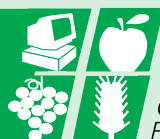


# Notiziario tecnico



## COLPO DI FUOCO BATTERICO (*Erwinia amylovora*)

RISULTATI DELLA RICERCA IN EMILIA-ROMAGNA



**CRPV**

soc. coop. a r.l.

CENTRO RICERCHE  
PRODUZIONE VEGETALI

# BASE SOCIALE CRPV

## Soci Produttori

A.B.I. (Associazione Bieticoltori Italiani) - Ferrara  
A.F.E. (Associazione Frutticoltori Estense) - Ferrara  
AGRIBOLOGNA - Bologna  
A.N.B. (Associazione Nazionale Bieticoltori) - Bologna  
APO SCALIGERA - S. Maria di Zevio (Vr)  
A.P.S.O.C.E.R. (Associazione Produttori Semi Oleosi Cereali dell'Emilia-Romagna) - Bologna  
A.Pro.S. (Associazione Produttori Sementi) - Ravenna  
A.P.P.E. (Associazione Produttori Patate dell'Emilia-Romagna) - Bologna  
A.R.P.O. (Associazione Regionale Produttori Olivicoli) - Rimini  
A.R.S. (Associazione Romagnola Sementi) - Forlì  
A.S.I.P.O. (Associazione Interprovinciale Produttori Ortofrutticoli) - Parma  
ASSO.CER. (Associazione Interprovinciale Produttori di Cereali) - Bologna  
ASSO.PA. (Associazione Interprovinciale tra Produttori di Patate) - Bologna  
ASSO.VIT. (Associazione Interprovinciale Produttori Vitivinicoli) - Faenza (Ra)  
ASSO.VI.P.P. (Associazione Viticoltori Piacentini e Parmensi) - Piacenza  
A.V.E.O. (Associazione Vitivinicoltori Emilia Occidentale) - Modena  
APO CONERPO (Gruppo Cooperativo Ortofrutta) - Bologna  
APOFRUIT (Associazione Produttori Ortofrutticoli) - Cesena (Fc)  
C.A.C. (Cooperativa Agricola Cesenate) - Cesena (Fc)  
C.I.C.O. (Consorzio Italiano Cooperative Ortofrutticole) - Ferrara  
C.I.O. (Consorzio Interregionale Ortofrutticoli) - Parma  
C.N.B. (Consorzio Nazionale Bieticoltori) - Bologna  
C.O.R.E.R. (Gruppo Ortofrutticolo Regionale Emilia-Romagna) - Ravenna  
CO.PRO.B. (Cooperativa Produttori Bieticoli) - Minerbio (Bo)  
CO.NA.SE. (Consorzio Nazionale Sementi) - Conselice  
GRANFRUTTA ZANI - Ravenna  
GRUPPO CEVICO (Centro Vinicolo Cooperativo Romagnolo) - Lugo (Ra)  
OROGROUP ITALIA - Cesena (Fc)  
PROBER (Associazione Produttori Biologici e Biodinamici dell'Emilia-Romagna) - Bologna  
SOLEMILIA MODENA - Vignola (Mo)

## Soci non Produttori

A.F.E.R.O. (Associazione Produttori Florovivaisti Emiliano-Romagnolo) - Bologna  
AGRI 2000 - Bologna  
AGRIFUTURO - Forlì  
AGRI.LAB TRADE - Cesena (Fc)  
AGRIOK - Bologna  
AGRONOMICA - Ravenna  
ASS.C.A.E.R. (Associazione Consorzi Agrari Emilia-Romagna) - Bologna  
AZIENDA AGRARIA SPERIMENTALE M. MARANI Ravenna  
AZIENDA AGRARIA SPERIMENTALE STUARD Parma  
AZIENDA SPERIMENTALE VITTORIO TADINI - Gariga di Podenzano (Pc)  
BIOPLANET - Cesena (Fc)  
CANTINE COOPERATIVE RIUNITE - Reggio Emilia  
C.A.V. - Faenza (Ra)  
C.E.R. (Consorzio di bonifica di secondo grado per il Canale Emiliano Romagnolo) - Bologna  
CENTRALE SPERIMENTAZIONI E SERVIZI AGROAMBIENTALI - Cesena (Fc)  
CENTRO DIVULGAZIONE AGRICOLA - Bologna  
CIFO - Bologna  
CISA MARIO NERI - Imola (Bo)  
CONFAGRICOLTURA EMILIA-ROMAGNA - Bologna  
CONFEDERAZIONE ITALIANA AGRICOLTORI - Bologna  
CONSORZIO AGRARIO RAVENNA  
CONSORZIO AGRARIO INTERPROVINCIALE BOLOGNA-MODENA  
CONSORZIO AGRARIO INTERPROVINCIALE FORLÌ-CESENA E RIMINI  
CONSORZIO PER LA TUTELA DEI VINI "REGGIANO" E "COLLI DI SCANDIANO E DI CANOSSA" - Reggio Emilia  
COPAGRI REGIONALE - Sede Emilia-Romagna  
I.R.F.A.T.A. (Istituto Regionale di Formazione e Assistenza Tecnica Agricola) - Bologna  
I.TER. - Bologna  
PROMOSAGRI - Ravenna  
S.I.S. (Società Italiana Sementi) - San Lazzaro (Bo)  
TERREMERSE - Ravenna  
TERRENALDI - Faenza (Ra)

## Amministrazioni Provinciali

Ferrara - Forlì • Cesena - Modena - Piacenza - Ravenna - Rimini - Parma

## Prefazione

Gentili lettori,

con questo numero si apre la programmazione 2003 del "Notiziario tecnico" edito dal Crpv. Vi ringraziamo per l'attenzione dimostrata, che ci stimola a fare sempre più del nostro meglio per fornirVi informazioni puntuali sulle più recenti acquisizioni della ricerca e della sperimentazione.

Per questo siamo a presentarVi il piano editoriale per il 2003:

- n. 66 - Colpo di fuoco batterico: risultati della ricerca in Emilia-Romagna
- n. 67 - Una ricognizione bibliografica sul biologico

Le singole copie della rivista saranno in vendita presso il Crpv (sede di Cesena), o nell'ambito di iniziative organizzate dallo stesso Crpv, al **prezzo di copertina di € 10,00 (+ € 4,00 per spese di spedizione postale)**, mentre l'abbonamento avrà i seguenti costi:

- **abbonamento in Emilia-Romagna: € 10,00;**
- **abbonamento fuori Regione: € 30,00;**
- **abbonamento gratuito per i soggetti espressione della base sociale del Crpv e per i funzionari di servizi regionali.**

I pagamenti possono essere eseguiti utilizzando un bollettino di conto corrente postale (n. 10394476), specificando in modo chiaro l'indirizzo presso cui si desidera ricevere la corrispondenza e la causale del versamento.

Le **copie arretrate** della rivista potranno essere richieste al prezzo di **€ 10,00 (+ € 4,00 per spese di spedizione postale)**.

Il Notiziario Tecnico è inoltre consultabile al sito **[www.crpv.it/](http://www.crpv.it/)**

**Autori:**

*M. Alexandrova, C. Andreotti, V. Babini, E. Baldi, F. Baroni, C. Bazzi, M. Bergamaschi, G. Bertazza, E. Biondi, A. Brunelli, A. Calzolari, E. Carpana, G. Celli, P. Ceroni, G. Costa, F. Finelli, E. Gatti, S. Ghini, P. Gianati, S. Girotti, M. Govoni, A. Lucchi, D. Malaguti, B. Marangoni, U. Mazzucchi, P. Minardi, M. Morbio, S. Mucini, M. Musiani, I. Ponti, C. Porrini, S. Predieri, P. Pupillo, F. Ramilli, F. Rapparini, L. Rivalta, L. Rotino, A.G. Sabatini, E. Sabatini, S. Sirri, G. Sorrenti, F. Sparla, F. Spinelli, G. Sponza, M. Toselli, F. Traversa, P. Trost, M. C. Valgimigli*

**Comitato di redazione:**

*F. Pasini, F. Marini, D. Missere, A. Crociani*

---

*Pubblicazione realizzata con il contributo della Regione Emilia-Romagna ai sensi della L.R. 28/98 e successive modifiche*

## Presentazione

**Giacomo Agarossi**

Presidente del Centro Ricerche Produzioni Vegetali - Cesena

In questo numero del "Notiziario Tecnico" sono contenuti i risultati finali delle ricerche che la Regione Emilia-Romagna ha finanziato nell'ambito della LR 28/98, con il coordinamento e il cofinanziamento del Crpv, per fare fronte alla grave situazione venutasi a creare in seguito al recente diffondersi incontrollato del colpo di fuoco batterico nella nostra regione.

L'Emilia-Romagna si trova a dovere affrontare una vera e propria emergenza *Erwinia amylovora* esplosa in seguito alla grave epidemia verificatasi nella seconda metà del 1997 e che minacciava di compromettere seriamente il futuro della pericoltura regionale. I danni che il colpo di fuoco batterico può provocare sono, infatti, ingentissimi; l'abbandono d'interesse a frutteto negli USA e il notevole ridimensionamento della pericoltura francese sono le prove più indicative dell'estrema pericolosità di questa malattia.

Avviate nel 1998 e protrattesi nell'arco di un quinquennio, le ricerche s'inquadrano nell'ambito dei seguenti obiettivi generali:

- approfondire le conoscenze sui meccanismi di sopravvivenza, disseminazione ed evoluzione di *Erwinia amylovora* in ecosistemi dell'Emilia-Romagna, al fine di acquisire nuovi elementi epidemiologici utili per il contenimento della malattia;

- affrontare scenari prossimi di convivenza forzata con il colpo di fuoco batterico, sia mettendo a punto nuovi strumenti di lotta integrata (chimica, biologica e agronomica) per un maggiore controllo della malattia, sia ricercando nuove varietà resistenti ad *Erwinia amylovora* in relazione a una possibile programmazione del panorama varietale regionale in funzione di una maggiore tolleranza al batterio;

- verificare il ruolo delle api nella diffusione di *Erwinia amylovora* e nel contempo mettere a punto un sistema di monitoraggio sistematico basato sull'impiego di questo insetto, con il duplice scopo di individuare precocemente possibili nuovi focolai della malattia e acquisire nuovi dati in merito alla diffusione del patogeno.

L'espletamento dei lavori e la pubblicazione di questo volume

non rappresentano peraltro un fatto isolato, ma s'inseriscono nell'ambito di una strategia d'interventi messi in atto dall'Amministrazione Regionale per il controllo fitosanitario del territorio e per il contenimento della batteriosi; interventi rivelatisi finora complessivamente validi, considerata la sostanziale tenuta della pericoltura emiliano-romagnola e l'attuale tendenza al reimpianto di pere e mele.

Scorrendo le pagine di questo volume, arricchito di brevi *abstract* in lingua inglese, il lettore si renderà conto delle forze, sia in termini finanziari, sia in termini di ricercatori coinvolti, che la Regione Emilia-Romagna e il Crpv hanno messo in campo per cercare di aggredire questo grave problema.

Le conoscenze acquisite nell'ambito di questi cinque anni hanno senz'altro contribuito a migliorare il controllo del colpo di fuoco batterico nella nostra regione e si traducono innanzitutto in un contenimento del danno economico per le aziende che coltivano melo e pero e per quelle vivaistiche che producono e commercializzano il materiale di propagazione per i nuovi impianti.

## LA FRUTTICOLTURA IN EMILIA-ROMAGNA DOPO IL COLPO DI FUOCO BATTERICO

**I. Ponti, A. Calzolari, F. Finelli**

Servizio Fitosanitario, Regione Emilia-Romagna

### La situazione

La storia del colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*) nella Regione Emilia-Romagna è cominciata nel 1994 con l'individuazione dei primi focolai nella provincia di Bologna. Le due gravi epidemie registrate negli anni 1997 e 1998 sono state caratterizzate dalla comparsa della malattia principalmente su pero nelle province di Bologna, Ferrara e Modena, tradizionalmente vocate a questa coltura. Nelle province di Reggio Emilia e Ravenna, interessate solo marginalmente in quegli anni, più recentemente è stato segnalato

un aumento di focolai della batteriosi su pero e biancospino. Nel 1999 sono stati segnalati alcuni primi focolai nelle province di Piacenza e di Forlì-Cesena. Al momento attuale in provincia di Piacenza i focolai sono eradicati e nessun caso nuovo è stato accertato successivamente, mentre nella provincia di Forlì-Cesena vengono segnalati ancora pochi casi sporadici. Nella regione la malattia a tutt'oggi non è mai stata accertata nelle province di Parma e Rimini. Per quanto riguarda piante ospiti di *E. amylovora* diverse dal pero, mentre il melo generalmente è stato colpito in un numero assai limitato

di casi, il biancospino (*Crataegus*) è risultato, negli anni, una pianta colpita dalla batteriosi in un numero crescente di casi.

Complessivamente, l'entità degli abbattimenti di piante di pero affette da colpo di fuoco batterico si è stabilizzata su valori di gran lunga inferiori rispetto ai valori associati alle gravi epidemie registrate nel 1997 e 1998. Nella *tabella 1* sono riportati i casi di colpo di fuoco batterico accertati ufficialmente dal 1994 al 2002, distinti per le specie colpite nella nostra regione. È opportuno sottolineare che le linee tecniche di profilassi e terapia, messe a punto nel 1997,

**Tabella 1** - Le piante ospiti di *E. amylovora* oggetto di controllo: la situazione nella Regione Emilia-Romagna dal 1994 al 2002

Pianta colpita	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	
	n. casi	n. casi	n. casi	%	%	%	%	%	n. casi	%
<b>Pero</b>	2	7	25	94,6	93,8	79,1	84,8	83,8	<b>895</b>	66,2
<b>Biancospino</b>	3	-	7	3,3	3,9	17,4	10,6	10,5	<b>405</b>	30,0
<b>Melo</b>	-	-	-	0,7	0,4	0,7	2,8	3,8	<b>27</b>	2,0
<b>Nespolo</b>	-	-	-	0,4	0,3	0,6	0,7	0,7	<b>6</b>	0,4
<b>Cotogno</b>	-	-	-	0,3	0,4	0,7	0,4	0,4	<b>6</b>	0,4
<b>Azzeruolo</b>	-	-	-	-	0,1	0,3	0,3	0,4	<b>8</b>	0,6
<b>Agazzino</b>	1	-	-	0,1	0,7	0,7	0,2	0,1	<b>1</b>	0,1
<b>Sorbo</b>	1	-	-	-	-	0,2	0,2	0,1	<b>1</b>	0,1
<b>Cotoneaster</b>	-	-	-	0,4	0,2	0,3	-	-	<b>2</b>	0,1
<b>Nashi</b>	-	-	-	0,1	0,1	0,1	-	0,1	<b>0</b>	0,0
<b>Photinia (Stranvaesia)</b>	-	-	-	0,1	-	-	0,1	0,1	<b>0</b>	0,0

periodicamente aggiornate e divulgate attraverso i bollettini provinciali di assistenza alle coltivazioni, sono state seguite e sembrano avere prodotto un contenimento efficace del danno. In particolare, gli interventi attuati nelle aziende agricole hanno ottenuto un buon controllo della batteriosi, sia nelle aree con storia di malattia che nelle zone nuove individuate nel corso degli anni. Tali risultati si sono rivelati incoraggianti e sono confermati da una sensibile ripresa nella costituzione di nuovi impianti di pero e di melo.

In generale, nei frutteti dell'Emilia-Romagna il periodo primaverile-estivo è caratterizzato da una buona situazione fitosanitaria: pochi focolai attivi, infezioni contenute, limitate estirpazioni di piante. Le alte temperature, le piogge consistenti e le seconde fioriture che si registrano nei mesi di settembre ed ottobre invece determinano talora la comparsa della malattia in impianti frutticoli fino a quella data esenti ed una recrudescenza in aziende già interessate dal colpo di fuoco batterico; le grandinate inoltre possono costituire un rischio di gravi danni talvolta rilevabili non immediatamente ma l'anno successivo. È pertanto ancora evidente la pericolosità di *E. amylovora* e la necessità di mantenere costantemente sotto controllo le piante ospiti del patogeno allo scopo di individuare precocemente i sintomi della malattia ed eliminare tempestivamente le parti di pianta o, se necessario, l'intera pianta colpi-

ta dalla malattia.

### Le normative fitosanitarie

Dal 2001 tutta l'attività di controllo del territorio ed in particolare della produzione vivaistica sono state svolte in adeguamento della perdita della condizione di "zona protetta" nelle province di Bologna, Ferrara, Modena, Ravenna e Reggio Emilia come stabilito con D. M. 4 agosto 2001. Tale condizione è stata confermata fino al 31 marzo 2003 dalla Direttiva 2002/29/CE del 19 marzo 2002, con la quale è stata stabilita anche la perdita della condizione di zona protetta per parte del territorio della Regione del Veneto. La nostra Regione, come anche la Regione del Veneto, all'interno delle zone contaminate ha istituito "zone tampone" ove effettuare controlli più rigorosi allo scopo di garantire la sanità del materiale di propagazione ivi prodotto e la sua commercializzazione con passaporto ZP. Le modalità di controllo delle zone tampone sono quelle stabilite dalla Direttiva 2000/29/CE. Fatta eccezione per parte del territorio di queste due regioni, il territorio italiano è ancora "zona protetta". La rete ufficiale di monitoraggio, istituita nel 1992, è attualmente ancora attiva nelle province di Forlì-Cesena, Parma, Piacenza e Rimini, ancora oggi riconosciute "zona protetta". I monitoraggi straordinari, realizzati nelle province di Bologna, Ferrara, Modena, Ravenna e Reggio Emilia, iniziati negli anni 1995-1996,

hanno assunto una dimensione più ampia negli anni successivi, con il coinvolgimento di rilevatori addestrati *ad hoc*, che hanno effettuato annualmente ispezioni nelle aree del territorio regionale a rischio di colpo di fuoco batterico per la presenza di piante ospiti di *E. amylovora*. I rilevatori hanno spesso anche affiancato nel controllo del territorio gli Ispettori fitosanitari, prevalentemente impegnati nelle visite presso le aziende vivaistiche.

L'Amministrazione regionale nel corso del 2001 ha adottato una serie di provvedimenti per cercare di rallentare la diffusione della malattia e diminuirne l'impatto negativo, in particolare per il settore vivaistico. Con la L. R. 21 agosto 2001, n. 31 "Misure di prevenzione della diffusione di organismi nocivi di rilevante importanza fitosanitaria" la Regione si è dotata di uno strumento attraverso il quale la sua struttura tecnica competente in materia fitosanitaria (il Servizio Fitosanitario regionale) può istituire "zone fitosanitarie tutelate" a salvaguardia della produzione vivaistica regionale o adottare divieti temporanei di mettere a dimora di piante appartenenti a specie che possono favorire la diffusione di organismi nocivi di rilevante importanza fitosanitaria. In applicazione di tale legge è stato adottato un provvedimento che vieta, fino al 31 dicembre 2004, la messa a dimora su tutto il territorio regionale di piante appartenenti al genere *Crataegus* (*C. monogyna*, *C. oxyacantha*, *C. azarolus* ed al-

tri *Crataegus* ornamentali) con il quale si è voluto, anche se temporaneamente, limitare la diffusione di piante che, almeno nel nostro ambiente, si sono dimostrate particolarmente sensibili alla malattia ma difficilmente controllabili una volta messe a frutto mantenute sotto il controllo attento dell'agricoltore.

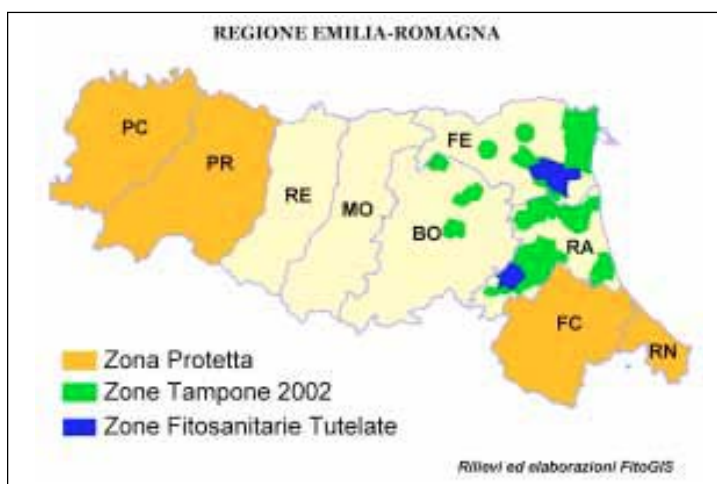
Inoltre, in applicazione della medesima L. R. 31/2001, sono state istituite una "zona fitosanitaria tutelata" nel territorio della Provincia di Ravenna, che interessa parte del territorio dei comuni di Brisighella, Castel Bolognese, Faenza e Riolo Terme ed una "zona fitosanitaria tutelata" nel territorio della Provincia di Ferrara, che interessa parte del territorio dei comuni di Argenta, Comacchio, Ostellato e Portomaggiore. Tali provvedimenti sono stati adottati con l'intento di salvaguardare l'attività vivaistica, estremamente importante per l'economia agricola della Regione. Per la zona istituita in provincia di Ravenna la tutela è estesa anche al virus della vaiolatura delle drupacee (Sharka). In particolare, in Provincia di Ravenna, più precisamente a Tebano, in Comune di Faenza, ha sede il Centro Attività Vivaistiche (C. A. V.), una struttura consortile dei vivaisti che svolge un'attività basilare nell'ambito del sistema di certificazione volontaria delle piante da frutto vigente in Emilia-Romagna. In Provincia di Ferrara è stata individuata una zona, la Valle di Mezzano-Pega, praticamente

priva di piante ospiti di *E. amylovora* e particolarmente vocata per l'attività vivaistica. In tali zone fitosanitarie tutelate è vietato, senza la preventiva autorizzazione del Servizio fitosanitario regionale, mettere a dimora piante ospiti di *E. amylovora*.

### La gestione del colpo di fuoco batterico

Lo scoppio epidemico di colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*) registrato in Emilia-Romagna nel 1997 ha stimolato la ricerca di uno strumento per la gestione dell'emergenza fitosanitaria, capace di raccogliere dati e rapidamente elaborarli. È stato scelto FitoGIS, strumento informativo che si è rivelato valido sia nell'immediato che nella pianificazione del futuro. Pertanto l'organizzazione dei monitoraggi del territorio, la registrazione in tempo reale dei dati relativi ai controlli effettuati e l'appli-

cazione tempestiva delle normative fitosanitarie sono state, e lo sono tuttora, attività "guidate" da FitoGIS. La mappatura dei punti ispezionati e dei focolai della batteriosi ufficialmente accertati ha consentito la delimitazione delle aree contaminate da *E. amylovora*, necessaria principalmente al fine di garantire la sanità del materiale vivaistico. Quindi, l'istituzione delle "zone di sicurezza" così come previsto dal D. M. 356/1999 (misure di lotta obbligatoria contro il colpo di fuoco batterico) nei territori ancora "zona protetta" nonché delle "zone tampone" nelle aree che hanno perso tale condizione e, più recentemente, l'istituzione di "zone fitosanitarie tutelate" sono state agevolate da FitoGIS, con cui sono stati adeguatamente elaborati i dati storici relativi alla diffusione della batteriosi nella regione (fig. 1). L'aggiornamento in tempo reale della situazione di diffusione della



**Figura 1** - Il territorio della Regione Emilia-Romagna suddiviso in "zona protetta", "zone tampone" e "zone fitosanitarie tutelate" per *E. amylovora*



malattia consente di intensificare i controlli nelle aree ritenute più a rischio per densità di coltivazioni frutticole, vivai, piante spontanee ed ornamentali, con particolare attenzione ai generi *Pyrus*, *Malus* e *Crataegus*. I provvedimenti che vengono adottati in applicazione del citato D. M. n. 356/1999 nel corso della stagione vegetativa riguardano inoltre l'abbattimento e la distruzione col fuoco delle piante ammalate e, per quanto riguarda i vivai in particolare, la sospensione dell'autorizzazione all'emissione del passaporto ZP. Infine, limitatamente al periodo della fioritura delle principali piante ospiti di *E. amylovora*, viene prescritto il divieto di trasferimento degli alveari dalle aree contaminate dal patogeno verso aree che ne sono ufficialmente esenti.

Le elaborazioni possibili, ed in parte già effettuate, di diversi dati territoriali consentiranno di approfondire le conoscenze epidemiologiche sul colpo di fuoco batterico per meglio impostare la lotta a questa malattia, per la quale non sono state ancora individuate strategie di lotta risolutive.

### Gli aiuti alle aziende colpite

Gli oltre 11 miliardi di lire (5 milioni e mezzo di euro) assegnati, in applicazione delle leggi 206/97 e 307/99, dallo Stato alla Regione Emilia-Romagna sono stati sufficienti a soddisfare non interamente le graduatorie approvate delle aziende agricole per l'estirpazione ed il reimpianto di alberi colpiti da *E. amylovora* effettuati negli anni 1997 e 1998; sarebbe necessario un ulteriore rifinanziamento di almeno 1 milione di euro.

Con la L. R. 35/99, la Regione Emilia-Romagna ha previsto la concessione di un proprio contributo finanziario alle aziende colpite dalla batteriosi che hanno aderito, volontariamente, a fondi di solidarietà istituiti a livello provinciale e si sono impegnate ad attuare tutte le misure di prevenzione dettate dal Servizio Fitosanitario regionale. Tale contributo è stato concesso agli Enti gestori di tali fondi operanti presso le province di Ferrara, Modena e Reggio Emilia, per un importo di circa 1 miliardo e trecento milioni di lire (quasi settecentomila euro) per l'attività svol-

ta nel 2000, e per un importo di quasi ottocentomila euro per l'attività svolta nel 2001. Un analogo intervento è previsto anche per l'attività realizzata nel 2002.

### Considerazioni finali

Nei quasi duecento anni di conoscenza di *E. amylovora*, nel mondo scientifico e nelle realtà produttive sono state acquisite conoscenze che hanno contribuito complessivamente al miglioramento del controllo del colpo di fuoco batterico. In considerazione della storia recente di questa malattia nella regione Emilia-Romagna, è prematuro tentare di fare un bilancio dell'attività svolta per il suo controllo. Tuttavia si può affermare che le strategie messe in atto per il controllo fitosanitario del territorio e per il contenimento della batteriosi si sono rivelate in generale fino ad oggi valide. Inoltre, per quanto riguarda il settore vivaistico, in seguito all'evoluzione della situazione fitosanitaria sono state introdotte nuove e diverse modalità di controllo del territorio che possono continuare a garantire la sanità del materiale di propagazione prodotto nella regione.

## ABSTRACT

### The fruit growing in the Emilia-Romagna region after the occurrence of fire blight

Fire blight caused by *Erwinia amylovora* was first detected in the Emilia-Romagna region in 1994 and in the years 1997 and 1998 severe epidemics were recorded in the typical fruit growing areas. Currently, after the above mentioned peaks, the attained steady situation of the disease may express the effectiveness of the control measures adopted in order to obtain the eradication first and to contain the disease then. Pear trees were the most affected plants and several foci were found on hawthorn as well; apple and ornamental wild and grown plants of other susceptible species were rarely infected. As regards the nursery sector, following the spreading of fire blight, in order to guarantee the healthy status of the propagation material produced in the region new and different inspection programs of the territory were implemented.



# INNOVAZIONE VARIETALE

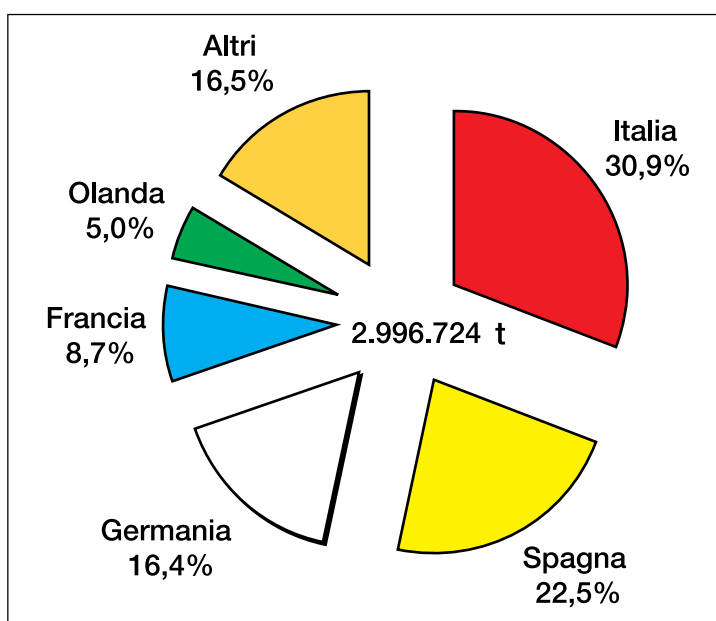
## MIGLIORAMENTO GENETICO DEL PERO PER LA RESISTENZA AD *ERWINIA AMYLOVORA*

**L. Rivalta, M. Bergamaschi, S. Sirri**

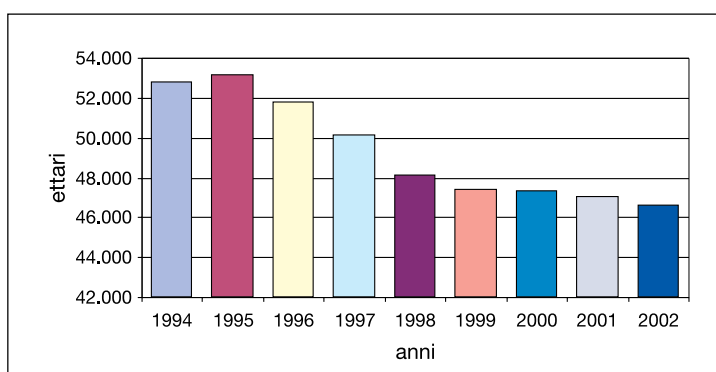
Istituto Sperimentale per la Frutticoltura – Sezione di Forlì

### Lo stato della pericoltura

L'Italia produce annualmente circa 900.000 tonnellate di pere toccando in annate favorevoli le 1.100.000 t. Queste produzioni la pongono al secondo posto fra i produttori mondiali di pere, dopo la Cina (la cui produzione è però costituita in gran parte di pere asiatiche (Nashi)) e prima degli Stati Uniti (t 880.000) e al primo posto in ambito UE con circa il 31% del totale, davanti a Spagna (22,5%), Germania (16,4%) e Francia (8,7%, *fig. 1*). Nel 2002 la superficie coltivata a pero in Italia è stata di 46.600 ettari, quasi il 12% in meno rispetto al 1994 (*fig. 2*), anno in cui si manifestò per la prima volta in forma epidemica il "colpo di fuoco batterico". Conference è la varietà più diffusa nell'UE partecipando al 24% della produzione, ed è coltivata prevalentemente in Italia e Francia; è seguita da William con una produzione che si mantiene stabile (11,9%), da Abate Fetel (9,9%), molto diffusa in Italia dove rappresenta il 27,6% della produzione totale. Blanquilla, che rappresenta circa 10% della produzione comunitaria, è coltivata prevalentemente in



**Figura 1** - Produzione UE di pere (media 2000-2002) suddivisa per Paese



**Figura 2** - Evoluzione della coltura del pero in Italia dal 1994 al 2002

**Tabella 1** - Le principali varietà diffuse in UE, Italia ed Emilia Romagna. Valori percentuali riferiti alle produzioni medie del triennio 2000-2002, a confronto con quelle del triennio precedente

Varietà	UE		Italia		Emilia-Romagna	
	2000-'02	1997-'99	2000-'02	1997-'99	2000-'02	1997-'99
Conference	24,0	22,1	16,3	16,6	17,2	13,6
William	11,9	12,0	20,8	18,8	24,2	20,3
Blanquilla	10,1	10,7	0	0	0	0
Abate Fetel	9,9	10,7	27,6	26,1	32,4	27,8
Guyot	5,3	6,0	0,6	0,9	0,6	0,9
Coscia	4,7	3,5	6,3	5,0	0,1	0,1
Decana del Comizio	4,5	6,4	6,9	9,0	8,2	15,2
Kaiser Alexander	2,2	3,1	6,2	7,7	6	5,9
Max Red Bartlett	1,3	1,5	3,5	3,7	4,1	4,2
Passa Crassana	1,3	2,6	2,3	3,5	2,5	2,6
Altre	24,8	21,4	9,5	8,7	4,7	9,4

Dati CSO-Ferrara rielaborati

**Tabella 2** - Generi di piante che includono specie sensibili al colpo di fuoco batterico

*Amelanchier, Aronia, Aruncus, Chaenomeles, Cotoneaster, Cowania, Crataegus, Crataegomespilus, Cydonia, Dichotomanthes, Docynia, Dryas, Eriobotrya, Exochorda, Fragaria, Geum, Heteromeles, Holodiscus, Kageneckia, Kerria, Malus, Mespilus, Osteomeles, Peraphyllum, Photinia, Physocarpus, Potentilla, Prunus, Pyracantha, Pyrus, Rhodotypos, Rhamphiolepis, Rosa, Rubus, Sorbaria, Sorbus, Spiraea, Stranvaesia*

Spagna (*tab. 1*).

Circa l'80% della produzione pericola italiana del 2002 è concentrato in due sole regioni settentrionali: Emilia-Romagna (550.000 t) e Veneto (108.000 t) (dati CSO-Ferrara). Altre regioni interessate a questa coltura sono, in ordine decrescente: Sicilia, Piemonte, Campania e Lombardia. Nelle aree settentrionali sono coltivate prevalentemente varietà autunno-invernali; mentre nelle regioni centro-meridionali sono diffuse varietà a maturazione precoce con un mercato generalmente più locale.

### La situazione in Emilia-Romagna

La produzione di pere in questa

regione è concentrata nelle aree di Ferrara, Modena, Bologna e Ravenna ed il panorama varietale è caratterizzato da uno scarso dinamismo in quanto ancora concentrato su 5 vecchie varietà: Abate Fetel (32%), William (24%), Conference (17%), Decana del Comizio (8%) e Kaiser (6%, *tab. 1*).

Da alcuni anni si è assistito ad una sostanziale stabilità produttiva, pur con una certa variabilità dovuta agli andamenti climatici e ad una lieve contrazione delle superfici. La superficie nel 2001 è stata infatti di circa 23.000 ettari, il 3,7% in meno rispetto il 1994.

La situazione varietale attuale lascia alcuni spazi ad una diversificazione merceologica del pro-

dotto, particolarmente nel periodo precoce (Sansavini, 1997), ma la vera novità per il futuro è rappresentata dalle varietà resistenti al colpo di fuoco batterico. È ragionevole ipotizzare una loro crescente importanza in considerazione del fatto che la malattia sta espandendosi sempre di più raggiungendo, anche le zone più marginali dell'area produttiva, sempre che si rendano competitive sul piano agronomico e pomologico.

### Colpo di fuoco batterico

Il colpo di fuoco batterico è la più grave malattia che colpisce il pero. L'agente causale è *Erwinia amylovora*, un organismo da quarantena secondo la

legislazione fitosanitaria europea, soggetto a lotta obbligatoria sul territorio italiano (DM 27 marzo 1996). I danni alla produzione possono essere così gravi da costituire un fattore limitante alla coltivazione del pero, tenuto conto della difficoltà di controllo per l'assenza di efficaci mezzi di lotta. Dove consentito, ad esempio in USA, Canada, Nuova Zelanda, Israele, vengono impiegati antibiotici, ma sono stati già individuati ceppi resistenti di *Erwinia*.

Altri elementi che contribuiscono a rendere difficile il successo degli interventi eradicanti sono rappresentati dall'elevato numero di specie vegetali ospiti, oltre 150, fra cui alcune molto diffuse nei frutteti e nei giardini, suddivise in almeno 37 generi (*tab. 2*), nonché dalla moltitudine di vettori (uomo, insetti, uccelli, correnti aeree, materiali di propagazione).

La prospettiva più concreta per il controllo di questa batteriosi è offerta dall'impiego di varietà resistenti o poco suscettibili, anche se le varietà attualmente disponibili, purtroppo, non presentano ancora elevate caratteristiche qualitative dei frutti, tanto che nessuna si è pienamente affermata.

### Sintomatologia

I sintomi possono comparire su tutte le parti aeree degli alberi e durante tutto il ciclo vegetativo, determinando avvizzimenti, disseccamenti e formazione di cancri rameali. Se il cancro interessa l'intera circonferenza di un

ramo è causa di totale disseccamento, come pure se interessa il tronco o il colletto causa spesso la morte dell'intero albero. È possibile anche che la malattia progredisca dal portinnesto, estendendosi a tutto il nastro.

L'infezione e la diffusione della malattia sono influenzate notevolmente da diversi fattori; oltre alla suscettibilità varietale, assumono una notevole importanza anche lo stadio fenologico (la massima suscettibilità si ha in concomitanza della fioritura, i germogli, inoltre risultano molto più suscettibili quando sono nella fase di crescita vegetativa), l'età della pianta, le condizioni climatiche, la suscettibilità del portinnesto. Esistono inoltre differenze del livello di resistenza fra i tessuti dei boccioli fiorali, dei germogli o dei rami.

### Diffusione

La prima segnalazione della presenza del fuoco batterico è avvenuta nello Stato di New York oltre 200 anni fa; ben presto la malattia si estese ad altri Stati americani, e successivamente all'Europa, alla Nuova Zelanda, al Medio Oriente, al Nord Africa.

In Europa, dopo la comparsa, avvenuta nel 1957, in Inghilterra (Kent), non sono state segnalate altre infezioni fino al 1966, allorché furono individuati casi in Olanda e in Polonia. Da allora la diffusione è stata progressiva, tanto che ha interessato l'intero territorio europeo, con le sole eccezioni di Portogallo e Finlandia.

In Italia, la prima segnalazione si è registrata in Puglia nel 1990, da allora si è assistito ad un costante sviluppo della malattia, inizialmente più lentamente per poi progredire molto rapidamente, in particolare nella Pianura Padana, dove le condizioni ambientali favoriscono sicuramente lo sviluppo del patogeno. In quest'area, in particolare nelle province di Ferrara, Bologna e Modena, la malattia ha conosciuto una vera e propria esplosione nel biennio 1997-1998 (Calzolari *et al.*, 1999).

### Attività di miglioramento genetico

Nel genere *Pyrus*, le specie *pyrifolia*, *calleriana* e *ussuriensis* trasmettono fattori di tolleranza a *Erwinia amylovora*, purtroppo unita a negative caratteristiche dei frutti (astringenza e granulosità della polpa, scarsa pezzatura) e degli alberi (tardiva entrata in fruttificazione). Nella specie *communis* non si conoscono fattori di resistenza totale alla malattia, e tutte le varietà, pur con un diverso grado, sono risultate suscettibili. Spesso però i risultati riportati in letteratura sono discordi in quanto le metodologie adottate per rilevare il livello di suscettibilità non sono omogenee e numerosi sono i fattori che condizionano lo sviluppo della malattia (Sansavini, 1999). L'ampia variabilità varietale nella manifestazione della suscettibilità, sembra indicare un controllo poligenico della resistenza, ad eccezione di quella del

*P. ussuriensis*, a controllo monogenico (Bellini, 1995).

Il miglioramento genetico del pero finalizzato alla resistenza a colpo di fuoco batterico si può fare risalire all'800, a seguito dell'introduzione di *P. pyrifolia* in Nord America. Le varietà Le Conte, Kieffer e Garber, ibridi interspecifici fra *P. communis* e *P. pyrifolia*, sebbene con frutti di qualità inferiore alle varietà europee, furono coltivate per la loro elevata resistenza (Bell *et al.*, 1966). I primi importanti programmi di miglioramento genetico finalizzati alla resistenza del pero a fuoco batterico sono iniziati negli anni '60 in USA e Canada, coinvolgendo numerose Istituzioni. Di seguito vengono descritti brevemente i principali programmi attualmente attivi nel mondo.

### **Nord America**

**Canada - Harrow Research Centre di Harrow (HWR), Ontario.** Il programma di Harrow è iniziato nel 1963 sotto la responsabilità di R.E.C Layne (1963-1968), H.A. Quamme (1968-1980), F. Kappel (1983-1987) e D.M. Hunter (1988-1995). Dal 1995, a seguito di una riorganizzazione dell' Agriculture and Agri-Food Canada, l'attività è stata trasferita alla Stazione di Vineland, dove D.M. Hunter sta continuando lo sviluppo di peri resistenti a "fire blight" mediante l'integrazione fra tecniche di breeding tradizionale e biotecnologie.

Il materiale resistente è stato ottenuto da incroci fra le varietà Seckel, Waite, Maxine, Old

Home, Farmingdale e Kieffer e anche con alcune selezioni di *Pyrus ussuriensis* (76) e *pyrifolia* (NJ-1) ricorrendo, in questi casi, a reincroci, in particolare con Bartlett, al fine di migliorare la qualità dei frutti. Nel 1972 si è iniziato ad impiegare negli incroci anche le prime selezioni HWR ottenute dai programmi precedenti al fine di seguire uno schema di selezione ricorrente. La tecnica di selezione prevede, inizialmente, l'inoculazione in serra del batterio sui semenzali in forte crescita vegetativa ed il successivo passaggio in campo dei soli resistenti (con lesioni inferiori al 25-30% della lunghezza complessiva del germoglio). In seguito viene valutata la suscettibilità in campo ad infezioni naturali; i semenzali più promettenti dal punto di vista agronomico vengono ulteriormente saggiati con successive inoculazioni artificiali (Hunter, 1999). Sono 25 le selezioni scaturite da questo programma, di cui 5 sono già state diffuse commercialmente: Harvest Queen, Harrow Delight, Harrow Sweet, Harrow Gold e Harrow Crisp. Pur presentando buoni livelli di resistenza, nessuna varietà è risultata immune all'infezione.

**USA - USDA, Appalachian Fruit Research Station, Kearnyesville, West Virginia.** È, con quello canadese, il principale programma di miglioramento genetico del pero nel Nord America. Si è cercato di aggiungere ad alcune fonti di resistenza rinvenute in alcune varietà di *P.*

*communis*, anche geni di resistenza derivati da *P. ussuriensis*, *P. pyrifolia*, e *P. calleryana*.

La metodologia di selezione prevede la inoculazione artificiale in serra di tutti i semenzali. In seguito, i semenzali con il più alto livello di resistenza vengono messi a dimora in vivaio, e reinoculati. Solo i semenzali con sintomi della malattia su meno del 10% della superficie del ramo inoculato vengono trasferiti in campo per un periodo di 8 anni (Bell e Van der Zwet, 1993).

Le selezioni più avanzate, tutte individuate per la loro migliore qualità dei frutti unita ad un alto grado di resistenza al fuoco batterico (evidenziata sia in pieno campo che in serra), superiore a quella di 'Seckel', progenitore resistente comune, sono attualmente a confronto in diverse prove sperimentali. Negli ultimi anni si è rimodulato il programma, prevedendo, a fianco delle tecniche classiche di breeding, anche l'utilizzo di tecniche di ingegneria genetica. Sono già state diffuse 2 varietà resistenti: Potomac (1993) e Blake's Pride (1998).

### **Europa**

**Francia - Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Angers.** La comparsa del fire blight nel 1978 nel Sud-Ovest della Francia ha consentito di valutare nei campi sperimentali di Dax la suscettibilità di molto materiale, fra cui le selezioni canadesi di Harrow, presenti in Francia dal 1974, e le varietà presenti nelle proprie

collezioni.

Il programma, iniziato da Thi-bauld nel 1981, ha impiegato negli incroci parentali moderatamente suscettibili. La tecnica di selezione prevede l'inoculo in serra dei semenzali in attiva crescita vegetativa ed il successivo passaggio in campo per le valutazioni agronomiche di quelli con lesioni sul germoglio inferiori al 50% della lunghezza complessiva. Con questa prima selezione non particolarmente severa, viene mantenuto in campo un numero di piante per incrocio sufficiente per valutare l'influenza genetica dei parentali e consentire una più ampia base entro cui selezionare per i migliori caratteri qualitativi del frutto (Lespi-nasse *et al.*, 2000).

Nel 1992, al fine di accelerare i tempi rispetto al breeding tradizionale, è iniziato un programma di ingegneria genetica, con lo scopo di incrementare la resistenza a fire blight di alcune importanti cultivar europee introducendovi i geni di resistenza (Chevreau *et al.* 1999).

#### **Germania – Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben (IPK) - Genbank Obst Dresden-Pillnitz.**

Il programma tedesco è iniziato nel 1961 da G. Mildenerger a Naumburg/Saale, utilizzando materiale genetico di M. Zwintz-scher (Köln-Vogelsang) e G. Stolle (Halle/Saale). La selezione definitiva fu operata a partire dal 1971 da M. Fischer. Una parte del materiale di Naumburg fu

selezionato a Holovousy/CZ da J. Vondracek. Gli scopi del programma erano principalmente quelli di ottenere varietà con resistenza a ticchiolatura e a colpo di fuoco batterico e caratterizzate da un'ottima qualità dei frutti e da precoce e elevata fruttificazione degli alberi. Nel 1988, dopo una sperimentazione operata in diverse zone della Germania e Repubblica Ceca, furono introdotte le prime varietà, tutte però piuttosto suscettibili al colpo di fuoco batterico: Hermann, Isolda, Tristan, Armida, Elektra, Hortensia, Manon, Agata, David, Reglindis, Eckehard, Uta (Fischer e Mildenerger, 1998).

#### **Romania – Fruit Research Station, Voinesti.**

I principali obiettivi del miglioramento genetico del pero in Romania sono rappresentati dalla resistenza a ticchiolatura, fuoco batterico e psilla, unite alla buona qualità dei frutti. Sono stati effettuati incroci interspecifici fra *P. serotina* e varietà di *P. communis*. Le cultivar Haydeea (1993), Euras e Monica (1994), resistenti a fuoco batterico, sono i primi risultati concreti di questo programma, mentre altre selezioni, considerate immuni a fuoco batterico, sono state utilizzate in rein-croci (N. Andreis, 2000). Ultimamente altre 2 varietà, Ina Estival e Getica sono state diffuse commercialmente, ma non è nota la loro suscettibilità ad *Erwinia*.

Altri programmi europei che includono anche l'obiettivo della resistenza a colpo di fuoco batterico, sono sviluppati in Gran

Bretagna dall' HRI di East Mal-ling, Kent, che ha utilizzato come fonti di resistenza ibridi di *P. ussuriensis*, *P. serotina* e varietà resistenti quali Maxine e Moon-glow; in Svizzera dalla Station fédérale de recherches en production végétale de Changins (RAC), Centre des Fougères, che opera in collaborazione con il Federal Research Institute di Wädenswil (FAW); in Bulgaria dall'Istituto di Frutticoltura di Plovdiv, che ha prodotto interessanti ibridi fra *P. ussuriensis* e *P. communis*.

#### **Oceania**

**Nuova Zelanda – Horticulture and Food Research Institute of New Zealand Ltd, Havelock.** Il programma è controllato dal DSIR (Department of Scientific and Industrial Research) ed in misura minore dal MAF (Ministry of Agriculture and Fisheries). Iniziato nel 1983 con incroci interspecifici ed intraspecifici, impiegando un'ampia piattaforma di parentali, il programma ha prodotto annualmente circa 5.000 semenzali, da selezionare in campo per la loro suscettibilità a ticchiolatura, oidio e fuoco batterico (White e Brewer, 2000). Quattro varietà sono state diffuse commercialmente: Crispie, Maxie (1998), Nellie e Goldie (2000), ma non è nota la loro suscettibilità ad *Erwinia*.

**Australia - Institute for Horticultural Development (IHD), Victoria.** L' Australian Apple and Pear Growers Asso-

ciation (AAPGA) sostiene questo programma che presenta una particolarità rispetto agli altri. Il polline delle cultivar da utilizzare come parentali negli incroci per la resistenza al fuoco batterico, viene inviato fuori dall'Australia e usato per fecondare fiori di genotipi resistenti a fire blight.

I semi ottenuti ritornano in Australia dove viene condotta la normale selezione. Da questa attività sono già emerse 4 interessanti selezioni.

### Italia

In Italia sono due le Istituzioni che si occupano di miglioramento genetico del pero per la resistenza a colpo di fuoco batterico: il Dipartimento di Colture Arboree (DCA) dell'Università di Bologna, che ha inserito la resistenza al fuoco batterico fra gli obiettivi del programma nei primi anni '90, utilizzando quali genitori resistenti le selezioni americane US 309 e canadesi HW, fra cui Harrow Sweet. Dal 1998 ha intrapreso la strada dell'ingegneria genetica, intendendo individuare, per poi clonare e trasferire su varietà commerciali la regione del DNA implicata nella resistenza (Sansavini, 1999). L'altra Istituzione italiana è l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura (ISF), Sezione di Forlì, che da oltre un ventennio opera con continuità per questo obiettivo, e Sezione di Propagazione. La Sezione di Propagazione, dal 1999 coordina un progetto di trasformazione genetica delle drupacee per la resistenza al

PPV e delle pomacee per la resistenza ad *Erwinia amylovora*. Il programma di trasformazione del pero è attualmente nella fase di rigenerazione in vitro, mentre più avanzata è la ricerca su pero.

### Il programma ISF - Sezione di Forlì

Il programma ISF di miglioramento genetico del pero per la resistenza al colpo di fuoco batterico è iniziato all'inizio degli anni '80, quando ancora non era presente la malattia nel nostro Paese. Per questo motivo, al fine di verificare la suscettibilità di semenzali a questa batteriosi, si è iniziata una collaborazione, nell'ambito di un progetto dell'Unione Europea, con l'INRA di Angers che ha messo a disposizione i propri campi sperimentali di Dax, dove l'*Erwinia amylovora* è naturalmente molto diffusa, ed ha provveduto a fornire la metodologia per i saggi di inoculazione (Bagnara *et al.* 1994).

Inizialmente si è provveduto a moltiplicare i semenzali presenti nei campi sperimentali ISF e ad inviarne una copia in Francia per la valutazione della loro resistenza ad *Erwinia amylovora* a seguito di inoculazioni eseguite in campo e in serra. La collaborazione è proseguita fino al 1995, in questi anni sono stati complessivamente saggiati circa 11.000 semenzali.

Contemporaneamente alla selezione operata in Francia, presso i campi sperimentali ISF di Ce-

senza e Forlì è stata condotta la selezione agronomica e pomologica sui frutti di tutti i semenzali. Si è rilevato che i semenzali resistenti caratterizzati dalle migliori qualità dei frutti provenivano da combinazioni fra parentali suscettibili come Conference, Dott. J. Guyot, Bella di Giugno e Coscia. La loro capacità combinatoria per la resistenza è risultata migliore rispetto alle varietà considerate resistenti, come ad esempio Morgan, Prof. Molon, Duchessa d'Angoulême (Bagnara *et al.*, 1997).

Inizialmente sono stati selezionati circa 70 semenzali caratterizzati da resistenza al patogeno, ma un più accurato lavoro di selezione di campo ha portato all'individuazione di sole 3 selezioni: ISF-FO 80-57-83 (*Conference x Dr. Guyot*); ISF-FO 80-51-72 (*Coscia x Dr. Guyot*); ISF-FO 80-104-72 (*Coscia x Dr. Guyot*) che sono state ulteriormente saggate, utilizzando diversi ceppi batterici, presso l'INRA ad Angers nel triennio 1997-1999.

Questi test successivi hanno evidenziato una grande variabilità nella suscettibilità di queste 3 selezioni (Rosati *et al.*, 2000): ISF FO 80-57-83 è risultata alquanto suscettibile ai saggi eseguiti in serra rispetto alle infezioni riscontrate in pieno campo. Viceversa, la selezione ISF FO 80-51-72 ha evidenziato un buon livello di tolleranza nei saggi in serra, evidenziando in pieno campo una suscettibilità elevata; la selezione ISF FO 80-104-72 è risultata la più tolle-

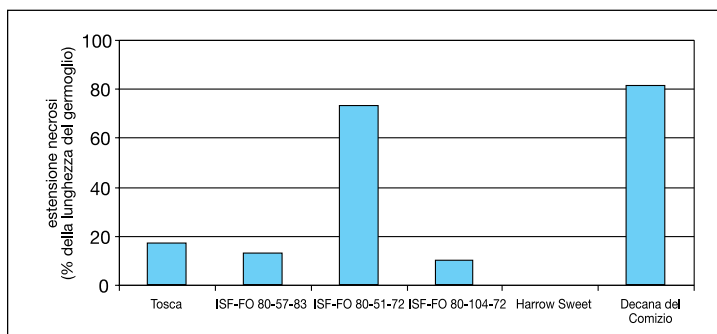


rante, al pari quasi di Harrow Sweet (fig. 3).

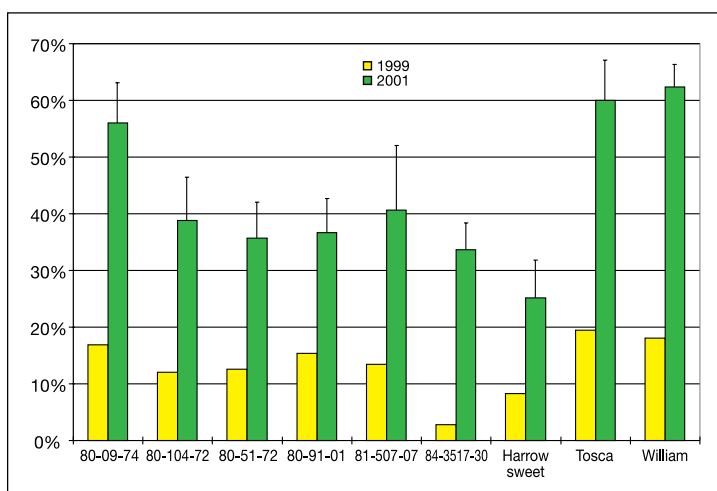
Dal 1993, l'ISF ha confluato la propria attività di miglioramento genetico del pero nell'ambito del Progetto finalizzato MiPAF "Frutticoltura", a cui si è affiancato, nel 1998, il progetto della Regione Emilia-Romagna "Programma di ricerca e sperimentazione sul colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*)", coordinato dal Crpv di Cesena. Ciò ha consentito di ampliare l'attività, infatti sono state ulteriormente saggiate le migliori selezioni ISF-FO e alcune varietà di pero tramite inoculazioni artificiali con un ceppo virulento italiano di *E. amylovora* fornito dal prof. Bazzi, dell'Università di Bologna, eseguite presso le serre del Servizio Fitosanitario Regionale di Bologna.

Questi test hanno evidenziato apprezzabili differenze per quanto riguarda l'incidenza della malattia (percentuale di germogli con evidenti tratti necrotici) e la gravità (lunghezza della necrosi, espressa come percentuale della lunghezza del germoglio inoculato). L'incidenza della malattia valutata nel corso degli ultimi 3 anni ha evidenziato che nessuna delle accessioni saggiate è totalmente immune alla malattia. Il valore massimo di incidenza si è costantemente riscontrato in William, mentre quello inferiore si è evidenziato in Harrow Sweet che tuttavia non si discosta significativamente da alcune selezioni ISF (fig. 4).

Le differenze riscontrate nei tre anni nella gravità della malattia



**Figura 3** - Risultati delle inoculazioni eseguite in pieno campo ad Angers (Francia), nel 1999: estensione della lesione sul ramo inoculato



**Figura 4** - Gravità della malattia nei genotipi saggiati nel 2001 a confronto con gli indici registrati nel 1999

sono da attribuire all'epoca di inoculazione, in quanto la presenza di germogli scarsamente lignificati, come si è verificato negli ultimi due anni, ha favorito lo sviluppo dell'infezione (Rosati *et al.* 2001) (fig. 4).

Le selezioni ISF-FO 80-57-83 (Conference x Dr. Guyot), ISF-FO 80-91-01 (libera impollinazione di US 309) e ISF-FO 80-104-72 8 (Coscia x Dr. Guyot),

che si sono evidenziate molto tolleranti dai numerosi saggi eseguiti in Francia ed in Italia, in pieno campo ed in serra, sono state inserite in diversi campi dimostrativi-sperimentali per un collaudo più ampio sul territorio regionale (Rivalta *et al.*, 2002).

La loro validità agronomica, l'interesse suscitato per la scarsa suscettibilità al fuoco batterico ri-

**Tabella 3** - Caratteristiche produttive e qualitative dei frutti delle selezioni descritte a confronto con William ed Harrow Sweet al momento della raccolta

	Produzione (William = 100)	Peso medio (g)	Durezza polpa (Kg)	Acidità titolabile (meq/100 g)	RSR (°Brix)	Epoca di raccolta
<b>ISF-FO 80-57-83</b>	115	160	5,5	3,3	14,2	II sett luglio
<b>ISF-FO 80-91-01</b>	61	130	5,2	2,7	15,6	IV sett luglio
<b>WILLIAM</b>	100	190	5,5	3,8	14,4	II sett agosto
<b>ISF-FO 80-104-72</b>	67	250	6,0	3,6	11,9	IV sett agosto
<b>HARROW SWEET</b>	85	170	6,5	3,9	15,6	I sett settembre

petto alle varietà tradizionali e  
le accettabili qualità organolettive

che dei frutti, hanno consentito  
di arrivare alla decisione di una

prossima diffusione commerciale (tab. 3).

