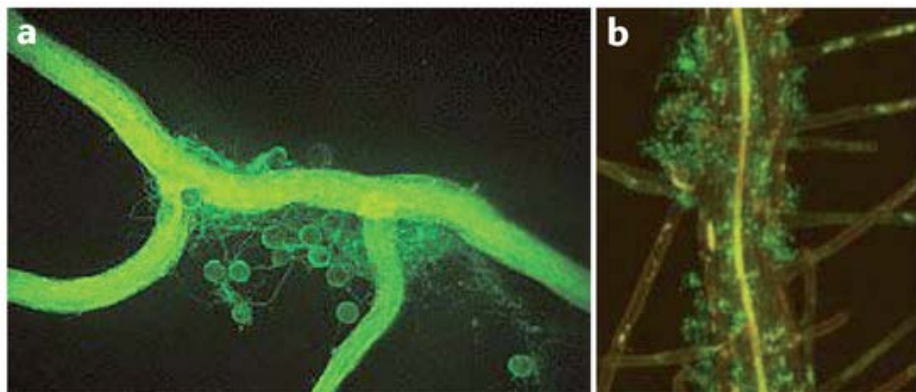
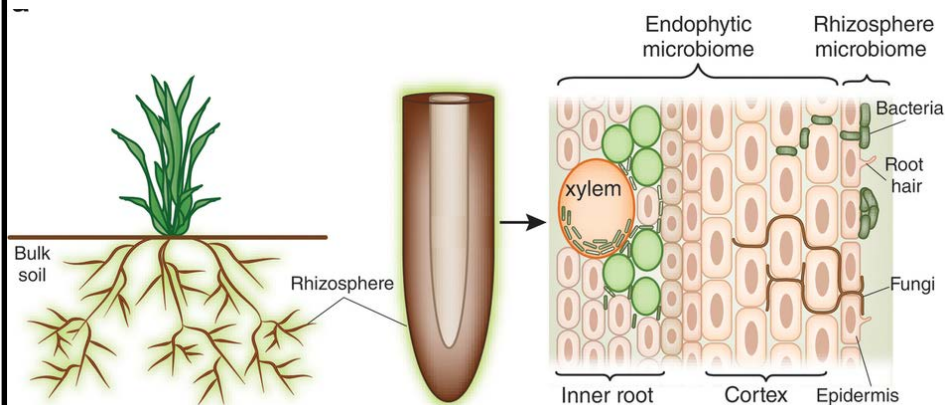
- Si basa sul fatto che **ferite e zone d'ingresso** del patogeno sono **colonizzate** dal microorganismo antagonista, che può anche produrre enzimi litici e tossine nel punto di colonizzazione
- Sul **consumo di sostanze necessarie** alla germinazione/crescita del patogeno (esempio *B. cinerea* ha bisogno di zucchero per germinare)
- Sull'**occupazione di spazio/nutrienti** che sarebbero usati dal patogeno (riduzione inoculo)



Aureobasidium pullulans contro *Botrytis cinerea* in microferita su buccia (www.bio-ferm.com)

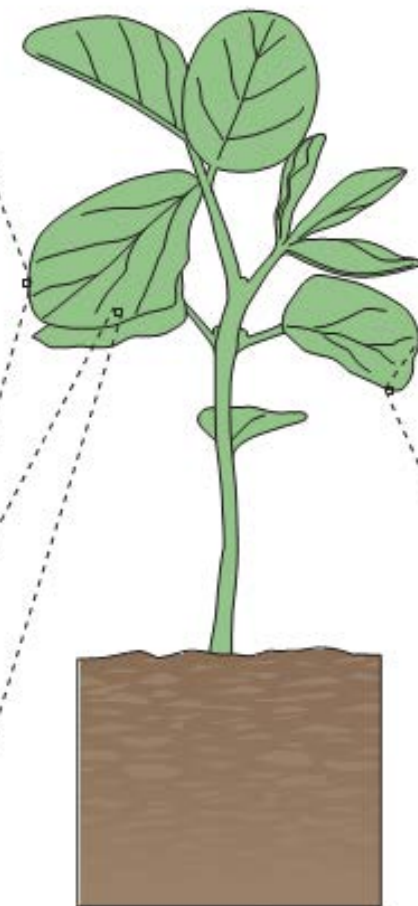
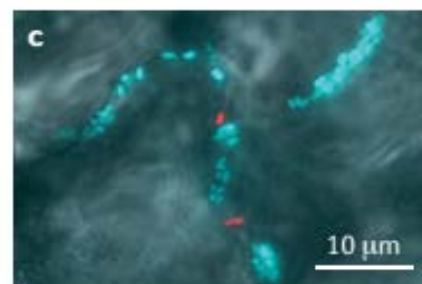
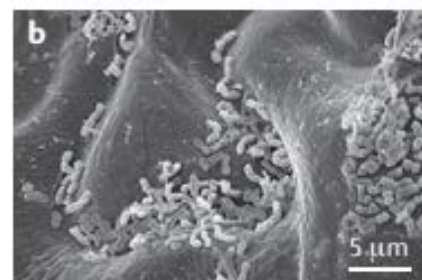
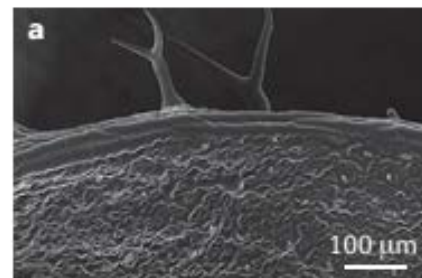
L'effetto 'barriera biologica'

Radici



Philippot 2013 Nat Rev Microbiol. 11:789-899t L1,

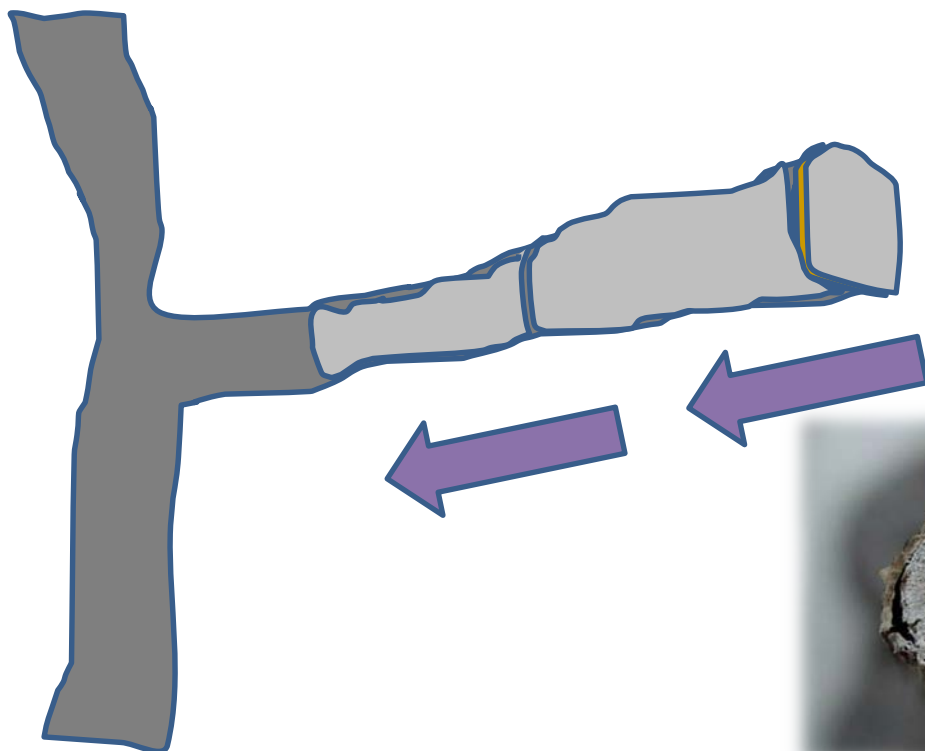
Foglia



Vorholt *et al.* 2012 Nat. Rev. Microbiol. 10:828-840

Trichoderma spp. come prevenzione delle malattie del legno

- Applicazione: trattamento con *Trichoderma* spp. sulle ferite
- Applicare sulle ferite quando il rischio infezione è elevato prima che la malattia compaia