#### **ISF-FO 80-57-83**

È più suscettibile al colpo di fuoco batterico di Harrow Sweet e di ISF-FO 80-104-72, e meno di William. L'albero è vigoroso se innestato su franco e di medio vigore se su cotogno (Ba29, EMA e Cts 212), la vegetazione è piuttosto compatta; con internodi alquanto ravvicinati. L'albero è di precoce entrata in produzione ed è produttivo. Il frutto è piriforme troncato, di pezzatura media, con buccia di color verde chiaro-giallo. La polpa è bianca, di tessitura fine, succosa, con aroma di William a maturazione. L'epoca di raccolta precede quella di William di circa 35 giorni. Discreta è la conservazione frigorifera. Ai panel test coordinati dal dott. Predieri dell'ISTEA di Bologna, è risultata gradita.



#### **ISF-FO 80-104-72**

È complessivamente poco suscettibile al colpo di fuoco batterico, con manifestazioni di gravità leggermete superiori ad Harrow Sweet, ma molto inferiori a ISF-FO 80-57-83 e William. L'albero di vigore medio se innestato su franco, è apparso poco affine al cotogno; entra precocemente in produzione ed ha una media produttività. Il frutto è di grossa pezzatura, calebassiforme, la buccia è di color giallo-verde, con sovracoloro rosso chiaro per il 30-35% della superficie. La polpa è bianca, con tessitura medio-fine, croccante, di discreto sapore. La consistenza è pari a quella di William, con valori più bassi di RSR ed acidità titolabile. Si raccoglie circa 15 giorni dopo William. La conservazione frigorifera dei frutti è buona e si può protrarre per circa 3 mesi. In ambienti più settentrionali, come il Cuneese o in Francia (Angers) ha mostrato un ottimo comportamento produttivo.



**ISF-FO 80-91-01**

Ha mostrato una suscettibilità al colpo di fuoco batterico simile a ISF-FO 80-104-72. L'albero ha una vigoria media, entra precocemente in fruttificazione e presenta una costante buona produttività. Il frutto è di pezzatura ridotta, con buccia di color verde chiaro sfumata di rosso sul 5% della superficie. La polpa è semifine, croccante e succosa, poco aromatica, con elevato RSR e bassa acidità titolabile. L'epoca di raccolta precede di 15-20 giorni William. Buona la conservazione frigorifera dei frutti.

**ABSTRACT Breeding for fire blight resistance in pear**

Italian pear production is the largest in the European Union (EU), even if during the last 9 years, the pear surface in Italy has decreased. The majority of Italy's commercial pear production is located in Emilia-Romagna region.

Fire blight, caused by the bacterium *Erwinia amylovora*, appeared in Italy in the early 90's and had a dramatic spreading. Breeding for fire blight resistance in pear began in the nineteenth century, but the major breeding programs started in North America in the sixties, and several other have started since then. After a review of the main breeding programs carried out in the world, the attention is focused on the breeding activity of the Istituto Sperimentale per la Frutticoltura of Forlì. Three interesting selections will be released in 2003.

**Bibliografia**

- Andreis N. 2000. *Achievements and prospects in pear breeding at the fruit research station, Voinești*. Romania.
- Bagnara G.L., Rivalta L., Laghi M., Quarta R., Lecompte P. 1994 - *Aspects genetiques et strategie de selection pour la resistance au feu bacterien: l'amelioration du poirier en Italie*. L'Arboriculture Fruitiere 472, 17-20.
- Bagnara G.L., Rivalta L., Laghi M., Quarta R. 1997. *Valutazione della resistenza al «colpo di fuoco batterico» nel pero: capacità di combinazione e strategie di miglioramento genetico*. Frutticoltura 3, 69-72.
- Bell R. L. and Zwet T., 1993. *New fire blight resistant advanced selections from the USDA pear breeding program*. Acta Hort. (ISHS) 338, 415-420.
- Bell L.R., Quamme, H.A. Layne, R.E.C. and Skirvin R.M., 1996. *Pears. Fruit Breeding*, Volume I: Tree and Tropical Fruits, edited by Jules Janick and James N. Moore, 441-514.
- Bellini E., 1995. *Il Miglioramento Genetico del Pero*. Atti Simposio Internazionale. Fruttiflor Faenza 13 ottobre 1995, 99-153.
- Calzolari A., Finelli F., Ponti I., Mazzoli G.L., 1999. *L'esperienza dell'Emilia-Romagna nella lotta al colpo di fuoco*. L'Informatore Agrario 14, 65-70.
- Chevreau E., Mourgues F., Reynold, J.P. and Brisset M.N.,

1999. *Gene transfer for fire blight resistance in pear*. Acta Hort. (ISHS) 489, 297-300.
- Fischer M. and Mildenerberger G., 1998. *The Naumburg/Pillnitz pear breeding programme results*. Acta Hort. (ISHS) 484, 135-138.
- Hunter D.M., 1999. *Update on Harrow Fire Blight-Resistant Pear Cultivars and Selections*. Compact Fruit Tree 32, 59-62.
- Lespinasse Y., Herb H. Aldwinckle, 2000. *Breeding for Resistance to Fire Blight*. In: Fire Blight The Disease and its causative Agent, *Erwinia Amylovora*. CABI Publishing 253, 274.
- Rivalta L., Rosati C., Sirri S., 2002 *Valutazione qualitativa dei frutti di selezioni avanzate di pero Dell'Ist. Sper. Frutticoltura al Colpo di fuoco batterico (Erwinia amylovora)*. SOI Spoleto 25-23 Aprile.
- Rosati C., Rivalta L., Dradi M. 2000 – *Evaluation of susceptibility to fire blight of seven italian pear advanced selections and varieties from ISF-FORLÌ*. Atti 8th ISHS Pear Symposium, Ferrara, 4-9 settembre. Poster.
- Rosati C., Sponza G., Bazzi C., Rivalta L., 2001 *Valutazione della resistenza al colpo di fuoco batterico di selezioni avanzate di pero*. Atti 8° Congresso SIPaV (Soc.It.Patologia Vegetale). Potenza, 3-5 Ottobre. Poster.
- Sansavini S., 1999. *I traguardi della genetica*. Il Divulgatore 1, 24-32.
- White A.G., L. Brewer. 2000. *The pear breeding project in New Zealand*. VIII International Symposium on Pear. Abstract.

---

*Lavoro svolto nell'ambito del progetto finalizzato MiPAF "Ricerche sul pero finalizzate alla riduzione dell'impatto ambientale e alla valorizzazione della qualità (P.R.I.A.)". Pubblicazione n. 1.*

## QUALITÀ DEI FRUTTI DI CULTIVAR E SELEZIONI RESISTENTI AL COLPO DI FUOCO BATTERICO

**S. Predieri, E. Gatti, F. Rapparini, G. Bertazza, M. Govoni**

Istituto di Biometeorologia - IBIMET-CNR, Sezione di Bologna

### Introduzione

L'Emilia-Romagna ospita oltre il 60% della superficie italiana investita a pero e contribuisce ad oltre il 70% della produzione della nazione che è al primo posto nella pericoltura mondiale (Sansavini, 1998). Enti locali e Associazioni di produttori hanno investito recentemente notevoli risorse sulla promozione e valorizzazione della pera IGP, con il fine di mantenere i risultati produttivi e la competitività commerciale della "Pera Tipica dell'Emilia-Romagna", cioè dare redditività agli investimenti di decenni.

In questo scenario la comparsa di *Erwinia amylovora* nella pianura padana, dove si concentra circa l'80% della produzione italiana di pere (Ravaioli e Scalise, 2001), è un evento grave non può essere considerata la semplice diffusione di un patogeno col quale occorre imparare a convivere. Questo batterio, in altre aree colpite ha causato addirittura l'abbandono della pericoltura, costituisce una pesante minaccia a questa produzione frutticola di punta per l'economia e l'immagine della Regione Emilia-Romagna.

In seguito alla comparsa dell'agente del colpo di fuoco batterico, considerata la più catastrofica malattia delle Rosacee, si sono urgentemente messe in atto una serie di strategie coordinate per la difesa di questo patrimonio frutticolo. La situazione ha richiesto di intervenire sia con l'attuazione di mezzi agronomici adeguati sia prevedendo l'eventuale inserimento di cultivar resistenti (Fornaciari, 2000). Il ricorso a nuove cultivar è tuttavia auspicabile solo se queste hanno capacità di imporsi sul mercato. La resistenza al colpo di fuoco, peraltro mai totale, può essere una condizione preferenziale, ma non sufficiente di scelta: la pera è infatti un frutto ricercato da consumatori con elevata capacità di spesa che richiedono un prodotto di qualità (Ferri e Della Casa, 2000). L'eventuale introduzione di cultivar resistenti al patogeno, da affiancare a quelle attualmente coltivate, dovrebbe quindi garantire il mantenimento di uno standard qualitativo elevato, comparabile con quello delle varietà IGP, fulcro della "Pera dell'Emilia Romagna", in grado di offrire al consumatore frutti con caratteristiche specifiche di tipicità e attri-

buti organolettici d'eccellenza. L'azione condotta dall'unità operativa dell'IBIMET-CNR ha analizzato le opportunità di un'evoluzione varietale in favore di nuove cultivar *Erwinia*-resistenti, valutandone i parametri qualitativi, per fornire in tempi brevi agli operatori della produzione e distribuzione informazioni di prima mano sulle cultivar con frutti di elevata qualità e al contempo per sconsigliare quelle giudicate scadenti, anche se resistenti.

### Situazione varietale del pero

Tutte le cultivar maggiormente coltivate in Emilia-Romagna hanno purtroppo scarsa resistenza al colpo di fuoco batterico. La lotta alla diffusione del patogeno deve essere affrontata anche con interventi drastici, tra i quali l'abbattimento degli impianti fortemente colpiti. La salvaguardia della pericoltura richiede però di non abbandonare la coltura, ma di procedere ad una razionale sostituzione degli impianti soppressi (Fornaciari, 2000). La disponibilità di cultivar e portinnesti dotati di maggiore resistenza offrirebbe minori rischi di infezione e quindi contribuirebbe a

contrastare la diffusione del batterio. Il miglioramento genetico del pero propone numerose cultivar e selezioni avanzate, che, nelle sperimentazioni condotte, hanno evidenziato buoni livelli di resistenza al patogeno. Tuttavia prima di pianificare iniziative di rinnovamento varietale si è necessario conoscere le caratteristiche qualitative dei frutti delle nuove cultivar e valutarne il gradimento da parte del consumatore. Sono infatti le cultivar "classiche" di pero ad avere il monopolio del mercato, quelle di nuova introduzione hanno generalmente vita contrastata ed effimera (Sansavini *et al.*, 1997). Esperienze svolte in altri Paesi europei indicano come la proposta di nuove varietà di pero sia convenientemente affrontata con interazioni tra gli Enti di ricerca, le diverse componenti della filiera ed i consumatori (Le Lezec, 1998).

Da alcuni anni sono disponibili cultivar con buoni livelli di resistenza che sono però qualitativamente scadenti, quindi non proponibili per la coltura attuale (Alexander, Seckel, Maxime) (Thibault *et al.* 1987). Ad altre cultivar, tra le quali Honey Sweet, Harvest Queen, Harrow Delight, vengono attribuite dai costitutori caratteristiche qualitative elevate. In particolare Harrow Sweet viene considerata la cultivar di riferimento mondiale per il grado di resistenza e per i validi risultati produttivi ottenuti in varie aree pericole (Brunner, 1997). La ricerca di cultivar che combinino la resistenza al colpo

di fuoco con elevate qualità agronomiche ed organolettiche è attiva in vari paesi europei, tra i quali Francia, Germania e Romania. Le principali novità arrivano tuttavia dal Nord America, dall'Istituto di Ricerca di Harrow (Canada), che ha licenziato recentemente le cultivar Harrow Crisp ed Harrow Gold, e dal Centro USDA di Kearnesville negli Stati Uniti, che ha realizzato le cultivar Potomac, Elliot e Blake's Pride (Bellini *et al.* 2000). In Italia la ricerca di nuove cultivar *Erwinia*-resistenti è in gran parte condotta dall'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Roma Sezione di Forlì (ISFO) che dispone di un buon numero di selezioni avanzate che hanno finora mostrato elevati livelli di resistenza (Rivalta e Dradi, 1998; Bellini *et al.*, 2000; Rosati *et al.* 2002).

#### **Metodi di valutazione della qualità del frutto delle cultivar di pero**

Nell'ambito del presente progetto si sono valutate le caratteristiche qualitative chimico-fisiche ed organolettiche delle cultivar e selezioni più promettenti, originate dal miglioramento genetico italiano ed estero, scelte dal Crpv per la sperimentazione agronomica in regione, allevate in campi sperimentali allestiti presso le aziende agricole "Flli. Spreafico" di Altedo (BO) e ITAS "Calvi" Finale Emilia (Mo).

Lo studio si è incentrato sulla messa a punto di metodologie di valutazione della qualità dei

frutti, integrando la determinazione dei parametri biochimici e chimico-fisici (Bartolozzi *et al.*, 1992; Genard *et al.*, 1994; Elgar *et al.*, 1997; Suwanagul e Richardson, 1998) con la valutazione degli attributi sensoriali, al fine di proporre al consumatore pere con caratteristiche organolettiche di piena soddisfazione (Kappel *et al.*, 1995; Neri *et al.*, 1997; Eccher-Zerbini, 2002).

Discipline scientifiche in costante sviluppo, quali l'analisi sensoriale e la consumer science (Porretta, 2000) sono state alla base dell'indagine, che si è orientata alla selezione delle cultivar *Erwinia*-resistenti dotate dei frutti di migliore qualità, definendone il momento di raccolta ottimale e i tempi di commercializzazione più appropriati. Gli studi sono stati condotti secondo le metodologie definite per l'analisi sensoriale della frutta da Kappel *et al.* (1995) e Dever *et al.* (1996), convenientemente adattate alla valutazione organolettica della pera (Predieri e Bogoni, 1999; Predieri e Gatti, 2001; Predieri *et al.*, 2002). Gli aromi sono stati considerati come componente di primaria importanza per la qualità del frutto, sono quindi stati determinati tramite metodologie analitiche innovative (Rapparini e Predieri, 2002; Rapparini e Predieri, 2003) (*fig. 1*).

La valutazione chimico-fisica e sensoriale è stata preceduta da una fase preliminare di acquisizione di dati di base pre- e post-raccolta.

La sperimentazione è stata con-



**Figura 1** - Fase di estrazione di un concentrato aromatico dallo “spazio di testa” presente nell’intorno di mezzene di pere poste in contenitori di vetro della capienza di 2 litri e chiuse con un tappo ricoperto di materiale inerte. I contenitori sono dotati di due collegamenti con l’esterno tramite due tubi fuoriuscenti dal tappo: uno per l’aria in entrata e l’altro per quella in uscita utilizzato per il campionamento. Nei contenitori è stata pompata aria purificata (tramite carbone attivo) con un flusso di circa 100 ml/min. Dopo che l’equilibrio nel sistema di campionamento è stato raggiunto (pochi minuti), nel tubo dell’aria in uscita è stata inserita una cartuccia contenente carbone attivo avente la capacità di fissare le molecole volatili. I VOCs (Composti Organici Volatili) sono adsorbiti da cartucce e dopo desorbimento con TDCTI (Chrompack), analizzati tramite gascromatografia (Hewlett Packard 5890) e spettrometria di massa (HP 5970 quadrupole mass spectrometer (GC-MS)

dotta per quattro anni, per garantire l’omogeneità del prodotto, prima delle analisi i frutti raccolti sono stati conservati, in atmosfera normale, presso le celle frigorifere dell’Azienda “Flli. Spreafico”, Tavernelle (Bo). Un primo approccio di analisi sensoriale è stato compiuto con test di valutazione visiva dei frutti e con test di discriminazione (test triangolare). Questi test

sono stati condotti su persone intervistate in qualità di consumatori generici di pere (circa 50 frequentatori della mensa CNR, scelti casualmente tra circa 400). Un’analisi più approfondita è stata effettuata dopo una adeguata selezione di assaggiatori e la costituzione di panel (gruppi). I giudici sono stati istruiti per offrire affidabili giudizi valutativi descrittivi (Quantitative Descriptive

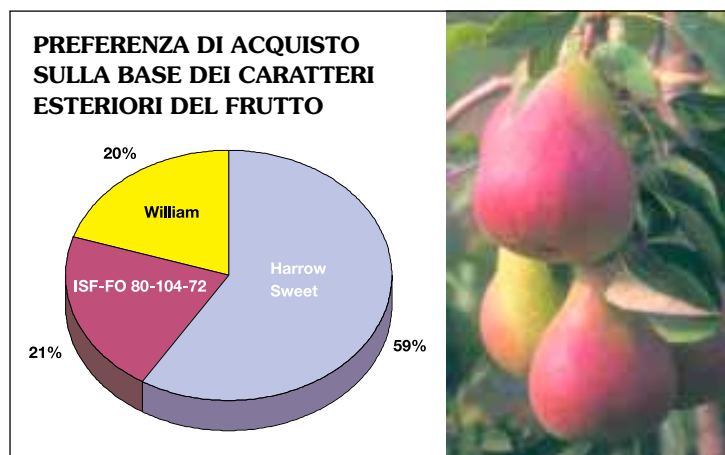
Analysis, QDA) nella valutazione dei parametri sensoriali di riferimento: consistenza, granulosità, succosità, dolcezza, acidità, aromaticità, astringenza. Hanno partecipato alle analisi sensoriali un gruppo di assaggiatori (oltre 30) selezionati presso l’Area di Ricerca CNR di Bologna, un gruppo (circa 12) presso il Cisa Mario Neri di Imola coordinato da L. Cavicchi ed un gruppo (circa 12) presso l’Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Roma - Sezione di Forlì, coordinato da L. Rivalta (costitutore di alcune delle nuove cultivar oggetto d’indagine). I dati ottenuti dalle analisi sensoriali, espressi dagli assaggiatori su schede astrutturate (Dever, 1996) sono stati sottoposti a standardizzazione e normalizzazione (media = 0; deviazione standard = 1) e successivamente elaborati statisticamente con il programma SAS (SAS Institute, Cary NC, USA).

### **Risultati della valutazione dei frutti prodotti da cultivar e selezioni resistenti a *Erwinia amylovora***

Tra le varie cultivar e selezioni avanzate valutate nell’ambito del progetto si propongono le caratteristiche di quelle risultate migliori.

#### ***Harrow Sweet***

Cultivar realizzata in Canada presso la stazione di Harrow (costitutore D.Hunter), già in produzione con buoni risultati in Francia, è in fase di introduzio-



**Figura 2** - Preferenze di acquisto di potenziali consumatori in base ai caratteri esteriori del frutto. Le caratteristiche che hanno orientato la scelta in favore di Harrow Sweet (a destra) sono la forma, la leggera rugginosità ed il colore rosso della faccia esposta al sole

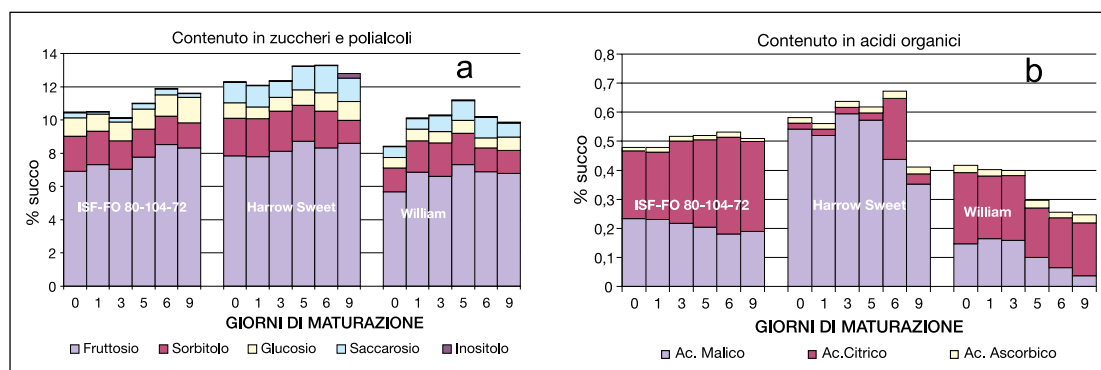
ne nell'Emilia-Romagna. I frutti di questa cultivar sono stati sottoposti ad un test di valutazione visiva comparativa da parte di potenziali acquirenti. La scelta in favore di Harrow Sweet è stata motivata in particolare dalla funzionale dimensione e dalla gradevole forma, dalla leggera rugginosità, associata al-

l'immagine di prodotto naturale, e dall'intenso colore rosso della superficie esposta al sole (*fig. 2*).

Interessanti informazioni sono emerse dalle analisi biochimiche. I frutti di Harrow Sweet si sono distinti per i contenuti particolarmente elevati di zuccheri (*fig. 3a*). Si veda in particolare il con-

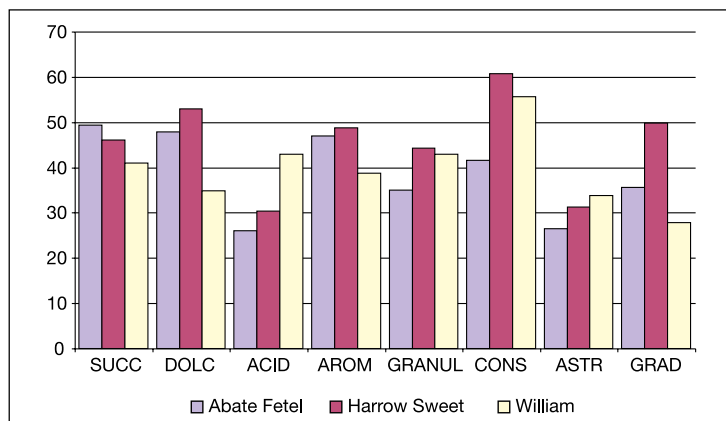
fronto con frutti di William. Harrow Sweet ha anche una composizione in acidi organici differente da William, con una più elevata presenza di acido malico (*fig. 3b*). Queste caratteristiche biochimiche possono in parte spiegare i complessi rapporti tra le caratteristiche biochimiche e fisiologiche del frutto ed il gradimento degli assaggiatori (ad esempio il rapporto tra consistenza, contenuto in zuccheri e dolcezza del frutto).

Sono stati effettuati test comparativi tra Harrow Sweet e due cultivar tipiche (*fig. 4*). Per Harrow Sweet si è registrato un livello di gradimento relativo molto elevato (51), significativamente superiore ad Abate Fetel (35) e William (27). Questo risultato non significa che Harrow Sweet sia "migliore" in assoluto, troppi fattori influenzano il gradimento relativo (es. area di produzione, data di raccolta, conservazione, ecc.); tuttavia le buone valutazioni, più volte confermate, indicano con certezza il posses-



**Figura 3** - Contenuto in zuccheri, polialcoli ed acidi organici in frutti di ISF-FO 80-104-72, Harrow Sweet e William appena usciti dalla frigoconservazione (0) e durante la maturazione a temperatura ambiente (shelf - life) a 20°C per 1, 3, 5, 6 e 9 giorni





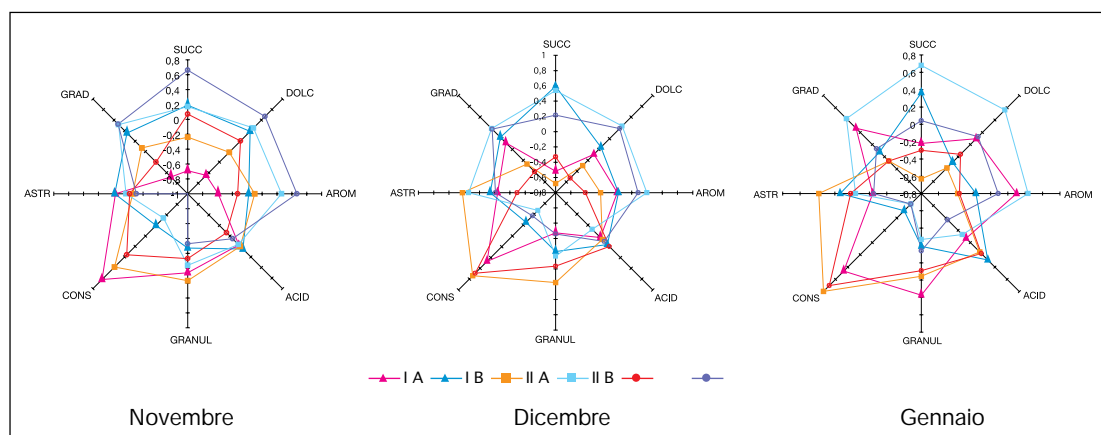
**Figura 4** - Risultati di test QDA comparativo tra le cultivar Abate Felcel, Harrow Sweet e William

so di attributi organolettici comparabili con quelli delle migliori cultivar. I livelli elevati di dolcezza e aromaticità, associati ad una superiore consistenza, sintetizzano le caratteristiche principali di Harrow Sweet: di avere nelle condizioni ottimali di consumo polpa consistente e dolce, e ricche componenti aromatiche. Panel test QDA più specifici

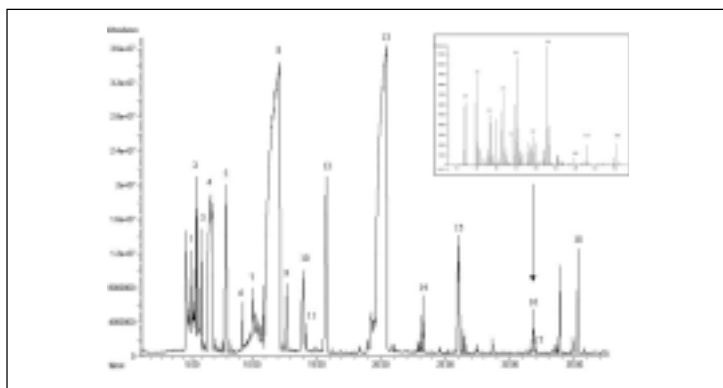
sono stati condotti per determinare l'influenza della data di raccolta (ultima decade agosto = I; prima decade settembre = II; seconda decade settembre = III) e dei tempi di commercializzazione (novembre; dicembre e gennaio) sulle caratteristiche del frutto. I parametri di durezza polpa e RSR erano:

- raccolta II: 7,1 kg e 14,9 °Brix;  
 - raccolta III: 6,8 kg e 15,9 °Brix.  
 Per ogni tesi si sono proposte due diverse shelf-life (giorni di maturazione post-frigoconservazione a 20°C), entrambe ottimali per il consumo, ma con frutti più (A) o meno (B) consistenti. Nei test condotti a novembre e dicembre solo i frutti delle raccolte più tardive hanno riscosso il massimo apprezzamento, sia in termini globali di gradimento (GRAD) che sulla base di singoli importanti caratteri gustativi, come indicato dai profili sensoriali (aroma, dolcezza e succosità) (fig. 5).

La situazione è cambiata nell'assaggio condotto a gennaio: i frutti della seconda raccolta con lunga shelf-life (IIB), hanno ancora suscitato il massimo gradimento, ma i frutti provenienti da raccolta tardiva (IIIA e IIIB) hanno ottenuto giudizi scarsi; al contrario i frutti raccolti precocemente e consumati dopo breve shelf-



**Figura 5** - Profili sensoriali di Harrow Sweet in tre momenti diversi di consumo (novembre, dicembre, gennaio) confronto tra frutti raccolti in tre diverse date (I, II e III) e proposti più (A) o meno (B) consistenti



**Figura 6** - Profilo gascromatografico di composti volatili emessi da frutti di Harrow Sweet. Nel riquadro il particolare degli esteri dell'acido decadienoico che determinano l'aroma tipico di pera

life (IA) sono molto ben valutati. Per Harrow Sweet in sintesi quindi il prodotto raccolto a metà settembre ottiene elevati giudizi gustativi se proposto entro due mesi dalla raccolta (dicembre). Questa cultivar comunque si è conservata bene in frigorifero fino a fine gennaio, i dati sensoriali indicano tuttavia che per una eventuale commercializzazione in tale mese è consigliabile anticipare la raccolta alla fine di agosto. L'aromaticità è il carattere sensoriale più correlato al gradimento globale (Rapparini e Predieri, 2003). Harrow Sweet ha una buona componente aromatica, apprezzata dagli assaggiatori ed ottimizzabile con una ben orientata scelta della data di raccolta. I buoni livelli di esteri dell'acido decadienoico, composti primari nel determinare l'aroma tipico della pera (fattori d'impatto), confermano i dati sensoriali (fig. 6). I risultati ottenuti concordano ampiamente quanto apprezzato e scritto su "Harrow

Sweet" prodotta in Francia (Brunner, 1997).

#### **ISF FO 80-57-83**

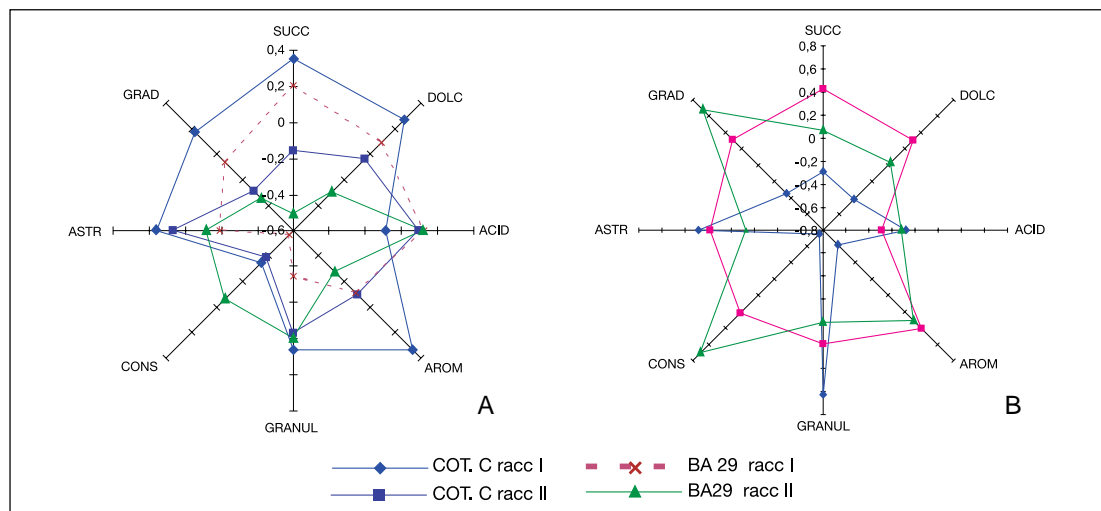
Tale selezione ottenuta dall'ISF di Forlì (Conference X Dr. Guyot), si raccoglie nella seconda decade di luglio. I suoi frutti cultivar sono stati sottoposti ad un test di valutazione visiva comparativa da parte di potenziali acquirenti, riscuotendo molto apprezzamento. Le caratteristiche che hanno orientato la scelta in favore della ISF FO 80-57-83 possono essere sintetizzate con "... un aspetto che richiama la genuinità". In particolare tale giudizio è determinato dalla forma classica di pera (simile a William) e dalla rugginosità lenticellare, non presente nelle cultivar poste proposte come confronto (ed in generale nelle cultivar precoci).

In successivi test triangolari ISF FO 80-57-83, confrontata con alcune delle più interessanti cultivar precoci, quali Butirra Pre-

coce Morettini, Coscia, Carmen, S. Maria, Tosca, è stata discriminata correttamente da circa 2/3 degli intervistati. La selezione ha ricevuto giudizi gustativi estremamente positivi, motivati in particolare dalla dolcezza e dalla aromaticità del frutto. L'analisi delle sostanze volatili emesse dai frutti conferma i giudizi sensoriali (tab. 1), la selezione emette un alto numero di sostanze volatili, nettamente superiore, ad esempio rispetto a S. Maria. Molte di queste sostanze influenzano l'aroma (es. ottanolo = aroma di agrumi; esil acetato = pera, floreale, fruttato) (Rapparini e Predieri, 2003). I panel test QDA hanno fornito indicazioni più approfondite. Si sono valutate produzioni ottenute su due diversi portinnesti (BA29 e Cotogno C). Si sono confrontate due date di raccolta, entrambe nella seconda decade di luglio, distanziate di una settimana (I, II) e due epoche di consumo (fine luglio, fine agosto). Nel test condotto a fine luglio sono stati i frutti raccolti più precocemente, su cotogno C, a riscuotere il maggior gradimento, in particolare si notano elevati livelli di aromaticità, succosità e dolcezza (fig. 7a - pag. 30). Nel panel test di fine agosto è la raccolta più tardiva, su BA29, a registrare le migliori valutazioni (fig. 7b - pag. 30). L'importanza dell'aromaticità nel determinare il gradimento complessivo del frutto si evince chiaramente dallo studio delle correlazioni: infatti risulta il carattere maggiormente correlato al gradimento

**Tabella 1** - Composti volatili aromatici dei frutti di S. Maria, Butirra Precoce Morettini, ISF-FO 80-5783. I composti emessi sono indicati con X

Classe chimica	Composto	Tempo di ritenzione (min.)	S. Maria	Butirra Precoce Morettini	80-57-83
Alcoli	2-Metil-1-propanolo	5.14		X	X
	Butanolo	6.03	X	X	X
	3-Metil butanolo	8.34		X	
	2-Metil butanolo	8.49		X	X
	Pentanolo	9.72		X	X
	(E)-2-Esenolo	14.40			X
	Esanolo	14.70	X	X	X
	Ottanolo	22.50	X		X
Aldeidi	Butanale	5.27			X
	Pentanale	6.55		X	X
	(E)-2-Esenale	13.05		X	X
	(E,E)-2,4-Esadienale	15.40		X	
	Benzaldeide	17.51		X	
Esteri	Etil acetato	5.55	X	X	X
	Propil acetato	7.44	X	X	X
	Metil butanoato	7.70			X
	Butil formato	7.77		X	
	Isobutil acetato	9.90	X	X	X
	Etil butanoato	11.12		X	X
	Butil acetato	12.00	X	X	X
	2-Metiletil butanoato	13.54		X	X
	3-Metilbutil acetato	14.61	X	X	X
	2-Metilbutil acetato	14.73		X	X
	Propil butanoato	14.97			X
	Etil pentanoato	15.64		X	X
	Butil propanoato	15.98		X	X
	Pentil acetato	16.25	X	X	X
	Metil esanoato	16.65		X	X
	Butil butanoato	19.62		X	X
	Etil esanoato	19.70	X	X	X
	Esil acetato	20.60	X		X
	Butil-2-metil butanoato	21.50			X
	Propil esanoato	23.30	X		X
	Etil eptanoato	23.41			X
	Esil propanoato	23.68			X
	Epil acetato	23.90			X
	Metil octanoato	24.33			X
	(Z)-4-etil octenoato	26.46			X
	Butil esanoato	26.54	X	X	X
	Esil butanoato	26.58	X	X	X
	Etil octanoato	26.77	X	X	X
	Octil acetato	27.20	X	X	X
	Esil -2-metil butanoato	28.10			X
Pentil esanoato	28.53			X	
Esil esanoato	32.45			X	
Altri	6-Metil-5-epten-2-one	19.00			X
	2-Etil furan	7.02	X	X	X
	Cicloesano isotiocianato	27.42	X	X	X
	Anethole	29.34			X
	(E,Z)-Farnesene	35.55	X	X	X
(E,E)-a-Farnesene	35.95	X	X	X	



**Figura 7** - Profili sensoriali di frutti di ISF FO 80-57-83 prodotti su cotogno C (Cot C) o BA29 e raccolti in due date (racc I, racc II), consumati a fine luglio (A) o a fine agosto (B)

( $r=0,668$   $p<0,0001$ ). La data di raccolta risultata più valida nel prolungare la conservazione frigorifera, nel 2001, per la selezione innestata su BA29 corrisponde al 16 di luglio, con una consistenza del frutto di 8,76 kg ed un grado Brix di 12,6. In relazione al periodo di consumo, il gradimento medio di ISF-FO 80-57-83 cresce da 51 (a luglio) a 61 (in agosto). Gli incoraggianti risultati riscontrati nella conservabilità dei frutti, hanno suggerito di verificare i limiti della commercializzazione, i frutti sono stati conservati in cella frigorifera fino a metà settembre, quindi sottoposti ad un semplice test di accettabilità, condotto su consumatori generici. Per questa selezione era stata paventata una limitata capacità di conservazione (Rivalta e Dradi, 1998), però gli elevati giudizi di gradimento registrati, mostrano interessanti

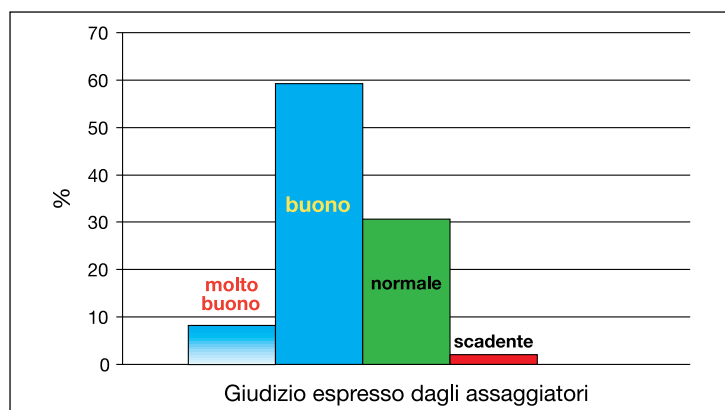
prospettive di prolungare il periodo di conservazione fino a gran parte dell'estate (fig. 8).

#### ISF FO 80-104-72

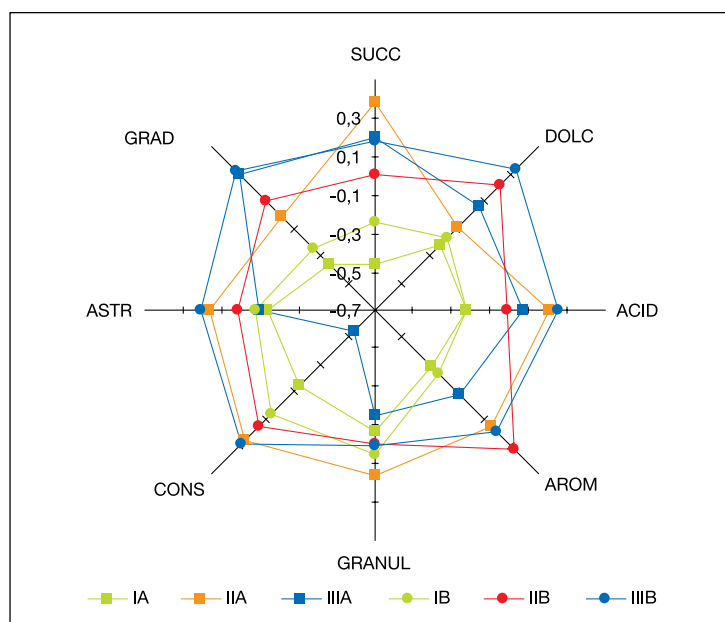
Questa selezione ottenuta dall'ISF di Forlì (Coscia X Dr. Guyot), attualmente in corso di licenziamento, la data di raccolta cade nella seconda metà di agosto. Nei panel test, condotti a novembre, si sono proposti frutti con tre diverse date di raccolta, distanziate di una settimana (I, II, III), ognuna proposta con 2 shelf-life (A, B). Dai profili sensoriali si osserva che le pere raccolte più tardivamente (24 agosto=III) raggiungono le migliori valutazioni con entrambe le shelf-life proposte (fig. 9). Seguono i due campioni di frutti raccolti il 17 agosto (=II) e per ultimi, come gradimento, quelli raccolti il 10 agosto (=I) (fig. 10 - pag. 32).

La composizione biochimica dei frutti durante la maturazione, dopo due mesi di frigoconservazione, è presentata in figura 3 - pag. 26. Si noti il buon contenuto zuccherino e le maggiori concentrazioni di acidi organici rispetto a William. Gli assaggiatori hanno riscontrato per i frutti una polpa, particolarmente bianco-brillante, e, quando il frutto è tagliato, molto resistente all'imbrunimento (ossidazione). L'elevato contenuto di acido citrico, potente antiossidante naturale, potrebbe spiegare questa caratteristica, proprietà interessante specie per il prodotto da trasformare.

Da una sintesi dei dati sensoriali rilevati (basati su oltre 250 assaggi QDA eseguiti da 36 panelisti, integrati da test triangolari condotti da generici consumatori) emerge che la selezione ISF-FO 80-104-72 presenta carat-



**Figura 8** - Frequenze giudizi di gradimento espressi da consumatori generici su frutti di ISF FO 80-57-83 proposti dopo circa 2 mesi di frigoconservazione

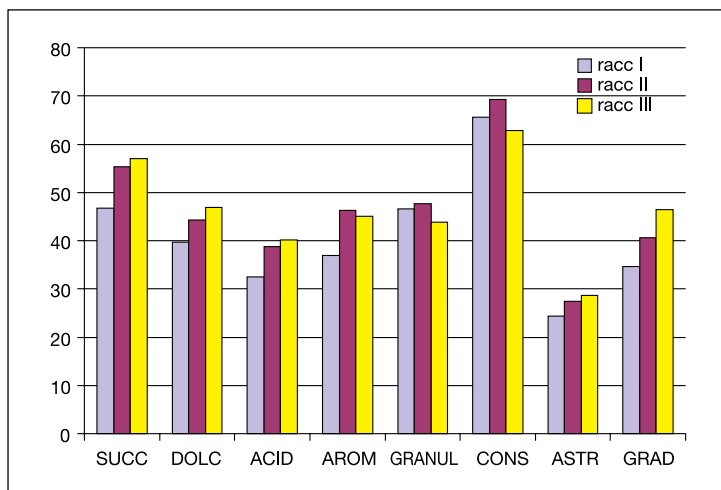


**Figura 9** - Profili sensoriali di ISF-FO 80-104-72, confronto tra frutti raccolti in tre diverse date (I, II e III) e proposti più (A) o meno (B) consistenti

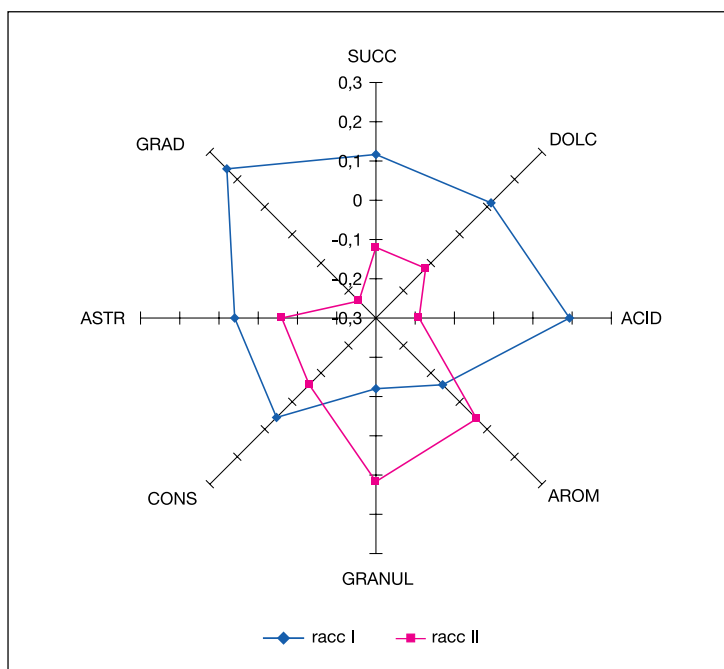
teristiche gustative più che accettabili, anche se nei test comparativi raramente è risultata competitiva rispetto alle cultivar standard. Il gradimento cresce ritardando la raccolta, e appare altamente correlato con l'aromaticità. Anche dallo studio delle correlazioni tra i parametri sensoriali, si è verificato che il para-

metro più importante nel determinare il gradimento è l'aromaticità ( $r=0,558$ ;  $p<0,0001$ ), seguita da dolcezza e succosità. Le pratiche agronomiche potrebbero quindi essere orientate nella direzione di potenziare questi caratteri. Tuttavia il frutto ha polpa croccante, sapore dolce-acidulo ed è tendenzialmente poco aromatico, piuttosto distante quindi dalle caratteristiche tipiche della pera Emilia-Romagna IGP commercializzata in novembre-dicembre, potrebbe tuttavia essere appropriato, ad esempio, per un mercato Nord Europeo.

**ISF-FO 84-3960-42**  
Ancora una selezione ottenuta dall'ISF di Forlì, tuttora in corso di valutazione pre-licenziamento, che viene raccolta nella prima metà di settembre. Questa selezione è entrata in produzione nei campi sperimentali solo nel 2002, quindi i dati qui presentati hanno un valore solo indicativo. Tuttavia, poiché la selezione ha ottenuto valutazioni molto positive, si è scelto di presentare comunque i profili sensoriali (fig. 11 - pag. 32). La selezione, come detto ha avuto valutazioni di gradimento globale piuttosto elevate (57 per la prima raccolta, 51 per la seconda). Dalle analisi chimico-fisiche si rileva come il frutto abbia un elevato tenore zuccherino (fig. 12 - pag. 33). Non si riscontrano singoli caratteri gustativi che nell'analisi delle correlazioni, abbiano un'influenza elevata nel determinare il gradimento. La caratteristica



**Figura 10** - Media dei giudizi di intensità per i diversi caratteri sensoriali e del gradimento globale di frutti di ISF-FO 80-104-72 raccolti in tre diverse date (I, II, III) distanziate di una settimana



**Figura 11** - Profili sensoriali di ISF-FO 80-3960-42, confronto tra frutti raccolti in due diverse date (I, II) distanziate di una settimana

del frutto che ne massimizza l'apprezzamento è di possedere un buon equilibrio tra i vari parametri organolettici. Il frutto, proposto in condizioni ottimali di consumo (data di raccolta, momento di commercializzazione, shelf life) ha una particolare polpa fondente, che consente di ben apprezzare le varie note gustative.

### Conclusioni

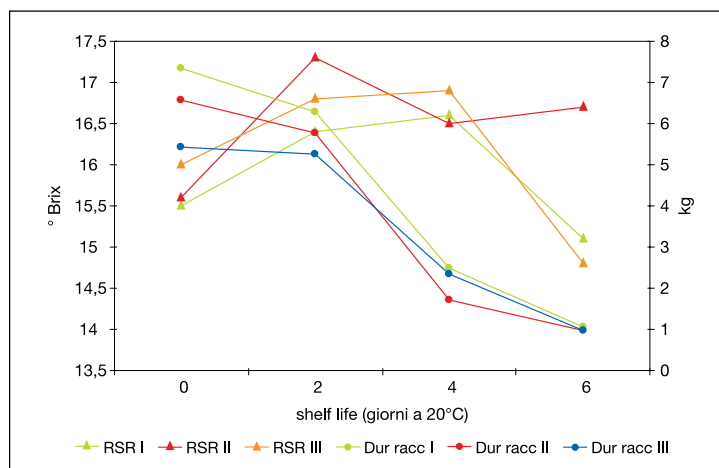
Attualmente appare indispensabile nel campo dell'innovazione in frutticoltura una migliore comprensione di che cosa è la qualità dal punto di vista del consumatore (Shewfelt, 1999; Porretta 2000). Le ricerche sviluppate dall'unità operativa dell' IBIMET-CNR propongono un'approfondita caratterizzazione qualitativa dei frutti di nuove cultivar di pero resistenti a colpo di fuoco batterico.

Gli studi poliennali condotti hanno consentito di identificare tre selezioni (dell'ISF di Forlì) ed una cultivar, Harrow Sweet, dotate di requisiti qualitativi interessanti, con buone possibilità di inserimento nella produzione regionale.

Le loro differenti epoche di maturazione possono essere utili per coprire il calendario delle raccolte dalla metà di luglio fino alla metà di settembre, offrendo ai produttori buone opportunità di programmazione agronomica. Le diverse tipologie e la conservabilità dei frutti consentono differenziate opportunità di commercializzazione.

Se si confermeranno gli attributi

ti di resistenza, le Istituzioni regionali potranno consigliare e sostenere l'introduzione di tali nuove cultivar, come strumento per il contenimento e la prevenzione della diffusione di *Erwinia amylovora*. Poi saranno i produttori a scegliere se può essere conveniente inserire cultivar *Erwinia*-resistenti nei frutteti per contrastare future recrudescenze dalla malattia, naturalmente con il supporto del marketing, che potrà contribuire ad un rinnovamento varietale anti-*Erwinia*, prospettando per le cultivar migliori una adeguata promozione commerciale.



**Figura 12** - Residuo secco rifrattometrico (RSR, °Brix) e durezza della polpa (kg) durante la maturazione post-frigoconservazione di frutti ISF-FO 84-3960-42

## ABSTRACT

### Quality of fire blight resistant pear cultivars and selections

Pear cultivars and selections known for their tolerance to fire blight were subjected to tests aimed to determine their sensorial traits and to evaluate their possibility to be introduced in culture in Emilia-Romagna. Sensorial tests were performed on visual and eating traits. Pear assessors were selected and trained for performing panel-test evaluation of fruits of standard and new cultivars to determine traits related to acceptance and quality. Among the tested cultivar Harrow Sweet was highly appreciated, particularly for aroma and sweetness. Fruits harvested early kept high quality traits until mid January. The very precocious (- 30 days Bartlett) selection "ISF-FO 80-57-83" had excellent sensory evaluations, because of its fine flavour. Two more ISF selections "80-104-72" and "84-3960-82" received positive evaluations. If the high levels of resistance to fire blight that led to their selection will be confirmed, growers will have increased possibilities to produce high quality pears even in areas contaminated by the pathogen.

### Bibliografia

Bartolozzi F., Bertazza G., Bassi D., Cristoferi G., 1992. *Simultaneous GLC determination of soluble sugars and organic acids as Trimethylsilyl derivatives in apricot*. J. Chromatography A 758, 99-107.

Brunner C., 1997. "Harrow

Sweet": una pera da seguire e incoraggiare. Frutticoltura 3, 43-45.

Dever M.C., MacDonald R.A., Cliff M.A., Lane W.D., 1996. *Sensory evaluation of sweet cherry cultivars*. Hortscience. 31(1), 150-153.

Eccher Zerbini P., 2002. *The*

*quality of pear fruit*. Acta Horticulturae 596, in press.

Elgar H.J., Watkins C.B., Murray S.H., Gunson F.A., 1997. *Quality of 'Buerre Bosc' and 'Doyennè du Comicè' pears in relation to harvest date and storage period*. Postharvest Biology and Technology 10, 29-37.

- Ferri G., Della Casa R., 2000. *La promozione commerciale delle pere in Italia e in Europa*. Frutticoltura 9, 14-16.
- Fornaciari M., 2000. *Il colpo di fuoco. Una convivenza difficile*. Edagricole, Bologna.
- Genard M., Souty M., Holmes S., Reich M., Breuils L., 1994. Correlations among quality parameters of peach fruit. *Journal of the science of food and agriculture* 66 (2), 241-245.
- Kappel F., Fisher-Fleming R., Hogue E.J., 1995. Ideal pear sensory attributes and fruit characteristics. *Hortscience* 30 (5), 988-993.
- Le Lézec M., 1998. *Qualcosa di nuovo nel regno delle pere*. Frutticoltura 9, 16-20.
- Le Lézec M., Laurens F., Michélesi J-C., Lecomte P., 1998. *Suscettibilità varietale del melo e del pero al "colpo di fuoco batterico"*. Frutticoltura 3, 9-14.
- Neri F., Vassalli P., Brigati S., 1997. *Studio della qualità organolettica delle pere*. Frutticoltura 3, 65-68.
- Porretta S., 2000. *Analisi Sensoriale & Consumer Science*. Chiarotti Editori. Pinerolo.
- Predieri S., 1997. *Analisi sensoriale della frutta, ovvero: ma che sapore ha la qualità?* Frutticoltura 11, 33-35.
- Predieri S., Bogoni M., 1999. *Impiego dell'analisi sensoriale nella valutazione di nuove selezioni di pero*. Workshop "La qualità dei prodotti ortofrutticoli: l'analisi sensoriale". Bologna 12-12-1996, 103-113.
- Predieri S., Rivalta L., 2000. *Nuove varietà di pero per recuperare biodiversità merceologico-qualitativa e affrontare nuovi mercati*. Frutticoltura 9, 71-82.
- Predieri S., Missere D., Gatti E., 2002. *Studies on sensory evaluation and quality of pear fruits in Emilia-Romagna*. Acta Horticulturae 596 (in press).
- Predieri S., Gatti E., 2001. *Pere: qualità garantita dall'analisi sensoriale*. Agricoltura 29 (11), 36-38.
- Rapparini F., Predieri S., 2003. *Volatile components from fruits of different pear cultivars*. Acta Horticulturae 596 (in press).
- Rapparini F., Predieri S., 2003. *Pear Fruit Volatiles*. Horticultural Reviews 28, 237-323.
- Ravaioli A., Scalise C., 2001. *Scheda Prodotto: Pera*. Corriere Ortofrutticolo 7/8, 57-64.
- Rivalta L., Dradi M., 1998. *Varietà e selezioni di pero resistenti al "colpo di fuoco batterico"* L'Informatore Agrario 45, 55-58.
- Rosati C., Belouin A., Chartier R., Dradi M., Lecomte P., Le Lézec M., Rivalta L., 2002. *Evaluation of susceptibility to fire blight of seven Italian pear advanced selections and varieties from ISF-Forlì, Italy*. Acta Horticulturae 596 (in press).
- Sansavini S., Asirelli A., Lugli S., Rivalta L., 1997. *Le cultivar di pero e nashi*. Frutticoltura 4, 39-44.
- Sansavini S., 1998. *Timori per il futuro della pericoltura italiana*. Frutticoltura 9, 9-14.
- Shewfelt R.L., 1999. *What is quality?* Postharv. Biol. Technol. 15, 197-200.
- Suwanagul A., Richardson D.G., 1998. *Identification of headspace volatile compounds from different pear varieties*. Acta Horticulturae 475, 605-623.
- Thibault B., Lecomte P., Hermann L., Belouin A., 1987. *Assessment of the susceptibility to Erwinia amylovora of 90 varieties or selections of pear*. Acta Horticulturae. 217, 305-309.





# EPIDEMIOLOGIA



## VARIABILITÀ GENOMICA DI CEPPI DI *ERWINIA AMYLOVORA* ASSOCIATI A INFEZIONI SU PIANTE OSPITI DIVERSE

**P. Minardi**

Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-forestali, Università degli Studi di Padova

**M. Morbio, U. Mazzucchi**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

### Introduzione

Uno studio comparativo dei genomi di ceppi di *Erwinia amylovora* isolati nelle provincie di Ferrara e Modena ha evidenziato che l'epidemia del colpo di fuoco su pero nel 1997 in Emilia Romagna è stata verosimilmente causata da batteri di una singola linea clonale discendente da quella associata ai primi focolai regionali del 1994 (Traversa *et al.*, 2000). In una linea clonale di un batterio, le diversità genetiche si possono verificare per mutazioni, per trasferimento orizzontale di geni (via plasmidi o elementi mobili) e per migrazioni (Leung *et al.*, 1993). Inoltre, le variazioni genetiche di una linea clonale sono soggette alla pressione selettiva dell'ambiente e alla deriva genetica. La pressione selettiva della pianta ospite, mediante le sue barriere di difesa, rappresenta senza dubbio la forza evolutiva con un ruolo preminente nel plasmare la struttura della popolazione di un organismo fitopatogeno; d'altra

parte anche la deriva genetica opera molto spesso sulle popolazioni come conseguenza del numero assai esiguo di individui che sopravvivono nelle sorgenti primarie di inoculo (ad es. cancri svernanti per *Erwinia amylovora*) e nei materiali vivaistici asintomatici di disseminazione (Traversa *et al.*; Ceroni *et al.*, pag. 45 e 53). Durante i monitoraggi del 1995 e 1996 nel territorio regionale attorno ai primi focolai si era notato che i casi riguardavano quasi esclusivamente peri (Finelli *et al.*, 1996) e che al contrario meleai potenzialmente suscettibili adiacenti ai focolai rimanevano indenni. Negli anni successivi al 1997 è progressivamente aumentata la frequenza di casi di colpo di fuoco su biancospino e melo (tab. 1 Ponti *et al.*, pag. 7; Rapporti del servizio Fitosanitario Regionale, 2002). La pressione selettiva operata dai nuovi ospiti potrebbe aver modificato nel corso degli anni la struttura della popolazione della linea clonale iniziale. Pertanto, è stata saggiata l'ipo-

tesi che dalla linea clonale si siano originate delle linee secondarie diverse per caratteri patogenetici selezionati dai nuovi ospiti o sia sopraggiunta e si sia propagata una nuova linea clonale. Inoltre, per saggiare l'ipotesi di continuità della linea clonale originale, è stato necessario studiare variazioni del grado di virulenza dei ceppi, conoscenza essenziale per valutare i prodotti finali del miglioramento genetico in corso nello stesso programma di ricerca regionale (Rivalta *et al.*, pag. 13).

Per identificare e classificare i ceppi batterici e per evidenziare le relazioni filogenetiche interspecifiche e intra-specifiche, negli ultimi anni è stata valutata la diversità genetica attraverso la comparazione di profili elettroforetici del DNA genomico esprimendo eventuali polimorfismi evidenziati come presenza o assenza di bande a seguito di digestione enzimatica oppure di amplificazione mirata di tratti selezionati o di entrambe le procedure. Profili differenti sono correlati

**Tabella 1** - Ceppi di *Erwinia amylovora* associati alle infezioni naturali di melo, biancospino ed altre piante ospiti in diverse province dell'Emilia-Romagna

PIANTA OSPITE	PROVINCIA				
	Bologna	Ferrara	Modena	Reggio Emilia	Ravenna
Melo	362M 366M 404M 767/3M	283M 287M 296M 318M 4050M		327M 346M	400M
Biancospino	319B 363B 781/2B	414B 618/1B		245B 294B 328B 418B	373B 382B 384B
Cotogno	323C				
Azzeruolo					420A
Pyracanta	782/1Py				
Photinia			295Ph		

positivamente a differenze genomiche tra i batteri. Un profilo genomico diviene così un'impronta da usare, dopo analisi numerica, per caratterizzare un ceppo o un campione di ceppi rappresentativi di una popolazione. Nello studio del polimorfismo del DNA viene usata, tra le altre, una moderna tecnica molecolare: il polimorfismo per lunghezza di frammenti di restrizione amplificati (AFLP, dall'inglese *Amplified Fragments Length Polymorphism*) basata sulla reazione a catena della DNA-polimerasi (PCR).

Per studiare la struttura genetica della popolazione di *E. amylovora* è stata impiegata la tecnica AFLP, applicabile all'intero DNA genomico, avente un alto potere di risoluzione interspecifico e intra-specifico (Janssen *et al.*, 1996; Minardi *et al.*, 2001). Inoltre questa tecnica

non richiede una preventiva conoscenza di sequenze, né la sintesi di primer specifici ed è considerata più efficiente della RAPD per il minore numero di analisi necessario per discriminare un elevato numero di ceppi altamente correlati e per l'elevato grado di riproducibilità e risoluzione garantiti dalle condizioni stringenti della PCR e dall'impiego di gel di poliacrilammide (Janssen *et al.*, 1996). Inoltre, l'AFLP permette di modulare il numero di bande ottenibili in base alla complessità del genoma e alle specifiche esigenze di analisi, attraverso la scelta della coppia di enzimi di restrizione e all'utilizzo di primer aventi una o più basi selettive.

In questo lavoro si presentano i risultati di un'analisi comparativa mediante AFLP dei DNA genomici di una collezione di ceppi isolati da differenti piante ospiti

nel periodo 1997-2001 nella regione Emilia-Romagna.

## Materiali e metodi

### Colture batteriche e piante ospiti

Nel periodo 2000/2001, in alcune province dell'Emilia-Romagna, sono state isolate nel laboratorio di batteriologia del Servizio Fitosanitario Regionale colture batteriche associate a infezioni naturali di piante ospiti diverse (*tab. 1*). Conformemente alle indicazioni del Decreto di Lotta Obbligatoria (DM 27/3/96 GU, 81, 9-14 del 5/4/1996), l'identità dei ceppi di *E. amylovora* è stata confermata di volta in volta dal laboratorio di fitobatteriologia del DiSTA di Bologna. La purificazione degli isolati è stata effettuata in base alla tipica morfologia leviforme delle colonie su NSA con saccarosio 5%. Per l'identificazione sono stati considerati i seguenti caratteri: mancata produzione di pigmento fluorescente su KB, induzione di necrosi ipersensitiva (HR) in piante di tabacco e di sintomi tipici su perine immature. Inoltre, l'identità degli isolati è stata confermata da analisi PCR mediante i primer A (5'-CGG TTT TTA ACG CTG GG-3') e B (5'-GGG CAA ATA CTC GGA TT-3') (McManus & Jones, 1995). La concentrazione finale dei primer nella miscela di reazione è stata di 0,5µM. Il profilo tempo-temperature è stato il seguente: iniziale denaturazione del DNA a 94°C per 5 min seguita da 37 cicli ciascuno costi-

tuito da 1 min a 94°C, 2 min a 52°C e 2 min a 72°C; alla successiva estensione finale del DNA a 72°C per 15 min i campioni sono stati mantenuti a 4°C. I suddetti primer hanno permesso l'amplificazione specifica di un frammento di 1 kb in tutti gli isolati di *E. amylovora* analoga a quella dei ceppi del ceppo di *E. amylovora* usato come controllo positivo. Nei controlli negativi non si è mai verificata amplificazione (H<sub>2</sub>O; *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* NCP-PB2664; *Ralstonia solanacearum* PD2762). Le colture pure sono state conservate a -50°C. Il ceppo di *E. amylovora* OMP-BO 1077/7, isolato da pero nel 1994 e virulento su pero, è stato usato come ceppo di riferimento e conservato congelato a -50°C. Il ceppo è stato allevato di routine su strisci di YDC-agar a 27°C per 48 ore.

### Estrazione del DNA genomico

Il DNA di *E. amylovora* è stato estratto essenzialmente secondo il protocollo di Ausebel *et al.* (1987) che prevede l'uso di cetil-trimetil-ammonio bromuro (CTAB). Per l'analisi AFLP sono state usate solo preparazioni di DNA con A<sub>260/280nm</sub> di 1,8-2,0 e il DNA è stato diluito in TE fino ad una concentrazione finale di 50 ng/μl.

### Analisi AFLP

**1. Digestione del DNA con enzimi di restrizione.** In questo lavoro la tecnica AFLP è stata applicata essenzialmente se-

condo il metodo di Vos *et al.* (1995). Per ciascun campione 250 ng sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *EcoRI* ed *MseI* per 2 ore a 37°C usando un incubatore a cicli termici Perkin Elmer 2400. In un volume finale di 25μl, ciascuna reazione conteneva 5 ml di tampone 5X RB, 0,5 μg/μl di BSA, 2,5 U di ciascun enzima di restrizione, e 250 ng di DNA. Al termine della digestione gli enzimi sono stati denaturati a 70°C per 15 minuti.

**2. Reazione della ligasi.** Nella successiva reazione della ligasi, il legame dei frammenti di restrizione è stato fatto nel suddetto incubatore a 37°C per 3 ore usando i seguenti adattatori: per *EcoRI*: AAT TGG TAC GCA GTC TAC e per *MseI*: TAC TCA GGA CTC ATC. A ciascun campione di DNA digerito, sono stati aggiunti 25 μl contenenti 12 μl di 2X *Ligation buffer*, 2,5 picomoli dell'adattatore per *EcoRI*, 20 picomoli dell'adattatore per *MseI* e 1U di T<sub>4</sub>-Ligasi. Al termine della reazione, l'enzima è stato denaturato a 70°C per 15 minuti.

**3. Amplificazione del DNA (PCR).** Dopo la reazione della ligasi, ciascun campione è stato diluito 10 volte con TE. 5 μl di ciascun DNA template diluito 1:10 è stato amplificato nell'incubatore a cicli termici dopo l'aggiunta di 5 μl di 10X PCR Buffer, 4 μl di dNTPs 2,5 mM, 80 ng di ciascun primer selettivo E03 (per *EcoRI*: sequenza 5'-GTA GAC TGC GTA CCA ATT CG-3') e M02 (per *MseI*: sequen-

za 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3') ed 1U di *Taq* DNA polimerasi per un volume finale di 50 μl. Il profilo tempo-temperatura è stato il seguente: 94°C per 30 sec, 30 cicli a 94°C per 30 sec, a 55°C per 1 min e a 72°C per 1 min. Dopo aver controllato il risultato dell'amplificazione su un gel di agarosio al 2%, a 35 μl di ciascun campione sono stati aggiunti 45 μl di colorante formammide. I campioni sono stati conservati a -20°C.

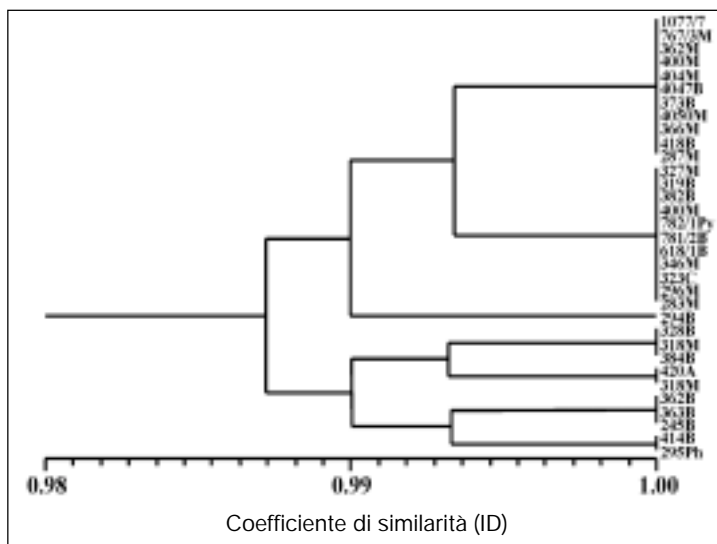
**4. Elettroforesi degli amplificati.** La separazione dei prodotti dell'amplificazione specifica è stata effettuata su gel di poliacrilammide al 4% secondo il metodo di Janssen *et al.* (1996). La percentuale di acrilammide è stata ridotta (dal 5 al 4%) nel gel AFLP in modo da favorire la risoluzione degli ampliconi compresi tra i 1000 e i 600 bp. Per questa analisi è stata usata una cella elettroforetica Nugeneration™ (modello S2S, per gel della dimensione di 35x45 cm con 77 pozzetti). Prima di essere caricati nel gel, 5 μl di ciascun campione sono stati denaturati a 95°C per 5 min; come marcatore dei pesi molecolari è stato usato il Gene ruler 100 bp (Genenco). La corsa elettroforetica è stata effettuata ad una potenza costante di 70 W per circa 2 ore. La colorazione degli amplificati con nitrato di argento è stata effettuata seguendo essenzialmente il metodo di Bassam *et al.* (1991).

**5. Analisi numerica dei profili genomici.** Ciascun frammento di DNA visibile come ban-

da sul gel, è stato identificato per mezzo di una accurata osservazione visiva. Sono state prese in considerazione tutte le bande visibili, che comparivano in modo distinto nelle ripetizioni. Per ciascun ceppo batterico con profilo identico ottenuto con AFLP è stata costruita una matrice rettangolare binaria designando con 1 la presenza di una banda e con 0 l'assenza di una determinata banda. Le matrici rettangolari preparate usando il programma di software Microsoft Excel sono state elaborate con il programma di software NTSY-Spc (dall'inglese *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versione 2.02h. Innanzitutto, dalle matrici rettangolari sono state ottenute delle matrici triangolari usando il programma SIMQUAL ed il coefficiente di similarità di Dice ( $S_D$ ) (Sneath e Sokal 1973). Una volta costruita la matrice di similarità, è stato usato il metodo UPGMA (dall'inglese *Unweighted Paired Group Method using Arithmetic means*, per costruire i dendrogrammi relazionali usando il programma SAHN di analisi *cluster* ed il programma TREE.

### Risultati e discussione

I profili genomici ottenuti hanno chiaramente evidenziato polimorfismi. Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte e i frammenti di DNA polimorfici sono risultati identici. Nei profili AFLP di tutti i ceppi è stata evidenziata una media di 110 frammenti.



**Figura 1** - Dendrogramma illustrante i coefficienti Dice di similarità (ID) tra i profili AFLP dei ceppi di *Erwinia amylovora* indicati in *tabella 1*. Il ceppo OMP-BO 1077/7 è stato usato come ceppo di riferimento rappresentante il clone presente su pero in Emilia-Romagna fin dal 1994

Nel ceppo di riferimento OMP-BO 1077/7, 76 bande di ampliconi compresi tra 1000 e 80 bp, i più distinti e riproducibili, sono stati selezionati per la costruzione delle matrici binarie dell'analisi numerica. Le bande al di fuori di questi pesi molecolari non sono state prese in considerazione perché la loro risoluzione non era chiara. La matrice rettangolare ottenuta dalla lettura del gel è stata elaborata come descritto nei materiali e metodi. Stimando la distanza genetica tra i vari ceppi con il coefficiente di similarità DICE è stato costruito un dendrogramma illustrato in *figura 1*. Per le piante ospite considerate i profili dei ceppi sono risultati assai simili tra loro. Infatti, il coefficiente Dice più basso è risultato es-

sere pari a 0,987.

L'analisi AFLP applicata ad un ampio campione di ceppi di *E. amylovora* associati nel 1997 alle epidemie in due pereti nelle provincie a più alta densità di casi ufficiali (Battilani *et al.*, 1999) ha mostrato un grado di somiglianza reciproca dei ceppi superiore a 0,98 (Traversa *et al.*, 2000), condiviso anche dal ceppo associato nel 1994 ai primissimi focolai di colpo di fuoco in regione usato come riferimento nella comparazione. L'alto valore dell'indice di somiglianza con il ceppo responsabile dei primi focolai indica che le popolazioni di *E. amylovora* associate alle epidemie del 1997 siano derivate da uno stesso clone; in altre parole si è ritenuto assai probabile che gli isolati del 1997 fossero

tutti discendenti dalle cellule di *E. amylovora* introdotte per prime in regione. In batteriologia per clone in senso stretto si definisce una popolazione batterica derivante da una singola cellula madre (Sneath, 1992). Ignorando l'origine del primo focolaio di colpo di fuoco, non è possibile sapere se la struttura della popolazione di *E. amylovora* in regione costituisse nel 1997 un clone in senso stretto o fosse costituita da più linee secondarie divergenti da un unico clone (Maynard *et al.*, 1993). Se si accetta l'ipotesi che *E. amylovora* sia stata introdotta in regione associata a materiale vivaistico importato asintomatico, si può ritenere che l'inoculo iniziale fosse costituito da una assai piccola popolazione. Dopo due anni, pertanto, la discendenza non era un clone in senso stretto, ma verosimilmente un insieme di linee secondarie divergenti da un clone originario. Nell'ambito di un clone la variabilità genetica può esprimersi in più linee diversificate e, nel caso degli organismi fitopatogeni, anche per adattamento ad un dato ospite (Kohn, 1994).

L'analisi AFLP più selettiva effettuata su un'ampia collezione di ceppi provenienti da ospiti diversi dal pero, isolati in anni successivi al 1997 in località diverse, ha mostrato di nuovo un alto grado di somiglianza reciproca dei ceppi superiore a 0,98. Evidentemente l'analisi AFLP non ha evidenziato una differenza tra i ceppi né in base alla specie ospite da cui sono stati isolati,

né in base alla località e all'anno di isolamento.

L'AFLP come l'analisi RAPD sono tecniche molecolari che permettono di ottenere dei profili di ampliconi di tratti distribuiti a caso su tutto il genoma. Nel caso dell'AFLP, tuttavia, i tratti da amplificare sono selezionati in base alla specificità degli enzimi di restrizione prescelti tanto che l'acronimo della tecnica dovrebbe essere più propriamente SRFA (*Selective Restriction Fragment Amplification*; Jansen, 2001).

Un agente di malattie infettive va soggetto a pressione selettiva intra-ospite e inter-ospite. Nel caso dei batteri fitopatogeni, la selezione intra-ospite ha luogo sulle cellule batteriche dall'ancoramento all'evasione, particolarmente durante la progressiva colonizzazione dei tessuti; la risposta del patogeno alla selezione intra-ospite condiziona la sua virulenza. La selezione inter-ospite ha luogo sulle cellule batteriche dalla liberazione dell'inoculo dall'ospite malato al momento della trasmissione all'ospite sano; la risposta del patogeno alla selezione inter-ospite condiziona il suo grado di trasmissibilità.

Le pressioni selettive intra-ospite e inter-ospite nelle popolazioni di *E. amylovora* possono comportare modificazioni delle frequenze geniche e/o genotipiche con possibili effetti anche sulla virulenza (Leung *et al.*, 1993). La selezione dell'ospite ha effetti sulla sub-struttura delle popolazioni di un patogeno, incide su

importanti variazioni ecologiche, ma non ha effetti su marcatori neutrali. Tratti distribuiti a caso nel genoma, selezionati per sequenze di riconoscimento di enzimi di restrizione, costituiscono una serie di marcatori neutrali e i profili dei loro ampliconi possono definirsi linee molecolari. In una popolazione linee molecolari di marcatori neutrali di regola non sono correlate ai patotipi (Milgroom & Fry, 1997). Analisi molecolari sulla diversità genetica intra-specifica di *E. amylovora* sono state fatte comparando profili di restrizione ottenuti per elettroforesi pulsata (PFGE; Bazzi *et al.*, 1999) e profili di ampliconi ottenuti per PCR da sequenze REP, ERIC e BOX (Mc Manus & Jones, 1995), da tratti casuali di genoma (RAPD; Momol *et al.*, 1997) e da tratti di DNA 16S-23S (ARDREA; Momol *et al.*, 1999), incluse le sequenze intergeniche (ITS-RA; Jeng *et al.*, 1999). La PFGE del DNA genomico tagliato in rari punti con *XbaI* su una collezione di ceppi di aree differenti in Europa ha evidenziato l'esistenza di almeno 5 linee molecolari (RFLP) associate ad aree geografiche (Bazzi *et al.*, 1999). Le analisi REP-PCR, RAPD, ARDREA e ITS-RA hanno differenziato i ceppi da lampone (*Rubus* spp.) da quelli da melo e pero, i ceppi da melo e pero nordamericani ed europei da quelli giapponesi da pero (indice di somiglianza intergruppo  $\leq 0,6$ ), ma non i ceppi neozelandesi, australiani e inglesi da quelli statunitensi (indice di somiglianza intra-

gruppo  $\approx 1$ ) (Momol *et al.*, 1999). Esclusi i ceppi da lampone e da pero giapponese, nessuna di queste analisi è riuscita ad evidenziare in Nord-America ed in Europa diversità genetiche associate alla pianta ospite di provenienza, coltivata o spontanea, e/o al loro grado di virulenza. Questi dati sono in accordo con la nostra analisi che non ha permesso di differenziare i ceppi regionali in base alla pianta ospite di origine. Tra le attuali tecniche producenti impronte genomiche, l'AFLP è probabilmente quella più affidabile e ad alto potere di risoluzione (Mueller & Wolfenbarger, 1999). La natura e il numero dei marcatori espressi dalle impronte genomiche sono di cruciale importanza per analizzare le strutture delle popolazioni dei microrganismi fitopatogeni (Leung *et al.*, 1993). L'AFLP, come la PFGE

e la RAPD, produce marcatori neutrali cioè non soggetti agli effetti della selezione intra- e inter-ospite. I gruppi omogenei riconoscibili dalle analisi basate su marcatori neutrali costituiscono linee molecolari che possono o no essere correlate ad adattamenti ad altrettante piante ospiti (Leung *et al.*, 1993). Pertanto ci si può attendere una correlazione solo in caso di popolazioni altamente clonali (Milgroom & Fry, 1997). L'analisi AFLP presentata in questo lavoro ha evidenziato una unica linea molecolare condivisa da ceppi provenienti da ospiti diversi. Dai dati ottenuti emerge la necessità di progettare per questa tecnica marcatori non neutrali, in particolare connessi alla patogenesi e/o alla trasmissione, soggetti alla pressione selettiva intra- e/o inter-ospite.

I nostri risultati indicano che la

maggior parte del genoma di *E. amylovora* è altamente conservato e che, finora, la sua popolazione nella regione Emilia-Romagna è assai poco diversificata geneticamente. Questi dati sono in accordo con l'osservazione che i profili genomici di una popolazione di *E. amylovora* restano costanti per parecchi anni nelle ampie aree dove è presente il colpo di fuoco (Jock *et al.*, 2002).

L'adattamento ad altri ospiti potrebbe comportare modificazioni nella frequenza genica e/o genotipica nelle sub-popolazioni di *E. amylovora* con possibili effetti anche sulla virulenza (Minardi *et al.*, 2000). L'ipotesi può essere verificata mediante analisi comparativa delle sequenze di geni connessi alla virulenza, verosimilmente oggetto di diversa pressione selettiva negli ospiti differenti.

#### **ABSTRACT Analysis of genetic variability among strains of *Erwinia amylovora* isolated from different host plants**

In the Emilia-Romagna region, after the 1997 epidemics on pear, there has been a large increase in the official cases of fire blight on different host plants, especially apple. This research investigates whether the clonal lineage of *Erwinia amylovora* introduced in 1994 diversified itself for the selective pressure on the new host plants or whether another clonal lineage was introduced. Genetic variations among *Erwinia amylovora* strains isolated in the Emilia-Romagna region on different host plants during the period 1997-2001 were studied using the amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. AFLP fingerprints revealed that all the strains belong to the same clonal lineage (similarity coefficient > 0.98) indistinguishable by that of the original strain introduced in 1994.



## Bibliografia

- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.C., Smith J.A., Struhl K. eds., 1989. *Current Protocols in Molecular Biology*. Vol. 1. Pages 2.4.1-2.4.5, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, NY.
- Bassam B. J., Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M., 1991. *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels*. Analytical Biochemistry 196, 80-83.
- Battilani P., Mazzoli G.L., Mazzucchi U., 1999. *A geophytopathological study of fire blight in a pear growing-area of the Po valley (Northern Italy)*. Acta Horticulturae 489, 93-97.
- Bazzi C., Merighi M., Zhang Y., Yock S., Geider K., Lopez M.M., 1999. *Differentiation of Erwinia amylovora strains isolated in Southern Europe by PFGE analysis*. Acta Horticulturae 489: 197-200.
- Finelli F., Calzolari A., Mazzucchi U., 1996. *E' possibile eradicare il colpo di fuoco? L'esperienza dell'Emilia Romagna*. L'Informatore Agrario 52 (18), 63-67.
- Janssen J.D., 2001. *Selective restriction fragment amplification by AFLP™*. In: *New Approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Ed. i Dijkshoorn L., Towner K.J., Struelens M.; Elsevier, Amsterdam, 177-210.
- Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K., 1996. *Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy*. Microbiology 142, 1881-1893.
- Jeng R.S., Beliaeva L., Hubbes M., Svircev A.M., Myers A.L., 1999. *The use of 16S and 16S-23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate Erwinia amylovora*. Acta Horticulturae 489, 49-54.
- Jock S., Kim W.-S., Geider K., 2002. *Molecular comparison and differentiation of Erwinia strains causing fire blight and Asian pear blight*. Acta Horticulturae 590, 423-427.
- Kohn L.M., 1994. *The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations*. Canadian Journal of Botany 73, S1231-S1240.
- Leung H., Nelson R.J., Leach J.E., 1993. *Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria*. Advances in Plant Pathology 10, 157-205.
- Maynard J.S., Smith N.H., O'Rourke M., Spratt B.G., 1993. *How clonal are bacteria?* Proceedings of the National Academy of Sciences USA 90, 4384-4388.
- McManus P.S., Jones A.L., 1995. *Detection of Erwinia amylovora by nested PCR and PCR-Dot-Blot and reverse-blot hybridizations*. Phytopathology 85, 618-623.
- Milgroom M.G., Fry W.E., 1997. *Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management*. Advances in Botanical Research 24, 1-30.
- Minardi P., Babini, V. Mazzucchi U., 2000. *Genetic diversity of Erwinia amylovora subpopulations using AFLP fingerprinting: role of different host plants*. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Congress of the European Foundation of Plant Pathology; Taormina, 18-22 settembre.
- Minardi P., Tampieri C., Friscina A., Mazzucchi U., 2001. *Genomic analysis of Erwinia amylovora isolates associated to official cases of fire blight in Veneto region*. Journal of Plant Pathology 83 (2), 237.
- Momol E.A., Momol M.T., Lamboy W.F., Norelli J.L., Beer S.V., Aldwinckle H.S., 1997. *Characterization of Erwinia amylovora strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs)*. Journal of Applied Microbiology 82, 389-98.
- Momol E.A., Momol M.T., Norelli J.L., Beer S.V., Burr T.J., Aldwinckle H.S., 1999. *Relatedness of Erwinia amylovora strains based on amplified 16S-23S ribosomal DNA restriction*

- enzyme analysis-ARDREA*. Acta Horticulturae 489, 55-59.
- Mueller U.G., Wolfenbarger, L.L., 1999. *AFLP genotyping and fingerprinting*. TREE 14 (10), 389-394.
- Sneath P.H.A., 1992. *International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision)*. American Society for Microbiology, Washington D.C., Stati Uniti, 189 pp.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R., 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco.
- Traversa F., Minardi P., Stefani E., Mazzucchi U., 2000. *Erwinia amylovora isolates associated with 1997 fireblight epidemic in the Po valley derived from the same clone*. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Congress of the European Foundation of Plant Pathology, Taormina, 18-22 settembre, pp. 71-73.
- Vos P., Hogers, R. Bleeker, M. Reijjans, M. Van de Lee, T. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J., Peleman, J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research 23 (21), 4407-4414.

## TEMPI DI SOPRAVVIVENZA DI *ERWINIA AMYLOVORA* SUI FRUTTI E SUI LORO CONTENITORI NEL PERIODO POST-RACCOLTA

**P. Ceroni, V. Babini, F. Traversa, U. Mazzucchi**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

**P. Minardi**

Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-forestali, Università degli Studi di Padova

### Introduzione

Le cellule di *Erwinia amylovora* possono sopravvivere nel periodo post-raccolta in nicchie biotiche e abiotiche, essere disseminate a breve, media e grande distanza e, in situazioni favorevoli, fungere da inoculo primario (Roberts *et al.*, 1998; Sobiczewski *et al.*, 1997). *E. amylovora* riesce a sopravvivere nelle mummie, nei ritagli di potatura, nei frutti raccolti e sui materiali di imballaggio. Occasionalmente *E. amylovora* può contaminare i cassoni usati per la raccolta in frutteto, il trasporto e la conservazione in magazzino, e le cassette dove i frutti sono confezionati per il consumo fresco subito dopo la raccolta o al termine della conservazione. Mentre si è consapevoli che tutti questi materiali possono essere contaminati in qualche modo e in diverso grado da cellule di *E. amylovora*, non è certo che possano essere sorgenti efficaci di inoculo. Frutti raccolti a maturità su un albero malato o in pros-

simità di un caso di colpo di fuoco, mummie generate dalla disidratazione di frutti infetti, ritagli di potatura di alberi malati, contenitori o carta da imballaggio contaminati da essudato batterico possono divenire efficaci sorgenti di inoculo quando la sopravvivenza di *E. amylovora* è tale da assicurare disponibilità di un adeguato numero di cellule vitali al momento della loro liberazione in presenza di bersagli suscettibili (Anderson, 1952; Calzolari *et al.*, 1984).

In questo lavoro sono illustrati i risultati di uno studio biennale sulla sopravvivenza in frigoconservazione di *E. amylovora* su pere mature, sulla carta da imballaggio e sui materiali più comunemente usati per la costruzione di cassoni e cassette. La sopravvivenza sul legno e sulla plastica dura dei cassoni è stata studiata anche all'aperto. Tenendo conto delle curve di sopravvivenza nelle pere e sui vari materiali si è tentato di definire un periodo di rischio fitosanitario facendo riferimento ad un mo-

dello di contaminazione digitale.

### Materiali e metodi

Per studiare la sopravvivenza è stato usato un ceppo virulento mutante di *E. amylovora* 273R1 resistente alla rifampicina, isolato originariamente da melo negli Stati Uniti, messo a nostra disposizione dal Prof. S.V. Beer della Cornell University (Ithaca, New York). Il ceppo è stato allevato a 27°C per 48 ore su substrato selettivo costituito da agar nutritivo al 5% di saccarosio (NSA) con aggiunta di rifampicina (200 µg/ml<sup>1</sup>) (Sigma R3501). Per contare il numero delle cellule è stato usato il conteggio su piastra di substrato selettivo con la tecnica di Mazzucchi e Comelli (1977). Le diluizioni decimali sono state preparate dalla sospensione di giovani cellule (48 h) con una concentrazione di 1x10<sup>8</sup> Unità Formanti Colonia (UFC) pari ad una assorbanza di 0,060 a 660 nm, misurata allo spettrofotometro. Questa sospensione (1x10<sup>8</sup> UFC/ml<sup>1</sup>) è

stata usata per contaminare i diversi materiali.

Le colonie del mutante sono state identificate per il loro aspetto leviforme, per il colore rosa scuro e, dopo la purificazione, mediante PCR (McManus e Jones, 1995) e prova di patogenicità su pere immature (D.M. 27-03-1996), quando la loro risposta era affidabile (luglio-novembre). Per valutare il numero delle cellule sopravvissute sono state considerate le piastre dove le colonie erano cresciute singole. Queste colonie, selezionate per fenotipo e purificate, sono state identificate e conteggiate.

La sopravvivenza è stata studiata principalmente su pere cv. Passa Crassana e sui materiali dei cassoni e delle cassette in frigoconservazione (-0,5°C; 85-90% UR); per i materiali dei contenitori la sopravvivenza è stata studiata anche all'aperto. Le pere di medie dimensioni sono state scelte a caso in cassoni immediatamente prima della frigoconservazione. Per la contaminazione le pere sono state immerse nella sospensione batterica per 15 minuti, messe ad asciugare con calice in alto a temperatura ambiente; appena asciugate, nella cavità calicina di ogni pera sono stati depositi 30 µl di sospensione batterica.

Per ogni tipo di materiale sono stati preparati dei campioni unitari in modo da poter costituire dei campioni multipli perfettamente comparabili. Con tagliatrice di precisione da cassoni e cassette usati sono stati fatti dei

parallelepipedi di rovere e di pioppo (7x7x300 mm) e di plastica 85x9x300 mm). Per le carte da imballaggio (blu e grigia) sono stati tagliati dei quadrati (2x2 cm).

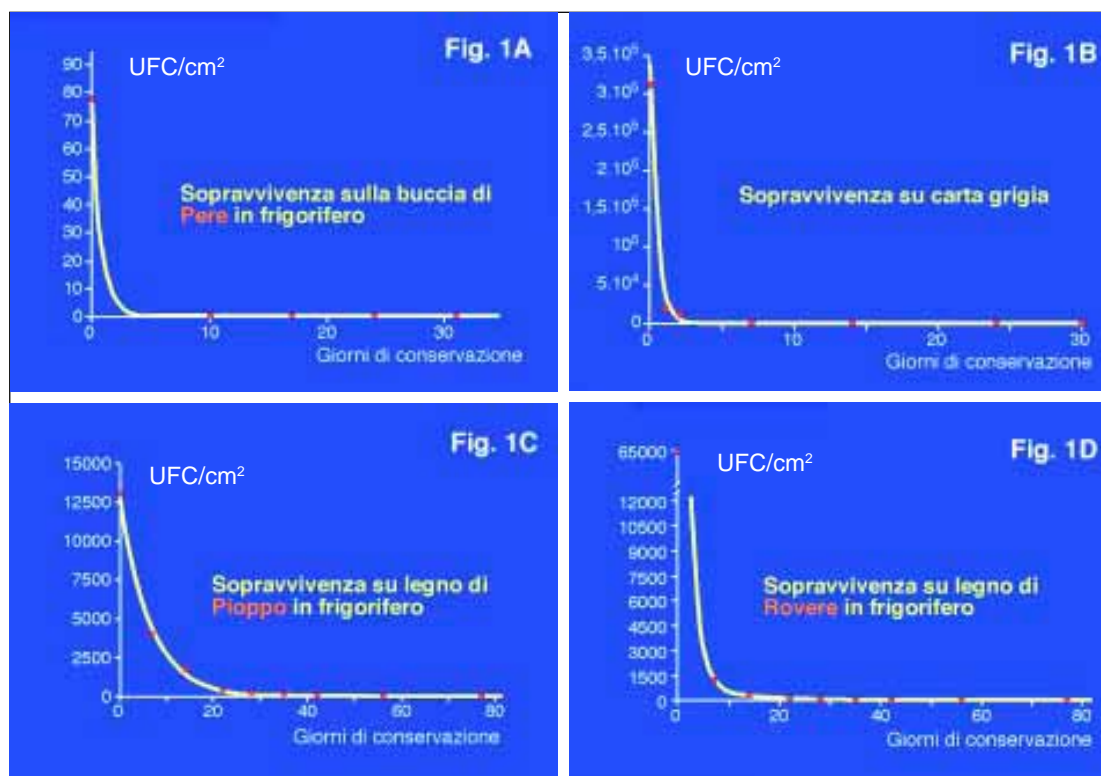
Per la contaminazione dei legni, la massa dei parallelepipedi di ogni tipo è stata immersa per 30 min. nella sospensione batterica. Per la contaminazione delle carte, su ogni quadrato sono stati depositati 200 µl di sospensione batterica. Dopo la contaminazione i diversi tipi di materiali sono stati fatti asciugare all'ombra, a temperatura ambiente, rendendo minimo (legni) o evitando (carta) il contatto reciproco dei pezzi. Il mattino successivo al giorno di contaminazione, i frutti e i diversi materiali sono stati portati in frigoconservazione o all'aperto.

Per valutare le cellule vitali di *E. amylovora* sopravvissute durante la conservazione, in tempi successivi sono state presi campioni multipli costituiti da 10 pere, 18 parallelepipedi per ogni tipo di legno e per la plastica, 20 pezzetti per ogni tipo di carta. Dalle 10 pere si preparavano due subcampioni, uno di 30 dischetti di buccia prelevati con foratappi e bisturi all'equatore (3 per pera) e uno di 10 cilindretti, asportati con foratappi e divisi a metà contenenti la cavità calicina. Ogni campione multiplo è stato messo in un appropriato contenitore sterile con un volume di tampone noto (pH 7) e lavato su agitatore rotativo. Il lavaggio a temperatura ambiente è durato 30 min per legno e plastica e 45

min per la carta. Il liquido di lavaggio è stato centrifugato a 10.000 g per 15 min e il sedimento è stato risospeso in 1,5 ml di tampone (concentrato finale) e usato per il conteggio su piastra (fino alla diluizione 10<sup>-4</sup>). Per le pere e gli altri materiali il numero dei germi contaminanti è stato calcolato immediatamente dopo la contaminazione sui campioni asciugati all'aria (tempo 0).

La sopravvivenza all'aperto (settembre - ottobre) è stata studiata conservando i campioni in cassette entro un cassone posto sotto ad alberi su un prato di una azienda di Massa Lombarda (RA). L'ubicazione era tale da esporre il cassone alternativamente al sole e all'ombra degli alberi nel corso della giornata. La temperatura media giornaliera è oscillata tra 21 e 7°C. È piovuto 11 volte. Le precipitazioni più intense sono state 20 mm (14/09), 14 mm (18/09), 18 mm (18/10), 10 mm (21/10) e 29 mm (24/10).

I dati di sopravvivenza sono stati espressi come densità batterica (UFC/cm<sup>2</sup> o UFC/calice) e come percentuale calcolata per ogni tempo facendo riferimento al numero di UFC/cm<sup>2</sup> (o UFC/calice) su un dato materiale al tempo 0 (100%). I dati sono stati elaborati statisticamente per trovare le curve interpolatrici più appropriate tenendo conto dei limiti di confidenza e calcolando la significanza (F) e il coefficiente di correlazione (R<sup>2</sup>). Per una comprensione più immediata dei grafici non si è ritenuto oppor-



**Figura 1** - Grafici di quattro funzioni esponenziali descrittive in frigoconservazione (-0,5 °C) la diminuzione progressiva nel tempo delle cellule vitali per cm<sup>2</sup> (UFC=Unità Formanti Colonia) di *Erwinia amylovora* contaminanti la buccia delle pere (A), la carta grigia da imballaggio (B), il legno di pioppo delle cassette (C) e il legno di rovere dei cassoni (D). Si può osservare come la discesa delle curve sia assai pronunciata entro 20 giorni e sia rapidissima per la sopravvivenza sulla buccia delle pere.

tuna la trasformazione logaritmica.

### Risultati

Subito dopo la contaminazione la densità media dei batteri sulla buccia delle pere è stata di 78 UFC/cm<sup>2</sup>. Dopo 10, 17, 24 e 31 giorni di frigoconservazione il reisolamento non ha avuto successo. La densità dei batteri contaminanti è decresciuta secondo una funzione esponenziale (fig. 1A) fino a zero dopo 10 giorni,

quando il valore calcolato di densità è risultato 0,11 UFC/cm<sup>2</sup>. Sulla parete della cavità calicina la densità media dei batteri al tempo 0 e dopo 10, 17 e 24 giorni di frigoconservazione è stata 79,5 - 100,5 - 82,5 e 3,75 UFC/calice. Nelle settimane successive la densità è decresciuta secondo una funzione arcotangente fino a quasi zero. Dopo 101 giorni sono stati trovati occasionalmente 3,75 UFC/calice. Dopo 120 giorni il valore calcolato è risultato 0,4 UFC/calice.

Sul legno di rovere dei cassoni la densità media dei batteri è decresciuta progressivamente secondo una funzione esponenziale (fig. 1D) da  $65,1 \times 10^3$  al tempo 0 a 0,18 UFC/cm<sup>2</sup> dopo 77 giorni. Dopo 28 giorni la densità, decresciuta di oltre il 99,5%, è stata 76 UFC/cm<sup>2</sup>.

Sul legno di pioppo delle cassette la densità media dei batteri è decresciuta progressivamente secondo una funzione esponenziale (fig. 1C) da  $13,04 \times 10^3$  al tempo = a 5,5 UFC/cm<sup>2</sup> dopo

77 giorni. Dopo 28 giorni la densità, decresciuta di oltre il 97%, è stata 307 UFC/cm<sup>2</sup>.

La sopravvivenza su legno di rovere e di pioppo all'aperto è stata valutata fino a 55 giorni (1/09-31/10). Sul legno di rovere all'aperto la densità media è decresciuta progressivamente secondo una funzione omografica da 49 al tempo 0 a 0,1 UFC/cm<sup>2</sup> dopo 27 giorni. Il reisolamento ha avuto successo fino a 27 giorni (0,1 UFC/cm<sup>2</sup>), ma non dopo 41 giorni.

Su pioppo la sopravvivenza percentuale di *E. amylovora* in frigoconservazione è stata significativamente più alta rispetto a quella all'aperto fino a 15-20 giorni. Su rovere la sopravvivenza percentuale in frigoconservazione è stata significativamente più alta rispetto a quella all'aperto fino a 3 giorni.

La sopravvivenza percentuale su pioppo in frigoconservazione è stata significativamente più alta rispetto a quella su rovere fino a 20 giorni. La sopravvivenza percentuale su pioppo all'aperto nei primi giorni non è stata significativamente più alta rispetto a quella su rovere.

La sopravvivenza su plastica di cassone è stata valutata solo all'aperto. Il reisolamento dei batteri contaminanti ha avuto successo al tempo 0, ma non dopo 1, 2 e 3 giorni. Al tempo 0 la densità media è stata 0,96 UFC/cm<sup>2</sup>.

La sopravvivenza sulla carta da imballaggio è stata valutata fino a 30 giorni in frigoconservazione; già dopo 24 giorni era nulla

su entrambi i tipi di carta. Sulla carta blu da parete la densità media dei batteri è diminuita da secondo una funzione esponenziale da  $1,5 \times 10^4$  al tempo 0 a 31,2 UFC/cm<sup>2</sup> dopo 14 giorni. Sulla carta grigia da fondo la densità media dei batteri è diminuita secondo una funzione esponenziale (*fig. 1B*) da  $3,1 \cdot 10^5$  al tempo 0 a 187 giorni dopo 14 giorni. La sopravvivenza percentuale sulla carta blu è stata significativamente più alta rispetto alla carta grigia solo fino a 7-8 giorni.

### Discussione

Sulla buccia delle pere *E. amylovora* non è sopravvissuta dopo 10 giorni di frigoconservazione. La funzione interpolatrice ha evidenziato che dopo soli 5 giorni la sopravvivenza era già assai vicina a zero. La sopravvivenza sulle pere risulta pertanto analoga a quella sulle mele dove la presenza del batterio su frutti raccolti in alberi o in prossimità di frutteti infetti è scarsa o nulla (Dueck, 1974; Hale *et al.*, 1987; Sholberg *et al.*, 1988). Si può pertanto concludere che la sopravvivenza di *E. amylovora* sulla superficie delle pere mature è assai breve ed ha un ruolo epidemiologico trascurabile.

La sopravvivenza di *E. amylovora* nella cavità calicina delle pere in frigoconservazione si è prolungata fino a 3-4 mesi; mediante l'equazione interpolatrice si può calcolare che solo dopo 4 mesi la sopravvivenza è prossima a zero. Nella cavità calicina

delle mele in frigoconservazione la sopravvivenza del batterio può arrivare fino a 5 mesi, ma non a 6 (Sholberg *et al.*, 1988). Questi risultati indicano che la cavità calicina e non la buccia dei frutti può costituire una nicchia favorevole alla sopravvivenza di *E. amylovora* per un tempo apprezzabile compatibile con il ruolo dei frutti come sorgente primaria di inoculo. In condizioni di campo, il numero di germi di *E. amylovora* contaminanti la cavità calicina dei frutti è assente nei frutteti senza colpo di fuoco (Hale *et al.*, 1987) ed è assai basso in frutti raccolti in frutteti gravemente infetti o in vicinanza di branche malate (Hale *et al.*, 1987; Van der Zwet *et al.*, 1990). Pertanto si può concludere che pere raccolte in frutteti senza casi di colpo di fuoco, anche in aree dove la malattia è endemica, non siano contaminate da *E. amylovora* e non costituiscano mezzo di disseminazione sia in caso di consumo immediato sia in caso di consumo posticipato al termine della frigoconservazione. Se nel frutteto ci sono casi di colpo di fuoco il rischio di contaminazione dei frutti è reale. Eliminando le parti infette nel frutteto qualche tempo prima della raccolta – come prescrivono le linee tecniche regionali di difesa – si riduce sensibilmente il rischio di raccogliere frutti maturi contaminati. Pere a cavità calicina contaminata raccolte inconsciamente potrebbero essere mezzi di disseminazione e sorgenti efficaci di inoculo solo nei casi di consu-

mo fresco o dopo periodi brevi di frigoconservazione (settembre-ottobre). Tuttavia, la trasmissione della malattia è improbabile per il basso numero di batteri che arrivano a contaminare la cavità calcina in condizioni naturali. La trasmissione diventa poi assai improbabile o impossibile quando le pere sono messe in commercio dopo lungo periodo di frigoconservazione sia per sopravvivenza quasi nulla dei batteri, sia per l'assenza di bersagli suscettibili nei luoghi e al momento del consumo a destinazione in Europa (dicembre - febbraio). Appare così giustificata l'esclusione dei frutti dai materiali vegetali oggetto di ispezione fitosanitaria ufficiale nella Unione Europea (Direttiva 200/29 EC).

Sul legno di rovere dei cassoni e di pioppo delle cassette *E. amylovora* è riuscita a sopravvivere bene sia in frigoconservazione sia all'aperto. In frigoconservazione la sopravvivenza si è prolungata fino a due mesi e mezzo sia su rovere che su pioppo, ma nei primi 15-20 giorni è risultata significativamente più alta su pioppo. All'aperto la sopravvivenza si è prolungata fino a circa 80 giorni su pioppo e 27 giorni su rovere; nei primi due giorni all'aperto è risultata simile su pioppo e rovere. La migliore sopravvivenza di *E. amylovora* su pioppo è stata verosimilmente conseguenza della porosità di quel tipo di legno. Di fatto, al momento della contaminazione e dell'asciugatura all'aria è verosimile che i batteri siano

stati adsorbiti negli anfratti del legno in maggior numero e più in profondità. Queste nicchie profonde devono aver offerto ai batteri sia protezione dalla disidratazione e dalle radiazioni solari, sia resistenza all'estrazione durante il lavaggio per effetto delle bollicine d'aria intrappolate al fondo delle screpolature. I nostri risultati sono abbastanza concordanti con quelli di Keck et al. (1996), se si tiene conto della loro dose contaminante assai più alta, generata dal contatto diretto dei pezzetti di legno sulla patina batterica in piastra. All'aperto sulla plastica dei cassoni, la sopravvivenza di *E. amylovora* è risultata inferiore a un giorno; già dopo 6 ore dalla contaminazione la densità media era quasi nulla. I cassoni di plastica hanno superfici idrofobiche. Immediatamente dopo la contaminazione, poche gocce di sospensione erano rimaste aderenti alla superficie dei parallelepipedi di plastica. L'insuccesso del reisolamento già dopo un giorno all'aperto può essere conseguenza sia della elevata mortalità entro poche ore delle cellule di *E. amylovora* esposte all'aria (Mazzucchi et al., 1984; Maas Gesteranus e de Vries, 1984) sia di un basso numero di cellule, raccolte nel concentrato finale del lavaggio, inferiore alla soglia di sensibilità del metodo. Questo risultato è in accordo con la bassa sopravvivenza sulla buccia delle pere ricoperta di cuticola e cere.

I nostri risultati mostrano chiaramente che per rendere mini-

mo il rischio di disseminare *E. amylovora* per mezzo della movimentazione dei cassoni e cassette, occasionalmente o inconsciamente contaminate, la plastica dura sia il materiale più consigliabile. Oltre ad assicurare sopravvivenza minima ai batteri, i cassoni e le cassette di plastica sono più facilmente lavabili. Per i contenitori di plastica un accurato lavaggio con acqua di acquedotto (per asportare bene ogni residuo organico e pulire le superfici) e una permanenza al sole per alcuni giorni sono interventi sufficienti per rendere trascurabile o nullo il rischio di contaminazione. I contenitori di rovere e di pioppo richiedono invece interventi più drastici secondo le linee tecniche di difesa.

In frigoconservazione la sopravvivenza di *E. amylovora* sulle carte blu e grigia da imballaggio è stata inferiore a 24 giorni. Sulla carta blu la sopravvivenza percentuale è stata più alta nei primi 3-4 giorni. Dopo 14 giorni la sopravvivenza di *E. amylovora* sulla carta blu (0,002%) è risultata superiore rispetto alla carta grigia (0,0006%), ma le differenze non sono state significative. Evidentemente la carta grigia da fondo assicura maggior calo della popolazione contaminante nei primi giorni e offre minor rischio fitosanitario.

Per interpretare l'importanza epidemiologica delle cellule vitali di *E. amylovora* contaminanti una superficie è necessario ipotizzare un modello di trasmissione dell'inoculo. I materiali dei

cassoni e delle cassette, incluse le carte di imballaggio, possono venire facilmente in contatto con le mani degli agricoltori o del personale dei magazzini durante la conservazione, la cernita, il trasporto o la vendita dei frutti. Nel caso più sfavorevole tutti i batteri contaminanti una certa superficie possono attaccarsi alle dita, soprattutto pollice o indice, venute a contatto. Se si accetta che 38 cellule sia la ID-50 (Dose Infettiva atta a causare infezioni sul 50% dei bersagli) per l'inoculazione di *E. amylovora* (Crosse, *et al.*, 1972) e che un dito possa trasferire tutto l'inoculo ad un potenziale sito di infezione, è possibile valutare un tempo critico di sopravvivenza ai fini della trasmissione. Dato che l'area di contatto del dito è circa 3,3 cm<sup>2</sup> (Battilani, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, com. pers.), la ID-50 per cm<sup>2</sup> sarà 11,5. Di conseguenza il tempo di sopravvivenza critico è dato analiticamente dalla ascissa del punto di intersezione tra

le curve di sopravvivenza e la retta UFC/cm<sup>2</sup>=11,5. In accordo a questo modello, per la dose contaminante usata nei nostri esperimenti si può calcolare il tempo critico di sopravvivenza: **in frigoconservazione** sulla buccia delle pere è 1,5 giorni, sui cassoni di rovere e sulle cassette di pioppo 45 giorni, sulla carta blu 33,2 giorni, sulla carta grigia 5 giorni; **all'aperto**, sui cassoni di rovere 1,3 giorni, sulle cassette di plastica meno di un giorno. Questi tempi possono essere presi convenzionalmente a rappresentare i periodi minimi a rischio di trasmissione per i tre tipi di materiali.

La dose contaminante iniziale dei nostri esperimenti è assimilabile a quella trasportata da aerosol liquidi generati da gocce di pioggia in stretta vicinanza di un organo infetto essudante, ma è verosimilmente assai inferiore a quella di un residuo solido di una goccia di essudato; inoltre nell'essudato naturale le cellule batteriche sono probabilmente più

protette dagli stress ambientali da una maggiore quantità di polisaccaridi extracellulari. Di conseguenza sembra appropriato ritenere minimi i tempi critici di sopravvivenza calcolati per la valutazione del rischio.

---

*Si ringrazia la Ortofrutticola Valle del Reno (Cento-Ferrara) per aver ospitato con cura i materiali sperimentali. Si ringrazia il Prof. S.V. Beer della Cornell University, Ithaca (New York-USA) per il ceppo mutante.*

### Bibliografia

Anderson H.W., 1952. *Maintaining virulent cultures of Erwinia amylovora and suggestion of overwinter survival in mummied fruit*. Plant Disease Reporter 36, 301-302.

Calzolari et al., 1984. *Surveys for the presence of fire blight in some Italian fruit growing areas*. Acta Horticulturae 151, 329-334.



- Crosse J.E., Goodman R.N., Shaffer W.H., 1972. *Leaf damage as a predisposing factor in the infection of apple shoots by Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 62, 176-182
- Direttiva 2000/29/CE del Consiglio concernente le misure di protezione contro l'introduzione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e contro la loro diffusione nella Comunità. OJ L. 169, 10/7/2000: 1-112.
- Dueck J., 1974. *Survival of Erwinia amylovora in association with mature apple fruit*. *Canadian Journal of Plant Science* 54, 349-351.
- Hale C.N., McRae E.M., Thomson S.W., 1987. *Occurrence of Erwinia amylovora on apple fruit in New Zealand*. *Acta Horticulturae* 217, 33-40.
- Keck M., Reich H., Chartier R., Paulin J.P., 1996. *First record of fire blight (Erwinia amylovora) in Austria. Preliminary experiments on the survival on fruit boxes*. *Acta Horticulturae* 411, 9-11.
- Maas Geesteranus H.P., de Vries P.M. 1984. *Survival of Erwinia amylovora on plant surfaces and their role in epidemiology*. *Acta Horticulturae* 151: 55-61.
- Mazzucchi U., Bazzi C., Coti G., Gasperini C., Calzolari A., 1984. *Quantitative evaluation of two techniques for the detection of epiphytic Erwinia amylovora during the dormant period*. *Acta Horticulturae* 151, 145-154.
- Mazzucchi U., Comelli R., 1977. *Evidence against penetration of Pseudomonas syringae into sugar beet seeds*. *Phytopathologische Zeitschrift* 88, 355-361.
- Mc Manus P.S., Jones A.L., 1995. *Detection of Erwinia amylovora by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations*. *Phytopathology* 85, 618-623.
- Roberts R.G., Hale C.N., Van der Zwet T., Miller C.E., Redlin S.C., 1998. *The potential for spread of Erwinia amylovora and fire blight via commercial apple fruit; a critical review and risk assessment*. *Crop Protection* 17 (1), 19-28.
- Sholberg P.L., Gaunce A.P., Owen G.R., 1988. *Occurrence of Erwinia amylovora of pome fruit in British Columbia in 1985 and its elimination from the apple surface*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10, 178-182.
- Sobiczewski P., Deckers T., Pulawska J., 1997. *Fire blight (Erwinia amylovora). Some aspects of epidemiology and control*. *Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland*, 71 pp.
- Van der Zwet T., Thomson S.V., Covey R.P., Bonn W.G., 1990. *Population of Erwinia amylovora on external and internal apple fruit tissues*. *Plant Disease* 74, 711-716.



## SOPRAVVIVENZA ENDOFITA DI *ERWINIA AMYLOVORA* IN ASTONI DI PERO ASINTOMATICI

**F. Traversa, M. Morbio, S. Mucini, U. Mazzucchi**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

### Introduzione

Le conoscenze epidemiologiche acquisite negli ultimi due decenni del secolo scorso indicano che i materiali vivaistici in commercio possono essere mezzi di disseminazione di *Erwinia amylovora* a breve, media e grande distanza (Curto, 1992; Van der Zwet, 1994; Van der Zwet e Walter, 1996; Momol *et al.*, 1998).

Le gemme e/o le ferite di caduta delle foglie possono albergare od essere contaminate da germi di *E. amylovora* (Van der Zwet e Walter, 1996; Billing e Paulin 1990; Calzolari *et al.*, 1982); di conseguenza marze o scudetti usati per gli innesti, portainnesti e astoni possono divenire mezzi di disseminazione e sorgenti di inoculo quando le piante madri e i campi di produzione si trovano in prossimità di focolai di colpo di fuoco.

La frequenza di germi vitali e virulenti associati ai materiali vivaistici in commercio pare essere verosimilmente assai bassa anche in situazioni ad alta pressione di malattia tanto che il ritrovamento di *E. amylovora* ha avuto successo in percentuale non superiore a 0,5% in gemme dormienti di pero raccolte in

pereto gravemente infetto (Billing e Paulin, 1990); d'altra parte in una campagna di analisi di astoni di melo importati in Italia in autunno *E. amylovora* è stata trovata solo in 0,9% dei campioni di gemme e scudetti (Calzolari *et al.*, 1982).

Inoculazioni autunnali attraverso ferite possono dar facilmente luogo ad infezioni latenti per la ridotta capacità del patogeno di colonizzare tessuti corticali alle basse temperature nel periodo novembre - dicembre e di generare cancri visibili durante l'inverno.

Mentre è certo che germi possono essere disseminati attraverso il commercio dei materiali vivaistici, poco o nulla si sa circa il loro ruolo di sorgenti primarie di inoculo nei luoghi dove ha luogo il trapianto e sui tempi di latenza. Una ipotesi verosimile è che i batteri possano sopravvivere all'interno della pianta come endofiti per lungo periodo e causare la comparsa di sintomi di malattia solo in particolari condizioni di ambiente e di pianta ospite. Gravi ferite nella parte epigea possono costituire fattori scatenanti (Keil e Van der Zwet, 1972). Questa ricerca ha avuto lo scopo di accertare se i

tempi di sopravvivenza endofita di *E. amylovora* in astoni di pero asintomatici messi in commercio siano compatibili con un loro ruolo di sorgente primaria di inoculo in un nuovo frutteto.

### Materiali e metodi

Per studiare la sopravvivenza endofita è stato usato il ceppo virulento mutante di *E. amylovora* 273R1 resistente alla rifampicina, isolato originariamente da melo negli Stati Uniti, messo a nostra disposizione dal Prof. SV. Beer della Cornell University (Ithaca, New York). Il ceppo è stato allevato a 27°C per 48 ore su substrato selettivo consistente in agar nutritivo al 5% di saccarosio (NSA) (Lelliott e Stead, 1987) con aggiunta di rifampicina (200 µg ml<sup>-1</sup>) (Sigma R 3501). Per valutare il numero di cellule da usare negli esperimenti è stato usato il conteggio su piastra di substrato selettivo con la tecnica Mazzucchi e Comelli (1977). Le diluizioni decimali sono state preparate dalla sospensione di giovani cellule (48h) avente una assorbanza di 0,060 a 660 nm allo spettrofotometro.

La sopravvivenza del mutante è stata studiata in astoni di pero.

Portainnesti di cotogno B29 in vivaio sono stati innestati a gemma dormiente con la cv. Abate Fetel e trapiantati a fine inverno 1998-99 singoli in vasi di plastica (diametro 40 cm), allevati su prato all'aperto e irrigati regolarmente. Il fusto principale sviluppato dalla gemma è stato allevato verticalmente durante la stagione vegetativa, asportando tutti i germogli di cotogno.

Per l'inoculazione, gli astoni pronti per la vendita in autunno, entro il loro vaso, sono stati messi in una cella climatica a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e con forbici da potatore è stato fatto un taglio trasversale a 10 cm dall'apice. Sulla ferita appena fatta è stata depositata con microsiringa Hamilton 705N una goccia di 30  $\mu\text{l}$  di sospensione batterica contenente 30000 giovani cellule (48 h). Sono state fatte 5 inoculazioni a 10 giorni l'una dall'altra a partire dal 21 settembre. Ad ogni data sono stati inoculati 15 peri e 5 peri sono stati contaminati con acqua distillata sterile e usati come controllo. Dopo ogni inoculazione, i peri sono stati tenuti per 4 giorni nella cella climatica a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e poi rimessi all'aperto sul prato. Dopo l'inoculazione i peri in vaso sono stati ispezionati settimanalmente fino alla fine dell'autunno dell'anno successivo (2000) per la presenza di cancri corticali basipeti dal punto di inoculazione o di sintomi di colpo di fuoco.

Durante l'autunno - inverno 1999-2000 e per tutta la stagione vegetativa 2000 tutti i fusti aventi cancri o disseccamenti

sono stati analizzati per la presenza di *E. amylovora*. Le piastre di substrato selettivo sono state incubate a  $27^\circ\text{C}$  per almeno 5 giorni. Frammenti di tessuto ai margini delle aree corticali necrotiche sono stati resi poltiglia in poca acqua sterile e la sospensione è stata usata per inseminare le piastre. I peri con i sintomi sospetti sono stati immediatamente segnati e, dopo aver asportato la parte sintomatica per l'analisi, messi per gran parte in isolamento in cella per monitorare l'evoluzione.