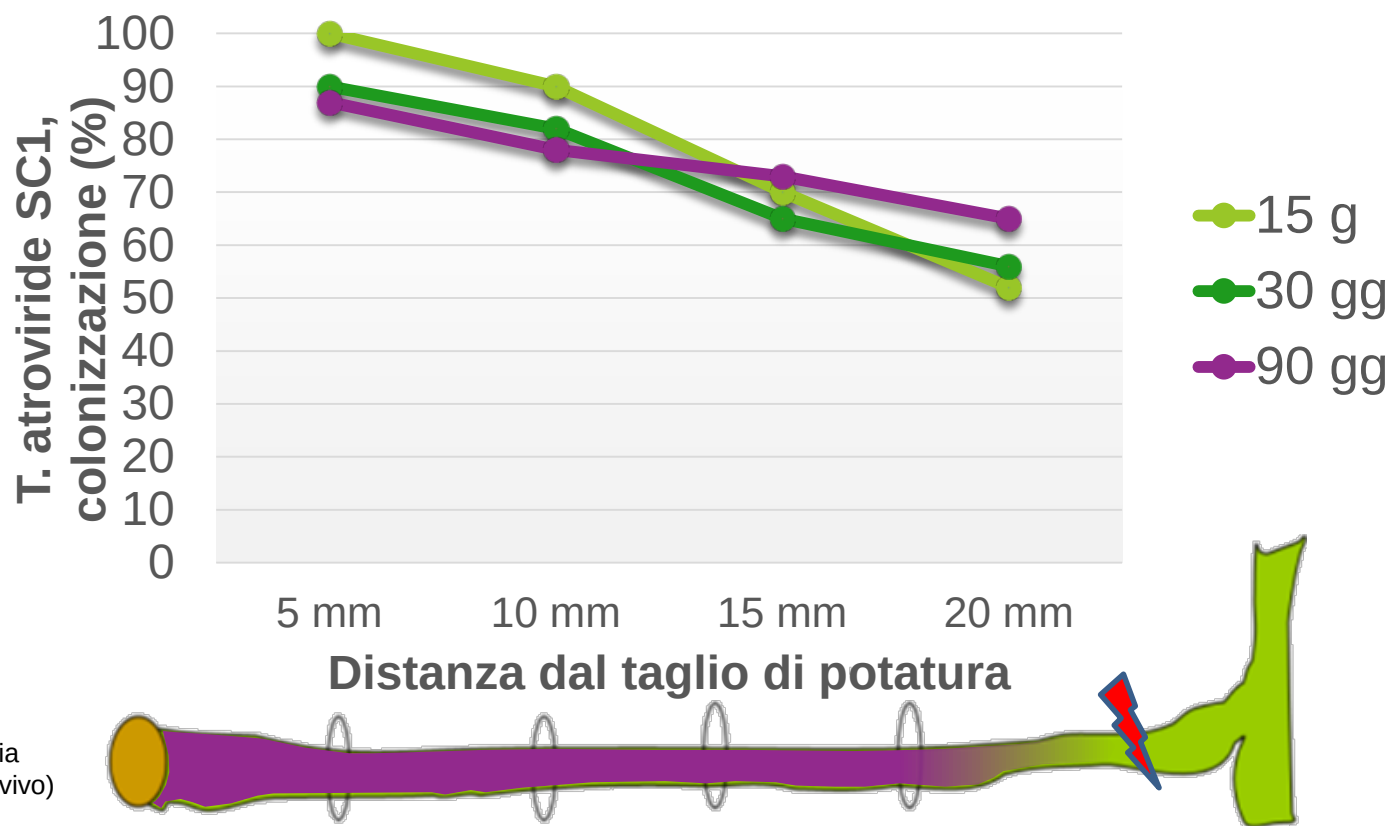
Treated



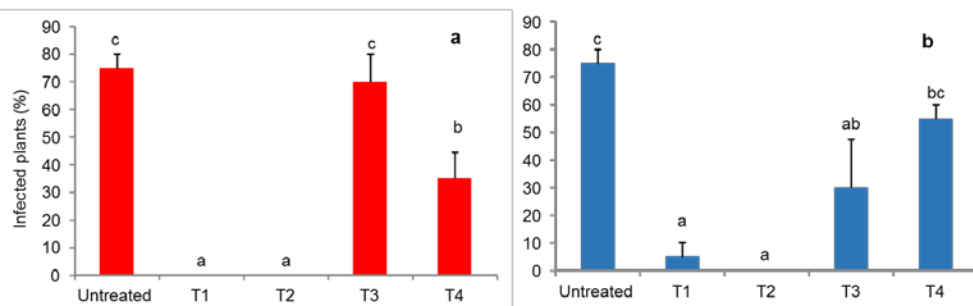
Untreated

Importanza della colonizzazione

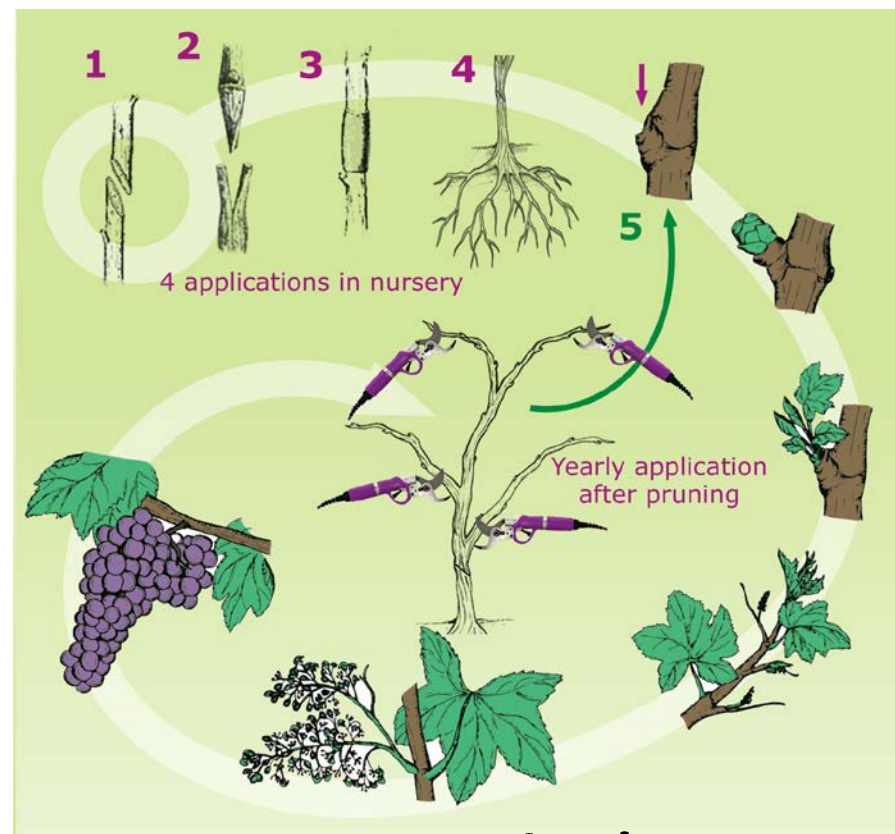
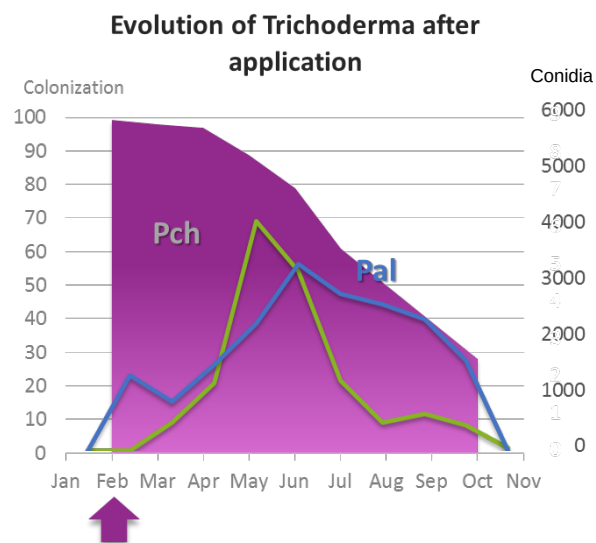
- Rapidità di colonizzazione
- Persistenza per l'intera stagione
- Legata al ceppo (colonizzazione % e produzione enzimi)



Protezione dell'intero ciclo della coltura



T1, T2 idratazione materiale pre-innesto
T3 post-innesto, forzatura
T4 radicazione



In vigneto



Vantaggi nell'uso

- Biodegradabili, rinnovabili, no bioaccumulo
- Non lasciano residui chimici
- Possono essere applicati vicino alla raccolta
- Meccanismo complesso: può essere inserito nelle strategie anti-resistenza
- Valido strumento nell'agricoltura biologica e nell'IPM
- In alcuni casi sono più efficaci del chimico
- Vantaggi per l'operatore (non è tossico)
- Non danno fitotossicità
- Non interferiscono con la fermentazione



Limiti nell'uso

- Sono soggetti alle condizioni ambientali
- Non sono miscibili con altri fungicidi (con eccezioni, es. *Bacillus* spp. è miscibile con fungicidi escluso il rame)
- Non si può conservare la sospensione per lungo tempo
- La botte dell'atomizzatore va risciacquata con cura prima dell'uso
- Il prodotto va (spesso) conservato preferibilmente al freddo ed ha scadenza (limiti logistici)
- Iperparassiti: preferibili per riduzione dell'inoculo
- (Eccetto iperparassiti) inefficaci se infezioni già in atto, lavora meglio da invaiatura in poi
- Se non usato, il prodotto va richiuso con attenzione possibilmente ermeticamente (teme l'umidità)

Prospettive e bioagrofarmaci di nuova generazione

- Nuovi specie più **persistenti e stabili** (isolamenti mirati e procedure nuove di isolamento)
- **Formulazioni** che ne garantiscano la persistenza
- Utilizzo del solo **metabolita attivo** (produzione in fermentatori)
- Utilizzo di **endofiti** e metodi di inoculo di endofiti protettivi
- Utilizzo di **sostanze nutritive** che modificano la naturale microflora verso i ceppi antagonisti dei patogeni (**nutrire il nemico del nemico**)



Grazie per l'attenzione!