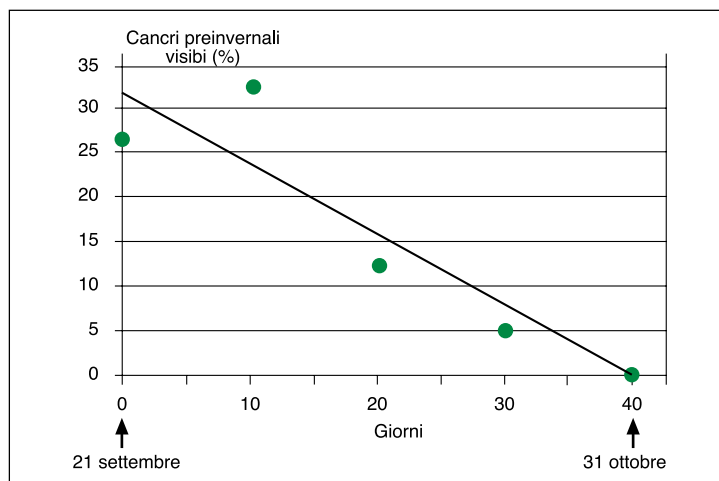
I peri rimasti asintomatici sono stati usati nell'autunno 2000 per tentare il reisolamento del mutante resistente alla rifampicina dai tessuti interni. Dal taglio trasversale, punto di contaminazione dell'autunno 1999, sono stati asportati con forbice da potatura 4 segmenti lunghi 10 cm: il primo segmento ( $T_1$ ) a partire dal punto di inoculazione, il secondo ( $T_2$ ) comprendente i 10 cm successivi lungo il fusto principale; il terzo ( $B_1$ ) e il quarto ( $B_2$ ) segmento sono stati rispettivamente presi alla base dei rami sviluppati dalle gemme dei due nodi immediatamente sotto il punto di contaminazione, indicando con  $B_2$  quello più basso. Ogni segmento è stato lavato abbondantemente con acqua di acquedotto e fatto asciugare all'aria. Dopo aver spalmato sulle superfici di taglio di ogni segmento vaselina filante, i segmenti sono stati immersi per 10 minuti in soluzione di ipoclorito sodico (varechina commerciale diluita 1:4 v/v con acqua di ac-

quedotto), e poi lavati abbondantemente in acqua di acquedotto, fatti asciugare all'aria e poi portati sotto cappa a flusso laminare di aria sterile. Asportate le estremità ricoperte di vaselina, ogni segmento è stato tagliato con forbice da potatore in fettine di 2-3 mm. Le fettine sono state raccolte entro beute sterili da 300 ml contenenti 50 ml di tampone fosfato potassico (0,01M; pH7) (TFP). Le beute sono state messe in agitatore rotativo 45 minuti a temperatura ambiente. Il liquido di lavaggio è stato raccolto e centrifugato a 10000 g per 15 minuti. Il sedimento di centrifugazione è stato risospeso in 1 ml di TFP (concentrato finale) e usato per il reisolamento su substrato selettivo fino alla diluizione  $10^{-1}$ . Dopo 5 giorni a  $27^\circ\text{C}$  le colonie assimilabili sulle piastre per la forma a cupola e per colore rosa scuro a quelle del mutante sono state segnate, trapiantate, purificate e identificate. L'identificazione è stata fatta mediante il saggio PCR e prova di patogenicità su pere immature cv. Conference conservate in frigorifero ( $-0,5^\circ\text{C}$ ; 90-95% UR). La positività al saggio PCR era contraddistinta dalla formazione di un amplicone di 1000 pb (McManus e Jones, 1995). La prova di patogenicità è stata quella prescritta dal decreto di lotta obbligatoria al colpo di fuoco (D.M.27-03-1996).

## Risultati

Durante le ispezioni di novembre

e dicembre 1999 (fino al 15) sono stati trovati 12 peri sintomatici con cancri tipici emiscuti-formi, basipeti, a partire dal taglio di potatura. I reisolamenti del mutante hanno avuto successo. Le frequenze dei peri sintomatici sono state variate da 4 su 15 o 5 su 15 a zero dalla prima alla ultima data di inoculazione. Le frequenze sono diminuite secondo una retta (fig. 1). Nessun pero di controllo ha manifestato cancri. Durante le ispezioni di gennaio, febbraio, marzo e inizio aprile 2000 nessun pero ha presentato sintomi riferibili a colpo di fuoco. In data 12 aprile 2000, a ripresa vegetativa già iniziata con germogli di 5-6 cm, sono stati trovati 4 peri con tipici cancri basipeti a partire dal taglio di potatura inoculato l'anno precedente (tab. 1). Nessun pero di controllo presentava cancri. Durante le ispezioni del periodo seconda metà di aprile-fine ottobre 2000 nessun pero è stato tro-



**Figura 1** - Percentuali di astoni aventi cancri preinvernali visibili a seguito di inoculazioni calibrate attraverso tagli di potatura effettuate a distanza di 10 giorni a partire dal 21 settembre. La distribuzione dei punti sperimentali (cerchi neri) è stata interpolata con una retta. Delle cinque inoculazioni solo l'ultima (31 ottobre) non ha causato cancri visibili prima di metà dicembre

vato sintomatico sia per presenza di cancri basipeti del punto di inoculazione, sia per avvizzimenti di germogli o di parte epigea riferibili a colpo di fuoco (tab. 1). Per la durata dell'intera prova, le

frequenze di peri sintomatici sono decresciute dal 33% delle inoculazioni del 21 settembre e 1 ottobre al 20% delle inoculazioni dell'11 ottobre fino al 6,6% delle inoculazioni di fine ottobre.

**Tabella 1** - Frequenze e percentuali di peri sintomatici osservati nel periodo 1 ottobre - 15 dicembre 1999 e 31 gennaio - 12 aprile 2000 in relazione alle cinque date di inoculazione. Il fusto principale cresciuto da gemma dormiente è stato inoculato depositando 30000 cellule di *E. amylovora* su un taglio trasversale a 10 cm dall'apice. Dopo 4 giorni di cella climatica a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  gli astoni in vaso sono stati tenuti all'aperto

Date di inoculazione	A	B	A+B
	Frequenze peri sintomatici novembre-dicembre	Frequenze peri sintomatici gennaio-aprile	Frequenze peri sintomatici novembre 1999 novembre 2000
21 settembre	4/15	1/11	5/15
01 ottobre	5/15	0/10	5/15
11 ottobre	2/15	1/13	3/15
21 ottobre	1/15	1/14	2/15
31 ottobre	0/15	1/15	1/15
<b>Totale</b>	<b>12/75 (16%)</b>	<b>4/63 (6,3%)</b>	<b>16/75 (21,3%)</b>
Controlli	0/25	0/25	0/25

Il numeratore delle frazioni esprime il numero degli astoni con cancri basipeti dal taglio di inoculazione, il denominatore il totale degli astoni inoculati per quella data.

**Tabella 2** - Frequenze e percentuali dei reisolamenti del mutante di *E. amylovora* dagli astoni di pero asintomatici un anno dopo l'inoculazione alle 5 date. Tutti gli astoni sintomatici erano stati eliminati entro metà aprile dell'anno successivo alle inoculazioni. I restanti astoni tenuti all'aperto e rimasti asintomatici sono stati monitorati in ottobre-novembre per la presenza endofita di *E. amylovora*

Date di inoculazione	Frequenze di reisolamento (%)
21 settembre	4/5
01 ottobre	3/8
11 ottobre	2/13
21 ottobre	3/10
31 ottobre	1/5
<b>Totale</b>	<b>13/41 (31,7%)</b>
Controlli	0/10

Il numeratore delle frazioni esprime il numero degli astoni da cui il reisolamento ha avuto successo, il denominatore il totale degli astoni monitorati.

**Tabella 3** - Frequenze e percentuali dei reisolamenti del mutante di *E. amylovora* da segmenti rimasti asintomatici dopo un anno dalla inoculazione. I segmenti sono stati sterilizzati chimicamente in superficie e poi tagliati a fettine. Il liquido di lavaggio delle fettine è stato usato per i reisolamenti.

Segmenti di fusto	Frequenze di reisolamento
T <sub>1</sub>	6/10
T <sub>2</sub>	4/10
B <sub>1</sub>	3/10
B <sub>2</sub>	4/10
<b>Totale</b>	<b>17/40</b>

T<sub>1</sub>= tratto di 10 cm del fusto principale a partire dal taglio di inoculazione; T<sub>2</sub>= tratto di 10 cm sotto a T<sub>1</sub>; B<sub>1</sub>= tratto di 10 cm alla base del primo ramo laterale a partire dal taglio di inoculazione; B<sub>2</sub>= tratto di 10 cm alla base del secondo ramo laterale a partire dal taglio di inoculazione

Nel periodo ottobre-dicembre 2000 da tutti i peri asintomatici inoculati circa un anno prima è stato tentato il reisolamento di eventuali germi del mutante di *E. amylovora* sopravvissuti all'interno dei fusti. Gli abbondanti lavaggi con acqua di acquedotto dei segmenti di fusto e il loro trattamento con ipoclorito sodico avevano lo scopo di eliminare i batteri contaminanti la superficie. La copertura con vaselina filante delle super-

fici di taglio aveva lo scopo di prevenire la diffusione dell'ipoclorito all'interno dei tessuti, particolarmente dello xilema, e il suo effetto battericida.

Il reisolamento del mutante dai segmenti dei peri asintomatici ha avuto successo in 13 peri su 41 e le frequenze sono variate tra 4 su 5 per la prima data di inoculazione a 1 su 5 per l'ultima data (tab. 2).

La frequenza dei reisolamenti

di successo dal segmento di fusto principale T<sub>1</sub> sono risultare più alte rispetto a quelle dal segmento T<sub>2</sub> e dai segmenti B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> della parte prossimale dei germogli laterali (tab. 3).

### Discussione

Gli astoni usati nell'esperimento erano assimilabili per età e modalità di allevamento a quelli prodotti in un vivaio nel corso di una stagione vegetativa e immessi in commercio in autunno. Le inoculazioni a fine stagione vegetativa avevano lo scopo di creare astoni ad infezione latente entro cui rilevare la presenza di *E. amylovora* endofita dopo un anno. I brevi periodi di permanenza in cella climatica dopo l'inoculazione avevano lo scopo da un lato di assicurare l'ancoramento del mutante, dall'altro lato di simulare alcuni giorni di autunno favorevoli ad infezioni tardive.

Cancri basipeti dal punto di inoculazione si sono manifestati sia nel tardo autunno che all'inizio della stagione vegetativa successiva. La maggior parte dei cancri si è sviluppata entro la metà di dicembre e le loro frequenze sono diminuite con andamento pressochè lineare dalla prima alla quinta data di inoculazione. Ciò indica che infezioni tardive per ferita nel periodo settembre – ottobre possono causare cancri visibili prima dell'inverno e che la loro osservazione è tanto più probabile quanto più anticipato è il momento della inoculazione. Pochi cancri si sono resi visibili

solo all'inizio della ripresa vegetativa e le loro frequenze per le cinque date di inoculazione sono state simili (9% contro 6-7%). Ciò indica che per questi cancri fattori diversi dalle date di inoculazione hanno contribuito a far rimanere latenti le infezioni durante l'inverno.

La frequenza totale degli astoni sintomatici l'anno successivo è stata valutata 16/75 (21,3%). Ciò indica che circa 1/5 di astoni soggetti ad infezioni tardive per ferita in autunno manifesta l'anno successivo cancri basipeti dal punto di inoculazione.

I tentativi di reisolare il mutante endofita dalle piante asintomatiche dopo un anno dalla inoculazione autunnale ha avuto successo in 13 casi su 41 (31,7%). Ciò indica chiaramente che il mutante è riuscito a sopravvivere endofita in quasi un terzo degli astoni inoculati l'autunno precedente e rimasti asintomatici per tutta la stagione vegetativa successiva. Una sopravvivenza di circa il 30% è stata rilevata anche in rami di melo asintomatici appena svernati, inoculati l'anno precedente (Crepel *et al.*, 1996). Questi risultati dimostrano che *E.amylovora* a seguito di inoculazioni autunnali per ferita può sopravvivere per almeno un anno all'interno di astoni di pero asintomatici. La frequenza parziale di reisolamento di successo dagli astoni asintomatici inoculati il 21 settembre è stata superiore di rispetto alle altre date (80% verso 20-37%). Ciò suggerisce che la sopravvivenza in astoni asintomatici sia

tanto più frequente quanto più anticipata è l'infezione autunnale rimasta latente.

La tecnica di reisolamento per lavaggio non permette di conoscere in quali tessuti sia avvenuta la sopravvivenza. Le modalità di inoculazione suggeriscono che i batteri siano in larga parte penetrati nel legno. Di conseguenza è verosimile che la sopravvivenza abbia avuto luogo nello xilema secondario, via di traslocazione endofita già nota per *E. amylovora* (Van der Zwet, 1994). D'altra parte è noto che *E. amylovora* penetrando attraverso microscopiche ferite alla base dei peli fogliari rotti può traslocare in poche ore a distanza apprezzabile nello xilema dei germogli (Lewis e Goodman, 1965; Bogs *et al.*, 1998). La frequenza parziale dei reisolamenti di successo del mutante dai segmenti di fusto  $T_1$  immediatamente sotto il punto di inoculazione è stata più alta rispetto a quella degli altri segmenti. Ciò era atteso, considerando che quei tessuti erano stati direttamente esposti alla contaminazione. Le frequenze parziali dei reisolamenti di successo dagli altri segmenti sono invece risultati simili tra loro ed in particolare dal segmento  $B_2$  laterale più distante dal punto di inoculazione. Il reisolamento di *E.amylovora* dai segmenti  $B_1$  e  $B_2$  asintomatici sviluppatasi l'anno successivo suffraga l'interpretazione che negli astoni asintomatici il batterio si sia moltiplicato ed abbia colonizzato nuovi tessuti. Durante l'esperimento tentativi

di reisolare germi endofiti da tratti  $T_1$  e  $T_2$  da 17 piante asintomatiche nel periodo luglio-agosto non hanno avuto successo. In analogo esperimento in astoni di melo asintomatici inoculati l'autunno precedente il reisolamento del mutante ha avuto successo nel mese di maggio e settembre, ma non in luglio (Ceroni, 1999). Questi risultati suggeriscono che *E.amylovora* in piante ospiti asintomatiche possa avere una vera e propria fase di vita endofita avente una dinamica condizionata dalle condizioni ambientali e/o dallo stato fisiologico della pianta ospite (Hickey *et al.*, 1999).

La facilità con cui il mutante è stato reisolato dopo un anno da peri asintomatici suggerisce che la permanenza endofita in assenza di sintomi possa protrarsi oltre 1 anno.

Questa ipotesi è stata oggetto di una nuova ricerca avente lo scopo di valutare la sopravvivenza di *E.amylovora* fino a due anni. Nell'autunno 2001 con metodologia identica a quella descritta in questo lavoro il mutante virulento resistente alla rifampicina è stato inoculato in 274 astoni di pero. I periodi di temperature relativamente alte dell'autunno 2001 hanno reso sintomatiche prima dell'inverno al punto di inoculazione il 15% e 30% delle piante inoculate rispettivamente alle date 21 settembre e 1 ottobre. I peri inoculati nelle tre date successive sono rimasti invece asintomatici. Nell'autunno 2002, dopo un anno dalla inoculazione, i risultati preliminari indica-

no che il reisolamento del mutante dai peri asintomatici ha avuto successo in circa 16 % dei casi. Sebbene la percentuale di sopravvivenza endofita sia inferiore, i risultati della ricerca iniziata nel 2001 stanno confermando quelli del biennio precedente. Nell'autunno 2003 sarà valutata la sopravvivenza dopo 2 anni.

In conclusione, gli studi di tre anni sulla sopravvivenza endofita di *E. amylovora* in astoni asintomatici di pero hanno evidenziato che:

- infezioni di *E. amylovora* per

ferita possono aver luogo anche in autunno avanzato;

- le infezioni autunnali più precoci possono rendersi visibili solo poco dopo la ripresa vegetativa dell'anno successivo;

- una percentuale apprezzabile di infezioni autunnali possono dar luogo a infezioni latenti o meglio alla esistenza di popolazioni all'interno dei tessuti, probabilmente nello xilema, tali di essere ritrovate anche dopo un anno;

- la presenza duratura di germi di *E. amylovora* endofiti in piante asintomatiche può non esse-

re espressione di mera sopravvivenza. È verosimile che i batteri colonizzino nuovi tessuti;

- il rischio di infezioni latenti di portainnesti e astoni di pero appare verosimile se i campi di produzione sono prossimi a focolai di colpo di fuoco;

- sono giustificate tutte le misure volte ad assicurare adeguato isolamento fitosanitario dei campi di piante madri, di portainnesti e di astoni nei vivai;

- sono infine giustificati interventi chimici anche nel periodo autunnale.

## ABSTRACT

### Survival of *Erwinia amylovora* in symptomless pear scions

One year old pear scions were inoculated in the autumn with *Erwinia amylovora* on a pruning cut, 10 cm from the tip on 5 successive dates (21/09;1/10;11/10;21/10;31/10). The inoculum dose consisted of  $3 \cdot 10^4$  cells of a virulent Rif<sup>R</sup> mutant. The five groups of pears and the controls were kept in the open for one year. They were inspected each week to detect any symptoms of fire blight. All the symptomatic pear trees (17 out of 75) were eliminated by mid April. The frequency of symptomatic pear trees decreased from the first to the last inoculation date. One year after inoculation, the symptomless pears were monitored for the endophytic presence of the mutant. Reisolation on selective medium was successful for 13 out of 41 scions.

## Bibliografia

Billing E., Paulin J.P., 1990. *Field observation and epidemiological studies in relation to risk assesment*. In: Agrimed Research Programme, Fire Blight of Pomoideae. Ed. Jip. Paulin, Commissione della Comunità Europea. Eur 12601, 34-37.

Bogs J., Bruchmüller I., Erbar C., Geider K., 1998. *Colonization of host plants by the fire blight pathogen Erwinia amylovora marked with genes for bio-*

*luminescence and fluorescence*. Phytopathology 88, 416-421.

Calzolari A., Peddes P., Mazzucchi U., Mori P., Garzena C., 1982. *Occurrence of Erwinia amylovora in buds of asymptomatic apple plants in commerce*. Phytopathologische Zeitschrift 103, 156-162.

Ceroni P., 1999. *Sopravvivenza del mutante virulento Rif<sup>R</sup> di Erwinia amylovora in nicchie biotiche e abiotiche*. Tesi di Lau-

rea, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Bologna.

Crepel C., Geenen J., Maes M., 1996. *The latent survival of Erwinia amylovora in hibernating shoots*. Acta Horticulturae 411, 21-25.

Curto G., 1992. *Bilancio delle avversità in Emilia-Romagna*. Terra e Vita 5, 45-47.

Hickey K.D., Orolaza-Halbrendt N., Van der Zwet T., 1999. *The presence of endophytic Erwinia*



- amylovora bacteria in symptomless apple tissues on orchard trees. *Acta Horticulturae* 489, 209-214.
- Keil H.L., Van der Zwet T., 1972. Recovery of *Erwinia amylovora* from symptomless stems and shoots of Jonathan apple and Bartlett pear trees. *Phytopathology* 62, 39-42.
- Lelliott R.A., Stead D.E., 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases in plants*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom 216 pp.
- Lewis S.M., Goodman R.N., 1965. Mode of penetration and movement of fire blight bacteria in apple leaf and stem tissue. *Phytopathology* 55, 719-723.
- Mazzucchi U., Comelli R., 1977. Evidence against penetration of *Pseudomonas syringae* into sugar beet seeds. *Phytopathologische Zeitschrift* 88, 355-361.
- McManus P.S., Jones A.L., 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot blot and reverse-blot hybridation. *Phytopathology* 85, 618-623.
- Momol M.T., Norelli J.L., Piccioni D., Momol E.A., Gustafson H.L., Cummins J.N., Aldwinckle H.S., 1998. Internal movement of *Erwinia amylovora* through symptomless apple scions tissues into the rootstock. *Plant Disease* 82, 646-650.
- Van der Zwet T., 1994. The various means of dissemination of the fire blight bacterium *Erwinia amylovora*. *EPPO Bulletin* 24, 209-214.
- Van der Zwet T., Walter J., 1996. Presence of *Erwinia amylovora* in apparently healthy nursery propagating material. *Acta Horticulturae* 411, 127-129.



## ERWINIA AMYLOVORA E API: SOPRAVVIVENZA NELL'ALVEARE E DISSEMINAZIONE

**A.G. Sabatini, E. Carpana, M. Alexandrova**

Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna

**C. Porrini, C. Bazzi**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

### Introduzione

Il colpo di fuoco batterico, causato dal batterio Gram-negativo *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*, è una delle più gravi malattie di pero, melo e di numerose altre rosacee coltivate e spontanee (Vanneste, 2000). Il patogeno può essere disseminato a breve e a lunga distanza da agenti biotici (attrezzi, uccelli, insetti, operatori) e abiotici (pioggia, vento, aerosol) (Bazzi *et al.*, 1994). Nell'ospite, i fiori rappresentano uno dei più importanti siti di penetrazione del batterio: pertanto, le api, in considerazione della loro attività di bottinamento sui medesimi, sono state oggetto di studi per valutarne l'effettivo ruolo quali mezzi di disseminazione del batterio stesso (Larue *et al.*, 1984; De Wael *et al.*, 1990), senza tuttavia giungere a risultati conclusivi.

In Italia, i primi casi della batteriosi furono scoperti nel 1990 (Cariddi, 1990), mentre in Emilia-Romagna, dove sono concentrate estese coltivazioni di pero,

i primi focolai sono stati scoperti a partire dal 1994 (Calzolari *et al.*, 1999), raggiungendo, nel 1997, il livello di epidemia. Come conseguenza di tale situazione, è stato emanato un Decreto Ministeriale recante misure per la lotta obbligatoria contro il colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*) nel territorio della repubblica (D.M. 27 marzo 1996, in *Gazz. Uff.* n. 81 del 5 aprile 1996, sostituito dal D.M. 10 settembre 1999, n.356), comprendente limitazioni alla movimentazione degli alveari con conseguenze molto gravi sull'attività di nomadismo e di impollinazione guidata.

Allo scopo di definire i rapporti esistenti tra api ed *E. amylovora*, sono state intraprese diverse sperimentazioni con i seguenti obiettivi:

- determinare la longevità del batterio nelle varie matrici apistiche mediante studi in laboratorio e in semi-campo (gabbie);
- migliorare le conoscenze sulla capacità dell'ape di acquisire il patogeno da fiori infetti e disse-

minarlo a fiori sani attraverso sperimentazioni in serra;

- valutare l'applicabilità di un metodo di "risanamento" di alveari contaminati da *E. amylovora*, basato sulla quarantena e sul trattamento con acido ossalico, al fine di consentirne la movimentazione in aree esenti da colpo di fuoco batterico.

### Materiali e metodi

#### Sopravvivenza di *E. amylovora* nell'alveare

Lo scopo di questa ricerca, svolta nel periodo 1998-2000, è stato la definizione del periodo di sopravvivenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino delle api e nelle varie matrici apistiche (miele, cera, polline e propoli), sia in laboratorio, a 4°C, 15°C, 28°C e 35°C, che in alveari mantenuti all'aperto in primavera e in autunno.

Per gli esperimenti di laboratorio, un ceppo locale virulento di *E. amylovora* (OMP-BO 1077.7/94) è stato marcato per antibiotico-resistenza a rifampi-

cina ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Per i saggi di laboratorio i campioni di miele, cera, polline, propoli e api sono stati contaminati con la sospensione del mutante Rif<sup>r</sup> ( $10^8 \text{UFC ml}^{-1}$ ) secondo le seguenti modalità: un volume di 100 ml di sospensione Rif<sup>r</sup> è stato aggiunto a 1000 g di miele e mescolato accuratamente; campioni di cera (500 g), polline (100 g), propoli (20 g) e api (800 individui) sono stati uniformemente contaminati con la sospensione del mutante; per ottenere la contaminazione interna delle api, 10  $\mu\text{l}$  della sospensione Rif<sup>r</sup> sono stati miscelati con un uguale volume di una soluzione zuccherina al 50% e ogni ape è stata nutrita con 20  $\mu\text{l}$  della miscela. Dopo la contaminazione, i campioni sono stati conservati a 4, 15, 28 e 35°C.

Per le prove di semi-campo, condotte nell'autunno 1998 e 1999 e nella primavera 1999 e 2000, due alveari, chiusi in una ampia gabbia di rete a maglie strette, sono stati contaminati nebulizzando all'interno, direttamente sui favi e sulle api, 150 ml per alveare della sospensione del mutante Rif<sup>r</sup> alla concentrazione di circa  $10^8 \text{UFC ml}^{-1}$ . La temperatura e l'umidità relativa negli alveari sono state misurate e registrate per mezzo di sonde Tinytalk® II Data Loggers insieme con OTLM Software. La longevità di *E. amylovora* nelle varie matrici apistiche e nelle api è stata determinata mediante reisolamenti quantitativi su substrato semi-selettivo NSA addizionato di  $100 \text{mg ml}^{-1}$  di rifampici-

na. In seguito, colonie rappresentative di *E. amylovora* sono state sottoposte ad analisi Bio-PCR (Schaad *et al.*, 1995) con gli inneschi A e B di Bereswill *et al.* (1992).

### Disseminazione di *E. amylovora*

Nella primavera del 2000, del 2001 e del 2002 sono stati condotti esperimenti in serra per valutare il ruolo dell'ape nella disseminazione di *E. amylovora* da:

a) fiori contaminati ad alveari sani;

b) alveari contaminati a fiori sani.

Gli esperimenti sono stati condotti in una serra condizionata, suddivisa in tre compartimenti chiusi e, per ognuno di essi, sono stati usati 15 astoni di pero (5 per settore) cv. Packams's Triumph in piena fioritura. Durante tutta la sperimentazione sono stati registrati i valori di temperatura e di umidità relativa all'interno della serra. Per la contaminazione dei corimbi fiorali e degli alveari sono state usate sospensioni batteriche di giovani cellule di *E. amylovora* alla concentrazione rispettivamente di  $10^6 \text{UFC ml}^{-1}$  e  $10^8 \text{UFC ml}^{-1}$ .

a) *Disseminazione da fiori contaminati ad alveari sani* - Nella primavera 2000, gli astoni di pero posti nel primo compartimento sono stati contaminati con la sospensione di *E. amylovora*; dopo 72 ore, è stato introdotto nello stesso settore un alveare esente da *E. amylovora* e lasciato a contatto con i peri inoculati per 24 ore. In seguito,

è stato spostato nel secondo compartimento dove è rimasto per altre 24 ore a contatto con 5 astoni di pero sani. Trascorse ulteriori 24 ore l'alveare è stato sistemato nel terzo compartimento con altre 5 peri sani.

b) *Disseminazione da alveari contaminati a fiori sani* - Nella primavera 2001, un alveare è stato contaminato nebulizzando direttamente sui favi e sulle api 150 ml della sospensione di *E. amylovora*. Subito dopo, è stato posto nel primo compartimento della serra insieme a 5 astoni di pero sani in piena fioritura precedentemente collocati. Dopo 24 ore, lo stesso alveare è stato spostato nel secondo compartimento assieme ad altri 5 astoni di pero sani; infine, dopo 24 ore, è stato spostato nel terzo compartimento per un ulteriore giorno. Lo stesso esperimento è stato eseguito contemporaneamente e con le stesse modalità usando un alveare in cui le api sono state alimentate con una sospensione di *E. amylovora* in soluzione zuccherina al 25%.

Ogni 24 ore, cioè prima dello spostamento dell'alveare da un compartimento all'altro, è stato fatto un campionamento di fiori (50 per albero) e di api (100 api-corpo e 100 api-intestino). L'esperimento è stato ripetuto nella primavera 2002, raccogliendo dagli alveari, oltre alle api, anche campioni di miele, cera e polline.

Il rilevamento di *E. amylovora* è stato effettuato mediante reisolamento quantitativo su terreno selettivo CCT e mediante Bio-PCR.

## Procedure di risanamento

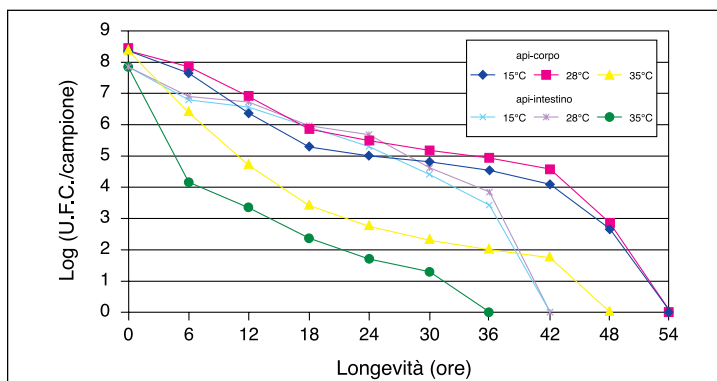
### Protocollo di quarantena

Si è cercato di mettere a punto un metodo per il "risanamento" di alveari situati in aree dove la malattia è endemica ed interessati a programmi di nomadismo in zone indenni nel periodo considerato a rischio. Sulla base dei dati sperimentali relativi alla sopravvivenza e degli esiti di un ampio monitoraggio del territorio regionale (Ghini *et al.*, 2002), al fine di ottenere l'autorizzazione da parte del Servizio Fitosanitario Regionale alla movimentazione degli alveari, si è convenuto di procedere nel seguente modo:

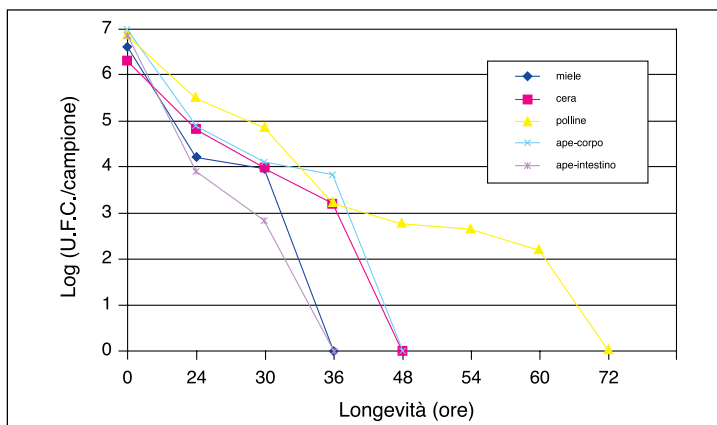
- campionare un alveare su tre, presenti nell'apiario interessato allo spostamento, prelevando da ciascuno (dall'entrata dell'arnia oppure dalla regione periferica del nido) un minimo di venti api bottinatrici;
- introdurre le api in contenitori idonei (scatolette di cartone o gabbiette da spedizione) a garantirne la sopravvivenza fino alla consegna al laboratorio, consegna che comunque deve avvenire entro quattro ore;
- confinare in ambiente chiuso dopo il prelievo tutti gli alveari destinati allo spostamento che potrà avvenire soltanto quando sarà stata accertata, tramite analisi batteriologiche, l'assenza di cellule vitali di *E. amylovora* nei campioni (non oltre le 48 ore).

### Trattamento degli alveari con acido ossalico

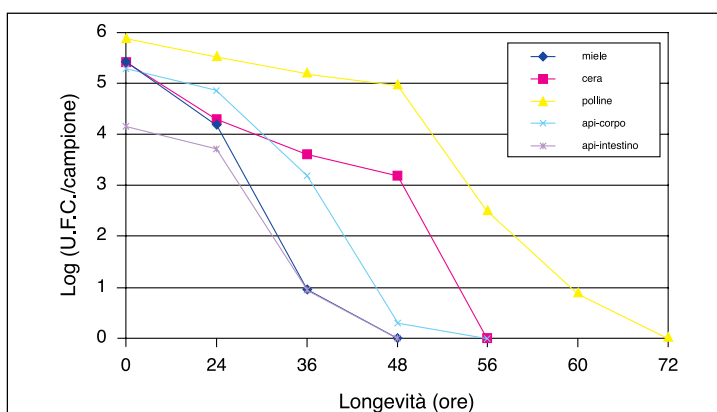
L'acido ossalico viene largamen-



**Figura 1** - Longevità di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape a diverse temperature



**Figura 2** - Longevità di *E. amylovora* in alveari mantenuti all'aperto nella primavera del 1999



**Figura 3** - Longevità di *E. amylovora* in alveari mantenuti all'aperto, nell'autunno del 1999

**Tabella 1** - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape (UFC/campione) dopo aver visitato fiori di pero contaminati artificialmente con il batterio (esperimento 2000)

Comparto	Ore dal contatto	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo	Api-intestino
1	24	5/5 (non determinato)	$8,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
2	48	5/3 ( $3 \times 10^5$ )	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0

**Tabella 2** - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante nebulizzazione a fiori di pero sani (esperimento 2001)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi contaminati (UFC/camp.)	Api-corpo $T_0 = 3,7 \times 10^7$	Api-intestino $T_0 = 0$
1	24	5/3 ( $4,6 \times 10^3$ )	$2,5 \times 10^3$	0
2	48	5/0 (0)	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0

**Tabella 3** - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante alimentazione a fiori di pero sani (esperimento 2001)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi contaminati (UFC/camp.)	Api-corpo $T_0 = 7 \times 10^3$	Api-intestino $T_0 = 2,5 \times 10^6$
1	24	5/3 ( $1 \times 10^5$ )	$1,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^2$
2	48	5/3 ( $2 \times 10^3$ )	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0

te utilizzato in apicoltura come principio attivo di origine naturale efficace nel trattamento profilattico degli alveari contro la varroasi. Il prodotto viene somministrato mediante uno o più trattamenti nell'arco della medesima stagione. Da qui l'interesse a verificarne l'efficacia battericida nei confronti di cellule di *E. amylovora* eventualmente contaminanti gli alveari.

Nell'autunno 2002, tre alveari sono stati contaminati con la sospensione di *E. amylovora*, alla concentrazione di  $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>, quindi dopo 30 min sono stati trattati con soluzioni di acido ossali-

co, secondo il seguente schema:

- *alveare 1*: somministrazione mediante nebulizzatore di 50 ml di una soluzione al 3% di acido ossalico;
- *alveare 2*: somministrazione mediante gocciolamento di 50 ml di una soluzione zuccherina (1:1) al 4% di acido ossalico;
- *alveare 3*: controllo non trattato.

A diversi intervalli di tempo è stata rilevato il livello di contaminazione di *E. amylovora* in campioni di api mediante reisolamento diretto su substrato semi-selettivo CCT. Per ogni prelievo, sono stati analizzati 3

campioni di api per alveare.

## Risultati e discussione

### Sopravvivenza di *E. amylovora* nell'alveare

La sopravvivenza dei batteri sul corpo delle api è stata di 48 ore a 15 e 28°C, mentre a 35°C sono stati rilevati batteri vitali fino a 42 ore dopo la contaminazione. Nell'intestino delle api, i batteri sono sopravvissuti per un massimo di 36 ore a 15 e 28 °C, mentre a 35°C sono stati reisolati batteri vitali fino a 30 ore dopo la contaminazione (fig. 1 - pag. 63). Negli alveari tenuti in campo du-

**Tabella 4** - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape e nelle matrici apistiche (UFC/campione) dopo aver visitato fiori di pero contaminati artificialmente con il batterio (esperimento 2002)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo	Api-intestino	Miele	Cera	Polline
1	24	5/5 (5,3x10 <sup>10</sup> )	3x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>5</sup>	0	5x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>
2	48	5/4 (3,4x10 <sup>5</sup> )	0	0	0	3x10	8x10 <sup>2</sup>
3	72	5/0 (0)	0	0	0	0	0

**Tabella 5** - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape e nelle matrici apistiche (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante nebulizzazione a fiori di pero sani (esperimento 2002)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo T <sub>0</sub> =5,7x10 <sup>6</sup>	Api-intestino T <sub>0</sub> =2,4x10 <sup>3</sup>	Miele T <sub>0</sub> =3x10 <sup>4</sup>	Cera T <sub>0</sub> =5x10 <sup>6</sup>	Polline T <sub>0</sub> =4x10 <sup>5</sup>
1	24	5/5 (5x10 <sup>7</sup> )	3,2x10 <sup>5</sup>	5,3x10	2x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>4</sup>
2	48	5/4 (2,8x10 <sup>3</sup> )	6x10 <sup>2</sup>	0	0	0	3,2x10 <sup>2</sup>
3	72	5/0 (0)	0	0	0	0	0

**Tabella 6** - Persistenza di *E. amylovora* sul corpo e nell'intestino dell'ape e nelle matrici apistiche (UFC/campione) dopo disseminazione da alveari contaminati mediante alimentazione a fiori di pero sani (esperimento 2002)

Comparto	Ore dalla contaminazione	N° alberi totali/alberi infetti (UFC/camp.)	Api-corpo T <sub>0</sub> =3x10 <sup>3</sup>	Api-intestino T <sub>0</sub> =5,5x10 <sup>6</sup>	Miele T <sub>0</sub> =0	Cera T <sub>0</sub> =6x10	Polline T <sub>0</sub> =1x10 <sup>2</sup>
1	24	5/3 (2x10 <sup>4</sup> )	2,5x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>3</sup>	3,3x10	1,7x10 <sup>2</sup>	4,3x10
2	48	5/0 (0)	0	0	0	0	0
3	72	5/0 (0)	0	0	0	0	0

rante la primavera, la sopravvivenza dei batteri è stata: 30 ore nel miele e nell'intestino dell'ape, 36 ore nella cera e sul corpo dell'ape, 60 ore nel polline (fig. 2 - pag. 63); durante l'autunno, la sopravvivenza di *E. amylovora* è stata: nel miele, 36 ore per la zona periferica del favo e 36-48 ore per l'area della covata; nella cera 48 ore; nel polline 60 ore; sul corpo e nell'intestino dell'ape rispettivamente 48 e 36 ore (fig. 3 - pag. 63). In altre sperimentazioni, condotte nella primavera 2000, è stato osservato che nel polline la sopravvivenza di *E. amylovora* può protrarsi fino a

72 ore, mentre per le altre matrici i dati ottenuti nel 1999 sono stati tutti confermati.

I risultati ottenuti dimostrano che sul corpo delle api, eventuali agenti di disseminazione di *E. amylovora* in campo, la sopravvivenza del batterio non supera le 48 ore.

#### Disseminazione di *E. amylovora*

Dopo aver visitato i fiori di pero contaminati con *E. amylovora*, le api sono risultate contaminate e in grado di trasportare il patogeno a piante sane in piena fioritura. Tuttavia a 48 ore dal pri-

mo contatto delle api con i fiori infetti non sono stati trovati batteri vitali sul corpo né nell'intestino delle api (tabb. 1 e 4), mentre questi erano ancora presenti nella cera e nel polline (tab. 4). Le api di alveari contaminati sperimentalmente hanno trasportato cellule di *E. amylovora* a fiori di pero sani per meno di 48 ore dal momento della contaminazione iniziale. Non sono stati infatti reisolati batteri vitali dalla superficie corporea e dall'intestino delle api, oltre le 24 ore dalla contaminazione degli alveari per nebulizzazione e per alimentazione (tabb. 2, 3, 5, e 6). Nel 2002,

**Tabella 7** - Risultati ottenuti nel corso dei controlli effettuati

Anno	N. Alveari controllati	N. alveari positivi alla presenza di <i>E. amylovora</i>
1999	300	0
2000	499	0
2001	691	0
2002	550	0

### Sopravvivenza di *E. amylovora* in alveari trattati con acido ossalico

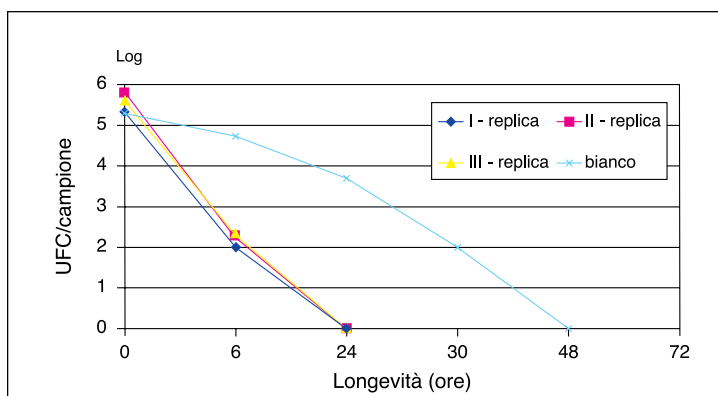
La longevità di *E. amylovora* si riduce significativamente in conseguenza della forte acidificazione dell'ambiente interno all'alveare provocata dal trattamento

solo in seguito alla contaminazione tramite nebulizzazione, batteri vitali sono stati trovati sul corpo delle api anche 48 ore dopo la contaminazione (tab. 5). Inoltre i batteri sono sopravvissuti solo per 24 ore dalla contaminazione iniziale in tutte le matrici apistiche nell'esperimento per ingestione (tab. 6), mentre solo nel polline sono rimasti vitali anche a 48 ore dalla contaminazione per nebulizzazione (tab. 5).

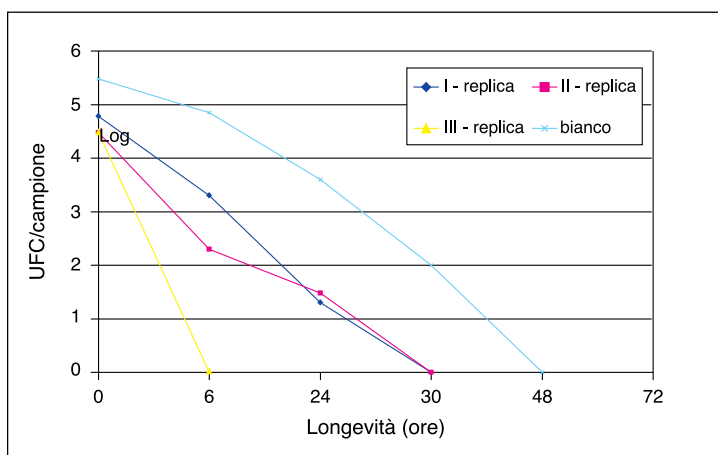
### Procedure di risanamento

#### Quarantena

Il protocollo di risanamento messo a punto, sebbene potenzialmente molto efficace in quanto basato su due livelli di sicurezza, (analisi di laboratorio e successivo periodo di quarantena di 48 ore), è risultato abbastanza complicato nella sua attuazione in particolare per quanto riguarda la costrizione delle api e l'individuazione di ambienti adatti al loro temporaneo collocamento. Tuttavia i confortanti dati ottenuti (tab. 7) e la fattiva collaborazione degli apicoltori è di stimolo per migliorare in futuro le procedure di messa in quarantena degli alveari.



**Figura 4** - Longevità di *E. amylovora* in alveare sperimentale contaminato e successivamente trattato con acido ossalico irrorato sui favi



**Figura 5** - Longevità di *E. amylovora* in alveare sperimentale contaminato e successivamente trattato con acido ossalico somministrato per gocciolamento



con acido ossalico, come chiaramente evidenziato dai grafici delle *figure 4 e 5*. La somministrazione per nebulizzazione si è dimostrata la più efficace (longevità inferiore a 24 ore), ma il numero limitato di dati sperimentali non ci consente di trarre

conclusioni definitive in tal senso.

In ogni caso la tecnica del gocciolamento è quella comunemente adottata dagli apicoltori. Questi risultati preliminari suggeriscono la possibilità di usare l'acido ossalico come meto-

do chimico di risanamento degli alveari da *E. amylovora* che, sebbene di efficacia parziale, consentirebbe di abbreviare sensibilmente il periodo di quarantena previsto dalle procedure precedentemente descritte.

### **T** *Erwinia amylovora* survival in honeybee and its dissemination

Studies on the role of honeybees in the dissemination of the bacterium *Erwinia amylovora* and as bioindicators of its presence in the environment.

Fire blight, caused by the Gram-negative bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* is one of most serious diseases on apple, pear and many other species of the *Rosaceae* family. As a consequence of disease spreading in Italy, and particularly, in the Emilia-Romagna region, different studies to evaluate the role of honeybee in the dissemination of *E. amylovora* were undertaken.

*E. amylovora* monitoring programs based on visual inspections. Second, *E. amylovora* longevity in honey, beeswax, pollen and propolis, as well as on honeybee bodies and in honeybee intestines, was studied both in laboratory, at different temperature regimes (4, 15, 28 e 35°C), and under outdoor conditions, in spring and autumn. It emerges that in the laboratory the bacterium longevity is inversely correlated with the storing temperature and under outdoor conditions *E. amylovora* is more persistent in autumn than in spring, in all tested matrixes. No bacteria were found in propolis. Third, the role of honeybees in the dispersal of *E. amylovora* from infected to healthy pear flowers and from contaminated beehives to healthy pear flowers was investigated. It was demonstrated that honeybees, having visited infected pear flowers, can transfer the bacterium on healthy ones within 48 hours. Finally, operating procedures and tests with oxalic acid allowing rational beehives moving from infected to disease-free areas were set up.

### **Bibliografia**

Bazzi C., Tagliati M.E., Spina F., Bendini L., 1994. *Disseminazione di Erwinia amylovora a breve ed a grande distanza. Atti giornate di studio sul colpo di fuoco da Erwinia amylovora*. U. Mazzocchi (ed.), Tecno-print s.n.c., Bologna, 29-40.

Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K., 1992.

*Sensitive and species-specific detection of Erwinia amylovora by polymerase chain reaction analysis*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3522-3526.

Calzolari A., Finelli F., Ponti I., Mazzoli G.L., 1999. *L'esperienza dell'Emilia Romagna nella lotta al colpo di fuoco*. L'Inf.tore Agr. 14, 65-70.

Cariddi C., 1990. *Colpo di fuoco*

*sul pero*. Terra e Vita 34, 67-69.

De Wael L., De Greef M., Van Laere O., 1990. *The honeybee as a possible vector of Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.* Acta Hort. 273, 107-113.

Ghini S., Girotti S., Calzolari A., Sabatini A.G., Alessandrini A., Zeri L., Porrini C., 2002. *Use of honeybees (Apis mellifera L.) as indicators of the presen-*

- ce pf the phytopathogenic bacteria Erwinia amylovora*. Ins. Soc. Life 4, 69-77.
- Larue P., Desbons C., Lecomte P., 1984. *Activity of pollinating insects of fire blight host plants*. Acta Hort. 151, 137-143.
- Merighi M., Malaguti S., Bazzi C., Sandrini A., Landini S., Ghini S., Girotti S., 1999. *Specific detection of Erwinia amylovora by immunoenzymatic determination of PCR products*. Acta Hort. 489, 39-42.
- Merighi M., Sandrini S., Landini S., Ghini S., Girotti S., Malaguti S., Bazzi C., 2000. *Chemiluminescent and colorimetric detection of Erwinia amylovora by immunoenzymatic determination of PCR amplicons (PCR-ELISA) from plasmid pEA29*. Plant Disease 84, 49-54.
- Schaad N.W., Cheong S.S., Tamaki S., Hatziloukas E., Panopoulos N.J., 1995. *A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect Pseudomonas syringae pv. phaseolicola in bean seed extracts*. Phytopathology 85, 243-248.
- Vanneste J., 2000. *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. Ed. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, UK, 370 pp.

## RILEVAZIONE DI *ERWINIA AMYLOVORA* NELL'AMBIENTE MEDIANTE API

**S. Ghini\***, **S. Girotti**

Istituto di Scienze Chimiche, Università di Bologna

**F. Baroni**

\*Soc. Coop. La Carlina, Ferrara

**G. Celli, C. Bazzi, C. Porrini**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

**A. Calzolari**

Servizio Fitosanitario, Regione Emilia-Romagna

**M. Musiani**

Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Università di Bologna

**A. G. Sabatini**

Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna

### Introduzione

Dopo la recente diffusione del colpo di fuoco batterico nella nostra Regione si è avvertita la necessità di avere a disposizione più efficienti metodi di monitoraggio della malattia (Calzolari *et al.*, 1999; Van Der Zwet, 1995). A tutt'oggi, nonostante i parziali risultati ottenuti con nuovi trattamenti fitoiatrici, il metodo di lotta più efficace per contenere questa grave patologia delle rosacee resta l'individuazione precoce dei sintomi sospetti nei frutteti, seguita dalla conferma microbiologica della presenza di *Erwinia amylovora*, e quindi

dalla distruzione di tutto il materiale infetto (Calzolari *et al.*, 1999; Van der Zwet, 1995). Questo metodo, tuttavia, richiede costanti, difficoltose e dispendiose ispezioni dirette sul campo, e quindi è estremamente difficile da sostenere per lunghi periodi in aree coltivate molto estese, ed è praticamente impossibile da realizzare in zone poco accessibili a prevalente flora spontanea.

Per superare questi problemi si è pensato di impiegare l'ape come biosensore per la rilevazione della presenza di *Erwinia amylovora* nell'ambiente, analogamente a quanto viene fatto per

il monitoraggio di pesticidi e radionuclidi (Celli *et al.* 1991 e 1996, Crane, 1984; Ghini *et al.*, 2002; Merighi *et al.*, 1999 e 2000; Svoboda, 1962).

### Finalità della ricerca

Scopo di questa ricerca è mettere a punto un sistema di monitoraggio continuo della presenza di *E. amylovora* basato sull'impiego dell'ape, sfruttando la sua caratteristica di portare quotidianamente all'alveare milioni di microcampioni provenienti da diverse matrici come nettare, polline, acqua, secrezioni varie di gemme, melata di afidi ecc., da un'area circostante dell'ordi-

ne di alcune centinaia di ettari. Se, come molti affermano, l'insetto è vettore del batterio, ricercando con metodi analitici sufficientemente sensibili la presenza di *E. amylovora* in campioni opportunamente scelti nell'alveare si potrebbe impiegare l'ape come costante "spia" naturale per controllare la diffusione del patogeno nell'ambiente su vaste aree, comprendendo anche le rosacee spontanee, con frequenze molto alte e a costi ragionevoli sia in zone colpite sia in zone indenni, cosa estremamente difficile con ispezioni e campionamenti sistematici diretti, che verrebbero così orientati in modo più mirato e meno oneroso.

In ogni caso con le evidenze sperimentali derivanti da questa ricerca si dovrebbero ottenere migliori mezzi diagnostici per *E. amylovora* per quanto riguarda il limite di rivelazione e la specificità, nonché una più approfondita conoscenza sui meccanismi associati alla biologia ed epidemiologia di *E. amylovora* nel nostro agroecosistema. In particolare sarebbero utili informazioni più precise sul ruolo degli insetti pronubi, come le api, in funzione di vettori del "Colpo di fuoco" nella nostra realtà agricola, consentendo, tra l'altro, di perfezionare le prescrizioni del Servizio Fitosanitario Regionale relativamente alla movimentazione degli alveari nelle zone ritenute a rischio, in modo da unire l'efficacia dei provvedimenti al minimo danno per l'ecosistema, per l'attività apistica e per quel-

le colture che dipendono dall'impollinazione da parte delle api.

### **Messa a punto di un nuovo metodo PCR-ELISA-chemiluminescente per la rivelazione del fitopatogeno *Erwinia amylovora* nel polline - 1998**

Tra i materiali presenti nell'alveare che possono essere usati come matrice per l'estrazione e la ricerca di *Erwinia amylovora* sono compresi il miele, il corpo delle api ed il polline. Per iniziare la messa a punto del monitoraggio si è scelto il polline, per le sue caratteristiche di relativa semplicità di campionamento, di "pulizia" della matrice, per la brevità del tempo intercorrente tra la raccolta da parte dell'ape ed il prelievo per l'analisi e la possibilità di accertare con sicurezza le specie vegetali visitate dall'ape. Solo dopo aver dimostrato la validità del metodo di rivelazione su polline si è passati a sperimentarlo anche su altre matrici dell'alveare.

In seguito a stime sulla probabilità di intercettazione del batterio da parte delle api è apparso subito evidente che le concentrazioni sul polline raccolto sarebbero state in ogni caso molto piccole. I metodi di rivelazione microbiologici disponibili all'inizio di questa ricerca non sembravano adeguati all'applicazione in questo caso specifico, sia per il limite di rivelazione troppo elevato, sia per la complessità del procedimento e la sua scarsa automatizzabilità, requisiti in-

dispensabili per l'esecuzione del notevole numero di analisi richieste dal monitoraggio ambientale.

Si è pensato quindi di sperimentare alcune metodiche alternative potenzialmente promettenti (es: saggi immunologici) che si sono però dimostrate ancora insufficienti. In seguito a questo lavoro preliminare si è deciso di sviluppare un metodo originale di diagnosi biomolecolare automatizzabile ed idoneo all'analisi su larga scala, basato sull'amplificazione *in vitro* del DNA genomico di *E. amylovora* mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) associata alla determinazione immunoenzimatica dei prodotti di amplificazione mediante sonde oligonucleotidiche biotilate. Si è cioè cercato di mettere a punto una metodica basata su marcatori molecolari che combina le potenzialità di amplificazione della PCR (dimostratasi molto migliore dei metodi convenzionali di isolamento diretto) con la specificità dell'ibridazione molecolare. La fase finale si basa su un procedimento ELISA con possibilità di rivelazione spettrofotometrica o chemiluminescente. Alla luce dei risultati ottenuti, utilizzando sia colture pure del patogeno sia campioni di materiale vegetale, è stata scelta la via chemiluminescente che ha fornito un limite di rivelazione da 10 a 100 volte inferiore rispetto a quella spettrofotometrica. Il metodo è stato provato con risultati soddisfacenti su polline fresco, liofilizzato e congelato (Merighi

**Tabella 1** - Confronto fra diversi metodi diagnostici per *Erwinia amylovora*

Tecnica	Sistema di rivelazione	Limite di rivelazione	Specificità	Tempi (giorni)	Automazione	Test multipli	Costo unitario (€)
PCR	Etidio bromuro	$1,3 \times 10^3$ cellule per tubo di reazione	+/- *	1	no	+/- **	1,55
PCR dot-blot	Chemi-luminescente	$1,3 \times 10^0$ - $1,3 \times 10^1$ cellule per tubo di reazione	+	2	no	sì	2,58
PCR-ELISA	Chemi-luminescente	$2,6 \times 10^0$ cellule per tubo di reazione	+	1	sì	sì	3,72
ELISA	Chemi-luminescente	$6,8 \times 10^3$ - $6,8 \times 10^4$ CFU per pozzetto di reazione	+/- *	3	sì	sì	5,58

\* = possibili reazioni crociate con alcuni ceppi batterici fitopatogeni o associati epifiticamente alle piante ospiti

\*\*= dispendioso in termini di costo e tempo

*et al.*, 1999 e 2000). Lo schema a blocchi è riportato nella *figura 1* a pag. 72 ed il confronto con altri metodi è riportato in *tabella 1*, tenendo conto che per campioni reali di polline il limite viene considerato 10 volte superiore a quello tabulato.

### Sperimentazione del metodo PCR-ELISA luminescente su polline raccolto dalle api in zone con focolai accertati di colpo di fuoco 1998-1999

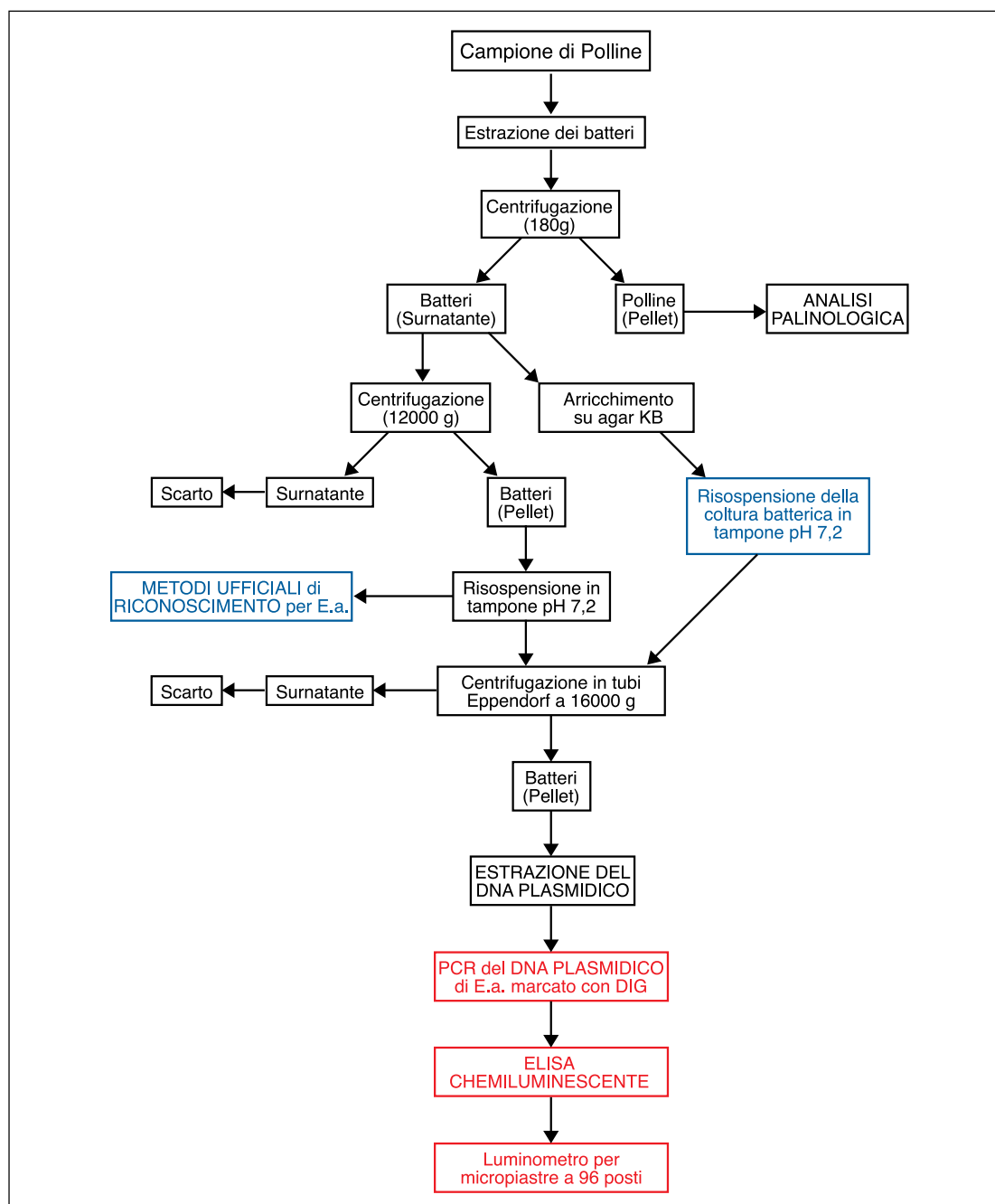
#### Installazione delle stazioni e raccolta dei campioni

Come condizione indispensabile per poter utilizzare l'ape come indicatore ambientale della presenza del colpo di fuoco delle rosacee, occorre verificare se nel polline raccolto dalle api in aree interessate dal colpo di fuoco fosse possibile identificare la

presenza del batterio *Erwinia amylovora* applicando il nuovo metodo PCR-ELISA. A questo scopo sono state installate 6 stazioni di monitoraggio nel 1998 e 7 stazioni nel 1999 in una porzione di territorio, compreso fra le province di Ferrara e di Bologna, caratterizzato dalla presenza di numerosi focolai ufficialmente accertati della grave fitopatologia. In base a studi etologici l'area di raccolta di ciascuna stazione viene convenzionalmente considerata un cerchio con un raggio di 1,5 km centrato sulla stazione e di circa 7 km<sup>2</sup> di superficie.

Ogni stazione era formata da tre alveari muniti di trappola per la raccolta del polline. I prelievi dei campioni sono stati eseguiti tra aprile, periodo della fioritura principale dei peri, e luglio, con frequenza media di due volte la settimana. I campioni di polline

venivano congelati a -80°C subito dopo la raccolta e poi conservati per le analisi successive a -20°C. La localizzazione delle prime 5 stazioni è stata fatta principalmente avendo cura che nel raggio di 1,5 km dagli alveari si trovassero frutteti di pero o melo con focolai di colpo di fuoco accertati negli anni precedenti. Di queste le località di S. Agostino (FE), Pieve di Cento (BO), Casoni (Minerbio -BO) erano già interessate dalla fitopatologia fin dal 1996, mentre Palata Pepoli (BO) e Crevalcore (BO) erano state particolarmente colpite nel 1997 in seguito anche alle numerose grandinate a cui questa zona è stata soggetta in quell'anno. La sesta stazione presso Casetti di Cadriano (Granarolo-BO) si trovava in un'area considerata al limite tra aree infette ed aree ancora indenni. Nel 1999 alle 6 stazioni del 1998 è stata aggiun-



**Figura 1** - Schema a blocchi del nuovo metodo PCR-ELISA chemiluminescente per il riconoscimento di *Erwinia amylovora* nel polline raccolto dalle api

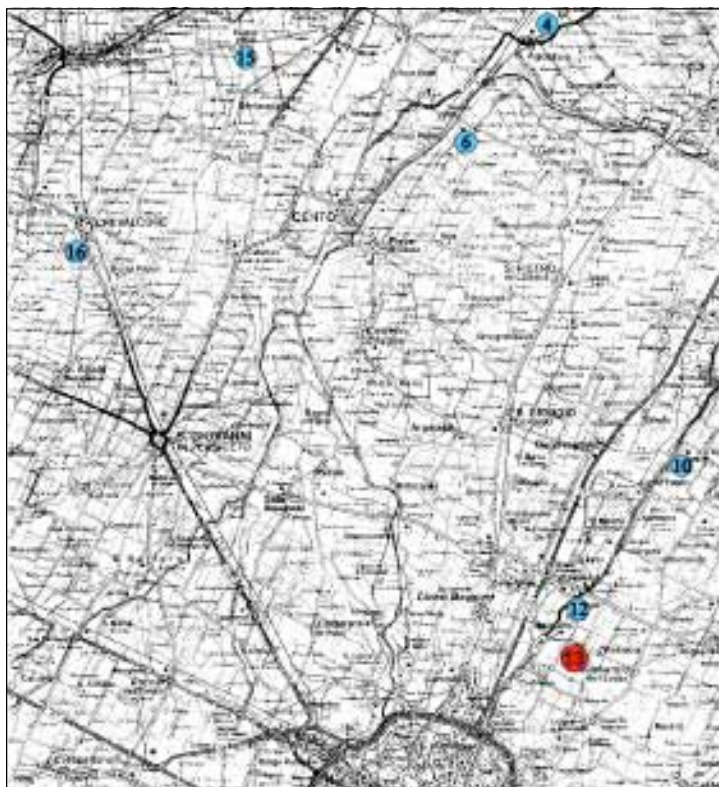
ta la stazione di Casino di Cadriano (Granarolo-BO) in un'area non contagiata dalla batteriosi ma vicino al limite raggiunto dall'epidemia l'anno precedente, allo scopo di avere un controllo negativo e di valutare un'eventuale ulteriore diffusione della malattia (fig. 2).

### Risultati sperimentali e discussione

Come riportato nelle figure 3 e 4 a pag. 74, nel biennio 1998-1999 sono stati analizzati 217 campioni di polline ed è stata riscontrata la presenza di *Erwinia amylovora* in almeno un campione in tutte le stazioni nel cui raggio di azione erano compresi focolai accertati di "Colpo di fuoco" (S. Agostino, Palata, Crevalcore, Pieve di Cento) tranne la stazione di Casoni (Minerbio, BO) nel 1998. L'assenza di campioni positivi in quest'ultima stazione nel 1998 potrebbe essere spiegata dai massicci abbattimenti, avvenuti nel corso del 1997, di interi frutteti pesantemente colpiti dalla malattia fin dal 1996. Invece nessuno dei campioni provenienti dalla stazione di Casetti di Cadriano (Granarolo, BO), posta al limite dell'area considerata infetta, è risultato positivo.

Nelle stazioni in cui è stato rilevato il patogeno la percentuale media dei campioni positivi sul totale è stata di circa il 15%, prevalentemente concentrati nei mesi di aprile e maggio (oltre 70% dei positivi).

Questi risultati hanno dimostrato



#### Stazioni 1998

- |                        |                              |                     |
|------------------------|------------------------------|---------------------|
| 4) S. Agostino (FE)    | 10) Casoni (BO)              | 15) Palata (BO)     |
| 6) Pieve di Cento (BO) | 12) Casette di Cadriano (BO) | 16) Crevalcore (BO) |

#### Stazione aggiunta nel 1999

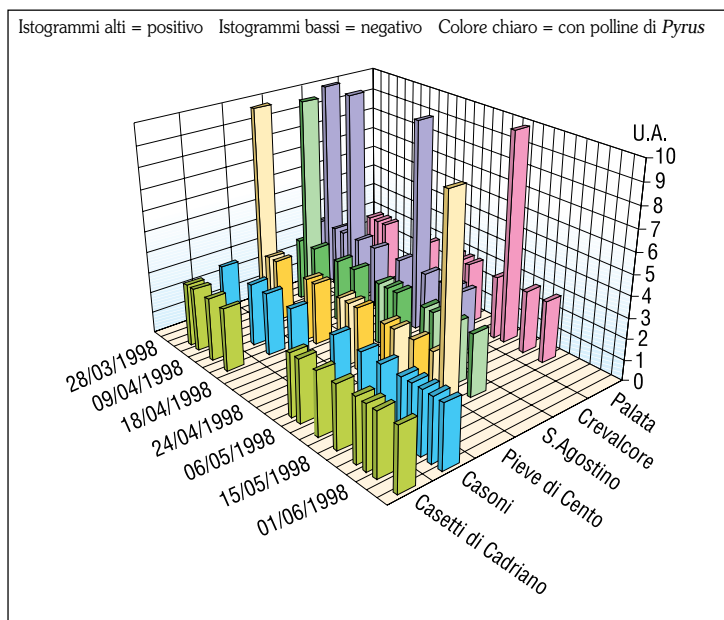
- 13) Casino di Cadriano

**Figura 2** - Monitoraggio di *Erwinia amylovora* con api. Mappa delle stazioni 1998-99

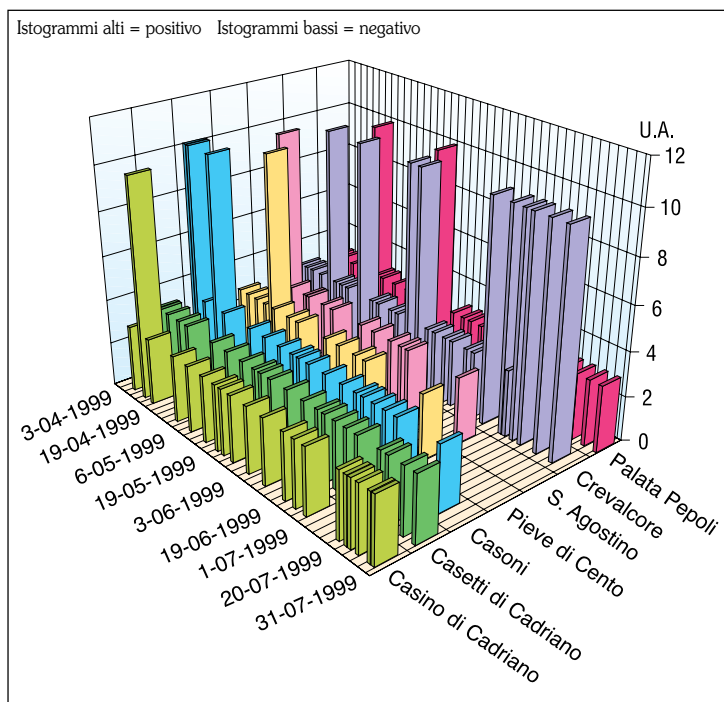
che, se nell'area di bottinamento degli alveari esistono casi rilevabili visivamente di colpo di fuoco, c'è un'alta probabilità che almeno un campione di polline primaverile prelevato due volte la settimana sia contaminato da *Erwinia amylovora*, aprendo la possibilità di studiare concretamente l'impiego dell'ape come indicatore

della presenza della patologia nell'ambiente circostante.

Ancora più interessanti sono state le prospettive suggerite dai dati della stazione di Casino di Cadriano (Granarolo, BO). Nonostante l'area circostante fosse considerata indenne, in un campione di polline raccolto durante il periodo di fioritura del pero



**Figura 3** - Campioni di polline analizzati nelle stazioni di monitoraggio del 1998



**Figura 4** - Campioni di polline analizzati nelle stazioni di monitoraggio del 1999

(16 aprile 1999) è stata riscontrata la presenza di *Erwinia amylovora*, facendo pensare ad un falso positivo. Alcuni mesi più tardi, invece, in un giovane pereto situato nel raggio di esplorazione delle api si sono sviluppati i sintomi del colpo di fuoco. Questo dato, se confermato, potrebbe consentire di usare le api per rilevare la presenza del patogeno molto tempo prima della manifestazione visiva dei sintomi della malattia.

### Monitoraggio della propagazione di *Erwinia amylovora* nell'ambiente mediante schiera lineare di stazioni ai margini dell'area interessata dal colpo di fuoco nella provincia di Forlì-Cesena - 2000-2002

#### Metodo analitico e campionamento

Sulla base dell'esperienza fatta nel 1998 -1999, è stato deciso di mantenere invariato il numero di alveari per stazione (3) ed il metodo di campionamento. La frequenza di campionamento invece è stata modificata, intensificandola in aprile ed inizio maggio, in corrispondenza del periodo di fioritura di pero melo e biancospino e riducendola da metà maggio alla fine dei prelievi. Inoltre, avendo trovato anche nel 2000, come nel 1999, altri positivi nel mese di luglio, ben oltre l'epoca di fioritura delle principali piante ospiti che si pensava, per il 2001 e il 2002 la durata del periodo di campionamento è stata prolungata fino



al termine della stagione di volo delle api.

A partire dal 2000 sono stati eseguiti campionamenti anche su matrici dell'alveare diverse dal polline, come detriti di fondo (2002) e api bottinatrici vive in entrata ed uscita, catturate mediante aspiratore o contenitori trasparenti.

La procedura analitica è stata migliorata abbassando il limite di rivelazione dei batteri vivi e diminuendo notevolmente i tempi di analisi. Questi miglioramenti sono stati raggiunti grazie alla risospensione dell'intera coltura batterica in fase di arricchimento, all'aumento del numero di campioni analizzati contemporaneamente su micropiastre ed all'abbandono della conferma microbiologica classica in quanto meno sensibile del nostro metodo. Infine a partire dal 2001 è stata adottata l'analisi completa dei campioni molto abbondanti suddividendoli in sub-aliquote analizzate indipendentemente, perché è stato riscontrato che con una divisione casuale è possibile trovare risultati contrastanti fra le diverse parti in cui è stato suddiviso il campione. Inoltre si è pensato di modificare il criterio di accertamento della positività dei campioni, passando dalla soglia costituita dal doppio del segnale del bianco di riferimento negativo adottata convenzionalmente da molti laboratori di microbiologia, al triplo della deviazione standard delle misure considerate negative e dei bianchi, criterio che viene generalmente adottato nell'ambito del-

la chimica analitica in quanto fornisce un livello di probabilità del 99,7%.

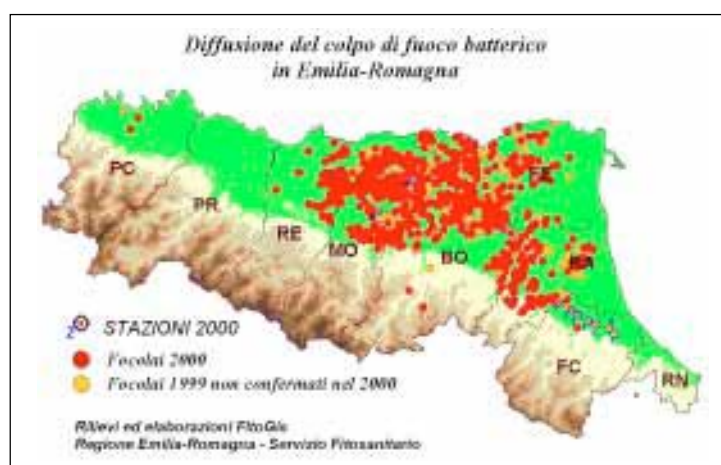
### **Rappresentatività dell'aliquota di polline per osservazione microscopica rispetto al campione raccolto**

Dai campioni di polline, dopo l'estrazione dei batteri, viene prelevata una piccola aliquota con cui vengono preparati i vetrini per l'analisi palinologica. Si è avvertita la necessità di verificare con uno studio specifico se il metodo di campionamento per diluizioni successive della sospensione usato finora portasse ad un prelievo finale con la stessa composizione pollinica del campione di partenza. Questa verifica è importante per l'attendibilità delle informazioni sulle specie botaniche effettivamente visitate dall'ape ed il loro confronto con la mappa culturale. A que-

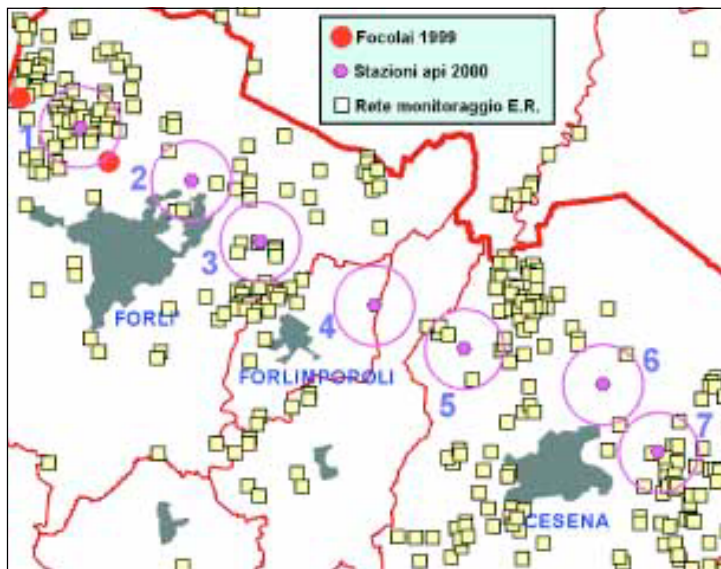
sto scopo sono stati preparati 10 vetrini da osservazione microscopica partendo da un unico campione ed usando il metodo sopra descritto. I vetrini sono stati quindi sottoposti ad identificazione microscopica ed i conteggi ottenuti confrontati tra loro. La composizione percentuale dei pollini riscontrati è risultata molto simile in tutti e 10 i preparati, quindi la verifica del metodo è stata giudicata pienamente soddisfacente.

### **Installazione delle nuove stazioni**

Il consistente numero di dati sperimentali degli anni precedenti ha dimostrato come nelle aree in cui i sintomi del colpo di fuoco sono già visibili sulle piante, la concentrazione e la distribuzione ambientale del fitopatogeno *Erwinia amylovora* sono sufficienti per consentirne la rivelazione tramite le api. In base al



**Figura 5** - Stazioni installate nel 2000 e situazione dell'epidemia di colpo di fuoco in Emilia-Romagna



**Figura 6** - Stazioni installate nel 2000 nella provincia di Forlì-Cesena



**Figura 7** - Stazione installata nel 2000 presso Piumazzo (Mo)

risultato della stazione di Cadriano 1999 in cui il batterio è stato trovato con mesi di anticipo nel polline rispetto alla comparsa dei sintomi della patologia in campo, si è deciso di utilizzare parte

delle stazioni disponibili per studiare il potenziale uso dell'ape a scopo di diagnosi precoce e di orientamento delle ispezioni visive dirette.

A questo scopo l'ideale sarebbe

stato circondare, almeno parzialmente, il bordo dell'area in cui è stata accertata la presenza di focolai della malattia nel 1999 con un doppio o triplo "cordone" di stazioni distanziate di 3 km una dall'altra, ma per ottenere un allineamento di lunghezza sufficiente il numero di stazioni necessarie sarebbe risultato eccessivo rispetto alle risorse a disposizione. Tenuto conto che il numero massimo di stazioni utilizzabili con la cadenza di campionamento prevista era di dieci, si è preferito installare una schiera di 7 stazioni in provincia di Forlì-Cesena, in un'area intensamente coltivata a frutteto, lungo la direzione presumibile di propagazione dell'epidemia verso Sud-Est e perpendicolarmente al fronte raggiunto dall'area infetta secondo le rilevazioni compiute nel 1999 dal Servizio Fitosanitario della Regione. La prima stazione, indicata con il n.1, (S. Tomè) è situata presso la località omonima a NO di Forlì a breve distanza dall'ultimo focolaio accertato nel 1999. Le altre stazioni sono distanziate di circa 4 km per evitare sovrapposizioni delle aree di volo, e numerate progressivamente fino alla n. 7 a 26 km circa dalla n. 1 (figg. 5 e 6), secondo il seguente elenco:

- 1) S. Tomè;
- 2) Punta di Ferro;
- 3) Santuario di Fornò;
- 4) Torrente Bevano;
- 5) S. Cristoforo;
- 6) Villa Chiaviche;
- 7) Ponte Pietra.

Come riferimento positivo per il

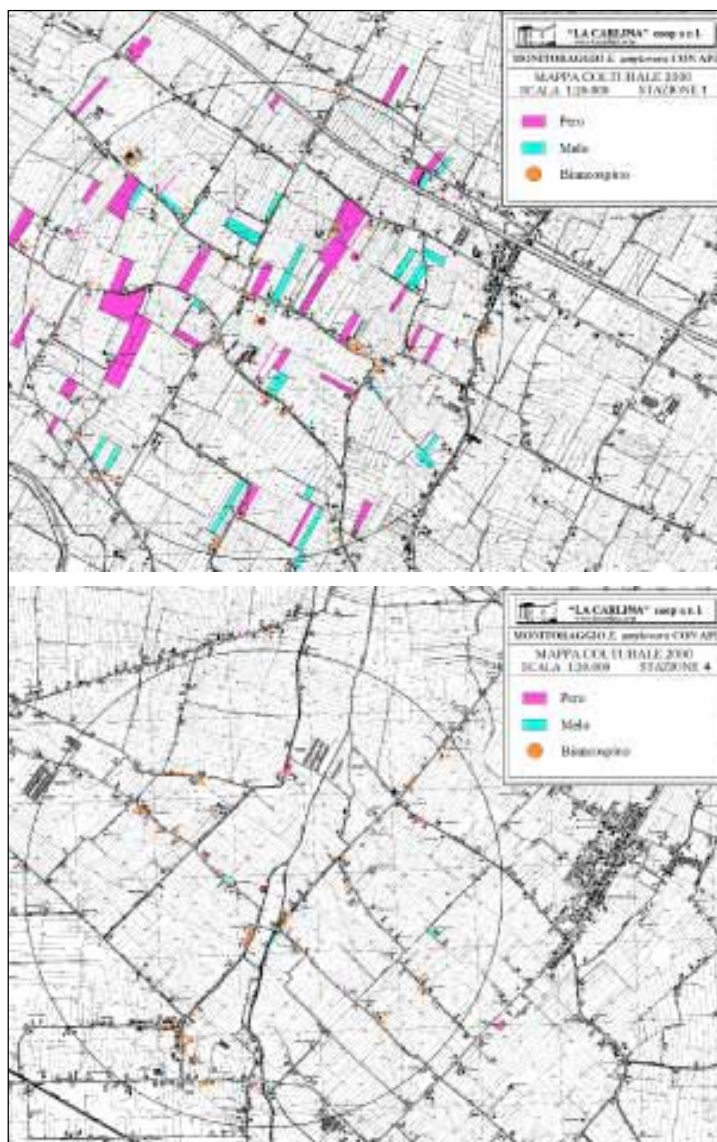
2000 è stata mantenuta la stazione 1999 di Palata Pepoli in Comune di Crevacore (BO) (n. 8; *fig. 5*) in quanto situata in un'area pesantemente infetta da Colpo di Fuoco. Inoltre è stata installata una nuova stazione Piumazzo (MO) (n. 9, *figg. 5 e 7*) in cui sono presenti focolai a diverse distanze dalla stazione, per studiare, con l'aiuto di pollini indicatori, i percorsi di bottinamento delle api in relazione all'eventuale trasporto di *Erwinia amylovora*. Nel 2001 e nel 2002 come stazione di riferimento in area sicuramente infetta si è deciso abbandonare la stazione di Palata Pepoli in Comune di Crevacore (BO) e di utilizzare al suo posto quella di S. Tomè a Nord di Forlì (Stazione 1 anno 2000, 2001 e 2002) perché di caratteristiche equivalenti.

### Mappe colturali

Per il 2000 e il 2001 sono state redatte le mappe colturali delle principali piante ospiti del colpo di fuoco nelle aree coperte dalle stazioni 1-7 in provincia di Forlì-Cesena. Non essendo disponibili dati ufficiali al riguardo è stato necessario ricorrere al rilievo diretto sul campo. Si riportano a titolo di esempio le mappe della stazione n.1 ad alta densità di frutteti e la n. 4 a bassa densità di frutteti e a prevalenza di piante sparse o isolate (*figg. 8 e 9*).

### Risultati complessivi e discussione

Nel triennio 2000-2002 sono

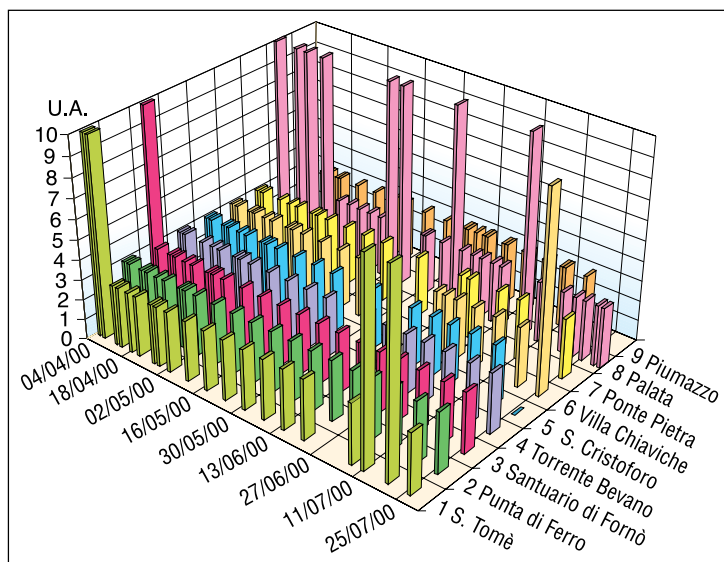


**Figure 8 e 9** - Mappe colturali 2000 delle stazioni 1 e 4 nella provincia di Forlì-Cesena

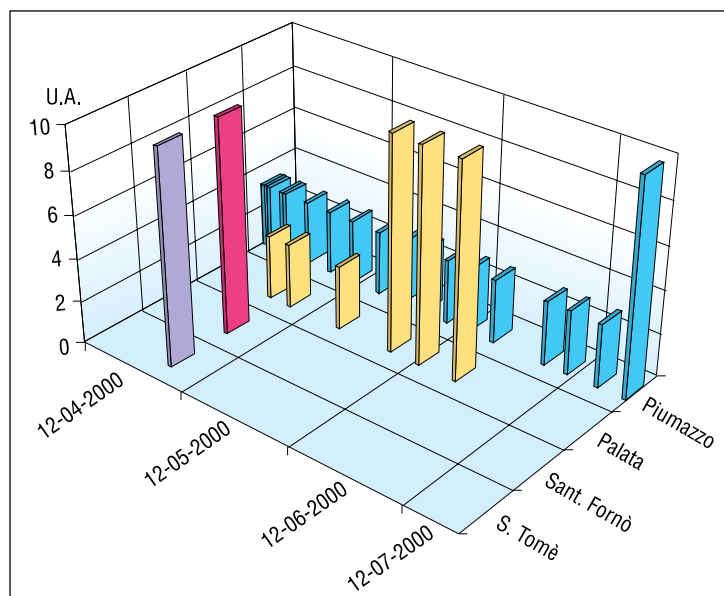
stati analizzati circa 500 campioni di polline per un totale di oltre 700 campioni dal 1998, circa 30 campioni di api bottinatrici vive e 6 prelievi di detriti di fon-

do dell'alveare.

I risultati analitici sono sintetizzati negli istogrammi 3D (*figg. 10-13 pagg. 78-80*) in cui convenzionalmente i positivi sono indi-



**Figura 10** - Pollini raccolti nelle stazioni di monitoraggio del 2000



**Figura 11** - Api bottinatrici raccolte nel 2000

cati in unità arbitrarie con valori alti ed i negativi con valori pari ad un terzo di quelli positivi. Il significato dei dati infatti è pura-

mente un riconoscimento qualitativo, trattandosi di campioni raccolti casualmente nell'ambiente. Questi risultati sono quindi

stati riportati anno per anno sulla mappa delle stazioni per un confronto con le ispezioni visive ed una valutazione dell'efficacia del monitoraggio precoce del colpo di fuoco usando l'ape come bioindicatore.

Nel 2000 (*fig. 14 - pag. 80*), sono stati raccolti campioni di polline positivi in Aprile, durante il periodo di fioritura del pero, nelle nuove stazioni n. 1 (S. Tomè), già interessata da focolai accertati di colpo di fuoco nel 1999, e n. 3 (Santuario di Fornò) a circa 8 km a SE. Le ispezioni dirette, condotte dal Servizio fitosanitario Regionale, hanno individuato un focolaio a Selbagnone, a circa 12 km dalla stazione n. 1. Inoltre sembra che attorno alla stazione n. 3 ci siano stati abbattimenti non denunciati di piante infette da colpo di fuoco. In questo caso la stazione n. 3 ha segnalato l'espandersi del fronte della malattia verso SE alcuni mesi prima dell'accertamento visivo. Nel mese di luglio sono risultate positive ancora la Stazione n. 1 e la stazione n. 6 (Villa Chiaviche) a ben 22 km di distanza dalla prima dove non sono stati segnalati focolai nel corso di tutto il 2000. Le ispezioni sul campo hanno scoperto la presenza del colpo di fuoco nei pressi di questa stazione solo nel 2001 (*fig. 15*), più di un anno dopo l'indicazione ottenuta attraverso le api, oltre a confermare il focolaio presso Selbagnone. Nella vecchia stazione di Palata Pepoli (n. 8), tenuta come riferimento in una zona pesantemente colpita dalla malattia, sono stati prelevati ben 8 campioni

positivi (circa il 30% del totale) da aprile all'inizio di luglio.

Nel 2001 sono risultate positive tutte le stazioni esclusa la n. 6 a partire dal mese di aprile fino alla fine di ottobre. Purtroppo nel frattempo le ispezioni dirette non sono state più condotte in modo sistematico ma sono state concentrate nelle zone circostanti i vivai di fruttiferi e quindi non è più possibile fare confronti precisi. Comunque, come si può vedere in *figura 15 a pag. 81*, i casi accertati concordano con la diffusione della patologia segnalata dalle api. Da notare che le stazioni n. 2 e n. 4 sono risultate positive anche se nella loro area di pertinenza mancano quasi completamente i frutteti e sono presenti solo piante ospiti isolate o a piccoli gruppi di spontanee, come i biancospini.

Nel 2002 (*fig. 16 - pag. 81*) non sono più risultate positive le stazioni n. 3 e n. 7, forse in seguito alla distruzione delle piante infette. Anche quest'anno sono stati trovati campioni positivi oltre che durante la fioritura principale dei frutteti anche nei mesi di giugno luglio e agosto. Nel corso di tutto il triennio, nelle stazioni situate in aree in cui la patologia è radicata da tempo, sono stati sempre trovati campioni di polline contenenti *Erwinia amylovora* a concentrazioni sufficienti per il riconoscimento.

### Considerazioni finali e valutazione delle possibili applicazioni metodo

I risultati ottenuti nel corso della

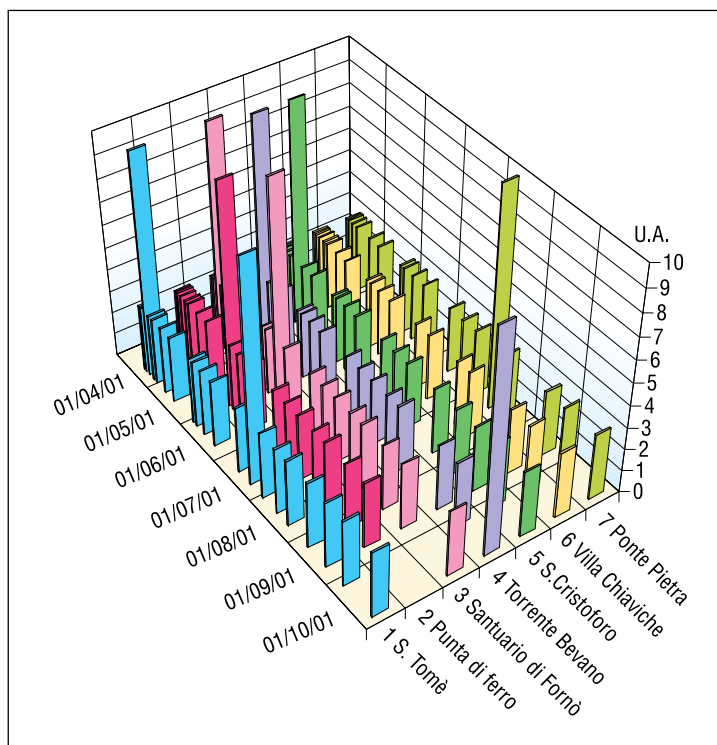
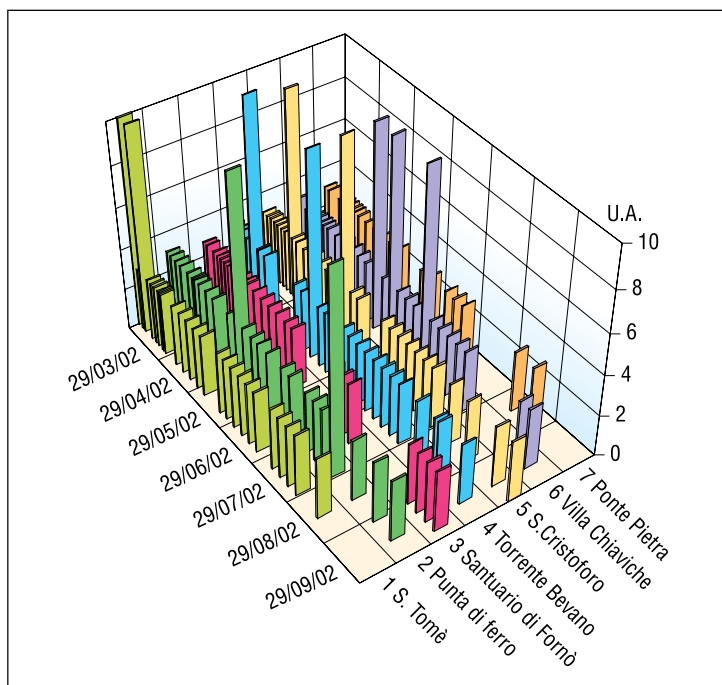


Figura 12 - Pollini raccolti nelle stazioni di monitoraggio del 2001

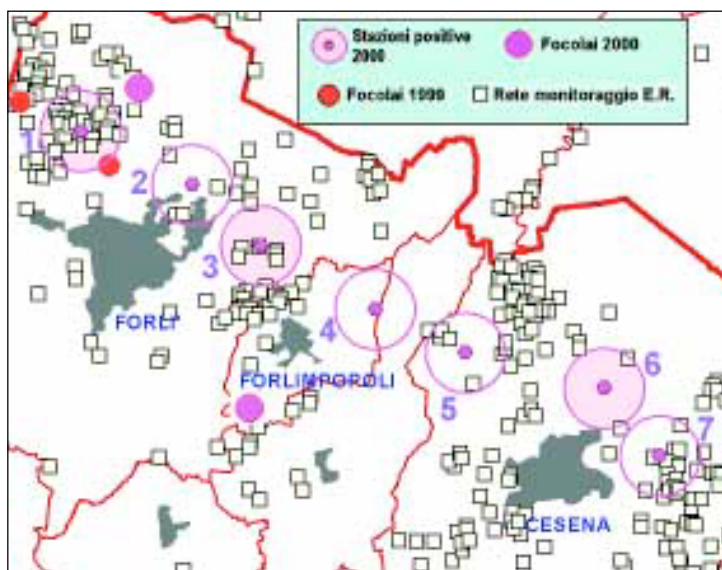
ricerca hanno convalidato le ipotesi di partenza, indicando che con le api è possibile rilevare la presenza di *Erwinia amylovora* nell'ambiente, non solo quando il colpo di fuoco si è già manifestato, ma anche prima della comparsa di sintomi evidenti sulle piante ospiti. Come già spiegato nell'introduzione, si aprono interessanti prospettive per l'impiego dell'ape nel controllo della diffusione e nella lotta contro questa grave malattia che minaccia le coltivazioni di pero e melo, oltre ad importanti specie spontanee ed ornamentali come il biancospino.

Pur essendo migliorabile sotto diversi aspetti, questo sistema si presta già ad un'applicazione pratica grazie anche alla bassa probabilità di dare falsi risultati positivi, derivata principalmente da due fasi consecutive altamente specifiche del metodo analitico per la rivelazione di *Erwinia amylovora*.

Uno dei punti su cui occorrerà lavorare è l'aumento della probabilità di intercettazione del batterio, eventualmente modificando il metodo di campionamento del polline o provando anche altre matrici dell'alveare. Mediamente la percentuale di campioni posi-



**Figura 13** - Pollini raccolti nelle stazioni di monitoraggio del 2002



**Figura 14** - Mappa delle Stazioni 1-7 (2000) con indicati i risultati del monitoraggio di *Erwinia amylovora* ottenuti con api e con le osservazioni dirette delle squadre di ispezione sul territorio

tivi nelle stazioni dove è presente il batterio ma senza sintomi visibili della malattia, è di poco inferiore al 10%, mentre nelle aree con focolai accertati di colpo di fuoco sale a circa il 15% fino a punte di oltre il 30% nelle zone maggiormente colpite.

Dai risultati sperimentali è emerso anche un dato nuovo ed inatteso. Pur essendo la percentuale di positivi più alta nel periodo di fioritura dei frutteti, quando nei campioni è presente quasi sempre polline di pero, anche se spesso in piccola quantità (1-3%), è notevole numero di campioni positivi che si riscontrano durante tutta l'estate e fino al mese di ottobre. Indagando su questo aspetto si potranno forse avere maggiori informazioni sui meccanismi di trasmissione ed in generale sull'epidemiologia del colpo di fuoco.

Infine sono state analizzate altre due matrici dell'alveare, le api bottinatrici ed i detriti di fondo dell'alveare. Le api hanno dato una percentuale di positivi superiore a quella del polline, ma il campionamento è molto più difficoltoso, per cui non sembrano, al momento, una possibile alternativa. Per quanto riguarda i detriti di fondo, molto comodi da campionare, non è stato possibile raccogliere dati sufficienti per una valutazione. I pochi campioni analizzati comunque sono risultati negativi.

### Bibliografia

Calzolari A., Finelli F., Ponti I. Mazzoli G.L., 1999. *L'esperien-*

za dell'Emilia-Romagna nella lotta al colpo di fuoco. *Informatore Agrario* 14, 65-70.

Celli G., Porrini C., 1991. *L'ape, un efficace bioindicatore dei pesticidi*. *Le Scienze* 274, 42-54.

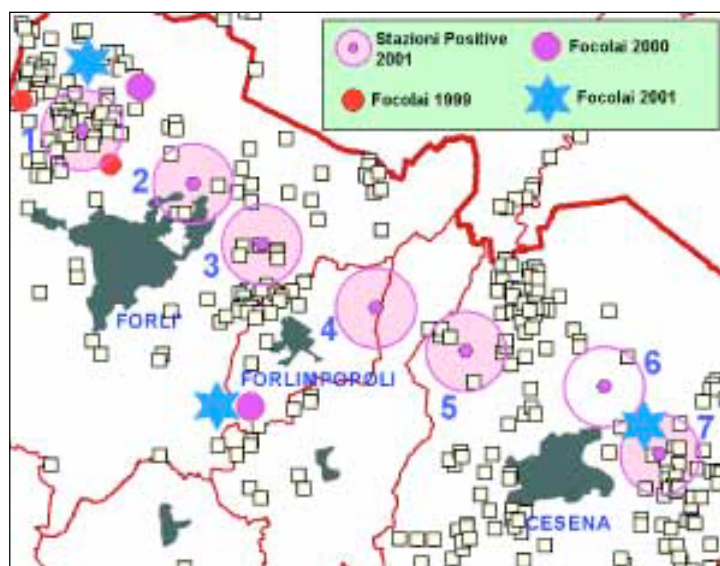
Celli G., Porrini, C. Radeghieri, P. Sabatini, A.G. Marcazzan, G.L. Colombo R., Barbattini R., Greatti M., D'Agaro M., 1996. *Honeybees (Apis mellifera L.) as bioindicators for the presence of pesticide in the agroecosystem*. *Field test*. *Ins. Soc. Life* 1, 207 - 212.

Crane E., 1984. *Bees, honey and pollen as indicators of metals in the environment*. *Bee Wld* 55, 47-49.

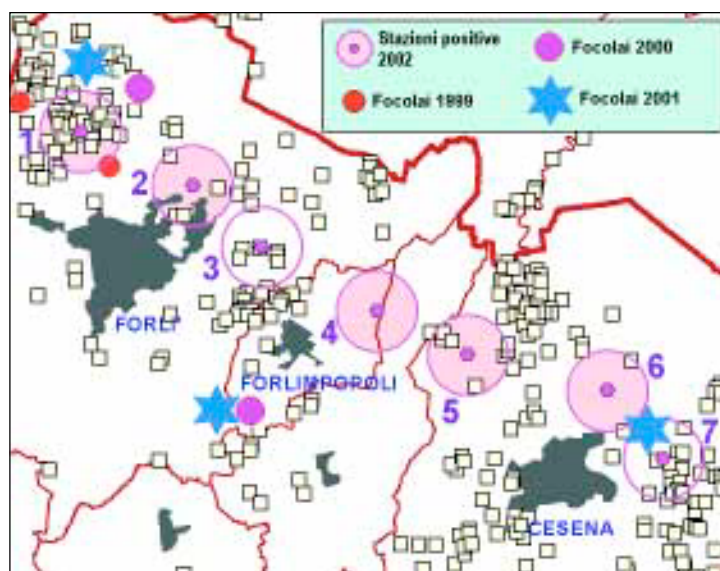
Ghini S., Girotti, S., Calzolari, A., Sabatini, A., G., Alessandrini, A., Zeri, L., And Porrini, C., 2002. *Use of honeybees (Apis mellifera L.) as indicators of the presence of the phytopathogenic bacteria Erwinia amylovora*. *Ins. Soc. Life* 4, 69-77.

Merighi M., Malaguti S., Bazzi C., Sandrini A., Landini S., Ghini S., Girotti S., 1999 - *Specific detection of Erwinia amylovora by immunoenzymatic determination of PCR products*. *Acta Horticolt.* 489, 39-42.

Merighi M., Sandrini S., Landini S., Ghini S., Girotti S., Malaguti S., Bazzi C., 2000. *Chemiluminescent and colorimetric detection of Erwinia amylovora*



**Figura 15** - Mappa delle Stazioni 1-7 (2001) con indicati i risultati del monitoraggio di *Erwinia amylovora* ottenuti con api e con le osservazioni dirette delle squadre di ispezione sul territorio



**Figura 16** - Mappa delle Stazioni 1-7 (2002) con indicati i risultati del monitoraggio di *Erwinia amylovora* ottenuti con api. Non sono ancora disponibili le osservazioni dirette delle squadre di ispezione sul territorio nel 2002

- by immunoenzymatic determination of PCR amplicons (PCR-ELISA) from plasmid pEA29. *Plant Dis.*, 84: 49-54.
- Svoboda J., 1962. *Teneur en strontium 90 dans les abeilles et dans leurs produits*. *Bull. Apicole* 5, 101-103.
- Van Der Zwet T., Beer S. V., 1995. *Fire Blight its nature, prevention and control. A practical guide to integrated disease management*. *Agric. Inf. Bull.* 631, 91.

A  
B  
S  
T  
R  
A  
C  
T

**Detection of *Erwinia amylovora* in environment by honeybees**

*Erwinia amylovora* (EA) causes fire blight, the most destructive bacterial disease affecting the Rosaceae family in general and pear, apple and ornamental species in particular. Honeybees are known to be potential vectors of EA and as a result legislation was passed to restrict the movement of hives for the production of honey and pollination. However, it has recently been shown that honeybees can be used to monitor EA in the environment. A number of stations consisting of three hives each were therefore set up in infected zones, at the edges of infected zones and in uncontaminated areas. To identify the EA in the honeybee matrices, a new technique was developed based on the immunoenzymatic chemiluminescent determination of the PCR products. At least one sample of pollen from each of the stations in the infected areas was positive. A sample of pollen from one station in the area defined as uncontaminated, but located at the edge of an infected area was also positive. A number of months later, the presence of the bacterium was reported in the same area. The pollen can therefore be considered an effective and easy to use matrix for monitoring EA. Array of seven stations installed perpendicularly to the borderline of infected area in South-East Emilia-Romagna region, during a period of three years, confirmed these results.





## INDIRIZZI DI DIFESA



## ASPETTI DELLA LOTTA CHIMICA AL COLPO DI FUOCO BATTERICO DEL PERO

**C. Bazzi, G. Sponza**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

**A. Brunelli, P. Gianati**

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università di Bologna

### Introduzione

Sin dall'estate del 1997, periodo in cui il colpo di fuoco batterico da *Erwinia amylovora* ha assunto forma epidemica nei pereti della Pianura Padana, è apparso chiaro come la lotta a questa devastante malattia delle rosacee potesse essere realizzata esclusivamente nell'ottica di una strategia integrata, basata su criteri di natura agronomica e fitoiatrica, nonché sull'uso di moderne tecnologie di controllo del territorio (Benedettini *et al.*, 2002). Infatti, un solo metodo di lotta semplice, efficace, economico ed ecocompatibile per prevenire e/o contenere questa complessa fitopatologia ciclica ed erratica non è ancora disponibile; pertanto, è assolutamente necessario attuare con scrupolo e tempestività molteplici interventi allo scopo di individuare precocemente i focolai di malattia, eliminare/ridurre le sorgenti di inoculo, limitare la sua disseminazione, prevenire l'avvio di cicli infettivi ed aumentare la resistenza dell'ospite. Per questo, occorre capire la malattia nei

suoi principali aspetti epidemiologici e conoscere l'agente causale per ostacolare il più possibile la sua moltiplicazione ed il processo patogenetico.

Le conoscenze sino ad ora maturate su *E. amylovora* e su questa malattia evolutiva e necrogenica mettono in evidenza come il batterio reagisca prontamente ai fattori ambientali (clima e stato fisiologico dell'albero) e come possa vivere associato all'ospite soprattutto in fase endofitica (Vanneste e Eden-Green, 2000): tali aspetti influenzano la scelta del criterio di lotta per eliminare il patogeno prima della sua penetrazione nella pianta e per prevenire il verificarsi di condizioni favorevoli alla sua rapida migrazione nel complesso del tessuto corticale e xilematico ed alla sua moltiplicazione in questa elettiva nicchia protettiva. Nelle cultivar suscettibili, da un fiore infetto i batteri possono migrare all'interno di un albero di un giovane albero di melo sino al portinnesto (Mommol *et al.*, 1998) e farlo morire nell'arco di una sola stagione vegetativa. Come combattere

allora il colpo di fuoco?

Per quanto riguarda la lotta chimica, nella farmacopea agricola è opportuno ribadire la necessità di preparati battericidi assolutamente efficaci per trattamenti programmati in campo e, nel contempo, rispondenti a requisiti di sistemicità, scarsa fitotossicità, economicità, ecc. In generale, sono ritenuti due i principali gruppi di composti dotati di efficacia nei confronti di *E. amylovora*: i tradizionali composti rameici e gli antibiotici (solfato di streptomycina, ossitetraciclina o terramicina), l'uso dei quali è rispettivamente all'origine di problemi legati all'insorgenza di fenomeni di fitotossicità e di resistenza stabile e trasmissibile anche ad altre popolazioni batteriche (Bazzi, 1998). Per questo, l'uso di antibiotici in agricoltura non è autorizzato nella maggior parte degli Stati dell'Ue (in Italia, un decreto ministeriale ne vieta l'uso dal 1971) ed anche negli Stati Uniti ci si sta sempre più orientando verso strategie di lotta alternative per ridurre l'applicazione (Jones e Schnabel, 2000). Negli ultimi 15

**Tabella 1** - Impostazione e risultati degli esperimenti condotti in serra nel 1998

A - ESPERIMENTO SU FIORI (INOCULAZIONE: 6/04)						
Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Data trattamento	Fiori inoculati (n.)	14/4 Fiori infetti (%)	
TESTIMONE	-	-	-	54	33,3	
ALIETTE (Fosetil-Al 80% WG)	250	200	2/4	87	27,5	
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	20	10	2/4	82	19,5	
KOCIDE DF (Cu idrossido 40% WG)	125	50	5/4	73	4,1	
POLTIGLIA BORDOLESE SCAM (Cu solfato 20% WP)	250	50	5/4	63	6,3	
DITHANE DG + COPPER PRO 50 WDG (Mancozeb 75% WG + Cu ossicloruro 50% WG)	200+100	150+50	5/4	81	13,5	
FIRESTOP (Flumechina 15% SC)	200	30	5/4	80	12,5	
B - ESPERIMENTO SU GERMOGLI (INOCULAZIONE: 7/05)						
Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Data trattamento	Indice di malattia		
				13/5	15/5	20/5
TESTIMONE	-	-	-	2,7 a	4,4 a	6,2 a
ALIETTE (Fosetil-Al 80% WG)	250	200	1/5	1,1 b	2,6 abc	6,1 a
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	20	10	1/5	0,7 b	2,7 abc	5,1 ab
KOCIDE DF (Cu idrossido 40% WG)	125	50	5/5	1,7 ab	3,1 abc	5,0 ab
POLTIGLIA BORDOLESE SCAM (Cu solfato 20% WP)	250	50	5/5	1,6 ab	3,4 ab	6,6 a
DITHANE DG + COPPER PRO 50 WDG (Mancozeb 75% WG + Cu ossicloruro 50% WG)	200+100	150+50	5/5	0,5 b	0,7 c	1,8 b
FIRESTOP (Flumechina 15% SC)	200	30	5/5	1,0 b	1,7 bc	3,6 ab

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente (p 0,05)

anni, anche se la ricerca di nuovi composti chimici ha dato i suoi frutti (Psallidas e Tsiantos, 2000) portando alla ribalta diversi prodotti dotati di diverso meccanismo d'azione quali flumechina, acido ossolinico, fosetil-Al, acibenzolar-S-methyl, arpina e prohexadione-Ca, molto rimane da fare per adattarne l'uso nell'ottica di programmi di lotta integrata in diversi agroecosistemi.

### Materiali e metodi

L'attività sperimentale è stata condotta dal 1998 al 2002, operando tutti gli anni sia in condi-

zioni naturali di pieno campo (in pereti interessati dalla presenza del colpo di fuoco), sia in ambiente controllato (serra con luce naturale), su giovani astoni di pero cv. Abate Fetel allevati in vaso e inoculati sperimentalmente con il ceppo locale virulento OMP-BO1077.7/94 di *Erwinia amylovora*. Nei saggi di serra, gli astoni sono stati mantenuti alla temperatura di circa 25 °C con umidità relativa prossima al 75% (solo per 24 ore dopo l'inoculazione l'umidità relativa era portata a valori vicini alla saturazione).

Nel corso della sperimentazione

sono stati saggiati i principali composti attualmente disponibili e accreditati di una potenziale attività contro *E. amylovora* e precisamente: il noto fosetil-Al, acibenzolar-S-methyl (stimolatore di SAR, Bertona *et al.*, 2000, recentemente introdotto anche in Italia per l'uso contro il colpo di fuoco), prohexadione-Ca (regolatore di crescita in grado di ridurre la suscettibilità della pianta alla malattia, Costa *et al.*, 2001), flumechina (battericida sintetico, non antibiotico e non sulfamidico, già usato in alcuni paesi come la Francia, Brisset *et al.*, 1991), Myco-Sin (prodotto

**Tabella 2** - Impostazione e risultati dell'esperimento in serra su fiori nel 1999 (inoculazione: 7/04)

Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Data trattamento	14/4 Fiori infetti (%)
TESTIMONE	-	-	-	84,6 c
ALIETTE (Fosetil-Al 80% WG)	250	200	1/4	84,9 c
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	20	10	1/4	72 abc
Solfato di streptomycina puro	10	10	6/4	53,5 abc
KOCIDE DF (Cu idrossido 40% WG)	125	50	6/4	80,6 bc
POLTIGLIA BORDOLESE RSR (Cu solfato 20%)	250	50	6/4	78,3 bc
CUPRAVIT FLOW (Cu ossicloruro 20% SC)	250	50	6/4	79,6 bc
CUPRAVIT FLOW (Cu ossicloruro 20% SC)	45	9	6/4	62 abc
COPPER PRO 50 WDG (Cu ossicloruro 50% WG)	100	50	6/4	66 abc
DITHANE DG + COPPER PRO 50 WDG (Mancozeb 75% WG + Cu ossicloruro 50% WG)	200+100	150+50	6/4	50,3 ab
DITHANE DG + COPPER PRO 50 WDG (Mancozeb 75% WG + Cu ossicloruro 50% WG)	200+200	150+100	6/4	58,6 abc
KAY TEE (Cu solfato )	100 ml	9	6/4	62 abc
FIRESTOP (Flumechina 15% SC)	200	30	6/4	40,6 a
MYCO-SIN (Argille solforate+estratto di equisetto)	1000	1000	6/4	91,2 c

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente (p 0,05)

di origine naturale a base di argille solforate, estratto di equisetto e componenti di cellule batteriche, proposto su melo in Germania, Röemmelt *et al.*, 1999), l'antibiotico solfato di streptomycina, diversi tipi di formulati rameici (idrossido, solfati, ossicloruro, quest'ultimo anche in miscela con mancozeb). I nostri risultati sono stati sottoposti, nella maggior parte dei casi, ad analisi statistica attraverso l'analisi della varianza e il confronto delle medie con il test di Duncan (p 0,05).

Poiché nelle prove di campo non sempre il colpo di fuoco si è manifestato in maniera significativa nelle parcelle non trattate, si riportano, oltre alle verifiche di serra, solo l'impostazione e i risultati delle sperimentazioni che hanno fornito risultati

attendibili.

## 1998

### Esperimenti in serra

Sono stati realizzati su peri in vaso di 2 anni di età in due fasi successive, rispettivamente su fiori e su germogli, saggiando i seguenti composti, applicati preventivamente: fosetil-Al e acibenzolar-S-methyl, somministrati alcuni giorni prima dell'inoculazione; idrossido di rame, poltiglia bordolese, ossicloruro di rame (in miscela con mancozeb) e flumechina, applicati 1-2 giorni prima dell'inoculazione (*tab. 1*). I trattamenti sono stati eseguiti mediante pompa a spalla, irrorando gli astoni sino al limite dello sgocciolamento.

Nel caso dei fiori, sono stati usati per ogni tesi 3 astoni di 2 anni

dotati complessivamente di 60-80 fiori; per i germogli, sono stati usati per 3 astoni per tesi con 5-7 germogli in attiva crescita, ognuno dei quali è stato considerato una ripetizione.

L'inoculo è stato preparato sospendendo in acqua giovani cellule di *E. amylovora* allevate per 48 ore su KB-agar. Le inoculazioni sono state effettuate in maniera differenziata: sui fiori, depositando con micropipetta nella cavità calicina di ciascun fiore 20 µl di sospensione batterica (contenente circa 2x10<sup>6</sup> CFU); sui germogli, tagliando gli apici delle tre foglie più giovani con forbici contaminate in una sospensione batterica contenente circa 7x10<sup>6</sup> CFU/ml. I rilievi sono stati effettuati mediante conteggio dei fiori sintomatici (necrosi, avvizzimento ed evasio-

**Tabella 3** - Impostazione e risultati dell'esperimento in serra su germogli nel 1999 (inoculazione: 7/05)

Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Data trattamento	24/5 - 4/6	
				Germogli infetti (%)	Estensione necrosi sui germogli infetti (%)
TESTIMONE	-	-	-	68,8 b	100
ALLETTE (Fosetil-Al 80% WG)	250	200	29/4	27,7 a	47
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	20	10	29/4	0 a	0
Solfato di streptomicina puro	10	10	6/5	16,6 a	100
POLTIGLIA BORDOLESE RSR (Cu solfato 20% WG)	250	50	6/5	38,8 ab	91,5
POLTIGLIA BORDOLESE RSR (Cu solfato 20%)	45	9	6/5	16,6 a	100
DITHANE DG + COPPER PRO 50 WDG (Mancozeb 75% WG + Cu ossicloruro 50% WG)	200+100	150+50	6/5	22,2 a	63,2
DITHANE DG + COPPER PRO 50 WDG (Mancozeb 75% WG + Cu ossicloruro 50% WG)	200+200	150+100	6/5	6,6 a	83,3
COPPER PRO 50 WDG (Cu ossicloruro 50% WG)	100	50	6/5	6,3 a	3,5
KAY TEE (Cu solfato 5,5% SC)	100 ml	9	6/5	4,1 a	100
MYCO-SIN (Argille solforate+estratto di equiseto WP)	1000	1000	6/5	5 a	100

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente (p 0,05)

**Tabella 4** - Impostazione e risultati dell'esperimento di serra su fiori nel 2000 (inoculazione: 6/04)

Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Data trattamento	13/4 Fiori infetti (%)
TESTIMONE	-	-	-	93,9 a
EPAL (Fosetil-Al 80% WP)	250	200	1/4 e 5/4	78,3 a
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	20	10	1/4 e 5/4	86,5 a
Solfato di streptomicina puro	10	10	5/4	76 a
POLTIGLIA BORDOLESE RSR (Cu solfato 20 % WG)	250	50	5/4	92,6 a
DITHANE DG + COPPER PRO 50 WDG (Mancozeb 75% WG + Cu ossicloruro 50% WG)	200+100	150+50	5/4	86,5 a
COPPER PRO 50 WDG (Cu ossicloruro 50% WG)	100	50	5/4	82,8 a
KAY- TEE (Cu solfato 5,5% SC)	100 ml	9	5/4	83,9 a
MYCO-SIN (Argille solforate+estratto di equiseto WP)	1000	1000	5/4	87,1 a

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente (p 0,05)

ne di gocce di essudato batterico) 8 giorni dopo l'inoculazione; sui germogli, è stato determinato, in tempi successivi, lo sviluppo delle infezioni fogliari sia mediante un indice di malattia (scala 0-10) basata sulla superfi-

cie di parenchima fogliare sintomatica che la percentuale di nervatura fogliare necrotica (Miglio *et al.*, 1999). A causa del limitato numero di fiori per astone nel primo esperimento, l'analisi statistica dei dati è stata esegui-

ta solo nell'esperimento sui germogli.

**1999**

**Esperimenti in serra**  
Analogamente al 1998, sono

stati condotti su fiori e germogli di peri in vaso, usando per ciascuna tesi 3 astoni (ripetizioni), ognuna delle quali era dotata rispettivamente di circa 400 fiori e di almeno 6 germogli in attiva crescita. I composti saggiati erano i seguenti: fosetil-Al, acibenzolar-S-methyl, alcuni prodotti rameici con caratteristiche differenziate, flumechina, Myco-Sin e e solfato di streptomycin (tabb. 2 e 3 - pag. 87 e 88). L'applicazione dei prodotti è stata effettuata preventivamente mediante pompa a spalla 6 giorni prima dell'inoculazione del patogeno per i primi due, un giorno prima per tutti gli altri.

Le inoculazioni sperimentali di fiori e germogli con *E. amylovora*, sono state eseguite in maniera differenziata. Diversa è stata anche la metodologia seguita per i rilievi.

Sui fiori, l'inoculazione è stata eseguita irrorando i corimbi con una sospensione acquosa del batterio contenente circa  $2 \times 10^6$  CFU/ml; i rilievi sono consistiti nel conteggio dei fiori sintomatici, dopo la completa manifestazione della malattia sulle piante testimoni, a distanza di una settimana dall'inoculazione.

Sui germogli, l'inoculazione è stata effettuata tagliando gli apici delle tre foglie più giovani con forbici contaminate in una sospensione acquosa del batterio contenente circa  $7 \times 10^8$  CFU/ml; dopo 3-4 settimane è stato rilevato lo sviluppo delle infezioni fogliari (necrosi dei tessuti parenchimatici e nervali) e sono state quindi determinate frequen-

za (% di germogli infetti) e gravità della malattia (estensione percentuale della necrosi rispetto a quella totale del germoglio).

## 2000

### Esperimento in serra su fiori

È stato condotto con la stessa metodologia e saggiando gli stessi prodotti usati degli anni precedenti (tab. 4 - pag. 88): tesi costituite da tre astoni di peri di 2 anni (ripetizioni) con almeno 500 fiori per astone, trattamenti preventivi con pompa a spalla, inoculazione mediante nebulizzazione sui fiori di una sospensione di cellule batteriche (circa  $10^6$  CFU/ml), monitoraggio dei fiori sintomatici 7 giorni dopo l'inoculazione.

### Esperimento in frutteto

Dopo gli esiti negativi degli esperimenti effettuati nel ferrarese nel 1998 e nel 1999, dovuti a mancata manifestazione della malattia, nell'anno 2000, a seguito della segnalazione di diffusi attacchi di colpo di fuoco in un'azienda sita nelle vicinanze di Molinella (BO), è stata condotta una prova in tale ambiente, per saggiare i prodotti riportati in tabella 5.

Si è operato su peri cv. Santa Maria che, nonostante i ripetuti trattamenti a base di prodotti rameici e le continue rimonde da parte dell'azienda, presentavano ai primi di giugno diffusi sintomi della malattia riferibili a necrosi di secondi fiori/germogli ed a cancri rameali. È stato adottato

lo schema sperimentale dei blocchi randomizzati con 4 ripetizioni (su due filari affiancati) e parcelle costituite da 7 alberi contigui. I trattamenti sono stati eseguiti con una motopompa dotata di lancia a mano a partire dal 9 giugno sino al 1 settembre (4 in pre-raccolta e 2 in post-raccolta) con cadenze suggerite dall'andamento climatico.

I rilievi sono stati eseguiti settimanalmente a partire dal 22 giugno e sino al 30 ottobre, mediante accurato monitoraggio di tutti gli alberi e conteggio, seguito da eliminazione, dei germogli infetti. Inoltre, i germogli colpiti sono stati attribuiti a due categorie: con necrosi limitata alla porzione apicale (derivante da penetrazione diretta dei batteri in tale sede) e con necrosi totale (più verosimilmente causata da batteri endofiti colonizzanti il ramo o la branca portante). Nel corso dell'esperimento i peri con diffusa presenza di cancri su fusto e branche principali sono stati eliminati ed esclusi dal conteggio.

## 2001

### Esperimenti in serra su germogli

Sono stati condotti 5 distinti esperimenti da marzo a giugno, per valutare l'efficacia preventiva di alcuni prodotti applicati a diversi tempi rispetto all'inoculazione sperimentale con *E. amylovora* (tab. 6).

Su ogni tesi, costituita da 3 repliche di 4-6 astoni di peri, ciascuno dotato di 5-7 germogli in attiva crescita, l'inoculazione

**Tabella 5** - Impostazione e risultati dell'esperimento condotto in frutteto nel 2000

Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Germogli infetti nei vari rilievi (%)		
			Con necrosi apicale e basale	Con necrosi apicale	Totale
TESTIMONE	-	-	2,66 a	2,05 a	4,71 a
ALIETTE (Fosetil-Al 80% WG)	250	200	0,91 a	0,75 a	1,66 a
R6 BORDEAUX (Fosetil-Al 25% +Cu ossicloruro 25% WP)	200		2,27 a	1,98 a	4,25 a
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	20	10	0,74 a	0,58 a	1,32 a
POLTIGLIA BORDOLESE RSR (Cu solfato 20% WG)	250	50	2,62 a	1,66 a	4,28 a
COPPER Pro (Cu ossicloruro 50 % WG)	100	50	1,10 a	1,04 a	2,14 a
COPPER PRO 50WDG + DITHANE DG (Cu ossicloruro 50% WG + mancozeb 75% WG)	100+200	50+150	1,38 a	1,06 a	2,44 a
KAY-TEE (Cu solfato 5,5 % SC)	100 ml	9	2,41 a	1,00 a	3,41 a
MYCO-SIN (Argille solforate + estratto di equiseto WP)	1000	1000	0,88 a	0,88 a	1,76 a

Date trattamenti: 9/6, 15/6, 29/6, 11/7, 8/8, 1/9

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente (p 0,05)

**Tabella 6** - Impostazione e risultati degli esperimenti di serra su germogli nel 2001

Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Germogli infetti (%)	Gravità malattia sui germogli infetti
1° ESPERIMENTO - Trattamento il 2/03, inoculazione il 16/03, rilievo 2 settimane dopo l'inoculazione				
TESTIMONE	-	-	80,7 b	55,9 ab
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	15	7,5	39,5 a	38,3 a
EPAL (Fosetil-Al 80% WP)	200	160	84,3 b	47,2 ab
MYCO-SIN (Argille solforate+estratto di equiseto WP)	800	800	75,1 b	62,6 b
2° ESPERIMENTO: Trattamenti il 6 e 13/04, inoculazione il 20/04, rilievo 2 settimane dopo l'inoculazione				
TESTIMONE	-	-	86,3 b	65,7 b
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	15	7,5	36,1 a	34,1 a
3° ESPERIMENTO - Trattamenti il 6 e 13/04, inoculazione il 23/04, rilievo 2 settimane dopo l'inoculazione				
TESTIMONE	-	-	99,2 b	85,5 b
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	15	7,5	73,1 a	54,5 a
4° ESPERIMENTO - Trattamenti il 21/04, 26/04, 3/05, inoculazione il 10/05, rilievo 2 settimane dopo l'inoculazione				
TESTIMONE	-	-	100 a	79,0 a
REGALIS (Prohexadione-Ca 10% WG)	100	10	89,6 a	71,3 a

Nell'ambito di ciascuna prova, i valori seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi (p 0,05)



**Tabella 7** - Impostazione e risultati dell'esperimento in serra su germogli nel 2002 (inoculazione: 3/05)

Tesi (prodotto e p.a.)	Dose formulato (g/hl)	Dose p.a. (g/hl)	Date trattamenti	17/5	
				Germogli infetti (%)	Gravità malattia sui germogli infetti
TESTIMONE	-	-	-	56,1 b	76,9 b
BION (Acibenzolar-S-methyl 50% WG)	20-15-15	10-7,5-7,5	27/3-10/4-23/4	20,8 a	53,7 ab
REGALIS (Prohexadione- Ca 10% WG)	125-125-100	12,5-12,5-10	27/3-10/4-23/4	3,7a	39,5 a
Solfato di streptomicina	10	10	2/5	4,8 a	52,7 ab

Le medie seguite dalla stessa lettera non differiscono significativamente (p 0,05)

con *E. amylovora* è stata eseguita mediante taglio dell'apice delle tre foglie più giovani dei germogli con forbici contaminate in una sospensione batterica contenente circa  $7 \times 10^8$  CFU/ml; solo nel quinto esperimento (in cui sono stati saggiati alcuni prodotti rameici, data inoculazione: 5 giugno), la sospensione acquosa, diluita 1:10, è stata nebulizzata sulle tre foglie apicali dove poco prima erano state provocate con apposita "pinza" tre ferite omogenee per foglia, simulanti colpi di grandine. Entro due settimane dall'inoculazione, sono stati eseguiti i rilievi e sono state determinate l'incidenza della malattia e la gravità delle infezioni sui germogli.

Il quinto esperimento non viene riportato, in quanto non è stato possibile eseguire appropriati rilievi per un massiccio attacco di afidi che ha compromesso lo sviluppo vegetativo dei germogli.

#### Esperimento in frutteto

È stato condotto nella stessa azienda dell'anno precedente, ma in un diverso appezzamento

(cv. Conference di 8 anni) per valutare l'attività di prodotti già inseriti nelle diverse sperimentazioni (fosetil-Al, acibenzolar-S-methyl, prohexadione-Ca, Myco-Sin, poltiglia bordolese, solfato di rame a basso dosaggio (Kay-Tee) ed applicati con lancia a mano alimentata da una motopompa, secondo cadenze rapportate all'andamento climatico, nel periodo compreso fra 24 aprile e il 17 settembre. È stato adottato lo schema sperimentale dei blocchi randomizzati con 6 ripetizioni e parcelle costituite da 10-12 piante, distribuite su filari affiancati.

2002

#### Esperimento in serra su germogli

È stato condotto su giovani astoni di pero, adottando la stessa metodologia degli anni precedenti ed allestendo per ciascuna tesi 4 ripetizioni, ognuna costituita da 5 astoni dotati di 5-8 germogli in attiva crescita. Sono stati saggiati acibenzolar-S-methyl e prohexadione-Ca, ap-

plicati tre volte prima dell'inoculazione con *E. amylovora*, a confronto con solfato di streptomina, applicato un giorno prima dell'inoculazione stessa (tab. 7). Questa è stata effettuata nebulizzando con una sospensione acquosa di cellule del patogeno ( $7 \times 10^6$  CFU/ml) le tre foglie apicali dei germogli in attiva crescita su ciascun astone, preventivamente ferite con apposita pinza. I rilievi sono stati eseguiti dopo due settimane, determinando l'incidenza della malattia e la sua gravità sui germogli infetti.

#### Risultati

1998

#### Esperimenti in serra

Come si può osservare in *tabella 1a*, in tale prova (da considerare orientativa per il limitato numero di fiori inoculati) il fosetil-Al ha complessivamente evidenziato un'attività pressoché nulla nel prevenire le infezioni fiorali, mentre gli altri prodotti hanno ridotto in maniera più o

meno sensibile la frequenza della malattia, con un effetto particolarmente marcato per idrossido di rame e poltiglia bordolese. Sui germogli, tutti i prodotti saggiati hanno esercitato una temporanea azione di contenimento della malattia che, peraltro, si è andata progressivamente esaurendo per la maggior parte di essi, esclusi la miscela mancozeb + ossicloruro di rame e, tendenzialmente, flumechina (*tab. 1b pag. 86*).

### 1999

#### **Esperimento in serra su fiori**

Come si può osservare in *tabella 2 a pag. 87*, l'esito dell'inoculazione sperimentale è stato particolarmente positivo, con oltre l'84% di fiori infetti nella tesi testimone. Con tale elevata incidenza della malattia, l'azione dei prodotti saggiati è risultata complessivamente limitata e, pur considerando una marcata variabilità della risposta nelle ripetizioni, il migliore grado di efficacia è stato evidenziato (su un piano significativo rispetto al testimone) da flumechina e dalla miscela ossicloruro di rame + mancozeb (50+150 g/hl).

#### **Esperimento in serra su germogli**

A fronte di una percentuale di germogli infetti abbastanza elevata nella tesi testimone (oltre 68%), tutti i prodotti hanno esercitato una più o meno marcata attività protettiva, apparsa totale per acibenzolar-S-methyl e

particolarmente accentuata anche per Kay-Tee, Myco-Sin, ossicloruro di rame da solo e in miscela con mancozeb alla dose maggiore (*tab. 3 - pag. 88*). Tendenzialmente meno efficaci si sono dimostrati il fosetil-Al, solfato di streptomycina e poltiglia bordolese, senza alcun effetto dose per quest'ultima.

### 2000

#### **Esperimento in serra su fiori**

Come si può notare in *tabella 4 a pag. 88*, in presenza di un grado di attacco nella tesi non trattata particolarmente elevato (circa 94% di fiori infetti), nessun prodotto è apparso in grado di limitare significativamente lo sviluppo della malattia e solo solfato di streptomycina e fosetil-Al hanno determinato una tendenziale riduzione dell'incidenza della malattia.

#### **Esperimento in frutteto**

Come si può osservare in *tabella 5 a pag. 90*, non sono emerse differenze significative tra le tesi trattate e quella testimone, anche a causa della variabilità tra le ripetizioni. Peraltro, in considerazione dell'accurato monitoraggio condotto nel corso dell'esperimento, si ritiene opportuno prendere in considerazione alcune indicazioni. Esaminando nell'insieme i dati rilevati emerge come alcuni programmi abbiano contenuto la diffusione della malattia nel corso della stagione vegetativa mentre altri non

abbiano modificato la situazione rispetto alla tesi non trattata. In particolare, tra i prodotti apparentemente dotati di una certa efficacia, si possono citare acibenzolar-S-methyl, fosetil-Al e Myco-Sin, mentre poltiglia bordolese, R6 Bordeaux e Kay-Tee non si sono discostati molto dalla tesi testimone.

Da notare che nelle parcelle trattate con Myco-Sin, i frutti e le foglie hanno presentato diffusi fenomeni di fitotossicità sottoforma di aree necrotiche.

### 2001

#### **Esperimenti in serra su germogli**

I risultati delle prove con esito positivo sono riportati in *tabella 6 a pag. 90*. Dai primi tre esperimenti, si può desumere un'interessante efficacia di acibenzolar-S-methyl, che, in tutti i saggi, ha ridotto significativamente sia incidenza che gravità della malattia; non chiara è apparsa, invece, l'influenza dei tempi di applicazione rispetto all'inoculazione: nessuna differenza fra un trattamento 14 giorni prima (1° esperimento) e 2 trattamenti rispettivamente a 14 e 7 giorni (2° esperimento), ma riduzione dell'efficacia con l'inoculazione eseguita 10 giorni dopo il secondo trattamento (3° esperimento). Poco o nulla efficaci (vedi 1° esperimento) si sono dimostrati fosetil-Al e Myco-Sin, che non hanno in pratica modificato la situazione rispetto al testimone non trattato. Un'attività molto limitata è

stata evidenziata (4° *esperimento*) anche da prohexadione-Ca, con una tendenziale riduzione di incidenza e gravità della malattia.

### Esperimento in frutteto

L'esperimento (non riportato in tabella) non ha fornito indicazioni sull'attività dei prodotti saggianti, a causa della sporadica manifestazione della malattia (per di più su peri con cancri preesistenti su branche e tronco). Peraltro, non sono stati riscontrati sui frutti gli effetti fitotossici del Myco-Sin evidenziati da tale prodotto nella stessa azienda (anno 2000) sulla cv. Santa Maria.

## 2002

### Esperimento in serra su germogli

I risultati sono riportati in *tabella 7 a pag. 91*. In presenza di oltre il 50 % di germogli infetti nella tesi testimone, prohexadione-Ca (applicato tre volte prima dell'inoculazione a intervalli di due settimane) e solfato di streptomina (applicato il giorno prima) hanno fortemente contenuto l'incidenza della malattia e acibenzolar-S-methyl ha altresì indotto una buona risposta difensiva, statisticamente analoga ma apparentemente inferiore; anche lo sviluppo della necrosi sui germogli sintomatici è stata ridotta dai tre composti e, soprattutto, da prohexadione-Ca.

### Conclusioni

Un esame complessivo dei risul-

tati ottenuti negli esperimenti condotti nel periodo 1998-2002 consente di desumere le seguenti osservazioni.

Tra le prove in frutteto, condotte annualmente in aziende dove era stata segnalata presenza significativa di colpo di fuoco batterico, solo in una (anno 2000) la malattia si è manifestata ad un livello consistente, ma la grande variabilità tra le ripetizioni ha purtroppo compromesso la significatività statistica dei risultati. Tuttavia, un esame dettagliato dei rilievi offre indicazioni positive sull'attività di alcuni composti chimici saggianti: in particolare, di acibenzolar-S-methyl, ma anche di fosetil-Al e Myco-Sin, anche se quest'ultimo si è dimostrato fitotossico sulla cv. Santa Maria. L'esperimento dell'anno 2001 ha, peraltro, consentito di verificare la perfetta selettività dello stesso Myco-Sin per la cv. Conference, seppure in mancanza di sintomi significativi della malattia.

Molto più ampia è la casistica derivante dalle sperimentazioni in serra, favorita anche dalla possibilità di effettuare inoculazioni *ad hoc* con un ceppo virulento di *E. amylovora*. Tuttavia, l'insieme dei risultati ottenuti con l'uso dei principali composti chimici, attualmente accreditati di potenziale attività nel prevenire e/o limitare lo sviluppo delle infezioni, non ha dato indicazioni univoche sulla loro reale efficacia: a esperimenti nei quali alcuni di essi hanno evidenziato una chiara attività anti-colpo di fuoco, ne sono infatti seguiti altri nei

quali gli stessi composti si sono rivelati praticamente inefficaci. I fattori alla base di tali irregolari e contrastanti risultati non sono facilmente individuabili, anche se si può ragionevolmente speculare che le condizioni di serra, da un lato ottimali per lo sviluppo delle infezioni (elevata quantità d'inoculo, stato vegetativo di attiva crescita degli organi vegetali, temperatura, umidità relativa, ecc.), dall'altro possano aver contribuito a "comprimere" l'efficacia dei prodotti chimici. Nel cercare di interpretare gli esiti degli esperimenti appare comunque possibile individuare alcune tendenze utili per una definizione delle attuali possibilità d'intervento contro il colpo di fuoco.

Un'prima osservazione, si riferisce alla scarsa attività protettiva sui fiori riscontrata negli esperimenti per la maggior parte dei prodotti. Ciò conferma la nota, elevata suscettibilità di tali organi, presumibilmente ancora più accentuata nelle condizioni sperimentali adottate. Al riguardo, si possono richiamare i risultati ottenuti in campo nello Stato di New York su melo, dove i composti a base rispettivamente di acido ossolinico ("S-0208") e di solfato di rame ("Phyton 27") sono stati efficaci quanto solfato di streptomina nel prevenire le infezioni fiorali; il prodotto cuprico ha altresì dimostrato un'ottima efficacia, al pari dell'antibiotico e del prohexadione-Ca, senza nel contempo causare sintomi da fitotossicità su frutti e foglie (Aldwinckle *et al.*,

2002). Gli esiti dei saggi sui germogli evidenziano invece, in alcuni casi, un'interessante azione protettiva, come si può osservare per la maggior parte dei composti saggiati nel 1999, per acibenzolar-S-methyl nel 2001 e 2002, per il bioregolatore prohexadione-Ca nel 2002. Questi ultimi appartengono alla classe dei cosiddetti "attivatori della pianta", in riferimento alla loro capacità di modularne la suscettibilità in vari sistemi ospite-patogeno, mediante attivazione o induzione di resistenza sistemica acquisita

(SAR), quale risultato di una complessa cascata di eventi fisiologici (Aldwinckle *et al.*, 2002; Baysal *et al.*, 2002; Brisset *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2001; Deckers e Schoofs, 2002; Röemmelt *et al.*, 2002).

La grande variabilità di risposta fornita dai diversi prodotti saggiati costituisce un'ulteriore conferma della difficoltà nell'ottenere risultati costanti e ripetibili con un patogeno imprevedibile quale *E. amylovora*, ripetutamente emersa a livello mondiale nella lotta chimica contro il colpo di fuoco (Psallidas e Tsiantos,

2000). D'altra parte, l'efficacia protettiva evidenziata in alcune situazioni sperimentali da quasi tutti i prodotti saggiati dimostra che, usando gli stessi in maniera opportuna, è possibile ottenere un valido contributo alla gestione della malattia. Al riguardo, emerge chiaramente l'esigenza di proseguire gli approfondimenti sperimentali allo scopo di accrescere le conoscenze sulle peculiarità e sui fattori che concorrono a definire l'azione dei prodotti individuati tra i potenziali candidati idonei alla lotta chimica contro la batteriosi.

A  
B  
S  
T  
R  
A  
C  
T

#### Chemical control of fire blight on pear

Experiments were carried out in the period 1998-2002 to evaluate the activity of different chemicals in the control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on pear trees both in the greenhouse and in the field, under experimental and natural infection conditions, respectively. The following products were tested: different copper compounds (sulfate, idroxiide, oxychloride alone and mixed with mancozeb), the fungicide fosetil-Al, the SAR activator acibenzolar-S-methyl, the plant growth regulator prohexadione-Ca, the bactericide flumequine, the mineral powder Myco-Sin. The antibiotic streptomycin was used only in the greenhouse as a negative control. In the greenhouse tests on flowers of scions cv. Abate Fetel, flumequine reduced the incidence of infections but the protection level was generally poor for most of the chemicals assayed. In some greenhouse experiments on pear shoots cv. Abate Fetel, an appreciable level of efficacy was shown by all products and, in particular, by acibenzolar-S-methyl and prohexadione-Ca. Anyway, the results obtained on shoots in the greenhouse were so irregular that further confirmed the difficulty in the chemical control of fire blight. Field trials (performed in orchards where fire blight previously occurred on different pear cultivars) did not give significant results because of the lack of suitable disease attacks in most years; only in 2000, a certain effect in shoot protection was observed for acibenzolar-S-methyl, fosetil-Al and Myco-Sin.

#### Bibliografia

Aldwinckle H.S., Bhaskara Reddy M.V., Norelli J.L., 2002. *Evaluation and control of fire blight infection of apple blossoms and shoots with SAR inducers,*

*biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials.* Acta Hort. 590, 325-331.

Baysal Ö., Laux P., Zeller W., 2002. *Systemic acquired resi-*

*stance (SAR) – Effect of BTH against fire blight.* Acta Hort. 590, 269-272.

Bazzi C., 1998. *Il punto su lotta chimica e biologica al "colpo di fuoco batterico".* Rivista

- di Frutticoltura 9, 65-73.
- Benedettini G., Bugiani R., Calzolari A., Finelli F., Govoni P., 2002. *Fire blight in Emilia-Romagna (Italy): searching possible relationships between epidemic spread, climate and territory using the regional geographic database and GIS technology*. Acta Hort. 590, 207-214.
- Bertona A., Liguori R., Bassi R., Fili V., Filippi G., Saporiti M., Casola F., 2000. *Attivazione delle difese naturali con CGA 245704 (acibenzolar-S-methyl): un aiuto alle piante per la loro autodifesa contro i patogeni*. Atti Giornate Fitopatologiche 2, 27-32.
- Brisset M.N., Luisetti J., Gaignard J.L., 1991. *Experimentations with Firestop™ 3M in the chemical control of fire blight*. Agronomie 11, 93-99.
- Brisset M.N., Faize M., Heintz C., Cesbron S., Chartier R., Tharaud M., Paulin J.P., 2002. *Induced resistance to Erwinia amylovora in apple and pear*. Acta Hort. 590, 335-337.
- Costa G., Andreotti C., Bucchi F., Sabatini E., Bazzi C., Malaguti S., Rademacher W., 2001. *Prohexadione-Ca (Apogee): growth regulation and reduced fire blight incidence in pear*. HortScience 36, 931-933.
- Deckers T., Schoofs H., 2002. *Host susceptibility as a factor in control strategies of fire blight in European pear growing*. Acta Hort. 590, 127-138.
- Jones A.L., Schnabel E.L., 2000. *The development of streptomycin-resistant strains of Erwinia amylovora*. In: *Fire blight and its causative agent*, Erwinia amylovora Ed. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, U.K., 235-251.
- Miglio G., Gamberini O., Alexandrova M., Bazzi C., 1999. *Colpo di fuoco batterico del pero: fitofarmaci a confronto*. L'informatore Agrario 34, 89-92.
- Momol M.T., Norelli J.L., Piccioni D.E., Momol E.A., Gustafson H.L., 1998. *Internal movement of Erwinia amylovora through symptomless apple scion tissues into the rootstock*. Plant Dis. 82, 646-650.
- Psallidas P.G., Tsiantos J., 2000. *Chemical control of fire blight*. In: *Fire blight and its causative agent*, Erwinia amylovora Ed. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, U.K., 199-234.
- Röemmelt S., Plagge J., Treutter D., Zeller W., 1999. *Fire blight control in apple using products based on mineral powders*. Acta Hort. 489, 623-624.
- Röemmelt S., Peterek S., Treutter D., Rademacher W., Speakman J.B., Andreotti C., Costa G., Sponza G., Tortoreto L., Bazzi C., Halbwirth H., Zimmermann N.M., Stich K., Forkman G., 2002. *Alteration of phenylpropanoid biosynthesis of fruit trees as a tool for enhancement of fire blight resistance*. Acta Hort. 590, 477-484.
- Vanneste J.L., Eden-Green S., 2000. *Migration of Erwinia amylovora in host plant tissues*. In: *Fire blight and its causative agent*, Erwinia amylovora Ed. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, U.K., 73-83.



## BATTERI ANTAGONISTI: PROSPETTIVE DI LOTTA BIOLOGICA AL COLPO DI FUOCO BATTERICO

**C. Bazzi, F. Ramilli, E. Biondi, G. Sponza**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università di Bologna

### Introduzione

La lotta biologica alle malattie delle piante è da molti anni oggetto di studio da parte dei fitopatologi e, sull'argomento, a partire dagli inizi del secolo scorso, esistono migliaia di pubblicazioni il cui numero è cresciuto in forma esponenziale (Baker, 1987; Cook, 1993). In molti casi, le ricerche hanno portato a risultati lusinghieri, ma, nonostante gli sforzi profusi in tale direzione, pochi sono a tutt'oggi i casi di un uso su vasta scala di microrganismi nella comune pratica agricola. La lotta biologica bene si adatta anche al concetto di agricoltura sostenibile, in quanto sfrutta al massimo cicli naturali ad impatto ambientale nullo o comunque ridotto, senza nel contempo produrre effetti negativi di lunga durata alla restante comunità microbica nell'ecosistema (Gilbert *et al.*, 1993). In tale contesto, si possono inquadrare anche i mezzi fisici di lotta (solarizzazione del terreno, termoterapia dei materiali vegetali di propagazione, ecc..) e molti mezzi chimici pur-

ché non inquinanti e soprattutto selettivi verso uno specifico bersaglio (Cook, 2000).

La ricerca di strategie anti-colpo di fuoco delle rosacee coltivate e spontanee, causato dal batterio Gram-negativo *Erwinia amylovora* (foto 1) basate sull'uso di diversi tipi di microrganismi comunemente definiti antagonisti, è iniziata più di sessanta anni fa (Beer, 1990). In particolare, i lusinghieri successi ottenuti all'estero con la lotta biologica (Johnson e Stockwell, 2000), associati al sempre più diffuso fenomeno della resistenza a streptomicina acquisita dai ceppi del patogeno ed alla crescente richiesta di un uso limitato di pesticidi da parte dell'opinione pubblica, hanno incoraggiato l'intensificazione degli studi in tale direzione; negli Stati Uniti ed in Nuova Zelanda, la lotta biologica al colpo di fuoco - ed in particolare verso le infezioni fiorali - è divenuta concreto mezzo in programmi di lotta integrata mediante l'uso dei biopreparati commerciali "Blight Ban<sup>®</sup>" (Plant Health Technologies, Boise, Idaho) e "Blossom Bless<sup>®</sup>" (Gro-Chem NZ Limited),

rispettivamente a base dei ceppi A 506 di *Pseudomonas fluorescens* e P10C di *Pantoea agglomerans* (Vanneste, 2000; Vanneste *et al.*, 2002). In Italia, risultati promettenti sono stati ottenuti con il biopreparato liofilizzato a base del ceppo BS-F3 di *Bacillus subtilis* (Agribiotec, S.r.l., Concordia, Modena) (Alexandrova *et al.*, 2000; 2002): seppure ottenuti in serra, offrono infatti evidenza della possibilità di ridurre incidenza e gravità delle infezioni sui germogli ("shoot blight"), vero tallone d'achille per le aree frutticole della pianura padana, soprattutto a seguito di pesanti grandinate.



**Foto 1** - Esito letale delle infezioni di colpo di fuoco batterico su giovani alberi di pero

## Materiali e metodi

### Ceppi batterici: isolamento, identificazione ed applicazione

I ceppi IPV-BO G19, IPV-BO 3371, IPV-BO 4027c sono stati isolati rispettivamente da campioni di gemme dormienti prelevati in frutteti commerciali del ferrarese da meli Oregon Spur, Fuji e peri cv. Abate Fetel. Questi batteri sono stati saggiati per la loro capacità di inibire *in vitro* la crescita di *E. amylovora* (Wodzinski e Paulin, 1994) e successivamente identificati mediante studio di impronte fenotipiche (produzione di pigmenti fluorescenti su KB-agar e di levano su NSA), molecolari (profilo degli esteri metilici degli acidi grassi cellulari, FAMES) (Stead *et al.*, 1992) e patogenetiche (saggi su perine verdi, fiori e germogli di pero e melo; induzione di necrosi confluyente ipersensitiva in pannelli internervali di foglie di tabacco "White Burley") (Beer, 1990).

Sospensioni in tampone fosfato-potassico (5 mM, pH 6,7) di questi isolati, del ceppo noto antagonista A 506 di *P. fluorescens* (isolato negli USA) e del ceppo locale virulento OMP-BO 1077.7/94 di *E. amylovora*, allevati su KB-agar per 24 ore a 27°C, sono state rispettivamente applicate alla concentrazione di  $7 \times 10^8$  e  $7 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> negli esperimenti su frutticini di pero, fiori di pero e melo e germogli di pero. Solfato di streptomomicina (100 ppm) e H<sub>2</sub>O sono stati usati come controlli. Coltu-

re pure di questi batteri sono mantenute allo stato congelato e liofilizzato presso il Laboratorio di Fitobatteriologia del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA).

### Esperimenti su perine verdi

Sono state saggiate 150 perine verdi Abate Fetel suddivise in sei tesi, ciascuna costituita da due repliche di quindici frutticini/cad. Dopo accurato lavaggio in H<sub>2</sub>O corrente, decontaminazione della superficie con etanolo 70% e risciacquo in H<sub>2</sub>O distillata sterile, sono stati praticati con apposito coltello sterile pozzetti di circa 4 mm di diametro e di profondità. I pozzetti sono stati separatamente trattati prima con 60 µl di sospensione degli antagonisti IPV-BO G19, IPV-BO 4027c, A506 e dopo 3-4 ore con 40 µl di sospensione del ceppo OMP-BO 1077.7/94 di *E. amylovora*. Posti in apposita scatola in plexiglass fungente da camera umida, sono stati mantenuti per 13 giorni in cella climatica a 25°C, monitorando giornalmente lo sviluppo di marciume ed evasione di essudato batterico.

### Esperimenti su fiori di pero e melo

Gli esperimenti sono stati condotti (1999, 2000) in parte presso le serre del Servizio Fitosanitario Regionale di Bologna (SFR) ed in parte presso le serre ed i campi sperimentali dell'HortResearch, Ruakura Research Centre, Hamilton, Nuova Zelanda,

in collaborazione con il Dr. J.L. Vanneste.

In Italia, gli esperimenti in serra sono stati eseguiti sia su branche fiorite di pero Abate Fetel e di melo Royal Gala, mantenute con la base in acqua, che su giovani alberi di pero Abate Fetel allevati in vaso; in Nuova Zelanda, sono stati invece usati singoli fiori distaccati e fiori su alberi di pero Stark Crimson. In tutti i casi, sia gli antagonisti che il patogeno (in Nuova Zelanda sono stati usati i ceppi Eh 252 di *Pantoea agglomerans*, ex *E. herbicola*, già noto come attivo antagonista verso diversi ceppi di *E. amylovora* (Vanneste *et al.*, 1992) e 1540 di *E. amylovora*) sono stati applicati mediante nebulizzazione.

Il numero di fiori infetti è stato monitorato per 10 giorni ed è stata determinata l'incidenza di malattia relativa al controllo positivo (H<sub>2</sub>O). I trattamenti nelle condizioni di campo neozelandesi, sono stati condotti su alberi di melo Braeburn di 6 anni; dopo 4 settimane, è stata determinata l'incidenza relativa di malattia mediante monitoraggio dei corimbi fiorali naturalmente infetti evidenziando almeno un fiore sintomatico per corimbo.

### Esperimenti su germogli di pero

Gli esperimenti sono stati eseguiti presso le serre del SFR di Bologna su astoni di pero Abate Fetel allevati in vaso (3-4 repliche di 4-6 astoni/tesi) e mantenuti a 25°C e 80% UR. Le sospensioni batteriche sono state nebuliz-



zate sulle foglie e, dopo 24 ore, su ognuna delle tre foglie apicali di 6-8 germogli in attiva crescita/astone sono state praticate tre ferite con apposita "pinza" ideata per simulare colpi di grandine (foto 2). I dati relativi a incidenza e gravità delle infezioni sono stati raccolti su 80-90 germogli per tesi circa due settimane dopo l'inoculazione sperimentale ed analizzati statisticamente (Test di Duncan, P 0,05).

### Meccanismo d'azione

La produzione di composti ad azione antimicrobica da parte dei ceppi batterici è stata saggiata mediante tecnica del doppio strato su GA medium ed in substrato liquido minimale (Vanneste *et al.*, 1992). Nel primo caso, i batteri sono stati devitalizzati con vapori di cloroformio; nel secondo caso, i batteri sono stati invece eliminati mediante filtrazione sterile con filtri Millipore (porosità: 0,2 µm). La produzione di tali sostanze è stata associata alla presenza di aloni di inibizione nelle piastre o assenza di crescita di *E. amylovora* in filtrati colturali sterili, valutata mediante conteggio su piastra. Per determinare la natura delle sostanze ad azione antimicrobica, il filtrato colturale è stato digerito con enzimi proteolitici (pronasi e proteinasi K) per 2 ore a 37°C e cloruro ferrico FeCl<sub>3</sub> (attività sideroforica); inoltre si è cercato di valutare la stabilità di queste sostanze a diverse temperature (37-120°C) ed a valori estremi di pH (3-10). In Nuova Zelanda, è stato usato il ceppo

di riferimento Eh 252 di *P. agglomerans*.

### Sensibilità in vitro dei batteri a composti cuprici

È stata preliminarmente saggiata inseminando a tutto campo 120 µl di sospensione batterica ( $7 \times 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) dei ceppi OMP-BO 1077.7/94 di *E. amylovora* ed IPV-BO G19, IPV-BO 3371, IPV-BO 4027c in piastre di agar patata glucosato (PDA). Nel centro di ciascuna piastra, è stato posto un dischetto da antibiogramma (Schleicher & Schuell, 9 mm) su cui sono stati applicati 60 µl dei seguenti prodotti cuprici in acqua, alla concentrazione di 0,5 g di Cu l<sup>-1</sup>: poltiglia bordolese BB RSR (Cu 20% da solfato WG), Copper Pro (Cu 50% da ossicloruro WDG), Kocide (Cu 40% da idrossido WG), Kay Tee (Cu 5,5% da solfato). Dopo incubazione di 24 ore a 27°C sono stati rilevati i rispettivi aloni di inibizione attorno ai dischetti.

### Sopravvivenza dei batteri su germogli di pero in campo

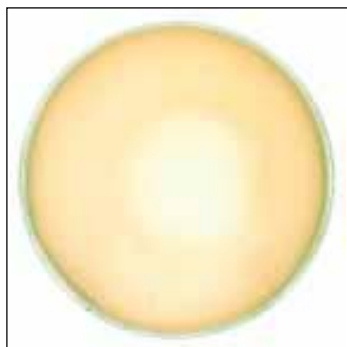
I ceppi A-506, IPV-BO G 19 e IPV-BO 4027C sono stati marcati per resistenza a rifampicina. Diverse colonie di mutanti spontanei sviluppatasi nelle piastre a gradiente di concentrazione di rifampicina sono state allevate in piastre di KB con dosi crescenti sino a 200 µg ml<sup>-1</sup> dell'antibiotico (Bazzi *et al.*, 1984). La stabilità *in vitro* di questi mutanti è stata saggiata dopo tre passaggi consecutivi in brodo nutritivo



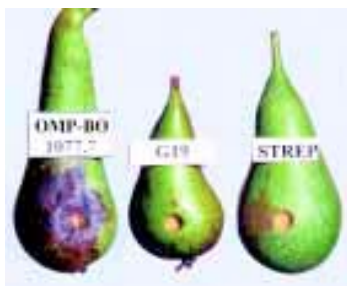
**Foto 2** - Pinza speciale usata per praticare ferite simulanti colpi di grandine sulle foglie

(Difco Laboratories, Detroit MI, USA) per 24 ore a 27°C in agitatore rotativo.

Sospensioni di giovani cellule (ca.  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) allevate in brodo nutritivo dei vari mutanti (Rif<sup>r</sup>) sono state nebulizzate (21/5/02) su germogli di peri Abate Fetel, coltivati in un'azienda sperimentale nei pressi di Ozzano dell'Emilia (BO). Il reisolamento dei mutanti su KB-agar contenente 200 µg ml<sup>-1</sup> di rifampicina e di actidione è stato effettuato 24 ore dopo l'applicazione e, successivamente, a intervalli prima settimanali poi mensili. Ad ogni rilievo, sono stati prelevati campioni di 80 foglie/cad. per tesi; in laboratorio, le foglie deprivate dei piccioli sono state lavate in beute contenenti tampone 10 mM MgSO<sub>4</sub> e poste in agitatore rotativo per 30 min. Il surnatante, ottenuto dopo una prima centrifugazione a basso numero di giri (1800 rpm, 10 min.) è stato ricentrifugato (13500g, 10 min.) ed il sedimento finale risospeso in 1 ml di tampone. Volumi da 10 µl di 5 diluizioni decimali della sospensione



**Foto 3** - Inibizione della crescita di *E. amylovora* da parte del ceppo IPV-BO 4027c: è evidente l'alone di inibizione al centro della piastra



**Foto 4** - Protezione di frutti immaturi di pero ottenuta con applicazione del ceppo batterico IPV-BO G19 e solfato di streptomina (controllo negativo); a sinistra, stadio avanzato di marciume da *E. amylovora* (controllo positivo)

“madre” sono stati inseriti sul substrato di reisolamento e, dopo incubazione di 48 ore a 27°C, è stato determinato il numero di cellule vitali mediante conteggio su piastra.

## Risultati

### Identificazione dei ceppi batterici

Dai campioni vegetali di diversa origine sono stati isolati più di cento ceppi batterici con tratti

fenotipici diversi per colore, forma, consistenza, elevazione delle colonie e produzione di pigmenti extracellulari. Le loro colture pure sono state saggiate per valutarne l'attività antagonista nei confronti di *E. amylovora*; in particolare, sono stati scelti tre ceppi sulla base di evidenti aloni di inibizione in piastra (foto 3) ed alla capacità di fornire apprezzabile livello di protezione di perine verdi, fiori e germogli di pero e melo a seguito della inoculazione sperimentale con il patogeno. Tali ceppi sono risultati Gram-negativi, hanno prodotto pigmenti fluorescenti su KB-agar eccetto IPV-BO 4027c ma non levano su NSA; non hanno indotto necrosi confluenti ipersensitiva in foglie di tabacco e non sono risultati fitopatogeni nei confronti di perine verdi, fiori e germogli di pero e melo. L'analisi del profilo degli esteri metilici degli acidi grassi cellulari (FAMES) di questi batteri saprotrofi, eseguita presso il Central Science Laboratory del Ministero dell'Agricoltura, Pesca ed Alimentazione (MAFF) di York (UK), ha permesso di identificarli come *Pseudomonas* spp.: il ceppo IPV-BO G19, simile a *P. putida* biotipo A (indice di somiglianza 87%) ed il ceppo IPV-BO 3371 molto simile a *P. mendocina* (indice di somiglianza 96%); l'identificazione del ceppo IPV-BO 4027c è rimasta dubbia in quanto pur evidenziando un certo indice di somiglianza (86,6%) con *Pseudomonas* per la presenza di tre tipici acidi grassi cellulari seppure

in percentuali troppo basse e la presenza di un altro acido grasso normalmente assente.

### Saggi su perine verdi

L'efficacia antagonista dei batteri saggiati nei confronti di *E. amylovora* è stata determinata sulla base della loro capacità di prevenire marciume delle perine verdi associato ad evasione di essudato a seguito dell'inoculazione sperimentale con il patogeno. Dopo 4 giorni, il 80% delle perine di controllo (H<sub>2</sub>O) ha evidenziato i sintomi da infezione da, a differenza delle tesi trattate con i batteri e con solfato di streptomina assolutamente prive di sintomi; dopo 6 giorni, la protezione relativa al controllo positivo (H<sub>2</sub>O) è stata 100%, 96% e 71% rispettivamente per le tesi IPV-BO G19, IPV-BO 4027c, A 506; dopo 13 giorni, le stesse tesi hanno mostrato, nell'ordine, protezione relativa 83%, 87%, 57%; a tale rilievo, tutti i frutticini del controllo positivo (H<sub>2</sub>O), hanno evidenziato i tipici sintomi di marciume con evasione di essudato batterico (foto 4). In tutti i rilievi, le perine pretrattate con l'antibiotico sono invece risultate asintomatiche (fig. 1).

### Saggi su fiori di pero e melo

Tutti i ceppi batterici saggiati sono risultati non fitopatogeni e non fitotossici sui fiori. Per il ceppo IPV-BO 3371 la protezione relativa è stata del 77% su fiori di melo in serra, ma variabile (6-49%) su fiori di pero; per il ceppo IPV-BO G19 la protezione

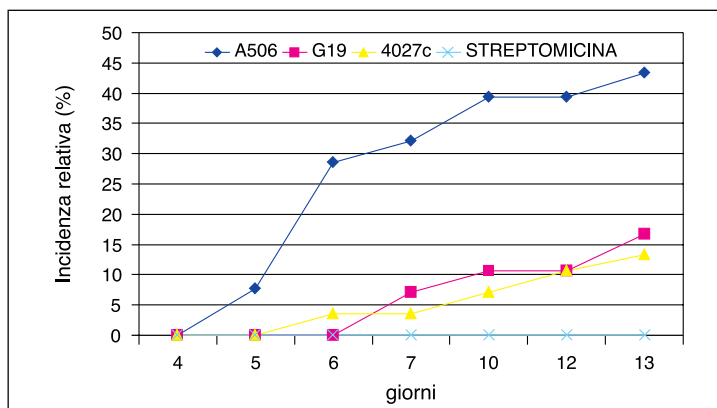
relativa è stata del 79% su fiori di melo in campo, 52% su fiori di melo e 25-34% su fiori di pero in serra. Per il ceppo antagonista A 506, la protezione relativa è stata del 15% su fiori di melo e del 26-61% su fiori di pero in serra; per il ceppo antagonista Eh 252 la protezione relativa è stata del 70% su fiori di melo in campo e del 36% su fiori di pero in serra (figg. 2 e 3).

### Saggi su germogli di pero

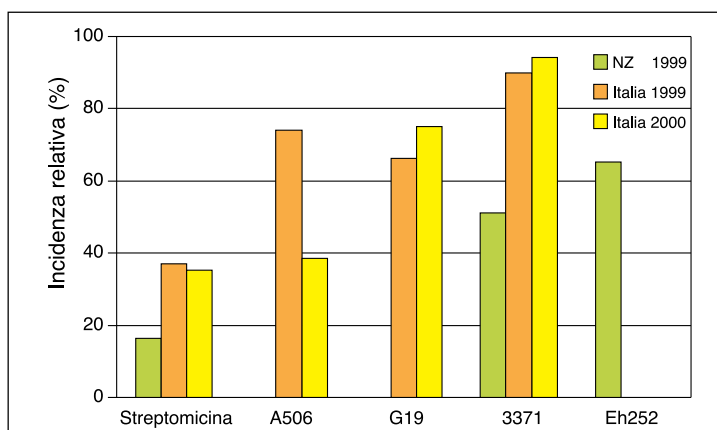
L'efficacia protettiva dei batteri è stata determinata sulla base di incidenza e gravità della malattia (tab. 1). Nel 2001, rispetto al controllo positivo ( $H_2O$ ), il ceppo IPV-BO G19 è risultato apparentemente il più efficace nel proteggere i germogli dalle infezioni sperimentali con *E. amylovora*, non differenziandosi significativamente dal trattamento con streptomycina (foto 5); il livello di protezione relativa ottenuto con applicazione dei ceppi IPV-BO G19 e IPV-BO 3371 è stato superiore a quello ottenuto con il ceppo noto A506 (fig. 4). Nel 2002, i ceppi IPV-BO G19 e IPV-BO 4027c, pur evidenziando un buon livello di protezione relativa dei germogli dalle infezioni (67% e 59%), non hanno raggiunto l'efficacia protettiva ottenuta con l'antibiotico (91%). In generale, l'applicazione dei batteri ha ridotto significativamente l'incidenza ma non la gravità delle infezioni.

### Meccanismo d'azione

I composti ad attività antimicrobica prodotti dal ceppo antago-



**Figura 1** - Incidenza relativa delle infezioni su frutticini di pero Abate Fetel dopo applicazione dei batteri antagonisti e di *E. amylovora*



**Figura 2** - Incidenza relativa delle infezioni su fiori di pero in serra, 10 giorni dopo l'inoculazione con *E. amylovora* (Italia e Nuova Zelanda)

**Tabella 1** - Incidenza e gravità delle infezioni su germogli di pero Abate Fetel inoculati in serra con *E. amylovora* dopo applicazione dei ceppi batterici

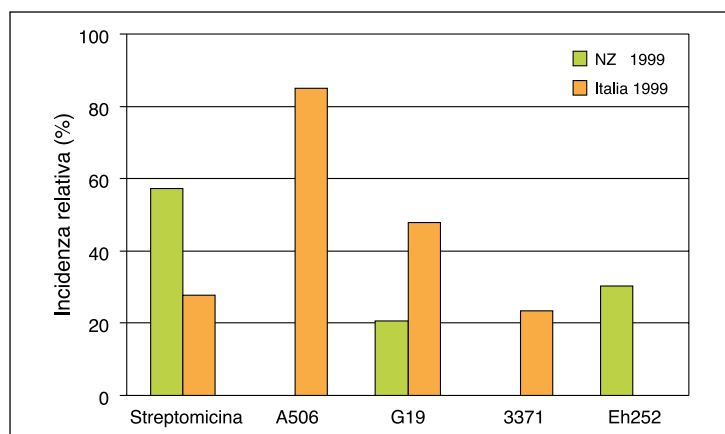
Trattamento	Incidenza (%)		Gravità (%)	
	2001	2002	2001	2002
$H_2O$	79,6 a	56,1 a	50,1 a	76,9 ab
Streptomycina	18,3 c	4,8 b	38,1 a	52,7 b
A506	52,0 b	-	40,9 a	-
IPV-BO G19	33,9 bc	18,2 b	33,9 a	63,2 ab
IPV-BO 3371	40,4 b	-	40,4 a	-
IPV-BO 4027c	-	22,7 b	-	87,0 a

nista IPV-BO G19 in substrato agarizzato non hanno prodotto aloni di inibizione dopo aggiunta di pronasi e proteinasi K: pertanto, tali composti sono riferibili a sostanze antimicrobiche di natura peptidica; lo stesso ceppo non è stato in grado di produrli se allevato in coltura liquida. Per i ceppi IPV-BO 3371 e IPV-BO 4027c è stata evidenziata invece la produzione di sostanze anti-

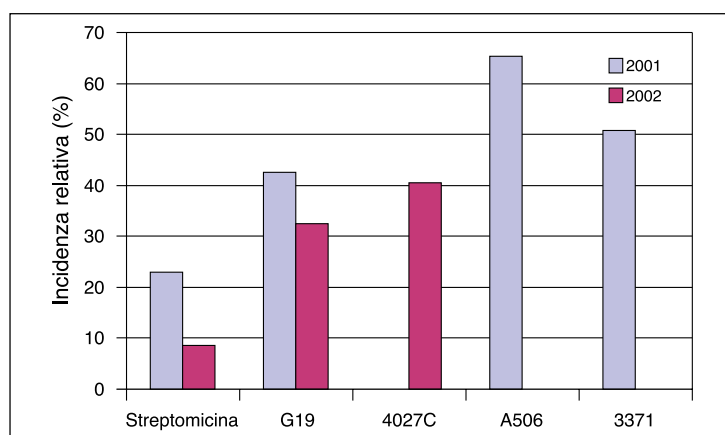
microbiche di natura non peptidica. Nessuno di tali composti ha agito come sideroforo. Inoltre, le sostanze prodotte dal ceppo IPV-BO 3371 sono state disattivate ad alte temperature ma non in un intervallo di pH 3÷10.

### Sensibilità a composti cuprici

La sensibilità di *E. amylovora* e degli altri batteri a composti ra-



**Figura 3** - Incidenza relativa delle infezioni su fiori di melo, 10 giorni dopo l'inoculazione con *E. amylovora* in serra (Italia) e 28 giorni dopo l'applicazione degli antagonisti in campo (Nuova Zelanda)



**Figura 4** - Incidenza relativa delle infezioni su germogli di pero in serra



**Foto 5** - Protezione di un germoglio di pero mediante applicazione del ceppo IPV-BO G19; a destra, germoglio di pero con tipici sintomi di colpo di fuoco (controllo positivo)

meici è stata determinata sulla base del diametro degli aloni di inibizione attorno ai dischetti da antibiogramma posti al centro delle piastre di PDA. A parità di concentrazione di ione rame ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) nei prodotti cuprici saggiati, la crescita batterica è risultata diversamente inibita: rispetto ad *E. amylovora*, i ceppi IPV-BO 4027c ed IPV-BO G19 sono risultati meno sensibili all'azione del rame, in particolare di quello contenuto rispettivamente in BB RSR (poltiglia bordolese) e Copper Pro (ossicloruro di rame) ed il maggiore livello di inibizione relativa è stato osservato nelle piastre con Kay Tee; il ceppo IPV-BO 3371 ha mostrato invece un livello di sensibilità simile o addirittura superiore (es: Copper Pro) a quello del patogeno (fig. 5).

### Dinamica degli antagonisti su germogli di pero

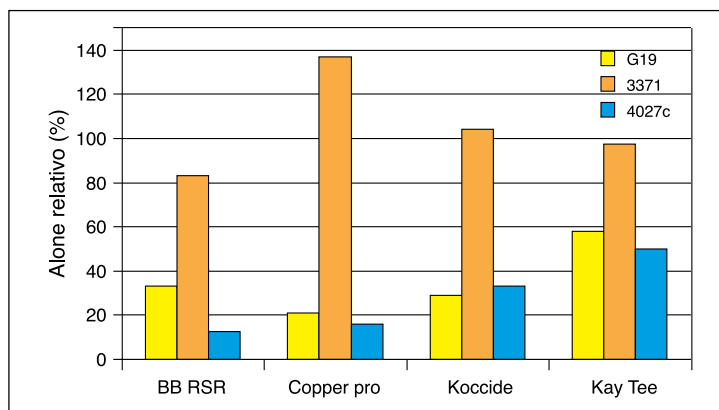
Mediante conteggio su piastra, è stato periodicamente determinato il numero di cellule vitali (CFU/foglia) dei mutanti Rif<sup>r</sup> dei ceppi IPV-BO 4027c, IPV-BO

G19, A 506. Il livello di popolazione dei primi due antagonisti, 104 giorni dopo la loro applicazione sui germogli, è calato rispettivamente sino a  $1,3 \times 10^3$  e  $2,6 \times 10^1$ , annullandosi per A 506 anche nei monitoraggi successivi; in particolare, dopo 132 giorni, il reisolamento di IPV-BO 4027c Rif<sup>r</sup> dai campioni ha evidenziato un incremento numerico tale da raggiungere approssimativamente il livello di popolazione rilevato dopo 24 ore ( $6,7 \times 10^4$ ) (fig. 6).

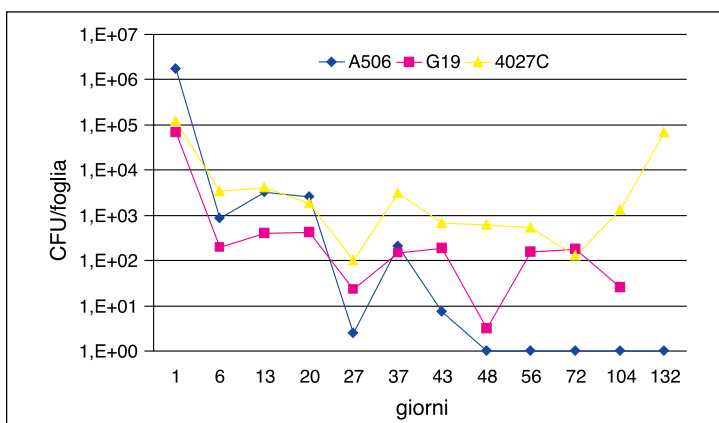
### Conclusioni

L'attività di sperimentazione e ricerca svolta nel quinquennio 1998-2002 ha portato ad alcuni risultati di grande interesse per le prospettive offerte dalla lotta biologica al colpo di fuoco batterico nei frutteti delle aree padane, dove le condizioni climatiche sono più spesso favorevoli all'avvio di cicli infettivi durante la stagione vegetativa a seguito di eventi traumatici (Bazzi *et al.*, 1996).

In particolare, tre dei tanti ceppi batterici saggiati, non fitopatogeni e non fitotossici, hanno dimostrato efficacia nel proteggere fiori di pero e melo, nonché frutticini e germogli di pero: non solo in ambiente controllato, ma anche nelle condizioni di campo neozelandesi, la protezione relativa dei corimbi fiorali di meli "Braeburn" da infezioni naturali è stata quasi dell'80% dopo applicazione della pseudomonade fluorescente IPV-BO G19 (identificata come *P. putida* biotipo



**Figura 5** - Inibizione relativa della crescita *in vitro* dei ceppi batterici saggiati ottenuta con diversi prodotti cuprici



**Figura 6** - Dinamica delle popolazioni dei mutanti batterici applicati su germogli di pero Abate Fetel in campo

A mediante analisi del profilo degli esteri metilici degli acidi grassi cellulari, ma più simile a *P. fluorescens* secondo l'analisi della sequenza parziale del gene 16S rDNA e della sequenza del DNA della regione ITS (Galasso *et al.*, 2002).

In alcuni casi, il livello di protezione ottenuto in serra su germogli di pero anche con il ceppo IPV-BO 3371 (*P. mendoci-*

*na*) è risultato addirittura simile e superiore a quello ottenuto rispettivamente con solfato di streptomycin e con il ceppo noto A 506 di *P. fluorescens*. Lo studio del/i meccanismo/i d'azione esercitato dagli antagonisti supporta precedenti evidenze sperimentali, indicando come la produzione di composti ad azione antimicrobica possa essere in parte comune a diversi

ceppi ed allo stesso tempo diversa (Vanneste, 1996; Johnson e Stockwell, 2000); inoltre, l'importanza della produzione di sostanze ad azione antimicrobica potrebbe variare a seconda della composizione in amminoacidi liberi del tessuto vegetale (Wodzinski e Paulin, 1994) e di altri fattori modulanti "l'ecosistema frutteto", in particolare il clima. La sola produzione di sostanze antibatteriche *in vitro* da parte dei ceppi antagonisti saggiati non può comunque offrire sufficiente evidenza della loro azione nella lotta biologica *in planta*: in altri termini, non è noto se tali antagonisti producano *in planta* sostanze ad effetto antibatterico diverse da quelle prodotte *in vitro* o se la loro attività antagonista sia correlata alla produzione di sostanze ad azione antibatterica o di altri metaboliti.

La completa conoscenza di questi meccanismi è di grande importanza per ottimizzare preparazione ed applicazione dei preparati batterici: ad esempio, *i*) la combinazione del ceppo A 506 di *P. fluorescens* con il chelato di ferro FeEDDHA sembra ridurre significativamente l'incidenza delle infezioni fiorali al pari del solfato di streptomycina (Stockwell *et al.*, 2001);

*ii*) la maggiore efficacia mostrata dal preparato liofilizzato del ceppo BS-F3 di *B. subtilis* rispetto a sospensioni di cellule e spore raccolte direttamente dal brodo colturale (Alexandrova *et al.*, 2000), apre altresì la strada alla produzione di biopreparati

attivi, di pratico uso e dotati della sopravvivenza necessaria per un'attiva colonizzazione della nicchia ecologica, idonea a competere con il patogeno.

A tale riguardo, lo studio in campo della dinamica dei mutanti Rif<sup>r</sup> dei ceppi antagonisti A-506, IPV-BO G19 e IPV-BO 4027c ha evidenziato la capacità di quest'ultimo di ripristinare, dopo circa 4 mesi, il livello di popolazione ( $6,7 \times 10^4$  CFU/foglia) rilevato 24 ore dopo l'applicazione su germogli di pero Abate Fetel. D'altra parte, il calo numerico delle popolazioni antagoniste monitorato durante la stagione vegetativa ha portato a formulare ipotesi sulla ottimizzazione della cadenza di intervento: dopo 15-20 giorni, potrebbe rendersi necessaria una seconda applicazione degli antagonisti per assicurarne un consistente ed adeguato livello numerico. È noto, infatti, come la migliore efficacia protettiva di frutti e germogli di pero in attiva crescita da parte del ceppo BS-F3 di *B. subtilis* sia stata ottenuta a seguito di applicazioni ripetute dell'antagonista (Alexandrova *et al.*, 2000). Ulteriori studi potranno migliorare le conoscenze sulla cadenza di applicazione degli antagonisti in relazione ad infezioni naturali da *E. amylovora*, sulla lunghezza del periodo di protezione dopo la loro applicazione, sulla possibile necessità di trattamenti ripetuti e sulla loro compatibilità con altri prodotti chimici convenzionali. A tale riguardo, nei nostri saggi preliminari *in vitro*, gli antagonisti IPV-BO

G19 e IPV-BO 4027c sono sembrati meno sensibili di *E. amylovora* all'azione della stessa concentrazione di ione rame contenuto in poltiglia bordolese e ossicloruro, ma non in Kay Tee: ciò porta ad ipotizzare un possibile uso integrato delle strategie della lotta biologica e chimica con certi prodotti convenzionali di largo uso nei nostri frutteti.

Si ritiene opportuno ribadire che il retaggio di vecchi preconcetti fa spesso considerare un agente dotato di intrinseche caratteristiche benefiche meno efficace di un prodotto chimico, apparentemente più versatile e di più semplice applicazione; inoltre, l'iter per brevettazione e registrazione di un valido microrganismo, non disgiunto da una necessaria interazione con il settore privato e frequentemente inficiato da eccessiva pesantezza normativa e lungaggini burocratiche, costituisce spesso concreto ostacolo per giungere rapidamente alla sua legale commercializzazione. Il numero dei microrganismi registrati in Italia, assai più limitato di quello dei microrganismi registrati all'estero, fa ragionevolmente ritenere che buona parte dei risultati acquisiti resti, purtroppo, "in lista d'attesa", confinato nei laboratori di ricerca (Acquadro e Gullino, 2001).

Si auspica che l'interesse verso la lotta biologica al colpo di fuoco batterico delle rosacee sia tale da scongiurare questo rischio e, ad imitazione di quanto già fatto all'estero, si passi dalla teoria alla pratica.

### A B S T R A C T **Bacterial antagonists: perspectives for biological control of fire blight**

Experiments were carried out in Italy (period 1998-2002) and in New Zealand (1999) to determine the effectiveness in preventing and/or limiting progression of fire blight infections on flowers and shoots of apple and pear of three local bacterial strains: two fluorescent pseudomonads isolated from apple buds (IPV-BO G19 and IPV-BO 3371, similar to *Pseudomonas putida* biotype A and *P. mendocina*, respectively) and a non-fluorescent one (IPV-BO 4027c) isolated from pear buds. The activity of these non-pathogenic and non-phytotoxic bacteria against *Erwinia amylovora* was tested both *in vitro* and on pear fruitlets. The strain IPV-BO G19 was found to produce a peptide antimicrobial compound when grown in agar medium but not when grown in liquid medium; in contrast, the other two strains were found to produce a non-peptidic compound when grown in liquid medium and on agar plates. None of these compounds acted as a siderophore. The efficacy of the bacteria in reducing disease incidence and severity was compared with that of two known biocontrol agents (*P. fluorescens* A 506 and *Pantoea agglomerans* Eh 252); water and streptomycin were used as positive and negative controls, respectively. For strain IPV-BO 3371, relative protection on apple flowers in the greenhouse was 77%, but variable on pear flowers (6 to 49%); for strain IPV-BO G19 relative protection on apple flowers in the field was 79%, 52% on apple flowers and 25-34% on pear flowers in the greenhouse. For strain IPV-BO G19, relative protection on pear shoots in the greenhouse varied from 57% to 67% and for strains IPV-BO 4027c and IPV-BO 3371 was 59% and 49%, respectively. A very high level of protection on pear fruitlets was given by strains IPV-BO G19 and IPV-BO 4027c. Spontaneous rifampicin resistant mutants (Rif<sup>r</sup>) of IPV-BO G19 and IPV-BO 4027c strains were used to study bacterial population dynamics on pear leaves in the field: viable bacteria were still present at a population level of  $6.7 \times 10^4$  CFU per leaf, 132 days after initial application. These antagonists seem very promising for biocontrol of fire blight, as in some cases they outperformed *P. fluorescens* A 506, *P. agglomerans* Eh 252 and streptomycin.

### Bibliografia

- Acquadro A., Gullino M.L., 2001. *Dalla scoperta all'impiego nella pratica dei mezzi biologici di lotta. I - Brevettazione e registrazione*. Inf.tore Fitopatol. 5, 40-46.
- Alexandrova M., Poppi S., Bazzi C. 2000. *Lotta biologica al colpo di fuoco batterico con il ceppo antagonista BS-F3 di Bacillus subtilis*. ATTI Giornate Fitopatologiche 2, 371-378.
- Alexandrova M., Bazzi C., Lameri P., 2002. *Bacillus subtilis strain BS-F3: colonization of pear organs and its action as biocontrol agent*. Acta Hort. 590, 291-297.
- Baker K.F., 1987. *Evolving concept of biological control of plant pathogens*. Annu Rev. Phytopathol. 25, 67-85.
- Bazzi C., Piazza C., Mazzucchi U., 1984. *Survival in the field of Pseudomonas cichorii (Swingle), causal agent of lettuce varnish spot*. Phytopath. Z. 111, 251-258.
- Bazzi C., Merighi M., Stefani E., Gambin E., Saccardi A., Calzolari A., Perugini C., 1996. *Maryblyt 4.2: prediction of fire blight outbreaks in Italy (Po Valley)*. Acta Hort. 411, 163-172.
- Beer S.V., 1990. *Biological control: Erwinia amylovora*. In: Methods in Phytobacteriology, Ed.ri Z. Klement, K. Rudolph, D.C. Sands, Academiai Kiadó, Budapest, 372-375.

- Cook R.J., 1993. *Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens*. Annu.Rev. Phytopathol. 31, 53-80.
- Cook R.J., 2000. *Ruolo nella lotta biologica nell'ambito dell'agricoltura sostenibile*. Inf.tore Fitopatol. 3, 39-44.
- Galasso O., Sponza G., Bazzi C., Vanneste J.L., 2002. *Characterization of two fluorescent strains of Pseudomonas as biocontrol agents against fire blight*. Acta Hort. 590, 299-307.
- Gilbert G.S., Parke J.L., Clayton M.K., Handelsman J., 1993. *Effect of introduced bacterium on bacterial communities on roots*. Ecology 74, 840-854.
- Johnson K.B., Stockwell V.O., 2000. *Biological control of fire blight*. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* Ed. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, U.K., 319-337.
- Stead D.E., Sellwood J.E., Wilson J., Viney I., 1992. *Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid and accurate identification of plant pathogenic bacteria*. J. Appl. Bacteriol. 72, 315-321.
- Stockwell V.O., Johnson K.B., Loper J.E., 2001. *Enhancement of biocontrol of fire blight by combining Pseudomonas fluorescens A 506 with iron chelate FeEDDHA*. 9<sup>th</sup> International Workshop on fire blight, 8-12 ottobre 2001, Napier, Hawke's Bay, Nuova Zelanda (Abstracts).
- Vanneste J.L., Yu J., Beer S.V., 1992. *Role of antibiotics production by Erwinia herbicola Eh 252 in biological control of Erwinia amylovora*. J. Bacteriol. 174, 2785-2796.
- Vanneste J.L., Yu J., 1996. *Biological control of fire blight using Erwinia herbicola Eh 252 and Pseudomonas fluorescens A 506 separately or in combination*. Acta Hort. 411, 351-353.
- Vanneste J.L., 2000. *What is fire blight? Who is Erwinia amylovora? How to control it?* In: *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora* Ed. J.L. Vanneste, CABI Publishing, Wallingford, U.K., 319-337.
- Vanneste J.L., 2002. *P10c: a new biological control agent for control of fire blight which can be sprayed or distributed using honey bees*. Acta Hort. 590, 231-235.
- Wodzinski R.S., Paulin J.P., 1994. *Frequency and diversity of antibiotic production by putative Erwinia herbicola strains*. J. Appl. Bacteriol. 76, 603-607.



## APPROCCI AGRONOMICI PER RIDURRE LA SUSCETTIBILITÀ DEL PERO AL COLPO DI FUOCO BATTERICO

**M. Toselli, D. Malaguti, E. Baldi, A. Lucchi, G. Sorrenti, B. Marangoni**

Dipartimento di Colture Arboree - Università di Bologna

**C. Bazzi, G. Sponza**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali - Università di Bologna

### Introduzione

A seguito dei devastanti attacchi di colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*) segnalati in pianura Padana sulle più importanti cultivar di pero a partire dall'autunno 1994, si è cercato di definire interventi agronomici idonei a prevenire e/o limitare lo sviluppo delle infezioni. La continua esigenza di strategie di lotta a basso impatto ambientale, ma soprattutto la mancanza di efficaci mezzi chimici in grado di combattere la malattia, hanno indirizzato la ricerca verso lo studio delle pratiche di gestione del frutteto capaci di ridurre la suscettibilità dell'albero al patogeno. Studi condotti su melo hanno rivelato come l'aumento della concentrazione osmotica, a seguito dell'accumulo di sorbitolo nelle foglie, sia positivamente correlato alla resistenza al colpo di fuoco batterico (Suleman e Steiner, 1994). Un aumento della concentrazione osmotica ed un relativo abbassamento del potenziale idri-

co ricorrono spesso in condizioni di stress radicale (ad esempio come risposta alla riduzione della disponibilità di acqua o all'aumento della salinità) e questo per la sintesi di zuccheri alcolici quali il mannitolo nell'olivo (Gucci e Tattini, 1997) o il sorbitolo nelle pomacee (Bielinsky, 1982). Un moderato aumento della salinità della soluzione del terreno è stato spesso messo in relazione alla maggiore resistenza ai patogeni. Un esempio è costituito dal sedano, che migliora la resistenza alla fisiopatia del cosiddetto "cuore nero" in condizioni di moderata salinità (Shannon e Grieve, 1999); un altro esempio è quello del pomodoro, spesso coltivato con consistenti somministrazioni di azoto (N) e potassio (K) in fertirrigazione al fine di aumentare la salinità della soluzione irrigua e, indirettamente, la concentrazione osmotica con effetti benefici sul controllo di *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* (McGuire *et al.*, 1991). Tuttavia, la salinità della soluzione, presenta

effetti diversi a seconda dei sali coinvolti: il cloruro di calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), infatti, è considerato meno pericoloso del cloruro di sodio (NaCl) per l'effetto benefico del calcio (Ca) che migliora la stabilità della membrana citoplasmatica (Bressan *et al.*, 1998; Marschner, 1996).

Lo stato nutrizionale svolge un ruolo importante sulla suscettibilità dell'albero ai patogeni. Infatti, un'eccessiva disponibilità di N predispone l'albero agli attacchi di colpo di fuoco batterico (Van der Zwet e Kiel, 1979) in quanto la ritardata lignificazione dei germogli rende i tessuti vegetali più succulenti e, di conseguenza, più facilmente colonizzabili dal batterio. Il ruolo del K non è altrettanto ben definito: se, negli Stati Uniti, l'elevata concentrazione di K nelle foglie è stata associata ad una maggiore sensibilità al colpo di fuoco batterico (Van der Zwet e Kiel, 1979), in Turchia, è stata evidenziata una positiva relazione tra il K fogliare e la tolleranza al colpo di fuoco (Koseoglu *et al.*,

1996). Il Ca e il silicio (Si) hanno mostrato una certa efficacia come stimolatori delle difese della pianta (Marschner, 1998). Il Ca, ad esempio, è in grado di formare legami con i gruppi carbossilici delle sostanze pectiche della lamella mediana aumentandone lo spessore e la resistenza meccanica; inoltre, questo catione regola l'idratazione del citoplasma e il potenziale elettrico tra cellula ed ambiente esterno. Un effetto simile viene svolto dal Si che, legandosi alla parete, ne aumenta la consistenza ed in alcune piante erbacee, la cuticola diventa più resistente e coriacea a seguito della formazione di silicati sulla sua superficie.

La sperimentazione, condotta su pero dal 1998 al 2002, si è articolata in diverse fasi perseguendo due obiettivi principali:

- la valutazione dell'effetto di stress idrici, indotti attraverso la riduzione dell'umidità del suolo e l'aumento della salinità, sulla risposta dell'albero al colpo di fuoco batterico;
- la valutazione dello stato nutrizionale, in relazione alla suscettibilità dell'albero alla malattia.

### Materiali e metodi

#### Stato idrico del suolo e tolleranza al colpo di fuoco batterico

Le varie sperimentazioni sono state condotte a Cadriano (Bo), presso il Centro didattico Sperimentale dell'Università di Bologna e presso le strutture del Servizio Fitopatologico Regionale

(SFR) di Bologna dove, la disponibilità di celle isolate, ha permesso la inoculazione delle piante con *Erwinia amylovora*. Il materiale vegetale era costituito da astoni di pero cv. Abate Fétel, innestati su Cotogno C, virus-esenti e certificati sani da *E. amylovora*, allevati in vasi di plastica da 20 litri, su di un substrato di sabbia e terra in rapporto 1:1. Alla ripresa vegetativa, è stata eseguita una potatura volta a lasciare 8-10 germogli, quindi sono stati applicati i trattamenti irrigui che hanno previsto tra l'altro:

- controllo, irrigato con acqua pura, con volume pari all'evapotraspirato (ET);
- riduzione del volume irriguo in ragione del 66% rispetto al controllo (ET 66%);
- riduzione del volume irriguo in ragione del 50% rispetto al controllo (ET 50%);
- riduzione del volume irriguo in ragione del 33% rispetto al controllo (ET 33%);
- irrigazione con soluzione salina di 0,72 g l<sup>-1</sup> di NaCl + 0,7 g l<sup>-1</sup> di CaCl<sub>2</sub>, per una conducibilità elettrica di 2,1 mS cm<sup>-1</sup> (CE 2,1 mS cm<sup>-1</sup>);
- irrigazione con soluzione salina di 1,45 g l<sup>-1</sup> di NaCl + 1,4 g l<sup>-1</sup> di CaCl<sub>2</sub> (CE 4,2 mS cm<sup>-1</sup>);
- irrigazione con soluzione salina di 2,9 g l<sup>-1</sup> di NaCl + 2,8 g l<sup>-1</sup> di CaCl<sub>2</sub> (CE 8,3 mS cm<sup>-1</sup>);
- irrigazione con soluzione salina di 5,6 g l<sup>-1</sup> di CaCl<sub>2</sub> (CE 8,3 mS cm<sup>-1</sup>).

Per impedire che le precipitazioni potessero variare l'umidità del suolo, tutti i vasi sono stati pro-

tetti con sacchetti di plastica. Per valutare correttamente il volume irriguo da restituire, l'acqua traspirata è stata determinata attraverso periodiche pesate effettuate a cadenza di 3 o 4 giorni l'una dall'altra, dopo aver irrigato i vasi fino alla capacità idrica di campo. Gli astoni trattati con soluzione salina sono stati irrigati con gli stessi volumi irrigui del controllo.

Dopo circa 6 settimane di trattamenti differenziati, gli astoni sono stati trasferiti presso le serre del SFR dove si è proceduto alle inoculazioni sperimentali con il ceppo virulento OMP-BO 1077.7/94 di *E. amylovora* isolato da peri infetti. L'inoculazione è stata effettuata tagliando l'apice delle tre foglie più giovani di tre germogli per pianta, con forbici contaminate in una sospensione di giovani cellule batteriche (10<sup>8</sup> cellule ml<sup>-1</sup>). All'interno delle serre, la temperatura è stata mantenuta a 25 °C con umidità relativa del 90% per le prime 48 ore dopo l'inoculazione sperimentale e quindi abbassata e mantenuta attorno al 75%. Durante la permanenza degli astoni in serra, a cadenze stabilite, dalla data di inoculazione, è stata misurata la lunghezza del tratto necrotico, dapprima sulle foglie e poi sul germoglio, in modo da poter determinare l'indice di gravità della malattia (IG) espresso dal rapporto tra la lunghezza della necrosi e la lunghezza totale della foglia o del germoglio.

Lo stato idrico delle piante è stato valutato attraverso la determi-

nazione del potenziale idrico ( $\Psi_w$ ) dell'albero come suggerito da Naor (2000), oppure attraverso il  $\Psi_w$  della foglia. In questo caso, prima del sorgere del sole (quando ancora gli stomi erano chiusi), la foglia è stata recisa con una lama affilata per garantire una perfetta superficie di taglio del picciolo ed immediatamente inserita nella camera a pressione, con l'estremità del picciolo emergente da un orifizio a tenuta stagna. Nella camera è stata immessa lentamente aria compressa da una bombola ad essa collegata, sino alla comparsa di una goccia di liquido all'estremità del picciolo (Scholander *et al.*, 1965). Il valore di pressione riportato sul manometro della camera indicava il  $\Psi_w$ .

La determinazione del potenziale osmotico ( $\Psi_s$ ) è stata effettuata su foglie preventivamente congelate a  $-20^\circ\text{C}$ , quindi scongelate per facilitare la rottura delle membrane citoplasmatiche e consentire la fuoriuscita del liquido apoplastico. Ciascuna foglia è stata quindi spremuta con apposite pinze in modo da estrarre una o due gocce di succo cellulare (40-50  $\mu\text{l}$ ), che è stato poi pesato e diluito in acqua distillata, prima di essere utilizzato per la misura della concentrazione dei soluti (espressa come osmolarità) mediante micro-osmometro 5B (Roebing, Analytical Control, Milano).

La salinità del terreno è stata determinata in ciascun vaso seguendo il metodo della pasta satura secondo la metodologia suggerita dalla Società Italiana

della Scienza del Suolo (1985) e modificata come segue: 100 g di terreno secco, sono stati aggiunti a 250 g di acqua, quindi energicamente miscelati per ottenere un composto omogeneamente fluido. Dopo aver lasciato sedimentare, la soluzione limpida è servita per la misura della conducibilità elettrica tramite conduttimetro (Crison 525, Crison Instruments Barcellona, Spagna). I valori ottenuti sono stati convertiti in concentrazione di sale (NaCl) per peso secco del terreno ( $\text{g kg}^{-1}$ ). La concentrazione di N nelle foglie è stata determinata attraverso il metodo Kjeldahl con mineralizzazione a caldo del campione e titolazione (titolatore automatico Kjeltac Auto Analyzer 1030) con NaOH e HCl. Il K, il Ca e il sodio (Na) sono stati determinati, previa mineralizzazione in muffola, attraverso spettrofotometria ad assorbimento atomico (Spectra AA-200, Varian, Mulgrave, Victoria - Australia). Il cloro (Cl) è stato determinato, dopo estrazione con acqua a temperatura ambiente, attraverso cromatografia ionica. La concentrazione dei principali carboidrati (sorbitolo, glucosio, fruttosio, saccarosio) ed acidi organici (malico, citrico, ascorbico, chinico) è stata determinata attraverso analisi gascromatografica secondo le indicazioni di Bartolozzi *et al.* (1997). Un grammo (secco) di campione fogliare macinato è stato posto a contatto con solvente composto da etanolo (50%) per l'estrazione dei composti organici. Quindi, previa

aggiunta di 1 mg di standard interno (b-phenyl-glucopyranoside), la soluzione estratta è stata derivatizzata e iniettata nel gas cromatografo (Carlo Erba 4200, Carlo Erba, Milano) dotato di un detector a fiamma ionizzante e una colonna capillare (25 m x 0,25 mm I. D., OV1 metil polisiloxano in fase stazionaria) MEGA (Legnano, MI). Carboidrati ed acidi organici sono stati identificati confrontandone il tempo di ritenzione con quello di standard noti.

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza e, dove non specificato, le medie sono state separate con il test di Student-Newman-Keuls ( $P \leq 0,05$ ).

### **Stato nutrizionale e tolleranza del pero al colpo di fuoco batterico**

Le prove sono state condotte sul materiale vegetale e con le attrezzature precedentemente descritte. In un primo esperimento, gli astoni sono stati concimati al terreno con 2 dosi di K (0 e 4 g per vaso) in forma di solfato di potassio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) e con 4 dosi di N (0, 2, 4 e 8 g per vaso) in forma di nitrato ammonico ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), secondo lo schema fattoriale  $2 \times 4$ . Il fertilizzante è stato distribuito in più fasi in ciascuna delle quali si distribuiva 1 g di elemento per vaso. In un secondo esperimento, sono stati applicati, a cadenze settimanali per 6 settimane, diversi trattamenti fertilizzanti alla chioma:

- controllo non trattato;
- silicato di sodio,  $\text{Na}_2\text{O}(\text{SiO}_2)_2$ , alla dose di 300  $\text{mg l}^{-1}$  di  $\text{SiO}_2$ ;

**Tabella 1** - Effetto della riduzione degli apporti irrigui e della soluzione salina sulla lunghezza della foglia e del germoglio e sull'indice di gravità (IG) della malattia rilevato sulla lamina fogliare e sul germoglio dopo 12 giorni dall'inoculazione sperimentale con *E. amylovora*

Trattamento	Lunghezza foglia (cm)	IG foglia	Lunghezza germoglio (cm)	IG germoglio
Controllo	4,61 a	0,98 a	35,9 b <sup>1</sup>	0,30 a
ET 50%	4,11 b	0,69 c	32,2 b	0,16 ab
8,3 mS cm <sup>-1</sup>	4,63 a	0,78 b	36,7 b	0,13 b
4,2 mS cm <sup>-1</sup>	4,40 ab	0,97 a	43,2 a	0,32 a
2,1 mS cm <sup>-1</sup>	4,59 a	0,99 a	39,5 ab	0,30 a
Significatività	***	***	*	*

Valori seguiti da lettere uguali non sono statisticamente diversi ( $P \leq 0,05$ )

\*, \*\*\* = effetto del trattamento significativo per  $P \leq 0,05$  e  $0,001$ , rispettivamente

**Tabella 2** - Effetto della riduzione degli apporti irrigui e della soluzione salina sulla salinità della soluzione del suolo, sulla lunghezza dei germogli e sull'indice di gravità (IG) rilevato su germogli di pero dopo 21 giorni dall'inoculazione con *E. amylovora*

Trattamento	Salinità (g kg <sup>-1</sup> ss)	Germogli (cm)	IG
Controllo	0,40 c	37,3 a	0,12 a
CaCl <sub>2</sub>	4,53 b	36,1 a	0,00 c
NaCl	6,30 a	34,1 ab	0,004 b
NaCl + CaCl <sub>2</sub>	5,53 ab	36,0 a	0,0004 bc
ET 66%	-	37,4 a	0,02 bc
ET 33%	-	31,7 b	0,009 bc
Significatività	***	***	***

Valori seguiti da lettere uguali non sono statisticamente diversi ( $P \leq 0,05$ )

\*\*\* = effetto del trattamento significativo per  $P \leq 0,001$

**Tabella 3** - Effetto della riduzione degli apporti irrigui e della soluzione salina sul potenziale idrico ( $\Psi_w$ ) ed osmotico ( $\Psi_s$ ) delle foglie sul  $\Psi_s$  della linfa grezza e sulla salinità del suolo

Trattamento	$\Psi_w$ Foglia (-MPa)	$\Psi_s$ Foglia (-mOsm l <sup>-1</sup> )	$\Psi_s$ Linfa (-mOsm l <sup>-1</sup> )	Salinità (g kg <sup>-1</sup> ss)
Controllo	0,15 d	1202 c	13,2 b	0,23 b
ET 50%	1,54 a	1194 c	12,0 b	0,28 b
8,3 mS cm <sup>-1</sup>	0,65 b	1424 a	37,2 a	2,27 a
4,2 mS cm <sup>-1</sup>	0,48 bc	1315 b	-	-
2,1 mS cm <sup>-1</sup>	0,31 cd	1235 bc	-	-
Significatività	***	***	***	***

Valori seguiti da lettere uguali non sono statisticamente diversi ( $P \leq 0,05$ )

\*\*\* = effetto del trattamento significativo per  $P \leq 0,001$

- urea privata di biureto alla dose di 2 g l<sup>-1</sup>;

- prodotto commerciale (Kendal®) composto di: N (3,5%) K<sub>2</sub>O (15%) carbonio organico (3%), oligosaccaride, glutazione ed estratti vegetali (non meglio precisati) alla dose di 4 g l<sup>-1</sup>;

- K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alla dose di 2 g l<sup>-1</sup>.

L'inoculo delle piante e i rilievi sperimentali sono stati eseguiti con i tempi e i modi precedentemente descritti.

## Risultati

### Stato idrico del suolo e tolleranza al colpo di fuoco batterico

I diversi trattamenti hanno modificato la lunghezza della lamina fogliare e dei germogli. La prima è risultata diminuita a seguito della riduzione del 50% del volume irriguo (tab. 1), mentre lo sviluppo dei germogli, stimolato dalla somministrazione della soluzione salina alla concentrazione di 4,2 mS cm<sup>-1</sup> (tab. 1), è risultato ridotto da apporti irrigui pari al 33% dell'ET (tab. 2). L'indice di gravità della malattia (IG) sulle foglie e sui germogli è risultato più basso nelle piante soggette a riduzione degli apporti irrigui e in quelle irrigate con soluzione salina alla concentrazione di 8,3 mS cm<sup>-1</sup> (tab. 1). Tra i diversi sali sagggiati, il CaCl<sub>2</sub> ha offerto i migliori risultati in termini di contenimento della malattia (tab. 2), frutto di una salinità del suolo inferiore a quella indotta dall'NaCl (tab. 2). La riduzione degli apporti irrigui ha diminuito di circa 10 volte il  $\Psi_w$

fogliare rispetto agli alberi di controllo (tab. 3). Anche l'irrigazione con soluzione salina ha diminuito il  $\Psi_w$  fogliare in misura proporzionale alla conducibilità della soluzione irrigua. Il potenziale osmotico ( $\Psi_s$ ) fogliare è risultato maggiore nelle piante di controllo ed in quelle irrigate con volume ridotto, mentre è diminuito progressivamente all'aumentare della concentrazione salina (tab. 3); il ricorso a  $\text{CaCl}_2$  non ha invece modificato il  $\Psi_s$  rispetto al controllo irrigato con acqua pura (dati non riportati). Il  $\Psi_s$  del liquido xilematico è diminuito a seguito dell'irrigazione con soluzione alla massima concentrazione (tab. 3).

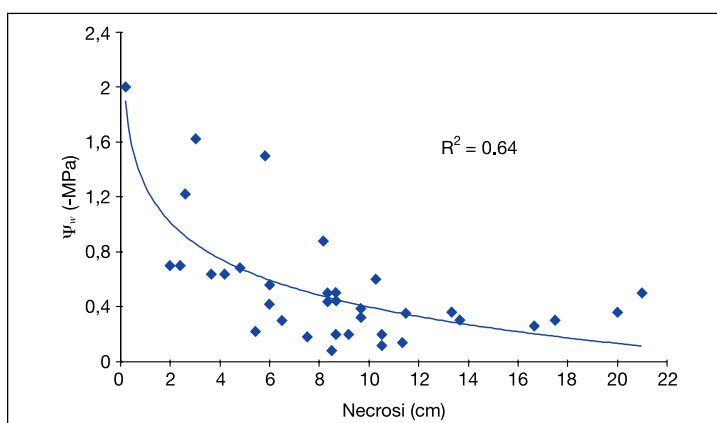
Una correlazione positiva è stata osservata tra  $\Psi_w$  fogliare misurato all'alba e la lunghezza del tratto necrotico sul germoglio: infatti, al diminuire del  $\Psi_w$  (aumento in valore assoluto), è diminuito anche lo sviluppo del sintomo di colpo di fuoco (fig. 1). Il  $\Psi_s$  e lo sviluppo della necrosi corticale sui germogli non sono risultati correlati (dati non riportati).

La concentrazione di sorbitolo è risultata maggiore nelle foglie di alberi trattati con volumi irrigui ridotti e con soluzione salina di  $8,3 \text{ mS cm}^{-1}$ ; dopo l'inoculazione con *E. amylovora*, la concentrazione di sorbitolo è diminuita in tutte le tesi (tab. 4). Prima dell'inoculazione, fruttosio e glucosio sono diminuiti a seguito del minore volume irriguo, mentre dopo l'inoculazione non sono emerse differenze sostanziali, se si esclude la diminuzione della

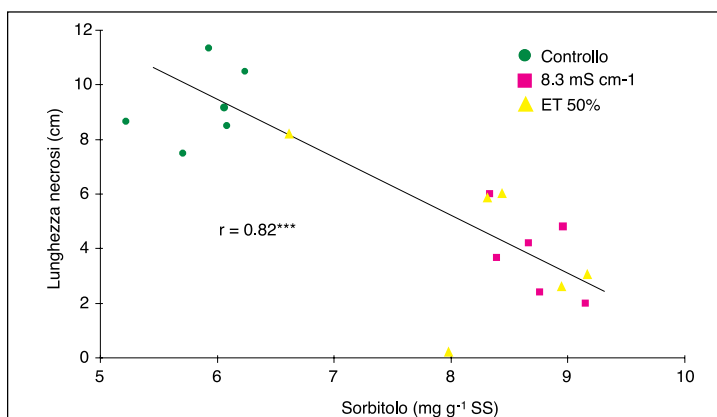
**Tabella 4** - Effetto della riduzione degli apporti irrigui e della soluzione salina sulla concentrazione ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ ss}$ ) di carboidrati nelle foglie prima e dopo l'inoculazione sperimentale con *E. amylovora*

Trattamento	Sorbitolo		Fruttosio		$\alpha$ -Glucosio		$\beta$ -Glucosio	
	prima	dopo	prima	dopo	prima	dopo	prima	dopo
Controllo	58,7	31,1	8,6	7,8	12,0	10,5	12,1	11,7
ET 50%	82,4	50,0	6,7	7,9	8,8	10,8	8,7	11,8
$8,3 \text{ mS cm}^{-1}$	87,1	41,0	8,3	5,5	10,6	10,5	10,8	12,0
2 SEM		5,3		0,8		0,9		1,3

SEM: Errore standard delle medie. Differenze tra medie  $> 2\text{SEM}$  indicano differenze statistiche ( $P \leq 0,05$ )



**Figura 1** - Relazione tra potenziale idrico fogliare ( $\Psi_w$ ) all'alba e lunghezza delle necrosi sui germogli 12 giorni dopo l'inoculazione sperimentale con *E. amylovora*



**Figura 2** - Relazione tra la concentrazione di sorbitolo nelle foglie e la lunghezza delle necrosi dei germogli, 12 dopo l'inoculazione sperimentale con *E. amylovora*

**Tabella 5** - Effetto della riduzione degli apporti irrigui e della soluzione salina sulla concentrazione ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ ss}$ ) di acidi organici nelle foglie prima e dopo l'inoculazione sperimentale con *E. amylovora*

Trattamento	Acido malico		Acido citrico		Acido chinico	
	prima	dopo	prima	dopo	prima	dopo
Controllo	0,29	0,30	0,42	0,81	3,02	2,55
ET 50%	0,27	0,40	0,32	0,77	2,99	2,55
8,3 $\text{mS cm}^{-1}$	0,29	0,25	0,31	0,92	3,12	2,39
2 SEM	0,04		0,06		0,2	

SEM: Errore standard delle medie

Differenze tra medie > 2SEM indicano differenze statistiche ( $P \leq 0,05$ )

**Tabella 6** - Effetto della riduzione degli apporti irrigui e della soluzione salina sulla concentrazione di Ca e Na nelle foglie

Trattamento	Ca ( $\text{mg g}^{-1}$ )	Na ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Controllo	9,2 b	141,7 b
8,3 $\text{mS cm}^{-1}$	10,9 a	512,0 a
4,2 $\text{mS cm}^{-1}$	10,9 a	335,8 b
2,1 $\text{mS cm}^{-1}$	11,2 a	267,5 b
Significatività	*	**

Valori seguiti da lettere uguali non sono statisticamente diversi ( $P \leq 0,05$ )

\*, \*\* = effetto del trattamento significativo per  $P \leq 0,05$  e  $0,01$ , rispettivamente

**Tabella 7** - Effetto della concimazione con N e K al suolo sull'indice di gravità (IG) della malattia rilevato sui germogli di pero dopo 13 giorni dall'inoculazione sperimentale con *E. amylovora*

Dose N ( $\text{g vaso}^{-1}$ )	IG germoglio	
	Dose K ( $\text{g vaso}^{-1}$ )	
	0	4
0	0,31	0,41
2	0,35	0,47
4	0,32	0,34
8	0,14	0,23
Interazione	*** (2 SEM = 0,05)	

SEM: Errore standard delle medie

Differenze tra medie > 2SEM indicano differenze statistiche ( $P \leq 0,05$ )

concentrazione di fruttosio come risposta alla somministrazione della soluzione salina (tab. 4). La concentrazione di acido malico è aumentata, ma solo dopo l'inoculazione, nella tesi irrigata con volumi ridotti; l'acido citrico è aumentato in tutti i trattamenti dopo dell'inoculazione, ma in

modo particolare nella tesi irrigata con soluzione salina di 8,3  $\text{mS cm}^{-1}$ . L'acido chinico non è stato influenzato dal trattamento, tuttavia è diminuito dopo l'inoculazione (tab. 5). La relazione tra la concentrazione di sorbitolo nelle foglie e la lunghezza del tratto necrotico dei ger-

mogli non è risultata particolarmente stretta e nella figura 2 si possono osservare due nubi di punti ben contraddistinte da valori di bassa ed alta concentrazione di sorbitolo a cui corrisponde una rispettiva maggiore o minore suscettibilità al colpo di fuoco.

Le concentrazioni fogliari di Ca e Na sono aumentate a seguito della somministrazione della soluzione salina (tab. 6) e solo la seconda è risultata correlata positivamente ( $P = 0,04$ ) con la minore suscettibilità al colpo di fuoco batterico, anche se il modello lineare può spiegare solo il 43% della variabilità (dati non riportati).

### Stato nutrizionale e tolleranza del pero al colpo di fuoco batterico

La maggiore dose di fertilizzante azotato ha ridotto il grado di infezione, indipendentemente dalla concimazione con K (tab. 7); tuttavia, la somministrazione di K ha aumentato la sensibilità dei germogli al colpo di fuoco batterico tranne che nel caso della concimazione con 4 g di N. La somministrazione della dose più elevata di N ha avuto un effetto contrastante sullo sviluppo vegetativo: infatti, pur determinando una concentrazione di azoto nelle foglie simile alle altre dosi di N (tabella 9), ha nel contempo ridotto la lunghezza dei germogli (tab. 8). La concimazione con N e K non ha influenzato la concentrazione di K, Mg e Na nelle foglie; la dose maggiore di N ha contribuito ad

aumentare il rapporto N/K (tab. 9). Il tentativo di correlare la lunghezza del tratto necrotico dei germogli con la concentrazione di elemento minerale nelle foglie non ha consentito di rilevare relazioni significative (dati non tabulati).

I trattamenti alla chioma con Kendal®, silicato di sodio e solfato di K hanno consentito di limitare lo sviluppo del tratto necrotico sui germogli inoculati sperimentalmente con *E. amylovora* (tab. 10). La somministrazione di urea non ha dato risultati significativamente migliori rispetto al controllo. I trattamenti alla chioma non sono risultati in grado di modificare il potenziale idrico e quello osmotico (dati non riportati).

### Discussione

Un moderato deficit idrico e l'irrigazione con soluzione salina alla concentrazione di 8,3 mS cm<sup>-1</sup> hanno significativamente ridotto la suscettibilità degli astoni di pero al colpo di fuoco batterico. Il positivo effetto trova verosimilmente diverse spiegazioni a seconda del trattamento. Il limitato sviluppo dei sintomi in condizioni di deficit idrico, osservato anche negli Stati Uniti in frutteti commerciali (Van der Zwet, 1979), sembra collegato alla difficoltà di moltiplicazione del batterio in tessuti vegetali poco idratati. È probabile che alla base del limitato sviluppo del tratto necrotico vi sia anche un più lento flusso linfatico (xilematico e floematico) con conse-

**Tabella 8** - Effetto della concimazione con N e K al suolo sullo sviluppo vegetativo degli astoni di pero

Dose N (g vaso <sup>-1</sup> )	Lunghezza germogli (cm)	n. germogli/pianta
0	40,2a	12,2ab
2	40,6a	13,5a
4	37,0b	10,6b
8	33,4c	12,6ab
Significatività	*	*
Dose K (g vaso <sup>-1</sup> )	Lunghezza germogli (cm)	n. germogli/pianta
0	38,6	12,1
4	36,9	12,4
Significatività	*	NS

Lettere uguali indicano valori statisticamente non diversi

NS, \* effetto del trattamento non significativo o significativo per  $P \leq 0,05$ , rispettivamente. Interazione tra i fattori non significativa

**Tabella 9** - Effetto dell'apporto di N e K al suolo sulla concentrazione (mg 100 g<sup>-1</sup> ss) di N, K, Mg, Na e sul rapporto N/K nelle foglie + germogli di pero

Dose N (g vaso <sup>-1</sup> )	N	K	Mg	Na	N/K
0	2,11b	1,00	0,29	0,023	2,16b
2	2,47a	1,13	0,31	0,031	2,21b
4	2,45a	0,95	0,32	0,028	2,64a
8	2,53a	0,95	0,30	0,030	2,67a
Significatività	**	NS	NS	NS	**
Dose K (g vaso <sup>-1</sup> )	N	K	Mg	Na	N/K
0	2,4	1,04	0,30	0,025	2,33
4	2,4	0,98	0,32	0,032	2,51
Significatività	NS	NS	NS	*	NS

Lettere uguali indicano valori statisticamente non diversi

NS, \* effetto del trattamento non significativo o significativo per  $P \leq 0,05$ , rispettivamente. Interazione tra i fattori non significativa

**Tabella 10** - Effetto del diverso trattamento fogliare sulla lunghezza del tratto necrotico dei germogli dopo 8 e 21 giorni dall'inoculazione con *Erwinia amylovora*

Trattamento	Lunghezza necrosi (cm)	
	8 gg	21 gg
Controllo	16,48 a	29,50 a
Urea	12,40 ab	23,73 ab
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,35 b	19,40 b
SiO <sub>2</sub>	7,23 b	17,60 b
Kendal	6,41 b	15,17 b
Significatività	**	**

Lettere uguali indicano valori statisticamente non diversi;

\*\* = effetto del trattamento significativo per  $P \leq 0,01$ .

guente minore velocità di avanzamento del fronte della malattia. È risaputo che le condizioni ottimali per la proliferazione del batterio sono determinate da una elevata umidità relativa; di conseguenza, i tessuti poco succulenti sono di norma anche i meno suscettibili alle infezioni, anche se la presenza di cellule del patogeno traslocate in tessuti asintomatici non può essere esclusa a priori senza un rilevamento *ad hoc*. Nelle piante soggette a deficit idrico non è stata osservata alcuna variazione della concentrazione osmotica delle foglie (il  $\Psi_s$  non è risultato diverso dal controllo non trattato), per questo il limitato livello di gravità della malattia non sembra legato alla variazione di concentrazione dei soluti nel citoplasma. Non sono emerse evidenze a conferma di correlazione positiva tra accumulo tessutale di sorbitolo e minore suscettibilità ad *Erwinia amylovora* degli astoni sottoposti alla minore restituzione irrigua.

L'effetto positivo indotto dalla soluzione con la maggiore concentrazione salina è probabilmente legato al fatto che questo trattamento è stato in grado di aumentare la concentrazione osmotica del succo cellulare sino ad un limite sfavorevole alla colonizzazione dell'ospite da parte dell'agente patogeno: la concentrazione osmotica dell'essudato batterico è di circa  $-1,5$  Mpa (Suleman e Steiner, 1994) e, per valori al di sotto di tale soglia, la moltiplicazione batterica può essere compromessa. Nel nostro

caso il  $\Psi_s$  fogliare nelle piante irrigate con soluzione di  $8,3$  mS  $\text{cm}^{-1}$  è stato di circa  $-3$  Mpa e, sebbene la concentrazione osmotica dei germogli non sia stata determinata, si può ipotizzare che solo nelle piante irrigate con la soluzione alla massima concentrazione salina, il potenziale osmotico dei tessuti sia stato inferiore a quello delle cellule batteriche. L'aumento di sorbitolo, in questo contesto, è legato alla diminuzione del  $\Psi_s$ , ma è verosimile che la maggiore concentrazione di questo carboidrato non sia sufficiente a spiegare la diminuzione di potenziale osmotico, in quanto un aumento simile di sorbitolo è stato osservato anche negli astoni sottoposti a deficit idrico che non hanno evidenziato modifiche di  $\Psi_s$ . È per questo che non è stata registrata una buona correlazione tra concentrazione di sorbitolo nelle foglie e lunghezza del tratto necrotico: infatti, l'andamento rettilineo della funzione è il risultato di due distinte popolazioni di punti i cui valori di concentrazione di sorbitolo sono risultati di circa  $60$  e  $90$   $\text{mg g}^{-1}$  ss. Sembra quindi emergere che il  $\Psi_s$  sia influenzato anche da altri soluti organici ed inorganici oltre che dal sorbitolo, come ad esempio gli ioni  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ , la cui concentrazione fogliare è aumentata in risposta alla irrigazione con soluzione salina alla massima concentrazione. Questi ioni, accumulati nei vacuoli, possono aver inciso notevolmente sull'aumento della concentrazione osmotica.

Un eccesso di salinità del terreno riduce lo sviluppo delle piante (Shannon e Grieve, 1999) e causa fitotossicità associata ad intensa colorazione verde-bluastra delle foglie ed accartocciamento/necrosi dei margini e dell'apice fogliare (Carloni, 1989). Nei nostri esperimenti, gli astoni di pero non solo non hanno evidenziato sintomi di sofferenza, ma spesso hanno fatto registrare una concentrazione di clorofilla superiore al controllo. Evidentemente, per periodi di tempo di qualche settimana, il pero è in grado di tollerare una salinità di  $8$  mS  $\text{cm}^{-1}$ , la quale non sembra procurare anomalie fisiologiche nelle giovani piante di 1 anno. Quando la soluzione salina era composta da  $\text{CaCl}_2$ , la presenza dello ione  $\text{Ca}^{++}$  può avere alleviato gli effetti negativi dello ione  $\text{Na}^+$ . È stato, infatti, sottolineato che la disponibilità di Ca, in condizioni di stress salino, può ovviare all'effetto negativo sullo sviluppo vegetativo indotto dal Na (Bressan *et al.*, 1998). Anche se il meccanismo biochimico con il quale il Ca esercita la sua azione benefica non è ancora stato chiarito, sembra tuttavia che il modello più probabile riguardi la stabilizzazione della membrana citoplasmatica, oltre che un coinvolgimento del Ca come messaggero secondario in molti sistemi biologici (Bressan *et al.*, 1998). In particolare, il  $\text{CaCl}_2$  è risultato il sale più promettente nell'abbassare la suscettibilità degli astoni al colpo di fuoco batterico, in quanto oltre a mostrare una buona effi-



cacia nel limitare lo sviluppo delle necrosi corticali ha contrastato l'effetto negativo della salinità del terreno.

Tra i diversi volumi irrigui sperimentati, la restituzione del 66% dell'ET ha dato buoni risultati in termini di contenimento delle necrosi senza tuttavia limitare lo sviluppo dei germogli, cosa che invece è stata riscontrata con irrigazione pari al 33 % dell'ET. Questo risultato lascia intendere che una oculata riduzione degli apporti irrigui può rivelarsi un mezzo efficace per ridurre la gravità delle infezioni senza compromettere la produttività dell'albero.

La fertilizzazione con dosi crescenti di N (2, 4 e 8 g per vaso) non ha prodotto alcun aumento della sua concentrazione nelle foglie, ma paradossalmente ha ridotto lo sviluppo dei germogli. La spiegazione più plausibile a questa risposta è che la consistente somministrazione di nitrato ammonico e solfato di potassio possa avere determinato un aumento della salinità del suolo la quale, pur non procurando sintomi visibili di sofferenza, ha però limitato l'attività radicale e lo sviluppo dei germogli. Somministrazioni di 8 g di N + 4 g di K per vaso hanno determinato una salinità del suolo pari a 1,9 g di NaCl kg<sup>-1</sup>, circa 10 volte superiore a quella del controllo non trattato e un  $\Psi_s$  di circa -71,2 mOsm l<sup>-1</sup>, superiore a quello indotto dalla soluzione salina di 8,3 mS cm<sup>-1</sup>. Tra le strategie di lotta alle malattie, la fertilizzazione si è rivelata efficace in di-

versi sistemi ospite-patogeno (Huber, 1980) ed è una pratica agronomica molto diffusa nella coltivazione del pomodoro in Florida al fine di ridurre la gravità degli attacchi di *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. (McGuire *et al.*, 1991). È stato infatti riportato che il livello della popolazione epifitica di tale batterio è risultato minore nelle piante fertilizzate con le dosi maggiori di N e di K. Tuttavia, a differenza del presente lavoro, nella sperimentazione condotta in Florida è stato osservato un aumento della concentrazione fogliare di N e di K a seguito dei maggiori apporti dei due elementi, cosicché all'inizio della stagione vegetativa, la popolazione epifitica di *X. c. vesicatoria* è risultata inversamente correlata alla concentrazione di K. McGuire e collaboratori hanno proposto un modello secondo il quale la popolazione di *X. c. vesicatoria* diminuisce all'aumentare della salinità del suolo. Tale modello potrebbe essere applicabile anche su pero, anche se nei nostri esperimenti non è emerso un aumento inequivocabile del sorbitolo, principale responsabile della diminuzione del potenziale osmotico, in concomitanza della minore suscettibilità al colpo di fuoco batterico. La mancanza di correlazioni tra elementi nutritivi e gravità della malattia lascia intendere che non vi sia un coinvolgimento diretto dei principali elementi minerali sullo sviluppo delle necrosi. Prove simili, volte ad aumentare la resistenza del pero alla "macu-

latura bruna", hanno messo in evidenza un benefico effetto della concentrazione di Ca nelle foglie, mentre l'elevata concentrazione di K sembrerebbe favorire lo sviluppo della malattia (Toselli *et al.*, 2002).

A seguito di tutti i trattamenti fogliari, ad esclusione dell'applicazione di urea, la risposta degli astoni di pero alle inoculazioni sperimentali è stata abbastanza soddisfacente: infatti, lo sviluppo delle necrosi su foglie e germogli è risultato minore rispetto a quello rilevato sul controllo. L'effetto positivo non può essere legato all'aumento di concentrazione dei soluti nelle foglie, dato che il  $\Psi_s$  non è stato modificato dal trattamento fogliare. Il positivo effetto dei sali di silicio sulla seppur parziale riduzione della suscettibilità del pero al colpo di fuoco è stato confermato da altri esperimenti non riportati in questo lavoro (Zucchi, 2001) e offre la prospettiva di includere l'uso di questi composti tra i mezzi agronomici per la lotta alla batteriosi. Se da un lato, l'impiego di urea non ha contribuito ad abbassare la suscettibilità del pero al colpo di fuoco, dall'altro non l'ha neppure aumentata, lasciando aperta la possibilità d'uso di questo fertilizzante nella gestione della nutrizione del pereto.

### Conclusioni

Dalla sperimentazione pluriennale sin qui condotta sembrerebbe che il parziale deficit idrico e la somministrazione di soluzio-

ne salina a base di  $\text{CaCl}_2$  siano in grado di diminuire la suscettibilità del pero al colpo di fuoco batterico.

Il controllo dei volumi irrigui nel frutteto commerciale risulta potenzialmente semplice da attuare, tuttavia, il periodo primaverile è spesso caratterizzato da abbondanti piogge assai efficaci nel mantenere la riserva di umi-

dità del terreno vicina alla capacità idrica massima, vanificando i tentativi di ridurre la disponibilità di acqua per l'albero. A tale proposito, è necessario definire il livello minimo di umidità del suolo alla quale l'attività vegeto-produttiva del pero non viene compromessa.

Interventi irrigui con soluzioni di  $\text{CaCl}_2$  risultano meno dannosi (a

parità di salinità) rispetto a quelli con soluzioni di  $\text{NaCl}$ ; tuttavia, nella pratica agronomica, non sembra plausibile un impiego massiccio, nel pereto, di soluzioni saline aventi conducibilità elettrica di  $8 \text{ mS cm}^{-1}$ , qualunque sia il sale disciolto.

Alla base dell'effetto benefico della riduzione dei volumi irrigui e dell'impiego delle soluzioni saline,

### **T** Agronomic approaches to reduce pear susceptibility to fire blight

**C** Over a 4-year-long period of time (1999-2002) several experiments were arranged to pursue two main objectives: 1. evaluate the effect of water stress (induced by a reduction of water supply and an increase of soil water salinity) and 2. evaluate the effect of tree nutritional status on pear susceptibility to fire blight. All the experiments here reported were carried out on potted, one-year-old pear trees of cv. Abate Fetel/Quince C. Treatments were imposed when shoot length was around 10 cm and continued for 40-45 days. Infection was applied on 3 apical leaves per shoot (3 shoots per tree) and leaf and shoot symptom progressions were evaluated after experimental inoculation with *Erwinia amylovora*. Pear tree water supply was manipulated to obtain the following treatments: 1) control, well irrigated, 2) irrigation rate reduced by 33%, 50% and 66% of the control; 3) full irrigation rate with water solution of  $\text{NaCl}$  and  $\text{CaCl}_2$  to obtain an electric conductivity (EC) of 2.1, 4.2 and  $8.3 \text{ mS cm}^{-1}$ , in addition  $\text{NaCl}$  and  $\text{CaCl}_2$  were used alone (EC of  $8.3 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Tree nutritional status was modified: 1) by soil applications of K (0 and  $4 \text{ g pot}^{-1}$ ) and N (0, 2, 4 and  $8 \text{ g pot}^{-1}$ ) according to a factorial experimental design; and 2) by spraying the canopy with different compounds including: a. water (as a control), b. sodium silicate  $\text{Na}_2\text{O}(\text{SiO}_2)_2$  ( $300 \text{ mg l}^{-1}$  of  $\text{SiO}_2$ ); c. biuret free urea ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ). Irrigation water with salt at a concentration of  $8.3 \text{ mS cm}^{-1}$  as well as a 50%-reduction of water supply were effective in increasing pear tolerance to fire blight, as compared with control trees. Irrigation solution with  $\text{CaCl}_2$  was more effective than  $\text{NaCl}$  in reducing bacterial infection. Water with an electric conductivity lower than  $8.3 \text{ mS cm}^{-1}$  did not reduce symptom progression in leaves and shoots. A 50%-reduction of water supply and a water solution of  $8.3 \text{ mS cm}^{-1}$  significantly increased sorbitol concentration in leaf tissue. No relationship between leaf osmotic potential ( $\Psi_s$ ) and symptom progression in leaves and shoots was observed. A logarithmic positive relationship between pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_w$ ) and the extent of shoot necrosis was observed. Surprisingly, soil N supply reduced shoot growth and the progression of shoot necrosis. This effect was possibly related to the soil salinity induced by N application (that was almost 10 time higher than in control trees). No correlation was observed between blight shoot symptoms and leaf N, K, Mg and Na. Unlike urea, foliar application of silicon was effective in reducing leaf and shoot susceptibility to fire blight. In conclusion, pear susceptibility to fire blight can be reduced by a correct irrigation management that avoid excess of soil moisture. Nitrogen management, including foliar sprays, within the recommendation of the integrated crop guidelines does not affect tree susceptibility to the disease.

sembra esservi una riduzione dell'idratazione dei tessuti dell'albero, divenuti così meno favorevoli alla colonizzazione batterica.

Effetti positivi nella lotta alla batteriosi sono stati ottenuti con i formulati fogliari, in particolare con i sali di silicio che oltre tutto trovano un certo impiego nella gestione biologica del frutteto.

Non è emersa una chiara relazione tra lo stato nutrizionale degli astoni di pero e la modulazione della reattività alle inoculazioni sperimentali con *E. amylovora*.

Tuttavia, il positivo effetto della concimazione azotata sul contenimento delle infezioni sui germogli non sembra attribuibile al maggior sviluppo vegetativo indotto dal fertilizzante, ma piuttosto ad una risposta indiretta degli astoni stessi sottoposti a consistenti concimazioni: ciò è dimostrato dal fatto che le infezioni sono risultate meno gravi sui germogli a sviluppo più contenuto anche se concimati con la dose maggiore di azoto.

### Bibliografia

- Bertelli D., 2001. *Influenza dello stato idrico e della salinità del terreno sulla tolleranza al colpo di fuoco batterico (Erwinia amylovora) del pero*. Tesi di laurea. Dipartimento di Colture Arboree, Università degli Studi di Bologna.
- Bialeski R. L., 1982. *Sugar alcohols*. p. 158-192. In: A. Pirson and M. H. Zimmermann (eds.), *Plant carbohydrates I. Intracellular carbohydrates*. Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 13A. Springer Verlag, Berlin.
- Bartolozzi F., Bertazza G., Bassi D. e Cristoferi G., 1997. *Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruit by gas-liquid chromatography*. J. of Chromatography. 758, 99-107.
- Bressan R. A., Hasegawa P. M. And Pardo J. M., 1998. *Plant use calcium to resolve salt stress*. *Trend in Plant Sci.* 3(11), 411-412.
- Carloni L., 1989. *I terreni salini ed alcalini*. In: 'Chimica del Suolo' (P. Sequi ed.), pp. 405-418, Patron, Bologna.
- Castiglioni A., 2000. *Influenza dei mezzi agronomici per il controllo del colpo di fuoco batterico (Erwinia amylovora) nel pero*. Tesi di laurea. Dipartimento di Colture Arboree, Università degli Studi di Bologna.
- Gucci R. e Tattini M., 1997. *Salinity tolerance in olive*. *Horticultural Reviews*, 21, 177-214.
- Huber D. M., 1980. *The role of mineral nutrition in defense*. In 'Plant disease: an advanced treatise. Horsfall V. J. G. e Cowling E. B. (eds.) pp. 381-406. Academic Press. New York.
- Koseoglu A. T., Tokmak S. e Momol M. T., 1996. *Relationships between the incidence of fire blight and nutritional status of pear trees*. *Journal of Plant Nutrition* 19(1), 51-61.
- Marschner H., 1998. *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, Londra.
- Mcguire R. G., Jones J. B., Stanley C. D. e Csizinszky A. A., 1991. *Epiphytic populations of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria and bacterial spot of tomato as influenced by nitrogen and potassium fertilization*. *Phytopathology* 81(6), 656-660.
- Naor A., 2000. *Valutazione dello stato idrico dell'albero e relazione tra irrigazione e produzione del pesco e del melo*. *Frutticoltura* 7/8, 21-24.
- Scholander, P. F., Hamme, H. T., Bradstreet, E. D. e Hemmingen, E. A., 1965. *Sap pressure in vascular plants*. *Science*. 148, 339-348.
- Shannon M. C. e Grieve C. M., 1999. *Tolerance of vegetable crops to salinity*. *Scientia Horticulturae* 78, 5-38.
- Società Italiana Della Scienza Del Suolo, 1985. *Metodi normalizzati di analisi del suolo*. Ed agricole, Bologna.
- Suleman P. e Steiner P. W., 1994. *Relationship between sorbitol and solute potential in apple shoots relative to fire blight symptom development af-*

- ter infection by Erwinia amylovora*. Phytopatology 84(10), 1244-1250.
- Toselli M., Malaguti D., Marangoni B., Cabrini L., Bazzi C., Sponza G. e Scudellari D., 2002. *Reduction of fire blight infection by manipulation of pear tree water status*. Acta Horticulturae 590, 193-199.
- Toselli M., Malaguti D., Sorrenti G., Brunelli A. e Marangoni B., 2002. *Influenza dello stato idrico e nutrizionale sulla tolleranza del pero alla maculatura bruna (Stemphylium vesicarium)*. Atti VI Giornate Scientifiche SOI.
- Toselli M., Marangoni B., Malaguti D., Sorrenti G., Bazzi C. e Collina M., 2003 *Use of soil-applied calcium chloride to reduce Fire Blight and Brown Spot susceptibility of pear*. Acta Horticulturae in stampa.
- Van Der Zwet, Kiel H.L., 1979. *Fire blight: A bacterial disease of Rosaceous plants*. USDA, Agriculture Handbook, N. 510.
- Zucchi M., 2001. *Effetti dello stato nutrizionale dell'albero e della fertilizzazione fogliare sulla suscettibilità del pero al colpo di fuoco batterico (Erwinia amylovora) nel pero*. Tesi di laurea. Dipartimento di Colture Arboree, Università degli Studi di Bologna.

# CONTROLLO DEL COLPO DI FUOCO BATTERICO DEL PERO MEDIANTE L'IMPIEGO DEL PROHEXADIONE-CA: ALCUNE INDICAZIONI SPERIMENTALI

**C. Andreotti, E. Sabatini, F. Spinelli, G. Costa**

Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna

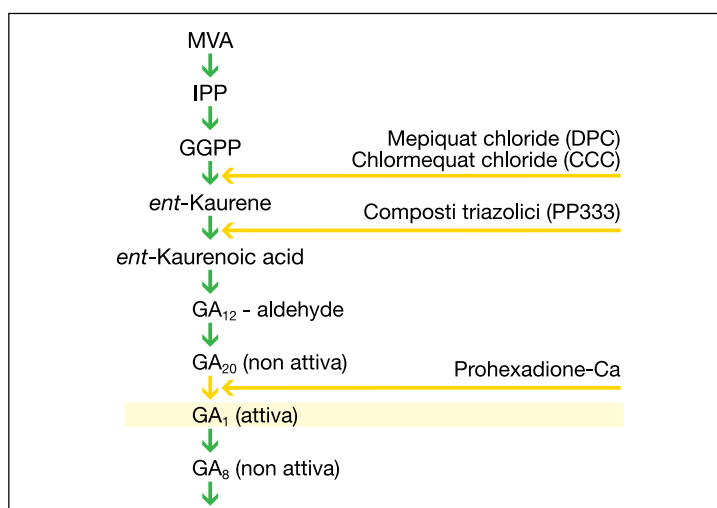
## Introduzione

L'impiego dei fitoregolatori (o bioregolatori), nell'ambito di una moderna gestione agronomica del frutteto, rappresenta un valido strumento integrativo per il controllo di numerosi processi fisiologici delle piante. In un contesto colturale equilibrato, questi composti sono in grado di esercitare la loro efficacia a concentrazioni relativamente basse, permettendo di raggiungere importanti risultati su specifici aspetti dello sviluppo vegetativo e riproduttivo delle piante. Recentemente, a fianco delle funzioni note e che normalmente sono prerogativa dei fitoregolatori (effetto brachizzante sullo sviluppo dei germogli, regolatori della dormienza delle gemme, anticascola dei frutticini, eccetera), grande interesse hanno suscitato le potenzialità in ambito fitosanitario di alcuni specifici composti. In altre parole l'osservazione di quello che potremo definire come un "effetto collaterale" (la scomparsa o attenua-

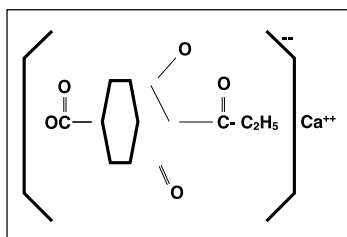
zione di determinati fenomeni fitopatologici) rispetto alla funzione principale nota del bioregolatore, ha finito per divenire l'aspetto di maggior interesse sul quale si sono concentrate le più approfondite verifiche sperimentali.

Un esempio del fenomeno appena riportato è rappresentato da una classe di composti in gra-

do intervenire inibendo l'attività di specifiche forme enzimatiche (le diossigenasi) responsabili di alcuni passaggi chiave di attivazione delle gibberelline. Più nel dettaglio (*fig. 1*, Rademacher, 2000) viene inibita la 3\_ idrossilazione che consente il passaggio dalle gibberelline inattive (GA<sub>20</sub>) a quelle biologicamente attive (GA<sub>1</sub>) (Nakayama *et al.*,



**Figura 1** - Influenza del prohexadione-Ca sullo step di sintesi della GA<sub>1</sub> attiva (*adattato da Rademacher, 2000*)



**Figura 2** - Formula di struttura del prohexadione-Ca

1990a). Ne consegue che l'esito più evidente, successivo alle applicazioni di composti inibitori delle diossigenasi, è una riduzione marcata dello sviluppo vegetativo e dunque un chiaro effetto brachizzante. Tra i composti inibitori delle diossigenasi, il prohexadione-Ca (Calcio 3-ossi-4-propionil-5-ossi-3-cicloesencarbossilato - Regalis®, BASF; fig. 2) è certamente la molecola più interessante, con la quale sono state svolte numerose prove sperimentali (principalmente su Pomacee) volte a meglio comprenderne le potenzialità agronomiche (su melo: Unrath, 1999; Bomben *et al.*, 1998; Owens e Stover, 1999; su pero: Costa *et al.*, 2001a e b; Andreotti *et al.*, 2001).

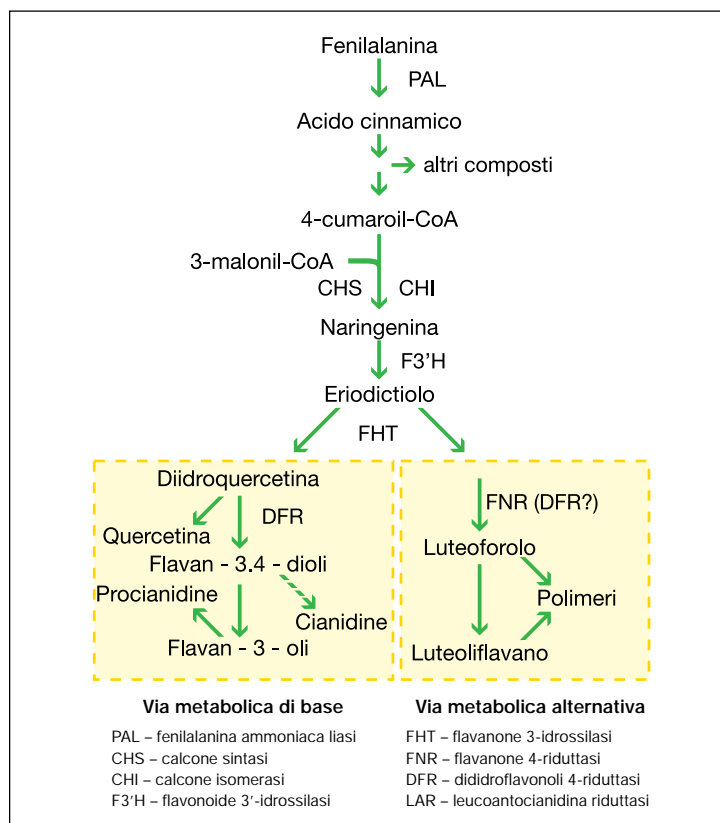
Parallelamente alla verifica delle capacità brachizzanti del prohexadione-Ca sono emerse alcune interessanti indicazioni circa lo stato fitosanitario delle piante trattate, che in alcuni casi risultavano meno suscettibili a due tra le più temute patologie delle pomacee: il colpo di fuoco batterico e la ticchiolatura (Yoder *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2001a e c). In un momento di vera e propria emergenza fito-

sanitaria, come è quella rappresentata dal colpo di fuoco batterico nell'Italia settentrionale, tali evidenze sperimentali hanno suscitato un immediato interesse nel campo della ricerca e della produzione.

Le conoscenze fino ad ora disponibili sul meccanismo di acquisizione di resistenza a patogeni successiva a trattamenti con prohexadione-Ca, indicano nell'alterazione parziale del metabolismo dei composti fenolici la più probabile causa fisiologica e biochimica. L'inibizione dell'enzima

flavanone-3-idrossilasi (una diossigenasi) ad opera del prohexadione-Ca comporterebbe un accumulo temporaneo del suo substrato (eriodictiolo), e l'apertura di una via metabolica alternativa (fig. 3) con conseguente neosintesi di specifici composti responsabili putativi dell'accresciuta resistenza (Römmelt *et al.*, 1999; 2000; Kampam *et al.*, 2000).

Con lo scopo di meglio comprendere l'efficacia agronomica e fitosanitaria del prohexadione-Ca, anche nell'ottica di un suo



**Figura 3** - Probabile via metabolica alternativa indotta dal prohexadione-Ca (adattato da Kampam *et al.*, 2000)

possibile inserimento nella articolata tecnica produttiva attualmente praticata per le pomacee, sono state condotte numerose prove sperimentali sia *in pieno campo* (ed in condizioni di inoculo naturale della malattia), che *in ambiente controllato* con inoculo artificiale del batterio patogeno *Erwinia amylovora*. Quello che segue rappresenta un resoconto riepilogativo dei principali risultati e delle più interessanti indicazioni emerse.

### Prove condotte in condizioni di pieno campo

Il controllo dello sviluppo vegetativo ottenibile sfruttando l'effetto brachizzante del prohexadione-Ca è stato oggetto di una intensa ed articolata attività di sperimentazione, condotta nel corso dell'ultimo quinquennio. La sperimentazione ha, nel dettaglio, avuto come obiettivo principale la costituzione di un'assieme di conoscenze ed esperienze in grado di assicurare un ottimale impiego del composto, nelle più diverse condizioni ambientali e colturali. In annate successive si è dunque proceduto a testare diverse concentrazioni, numero ed epoche dei trattamenti, valutando di volta in volta il conseguimento dell'effetto brachizzante indotto dal prohexadione-Ca.

Nella *tabella 1* a pag. 122, limitatamente alla cultivar Abate Fétel, sono riportati gli esiti sulla lunghezza finale dei germogli di trattamenti con prohexadione-Ca, singoli o ripetuti, in epoche

ed a concentrazioni diverse. Le concentrazioni provate andavano da un minimo di 50 ppm (applicazione ripetuta 4 volte nel corso della stagione) ad un massimo di 500 ppm (applicazione unica). Il primo trattamento è stato normalmente effettuato alla caduta petali, quando i nuovi germogli raggiungono una lunghezza media tra i 5 ed i 10 cm. La realizzazione di un trattamento molto anticipato, addirittura nella fase di pre-fioritura e quindi con uno sviluppo fogliare molto limitato, trova la sua giustificazione teorica nella possibilità di limitare l'incidenza di alcune patologie come il colpo di fuoco batterico che, proprio durante l'antesi, presentano il massimo rischio potenziale di infezione e colonizzazione del soggetto ospite.

Gli esiti delle prove di campo riportate in *tabella 1* permettono di indicare nel trattamento ripetuto a basse dosi di prohexadione-Ca (50 ppm x 4, ad esempio) la soluzione che negli anni ha fornito i risultati migliori (e costanti) per il controllo dello sviluppo vegetativo delle piante. Una riduzione della lunghezza finale dei germogli che mediamente si attesta su valori attorno al 40% appare certamente come una indicazione interessante. Concentrazioni più elevate (125 ppm, 250 ppm o addirittura 500 ppm) di prohexadione-Ca, somministrate una o due volte durante la stagione vegetativa, non hanno sortito effetti brachizzanti maggiori, presentando invece alcune controindi-



**Foto 1** - Riscoppi vegetativi seguenti ad applicazioni di elevate concentrazioni di prohexadione-Ca

cazioni. In particolare nel caso dell'unico trattamento con 500 ppm, il blocco repentino dello sviluppo dei germogli è stato poi seguito da un indesiderato "riscoppio vegetativo" nella seconda parte della stagione (*foto 1*), che oltre a vanificare il controllo sull'attività vegetativa della pianta, potenzialmente la espone a maggiori rischi di infezioni da colpo di fuoco batterico.

Il ruolo, e l'importanza, della cultivar nel determinare l'efficacia agronomica del prohexadione-Ca è apparso da subito un fattore di rilievo per un corretto impiego del prodotto. In maniera simile anche il portinnesto, soprattutto in quanto fattore importante nel determinare la "vigoria" complessiva della combinazione, è risultato decisivo per l'esito finale della prova. In linea generale i binomi (cultivar/portinnesto)

**Tabella 1** - Cv. Abate Fetel: effetto del prohexadione-Ca sulla lunghezza finale dei germogli. Riepilogo di un quadriennio di prove di campo (1998-2001)

Anno	Concentrazione (ppm)	Epoche interventi					Lunghezza finale germogli (100=controllo)
		Pre-fioritura	Caduta petali	+10 gg.	+10 gg.	+10 gg.	
1998	50 x 4		x	x	x	x	95,5
1999	50 x 4		x	x	x	x	66,7
2000	50 x 4		x	x	x	x	64,9
2001	50 x 4		x	x	x	x	69,1
1999	125		x				84,4
1999	125 x 2		x		x		87,8
1999	125 x 3	x	x		x		82,4
1999	125 x 3	x	x		x		70,0
2000	125 x 3	x	x		x		71,8
2001	125 x 3	x	x		x		57,6
1999	250		x				88,5
1999	250 x 2		x		x		77,9
1999	500		x				80,6

**Tabella 2** - Influenza del vigore della combinazione cv/portainnesto sull'efficacia del prohexadione-Ca nel controllo dello sviluppo vegetativo (*adattato da Costa et al., 2001b*)

Cultivar/portainnesto	Vigoria	Densità d'impianto (p/ha)	Tesi	Lunghezza finale germogli (cm)	Riscoppi vegetativi (n.)
Williams/Kirchensaller	Alta	1250	Controllo	102,8 a	4,7 a
			ProCa 125 ppm x 3	106,7 a	6,1 a
			ProCa 125 ppm x 4	103,0 a	5,8 a
Abate Fetel/Cot. C	Bassa	2630	Controllo	70,6 a	-
			ProCa 50 ppm x 4	48,2 b	-
			ProCa 125 ppm x 3	40,7 c	-

**Tabella 3** - Risultati ottenuti nella stagione 2002: effetto limitato del prohexadione-Ca sullo sviluppo finale dei germogli

Cultivar/portainnesto	Densità d'impianto (p/ha)	Tesi	Lunghezza finale germogli (cm)	Riscoppi vegetativi (%)
Santa Maria/Cot. BA 29	1850	Controllo	75,5 a	15
		ProCa 50 ppm x 4	68,9 b	43,3
Abate Fetel/Cot. Sydo	2850	Controllo	78,3 a	-
		ProCa 50 ppm x 4	78,4 a	-

tinnesto) vigorosi sono stati quelli per i quali il controllo vegetativo ottenibile mediante trattamenti con il prohexadione-Ca ha presentato le difficoltà maggiori. A

tale riguardo, in *tabella 2* sono riportati gli esiti di una prova sperimentale nella quale erano confrontati livelli di vigoria molto diversi, come quelli del bino-

mio vigoroso Williams-Kirchensaller e del binomio debole Abate Fetel-Cotogno C. Oltre ad una sostanziale inefficacia del trattamento sulla lunghezza finale dei



germogli, il binomio vigoroso si è caratterizzato per un più elevato numero di germogli che hanno presentato una seconda fase di crescita vegetativa. Risultati, questi ultimi, del tutto diversi da quelli evidenziatesi nella prova sul binomio debole Abate Fetel-Cotogno C.

L'inserimento del prohexadione-Ca nell'ambito della programmazione dei trattamenti normalmente eseguiti per la gestione dei frutteti, rappresenta un altro aspetto determinante per il proficuo impiego del composto e sul quale sono certamente necessari ulteriori approfondimenti. In questo senso, riteniamo che i risultati conseguiti nell'annata 2002 possano essere indicativi di quanto appena espresso. In *tabella 3* sono riportati i risultati di due prove condotte su "Santa Maria-Cotogno BA29" e "Abate Fetel-Cotogno Sydo" che, in maniera inaspettata, hanno evidenziato uno scarso effetto sul controllo dello sviluppo vegetativo dei germogli. Particolarmente indicativo è il dato di "Abate Fetel-Sydo", binomio che nell'ambito del medesimo impianto aveva fornito ben altre indicazioni in precedenti prove. Una possibile interpretazione di quanto accaduto riteniamo debba tenere in considerazione le particolari condizioni climatiche che hanno caratterizzato la primavera-estate 2002. Gelate e piogge abbondanti, seguite da periodi di alte temperature hanno certamente indotto ad un impiego importante di gibberelline esogene su pero (diversi trat-

tamenti), con la finalità di ridurre la cascola dei frutticini. Appare quindi evidente come l'impiego di un composto anti-gibberellico (il prohexadione-Ca) contemporaneamente all'applicazione di gibberelline esogene ( $GA_3$  e  $GA_{4+7}$ ) possa aver determinato gli esiti inattesi sopra indicati, del resto in parte già descritti in Nakayama *et al.*, 1990 (a; b).

L'influenza del prohexadione-Ca sui principali parametri riproduttivi (produzione per albero e peso medio dei frutti alla raccolta) è riportata nella *tabella 4 a pag. 124*, riassuntiva di diverse prove sperimentali condotte a partire dal 1998 su diverse cultivar di pero. In termini generali l'influenza che il prohexadione-Ca esercita su questi parametri è meno marcata rispetto a quanto è stato osservato sui parametri vegetativi. E' comunque da rilevare una interessante tendenza ad un generalizzato incremento del peso medio dei frutti alla raccolta. Fenomeno questo più evidente su melo (Bomben e Vizzotto, 2000) e, probabilmente, attribuibile alla capacità dei brachizzanti di ridurre la competizione tra *sink* vegetativi e riproduttivi con conseguente maggior accumulo di metaboliti ed acqua nei frutti (Costa *et al.*, 1986; Ramina *et al.*, 1981).

La valutazione in campo dell'efficacia dell'inibitore delle diossigenasi per il colpo di fuoco batterico del pero ha dovuto spesso confrontarsi con l'incostanza e la scarsa prevedibilità di questa batteriosi che, di anno in

anno, cambia notevolmente la sua incidenza e diffusione sul territorio. In altri termini, prove sperimentali realizzate appositamente in frutteti severamente danneggiati dal colpo di fuoco in precedenti annate allo scopo di valutare il prohexadione-Ca in condizioni di abbondante inoculo naturale, non hanno fornito le risposte attese proprio perché la malattia non è stata presente o, meglio, non si è manifestata. Nei casi però in cui il frequente monitoraggio (e la collaborazione degli agricoltori, che "segnalavano" i tagli in corrispondenza delle necrosi) ha evidenziato la presenza sintomatica di *E. amylovora* nelle piante oggetto della prova, il prohexadione-Ca ha di fatto confermato le positive indicazioni note in letteratura (Fernando e Jones, 1999; Momol *et al.*, 1999; Yoder *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2001a) e derivanti da prove condotte in ambiente controllato (vedi di seguito).

In *tabella 5 a pag. 124* è riportato l'esito finale del monitoraggio condotto su di un impianto di Abate Fetel in condizioni fitosanitarie compromesse (più di 14 infezioni, su diversi organi, per pianta). Quattro applicazioni ripetute di prohexadione-Ca (a 50 e 100 ppm) hanno consentito una riduzione consistente dell'incidenza della malattia (il 50% circa di riduzione con 50x4 ppm; il 75% circa con 100x4 ppm), abbattendo, in particolare, l'incidenza sulla fioritura secondaria. In condizioni parecchio differenti, con una manifestazione della

**Tabella 4** - Influenza del prohexadione-Ca sulla produzione per albero e peso medio dei frutti

Anno	Cultivar	Portinnesto	Concentrazione (ppm)	Produzione (kg/albero)	Peso medio del frutto (g)
1998	Abate Fetel	Cot. BA 29	Controllo	8,00	317
			ProCa 50 x 4	7,90	338 ↑
			ProCa 100 x 4	8,50	342 ↑
1999	Abate Fetel	Cot. BA 29	Controllo	-	308
			ProCa 125	-	322 ↑
			ProCa 125 x 2	-	338 ↑
			ProCa 250 x 2	-	362 ↑
	Conference	Cot. BA 29	Controllo	-	190
			ProCa 125+250 ProCa 25+250+250	-	193 210 ↑
Abate Fetel	BH/Cot.C	Controllo	9,73	277	
		ProCa 50 x 4	9,70	314 ↑	
		ProCa 125 x 3	9,86	298 ↑	
2000	Abate Fetel	BH/Cot. C	Controllo	13,30	280
			ProCa 50 x 4	14,80	293 ↑
			ProCa 125 x 3	13,80	303 ↑
	William	Kirchensaller	Controllo	3,40	249
			ProCa 125 x 3	4,09 ≠	242
			ProCa 125 x 4	5,04 ≠	249
2001	Abate Fetel	BH/Cot. C	Controllo	23,09	252
			ProCa 50 x 4	20,37	271 ↑
			ProCa 125 x 3	20,43	250
	William	Kirchensaller	Controllo	10,33	172
			ProCa 125 x 3	10,18	176
			ProCa 125 x 4	11,28 ≠	173
2002	Abate Fetel	Cot. Sydo	Controllo	14,49	259,5
			ProCa 50 x 4	14,05	274,5 ↑
	Santa Maria	Cot. BA29	Controllo	9,2	143,7
			ProCa 50 x 4	8,6	146,1

**Tabella 5** - Cv. Abate Fetel: efficacia del prohexadione-Ca nella riduzione dell'incidenza del colpo di fuoco (n. organi infetti per albero) e percentuale rispetto al controllo non trattato (*adattato da Costa et al., 2001a*)

ProCa (ppm)	Fiori second./albero		Germogli/albero		Frutti/albero		Branche/albero		Infezioni tot./albero	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
0 (controllo)	6,44 a <sup>z</sup>	100	4,73 a	100	0,34 a	100	2,68 a	100	14,19a	100
50 <sup>y</sup>	2,55 b	39,6	3,02 b	63,8	0,22 ab	64,7	2,02 a	75,4	7,82 b	55,1
100 <sup>y</sup>	1,07 c	16,6	1,62 c	34,2	0,05 b	14,7	1,02 b	38,1	3,77 c	26,6

<sup>z</sup> Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .

<sup>y</sup>4 applicazioni

batteriosi molto più limitata (circa 4 infezioni per pianta alla fine della stagione) entrambe i trattamenti con prohexadione-Ca

(125x3 ppm e 125x4 ppm) hanno comunque consentito un dimezzamento del numero delle manifestazioni sintomatiche nel

frutteto (*fig. 4*).

Tale efficacia non appare confermata sulla cultivar Santa Maria (*fig. 5*). Il numero delle infe-

zioni rilevate durante l'annata 2002 sulle piante trattate con il prohexadione-Ca è infatti risultato non differente da quello calcolato per le piante di controllo. La permanenza in fase di attiva crescita di piante ripetutamente trattate con gibberelline esogene (vedi quanto accennato in precedenza), potrebbe aver comportato una maggiore suscettibilità al colpo di fuoco per effetto di una maggiore presenza di tessuti vegetali giovani in attiva crescita, limitando dunque l'efficacia del trattamento con prohexadione-Ca sul controllo della malattia.

### Prove condotte in condizioni controllate e con inoculo artificiale del batterio *Erwinia amylovora*

Come in precedenza accennato, parallelamente alle prove condotte in condizioni di pieno campo, sono stati organizzati numerosi *test* in ambiente controllato (serra climatizzata) volti ad indagare in maniera specifica l'effettiva capacità del prohexadione-Ca di limitare efficacemente il colpo di fuoco batterico attraverso un accrescimento delle naturali barriere difensive delle piante.

Con questo obiettivo si è dunque proceduto ad inoculare artificialmente piante micropropagate o astoni di pero, in precedenza trattati con prohexadione-Ca. L'inoculo è stato effettuato contaminando con una sospensione batterica a concentrazione nota ( $10^8$  CFU/ml), il taglio

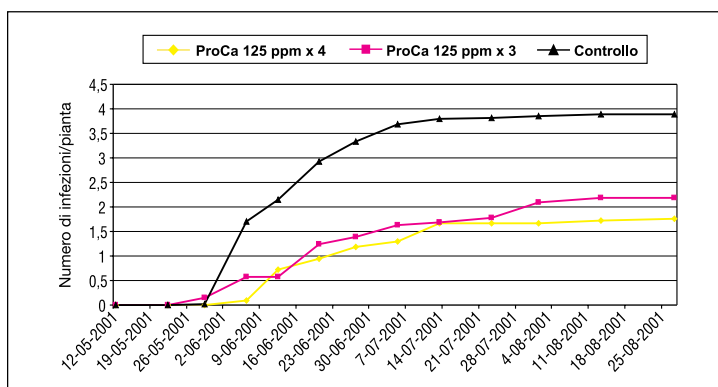


Figura 4 - Cv. Williams: numero di infezioni per pianta

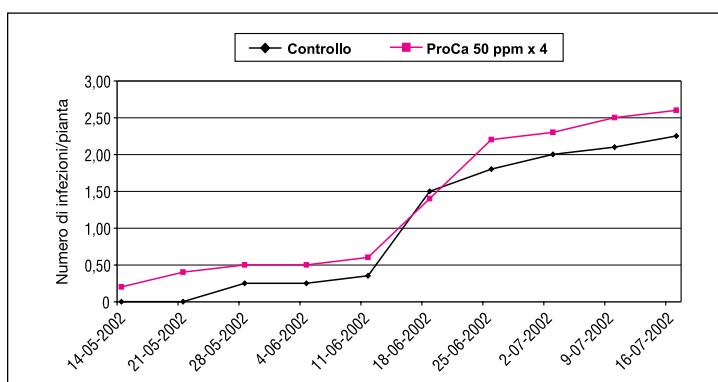


Figura 5 - Cv. Santa Maria: numero di infezioni per pianta

della porzione terminale delle foglie apicali dei vari germogli presenti sulle piante. Nelle prime ore successive all'inoculo si è provveduto a mantenere nella cella una temperatura di circa 25°C ed una elevata umidità (80% di U. R.). Sulla base di indicazioni reperite in bibliografia (Rademacher *et al.*, 1998; Römelt *et al.*, 1999; 2000), il trattamento con prohexadione-Ca ha preceduto di almeno 14 giorni l'inoculo, periodo questo ritenuto necessario alla pianta per sviluppare quelle modifiche nel

metabolismo di difesa (in particolare a carico della biosintesi dei composti fenolici) considerate alla base dell'accresciuta resistenza.

In *tabella 6 a pag. 126* è riportato l'esito di una prova condotta su astoni di Abate Fetel di due anni inoculati con *E. amylovora*, e di seguito monitorati e valutati per i valori di incidenza della malattia e gravità dei sintomi (*severity*). Un trattamento con prohexadione-Ca (250 ppm) effettuato 14 giorni prima dell'inoculo ha consentito di ri-

**Tabella 6** - Cv. Abate Fetel: effetto del prohexadione-Ca (250 ppm) su incidenza e *severity* del colpo di fuoco in seguito ad inoculazione artificiale con *Erwinia amylovora* (adattato da Costa et al., 2001a)

Tesi	Incidenza (%)	Severity (%)	Lunghezza delle necrosi (cm)
Controllo	70.0 a <sup>z</sup>	21.8 a	12.1 a
Prohexadione-Ca	57.9 a	15.1 a	6.5 b

<sup>z</sup>Duncan's multiple range test,  $P \leq 0.05$ .

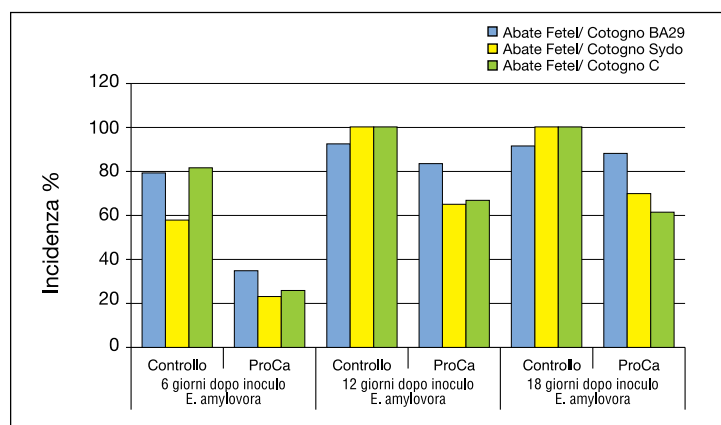
durre sensibilmente (seppure non in maniera statisticamente significativa) la percentuale di incidenza del colpo di fuoco. Evidente è risultata invece la riduzione nello sviluppo delle necrosi, che infatti misuravano in media una lunghezza circa dimezzata rispetto a quelle presenti sulle piante di controllo.

Le potenzialità degli inibitori delle diossigenasi quali induttori di parziale resistenza a patogeni, sono state considerate anche valutando le proprietà di molecole simili al prohexadione-Ca. Nell'esempio riportato in *tabella 7*, l'efficacia del prohexadione-Ca (a 125 o 250 ppm; 15 o 20 giorni prima dell'inoculo) è stata confrontata con quella del trinexapac-ethyl (nome commerciale Moddus; 250 o 500 ppm; 20 o 25 giorni prima dell'inoculo), un altro inibitore delle diossigenasi, la cui sperimentazione è attualmente in corso. I valori riportati per l'incidenza della malattia sui germogli inoculati mettono chiaramente in evidenza come, nelle condizioni in cui la prova si è svolta, entrambe i composti abbiano consentito una rilevante riduzione del numero di germogli inoculati e sintomatici. L'influenza dei trattamenti sugli altri parametri de-

scrittivi della malattia, come la *severity* su foglie o germogli (cioè il rapporto tra la lunghezza della lesione e quella dell'organo considerato), appare invece meno evidente, con valori che raramente si discostano chiaramente da quelli calcolati per le piante di controllo.

Gli studi condotti in condizioni di pieno campo circa la differente suscettibilità al colpo di fuoco batterico da parte delle diverse cultivar di pero, unitamente alla potenziale influenza da parte del portinnesto impiegato, hanno trovato nelle prove con inoculo sperimentale di *E. amylovora* un valido completamento. Una medesima cultivar (Abate Fetel)

innestata su diversi portainnesti (cotogno BA 29; cotogno Sydo e cotogno C) e, viceversa, diverse cultivar (Abate Fetel, "Williams", Santa Maria, Conference) sullo stesso portainnesto (cotogno BA 29) hanno costituito il materiale di base per prove di efficacia fitisanitaria del prohexadione-Ca nei confronti di infezioni artificiali di colpo di fuoco. L'influenza di portainnesti diversi sulla suscettibilità della medesima cultivar appare limitata (*fig. 6*). La cv. Abate Fetel risulta invece sensibilmente influenzata dal precedente trattamento con prohexadione-Ca (250 ppm), in grado infatti di dimezzare l'incidenza della malattia indipenden-



**Figura 6** - Influenza del prohexadione-Ca (250 ppm) sull'incidenza del colpo di fuoco

**Tabella 7** - Cv. Williams: influenza del prohexadione-Ca e del trinexapac-ethyl su incidenza e *severity* del colpo di fuoco; rilievo condotto 9 giorni dopo l'inoculo artificiale con *E. amylovora*

Tesi	Incidenza sui germogli (n. germogli sintomatici /n. germogli inoculati)	Incidenza sui germogli (%)	Severity sui germogli (%)	Severity sulle foglie (scala empirica*)
Controllo	5/6	83,33	63,25	1,00*
ProCa 125 ppm - 15gg.	1/6	16,67	40,00	1,33
ProCa 125 ppm - 20gg.	1/6	16,67	26,67	0,53
ProCa 250 ppm - 15gg.	0/6	0,00	-	2,00
ProCa 250 ppm - 20gg.	0/6	0,00	-	1,11
Treth 250 ppm - 20gg.	1/6	16,67	23,81	1,80
Treth 250 ppm - 25gg.	1/6	16,67	20,83	1,27
Treth 500 ppm - 20gg.	1/6	16,67	31,82	1,13
Treth 500 ppm - 25gg.	1/6	16,67	55,56	0,33

**Scala empirica**

0-1: necrosi indotta dal taglio parziale della lamina fogliare

1-2: alcuni cm lungo la venatura principale

2-3: necrosi lungo metà della lamina fogliare

3-4 necrosi lungo più della metà della necrosi fogliare

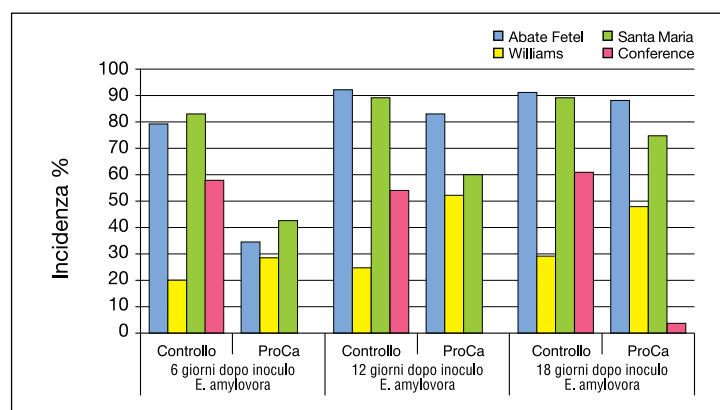
temente dalla combinazione cultivar-portinnesto considerata. Tale effetto è evidente in particolare durante la prima settimana successiva all'inoculo, mentre nei rilievi successivi (12 e 18 giorni dopo l'inoculo) si assiste ad una progressiva scomparsa dell'effetto protettivo indotto dal composto, con valori di incidenza che tendono ad eguagliare quelli riscontrati negli astoni di controllo.

L'esperimento condotto su astoni appartenenti a cultivar differenti innestate su cotogno BA 29, ha invece evidenziato una notevole difformità di comportamento tra le tesi considerate (fig. 7). I due casi estremi sono rappresentati dalla cultivar Conference e dalla cultivar Williams. Nel primo caso il trattamento con l'inibitore delle diossigenasi ha consentito un completo abbattimento nelle percentuali di incidenza del

colpo di fuoco. L'accresciuta tolleranza ad *E. amylovora* appare inoltre stabile e duratura per l'intero corso dell'esperimento (fino a 18 giorni dopo l'inoculo). Viceversa, sulla cv. Williams il trattamento con prohexadione-Ca non sembra aver indotto alcuna reazione di accresciuta resistenza, verificando dei valori di inci-

denza percentuale che sui germogli trattati sono stati addirittura più elevati che non nei germogli di controllo.

I risultati ottenuti dalle prove condotte in serra (con inoculo artificiale di *E. amylovora*) sottolineano, in maniera simile a quanto espresso dalle prove di campo, una certa alternanza nelle indica-



**Figura 7** - Influenza del prohexadione-Ca (250 ppm) sull'incidenza del colpo di fuoco. Portinnesto: cotogno BA29

zioni e negli esiti conclusivi. Le condizioni sperimentali relative sia all'ospite (stadio fisiologico attraversato dalle piante, condizione nutrizionale e sanitaria, ecc.) che al patogeno (virulenza del batterio, ecc.), assieme alle caratteristiche ambientali (come temperatura, umidità, luce, ecc.), influiscono fortemente sull'esito conclusivo del test rendendo spesso incerta la costanza dei risultati e delle conclusioni che da essi si vorrebbero trarre. Ciò non toglie che dalla considerazione dell'insieme delle prove da noi condotte in questi anni, si può comunque constatare un'efficacia (seppure parziale) dell'inibitore delle diossigenasi nell'aumentare la tolleranza della pianta ospite all'infezione. Risultato questo di per sé positivo, ma oltremodo interessante in quanto materia per possibili ulteriori studi di approfondimento e perfezionamento sul meccanismo fisiologico e biochimico alla base degli eventi osservati.

### Considerazioni conclusive

Al termine di un quinquennio di prove sperimentali sull'impiego e sulla validità agronomica e fitosanitaria del prohexadione-Ca su pero, sono di seguito presentate alcune considerazioni riepilogative:

- le numerose prove condotte in pieno campo e in ambienti agronomici differenti (caratteristiche degli impianti, cultivar, portinnesti, ecc.) hanno consentito una ottimizzazione dell'impiego pratico del prohexadione-Ca come composto brachizzante. Si ritiene di poter indicare nei trattamenti ripetuti (almeno quattro a partire dalla caduta petali) a concentrazioni contenute (50 ppm), la modalità d'impiego che meglio ha consentito il controllo dello sviluppo vegetativo delle piante durante l'intero arco della stagione;
- la vigoria della combinazione cultivar-portinnesto appare

come un importante fattore da considerare per un valido controllo dello sviluppo vegetativo delle piante. Numero, epoche dei trattamenti e concentrazioni vanno comunque sempre adeguate all'andamento climatico della stagione in corso;

- l'impiego sperimentale del prohexadione-Ca in contesti agronomici articolati e moderni ha messo in evidenza la necessità di meglio conoscere le possibili (ed inevitabili) interazioni di questo fitoregolatore con altri composti facenti parte della consueta pratica agronomica del pero. In particolare appare importante approfondire le dinamiche di interazione tra il prohexadione-Ca e le gibberelline esogene;

- per quello che riguarda, infine, l'efficacia del prohexadione-Ca per il controllo del colpo di fuoco batterico, certamente non siamo al cospetto di una risposta "definitiva" al problema. Il con-

A  
B  
S  
T  
R  
A  
C  
T

### Evaluation of prohexadione-Ca as fire blight controlling agent

Prohexadione-Ca is a new bioregulator currently under scientific evaluation for its agronomical efficacy and potentiality as fire blight controlling agent. Several experimental trials clearly showed prohexadione-Ca capacity to reduce shoot growth. The results were however very much affected by several aspects, such as: the vigour of the cultivar-rootstock combination, the seasonal climatic condition and the application of other compounds (exogenous gibberellin, for instance). As a general indication, repeated low dosages of prohexadione-Ca during vegetative season allowed the best shoot growth control.

Fire blight control was partially achieved both under natural infection condition (field trials) and after *Erwinia amylovora* controlled inoculation (green house trials). Prohexadione-Ca should be applied at least 10 to 14 days prior to the infection in order to allow the plant to enhance its tolerance towards the pathogen.

In the present paper is reported a summary of the most interesting results that we obtained with prohexadione-Ca on pear during the last five years of experimentation.

trollo della malattia che possiamo ottenere è comunque sempre parziale ed, inoltre, sempre fortemente *funzione* delle più svariate condizioni ambientali nelle quali è possibile operare. Da un approfondimento delle nostre conoscenze relative ai meccanismi fisiologici e biochimici alla base dell'accresciuta resistenza indotta dal prohexadione-Ca, è possibile prevedere lo sviluppo, e successiva disponibilità, di composti e tecniche di lotta al colpo di fuoco ancora più efficaci e risolutivi.

### Bibliografia

- Andreotti C., Costa G., Bucchi F., Sabatini E., Bazzi C., Malaguti E., 2001. *Meccanismi di controllo dello sviluppo vegetativo e del colpo di fuoco batterico nel pero indotti dal prohexadione-Ca*. Giornate Scientifiche SOI, Sirmione, 28-30 Marzo, 477-478
- Bomben C., Vizzotto G., 2000. *Mezzi chimici per il contenimento dello sviluppo vegetativo nel melo*. Giornate Scientifiche SOI, Sirmione, 28-30 Marzo, 537-538
- Bomben C., Vizzotto G., Costa G., 1998. *Controllo della crescita vegetativa nel melo: una nuova molecola, il prohexadione-calcio*. Giornate Scientifiche SOI, Sanremo, 1-3 Aprile, 189-190
- Costa G., Pisani P.L. e Ramina A., 1986. *Il controllo ormonale del ciclo della fruttificazione negli alberi da frutto*. Riv. di Ortoflorofruitticoltura Italiana. 70, 5-23
- Costa G., Andreotti C., Bucchi F., Sabatini E., Bazzi C. e Malaguti S., 2001a. *Prohexadione-Ca (Apogee): growth regulation and reduced fire blight incidence in pear*. Hortscience 36(5), 931-933
- Costa G., Sabatini E., Spinelli F., Andreotti C., Spada G. e Mazzini F., 2001b. *Prohexadione-Ca Controls Vegetative Growth and Cropping Performance in Pear*. 9<sup>th</sup> International Symposium on Bioregulators in Fruit Production, August 19-22, 2001. Seoul, Korea.
- Costa G., Spinelli F., Sabatini E. e Rademacher W., 2001c. *Incidence of Scab (Venturia inaequalis) in Apple as Affected by Different Plant Bioregulators*. 9<sup>th</sup> International Symposium on Bioregulators in Fruit Production, August 19-22, 2001. Seoul, Korea
- Fernando W. D. e Jones A. L., 1999. *Prohexadione calcium – A tool for reducing secondary fire blight infection*. Acta Hort. 489, 597-599
- Kampan W., Halbwirth H., Wurst F. e Stich K., 2000. *Biochemical investigations of apple and pear with respect to the induction of plant resistance against fire blight*. Polyphenols Communications 2000, Freising-Weihenstephan, September 11-15, 2000, pp 619-620
- Momol M. T., Uguine J. L., Norrelli J. L., e Aldwinckle H.S., 1999. *The effect of prohexadione calcium, SAR inducers and calcium on the control of shoot blight caused by Erwinia amylovora on apple*. Acta Hort. 489, 601-606
- Nakayama I., Kamiya Y., Kobayashi M., Abe H., Sakurai A., 1990a. *Effects of plant growth regulator, prohexadione, on the biosynthesis of gibberellins in cell-free systems derived from immature seeds*. Plant Cell Physiol. 31(8), 1183-1190
- Nakayama I., Miyazawa T., Kobayashi M., Kamiya Y., Abe H., Sakurai A., 1990b. *Effects of a new plant growth regulator prohexadione-calcium (BX-112) on shoot elongation caused by exogenously applied gibberellins in rice (Oriza sativa) seedlings*. Plant Cell Physiol. 31(2), 195-200
- Owens C. e Stover E., 1999. *Vegetative growth and flowering of young apple tree in response to prohexadione-calcium*. Hortscience 34(7), 1194-1196
- Rademacher W., 2000. *Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways*. Annual Review of Plant Molecular Biology, Vol.51

- Rademache W., J.B. Speakman, R.R. Evans, J.R. Evans, S. Römmelt, S. Michalek, A. Lux-Endrich, D. Treutter, T. Iturriagagoitia-Bueno and P. John., 1998. *Prohexadione-Ca - a new plant growth regulator for apple with interesting biochemical features*, p. 113-118. In: Proc. Plant Growth Regulat. Soc. Amer. 25<sup>th</sup> Annu. Mtg., LaGrange, Ga.
- Ramina A., Giulivo C. e Costa G., 1981. *Effetti del 2-cloroetil-trimetilammonio cloruro (CCC) sull'accrescimento dei frutti di pesco* (1). P 349-355. In Atti del Congresso su "I fitoregolatori in agricoltura". Firenze, 26-27 Novembre
- Römmelt S., Rademacher W. e Treutter D., 2000. *Changes in phenylpropanoid biosynthesis of apple induced by the dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca and its role in resistance against pathogens*. Polyphenols Communications 2000, Freising-Weihenstephan, September 11-15, pp. 589-590
- Römmelt S., Treutter D., Speakman J.B. e Rademacher W., 1999. *Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight*. Acta Hort. 489, 359-363
- Unrath C.R., 1999. *Prohexadione-Ca: a promising chemical for controlling vegetative growth of apples*. Hortscience 34(7), 1197-1200;
- Yoder K.S., S.S. Miller and R.E. Byers., 1999. *Suppression of fireblight in apple shoots by Prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation*. HortScience 34, 1202-1204.



## RESISTENZA SISTEMICA INDOTTA DA BION (ACIBENZOLAR-S-METILE) IN PERO CV. ABATE FETEL INOCULATO CON *ERWINIA AMYLOVORA*

**F. Sparla, L. Rotino, M.C. Valgimigli, P. Pupillo, P. Trost**

Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna

### Introduzione

*Erwinia amylovora*, agente infettivo del colpo di fuoco batterico, è un batterio gram-negativo che infetta diverse specie di rosacee, tra cui pero, melo e diverse specie ornamentali. L'infezione avviene attraverso naturali vie di accesso all'interno dei fiori, come i nettarii, oppure attraverso ferite, tipicamente provocate dalla grandine. I sintomi del colpo di fuoco consistono in estese necrosi dei tessuti infetti che conseguono alla colonizzazione massiva degli spazi intercellulari del parenchima. All'interno dell'apoplasto, negli ospiti compatibili, il batterio può diffondersi rapidamente e dare origine a infezioni sistemiche. Come conseguenza dell'infezione, nelle parti lignificate della pianta ospite si formano cancri, all'interno dei quali *E. amylovora* può svernare e dare origine, alla ripresa vegetativa, ad una successiva disseminazione in forma di essudato (Eastgate, 2000; e relativa bibliografia).

Attualmente, il controllo chimico di *Erwinia amylovora* si basa prevalentemente sull'utilizzo di composti rameici, che agiscono direttamente sul patogeno, ma hanno efficacia limitata. Inoltre, i trattamenti rameici possono provocare rugginosità sui frutti, soprattutto nelle cultivar a buccia liscia. Un approccio alternativo, e potenzialmente molto interessante, consiste nell'utilizzo di composti che pur non avendo alcun effetto diretto sul patogeno sono in grado di indurre una generale risposta di difesa da parte della pianta, tale da renderla meno suscettibile all'infezione. Tra i composti, fisiologici e non, capaci di indurre questo tipo di resistenza nei vegetali, l'acibenzolar-S-metile, principio attivo del prodotto commerciale Bion (Syngenta), è tra i più intensamente studiati (Sticher *et al.*, 1997). L'acibenzolar-S-metile è un derivato del benzotio-diazolo ed è anche conosciuto con l'acronimo BTH (adottato anche in questo lavoro). In diverse specie erbacee, il BTH

si è dimostrato un efficace induttore di resistenza sistemica acquisita (SAR). La SAR è una complessa risposta fisiologica delle piante, originalmente osservata in seguito a infezione da parte di patogeni necrotizzanti. Dopo la prima infezione, si osservava in queste piante che una successiva infezione, anche a carico di organi diversi, aveva minore successo, suggerendo che la pianta fosse stata in qualche misura immunizzata dal contatto col primo patogeno. Da notare che l'effetto di resistenza si poteva spesso osservare anche se il secondo patogeno era diverso dal primo, indicando che si trattasse di una forma di resistenza orizzontale e non specifica. Stabilito che il fenomeno non aveva nulla in comune con il sistema immunitario animale, solo di recente sono stati compresi alcuni meccanismi cellulari e molecolari che stanno alla base di questo particolare tipo di resistenza.

Nell'interazione tra un ospite e un patogeno necrotizzante, una

delle prime risposte da parte della pianta consiste in genere in una violenta produzione di specie reattive dell'ossigeno. Queste molecole tossiche hanno la duplice funzione di attaccare direttamente il patogeno, e di favorire la distruzione delle cellule limitrofe al sito di infezione, eventualmente con l'innescio del programma di morte cellulare. La morte di alcune cellule è il prezzo pagato dalla pianta per limitare la diffusione del patogeno. Nel caso del pero e di *Erwinia amylovora*, questo è esattamente ciò che accade durante le prime ore successive all'infezione, almeno nel caso in cui il patogeno viene artificialmente inoculato nel tessuto fogliare (Venisse *et al.*, 2001). Tuttavia, nella combinazione *E. amylovora*-pero, lo scoppio ossidativo non è fatale nei confronti del batterio. In condizioni favorevoli, all'infezione da parte di *Erwinia* succede rapidamente la colonizzazione dei tessuti, con conseguenze nefaste per l'ospite.

Una conseguenza dello scoppio ossidativo provocato dall'interazione pianta-patogeno è la produzione di acido salicilico (SA), che svolge all'interno della pianta importanti funzioni di messaggero (Mauch-Mani e Métraux, 1998). Alti livelli di SA influenzano indirettamente l'espressione di determinati geni che codificano per proteine correlate alla patogenesi (PR). Si tratta di proteine che normalmente sono poco presenti o del tutto assenti nei tessuti vegetali, ma che in

condizioni di stress da patogeno si accumulano in grande quantità (Van Loon e Van Strein, 1999).

Nella sua attuale concezione, la SAR è una forma di resistenza sistemica acquisita associata all'accumulo di acido salicilico e all'espressione di un gruppo di geni che codificano per proteine correlate alla patogenesi. La SAR è per sua natura efficace contro patogeni diversi (ma raramente riduce a zero l'incidenza di un singolo patogeno) e di norma si mantiene per periodi successivi all'evento induttivo.

Il BTH agisce nella pianta allo stesso livello o immediatamente a valle dell'acido salicilico e ne ricalca fedelmente gli effetti, con il vantaggio di non essere fitotossico. Per questi motivi il BTH è il più usato e conosciuto tra i composti capaci di indurre la SAR.

In questo lavoro noi abbiamo testato su piantine micropropagate di pero cv. Abate Fetel la capacità del BTH di indurre uno stato di minore suscettibilità all'infezione artificiale di *Erwinia amylovora*. Inoltre abbiamo studiato la capacità del BTH di agire in modo sistemico e l'effetto del BTH sulla sopravvivenza a lungo termine del patogeno all'interno di piante asintomatiche. Per capire se lo stato di minore suscettibilità ad *Erwinia amylovora* indotto dal BTH potesse dipendere dall'instaurarsi della SAR, abbiamo infine studiato l'espressione di un gene marker che codifica per la proteina correlata alla patogenesi PR-1.

## Materiali e metodi

### Materiale biologico

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su piantine di pero cv. Abate Fetel, di 2 anni di età, ottenute per micropropagazione presso l'azienda Vitroplant di Cesena. Le piante sono state allevate in terriccio in vasi da 1 litro. Prima di ogni esperimento le piante sono state acclimatate per almeno due settimane alle condizioni di temperatura e umidità della serra (25 °C, 70% UR). Tutti gli esperimenti sono stati condotti nella serra del Servizio Fitosanitario della Regione Emilia Romagna, nei mesi di giugno, luglio e agosto (anni 2000 e 2001). Le condizioni di illuminazione e fotoperiodo sono state naturali.

Le inoculazioni sono state eseguite con il ceppo 1077/7 di *Erwinia amylovora*, originariamente isolato e fornito dal Prof. Mazucchi. I batteri sono stati cresciuti su agar (15 g l<sup>-1</sup>) contenente Bacto nutrient broth (8 g l<sup>-1</sup>), saccarosio (50 g l<sup>-1</sup>), pH 7.0 (Nutrient sucrose agar, NSA). Le sospensioni batteriche alla concentrazione di 10<sup>8</sup> cellule ml<sup>-1</sup> sono state prepa-

### Abbreviazioni

**BTH**, estere S-metilico dell'acido 1,2,3-benzotriazololo-7-carbotioico, o acibenzolar-S-metile

**PR**, proteine correlate alla patogenesi

**SA**, acido salicilico

**SAR**, resistenza sistemica acquisita

rate in acqua sterile prima dell'inoculazione. L'inoculo, 10 µl di sospensione batterica, veniva iniettato nella gemma apicale mediante microsiringa.

### Trattamenti con acido salicilico e BTH

L'acido salicilico è stato utilizzato alla concentrazione di 10 mM, in una soluzione di 50 mM K-fosfato, 0,02% triton X-100, pH 7,5. Il BTH, fornito da Syngenta Italia, è stato utilizzato in forma di granuli sospensibili in acqua al 50% di principio attivo (acibenzolar-S-metile CGA 245704). Le sospensioni di BTH contenevano 200 mg l<sup>-1</sup> p.a. nello stesso tampone utilizzato per l'acido salicilico. Di norma i trattamenti sono stati eseguiti irrorando l'intera chioma, ma in alcuni casi sono state trattate solo le foglie basali, mentre la parte apicale della chioma era protetta da un apposito schermo.

### Valutazione dei sintomi di colpo di fuoco batterico

Lo sviluppo dei sintomi del colpo di fuoco batterico (necrosi a livello di foglia, picciolo e fusto) è stato monitorato a partire da 15 giorni dopo l'inoculazione. La gravità dei sintomi è stata valutata da due osservatori indipendenti e classificata sulla base di 3 categorie:

- assenza di sintomi (valore 0);
- necrosi limitate al sito di infezione e ai tessuti immediatamente circostanti (valore 1);
- necrosi estese (valore 2).

L'incidenza è stata calcolata

come percentuale delle piante sintomatiche rispetto al totale della piante inoculate.

### Analisi statistiche

La comparazione tra i valori medi è stata eseguita mediante test di Duncan con soglia di significatività del 5%.

### Analisi della presenza di cellule vitali di *Erwinia amylovora* mediante PCR

Segmenti di fusto di 1 cm, immediatamente al di sotto della gemma apicale, sono stati prelevati da piante che 6 mesi prima erano state trattate con BTH e inoculate con *Erwinia amylovora* 10 giorni dopo. Queste piante, che rappresentavano una piccola porzione di piante sopravvissute nel lungo periodo agli esperimenti di inoculazione, presentavano necrosi limitate o erano asintomatiche. I segmenti di tessuto, che comprendevano sia le parti necrotiche (se presenti) sia le parti sane, sono stati macinati in acqua sterile, chiarificati mediante centrifugazione, e la sospensione risultante è stata messa in coltura su piastre di agar contenente terreno NSA per 24 ore a 30 °C. Le colonie batteriche con aspetto tipico (colore biancastro, forma a cupola) sono state prelevate e risospese in acqua sterile per le reazioni di PCR. I primer utilizzati, specifici per il plasmide pEA29 di *Erwinia amylovora*, sono stati seguenti:

- pEA29L: 5'-CGGTTTT-TAACGCTGGG-3';
- pEA29R: 5'-GGGCAA-

TACTCGGATT-3' (Bareswill *et al.*, 1992).

Le reazioni di PCR sono state preparate in un volume totale di 50 µl contenenti i primer (0,4 µM) e il DNA derivante da 10<sup>5</sup> cellule, estratto mediante lisi a 100 °C per 10 minuti. La sequenza dei cicli è stata la seguente:

- 2 cicli a 93°C per 2 minuti, 49°C per 2 minuti, 72 °C per 2 minuti;
- 35 cicli a 93°C per 1 minuto, 49 °C per 2 minuti, 72°C per 2 minuti;
- 1 ciclo a 72°C per 7 minuti.

I prodotti delle reazioni di PCR sono stati quindi caricati su gel di agarosio, sottoposti ad elettroforesi ed evidenziati con colorazione al bromuro di etidio. Per confronto, in ogni gel è stato caricato anche un prodotto di PCR ottenuto con gli stessi primer in presenza di *Erwinia amylovora* ceppo 1077/7.

### Estrazione dell'RNA totale ed esperimenti ibridazione con sonde di cDNA (Northern blotting)

L'RNA totale è stato estratto con il metodo di Nawrath and Métraux (1999), opportunamente modificato per adattarlo al particolare tipo di materiale rappresentato dalle foglie di pero. L'RNA è stato precipitato per 12 ore a 4 °C con 3M LiCl, lavato due volte con etanolo 70% e risospeso in 50 mM Tris-Cl, pH 7,6, 25 mM acido borico, 100 mM NaCl. Gli zuccheri contaminanti sono stati precipitati con 0,4 volumi di etilenglicole, la-

**Tabella 1** - Effetto di protezione dell'acido salicilico su pero inoculato con *Erwinia amylovora*. Piantine di due anni (*Pyrus communis* cv. Abate Fétel) sono state trattate con SA (10 mM), 24 o 48 ore prima che il patogeno fosse inoculato attraverso iniezione nella gemma apicale. I sintomi sono stati valutati, sia in termini di gravità che di incidenza, due settimane dopo l'inoculazione (vedi Materiali e Metodi).

Trattamento	Incidenza (%)	Gravità (% rispetto al controllo)
Controllo	79 ± 14 (a)	100 ± 14 (a)
24 h SA	55 ± 5 (a)	62 ± 4 (b)
48 h SA	73 ± 15 (a)	81 ± 18 (ab)

Gli esperimenti sono stati condotti su 3 gruppi di 10 piante per ogni tesi. I risultati sono espressi come medie ± deviazioni standard. Il confronto tra le medie è stato effettuato mediante il test di Duncan al livello di significatività di 0.05. Le differenze statisticamente significative sono indicate da lettere diverse.

sciando i campioni in ghiaccio per 30 minuti prima di centrifugare (10,000 g per 20 min a 4°C). L'RNA è stato precipitato con 0,6 volumi di etilenglicole, lavato due volte con 70% etanolo e risospeso in acqua.

Aliquote corrispondenti a 5 µg di RNA sono state separate su gel di formaldeide/agarosio, colorate con bromuro di etidio e trasferite su membrane di nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham) per gli esperimenti di ibridazione con le sonde di cDNA della PR-1 e dell'rRNA 18S di pero.

#### Clonaggio delle sonde

I frammenti di cDNA codificanti per la PR-1 e l'rRNA 18S di pero sono stati ottenuti mediante RT-PCR, con l'utilizzo di primer appositamente concepiti sulla base delle sequenze della PR-1 di *Pyrus pyrifolia* e dell'rRNA 18S di *Pyrus communis* disponibili in banca dati:

- PR-1 - *left*: 5'-ACAACAC-CGCTCGAGCAG-3'; *right*: 5'-AGTTACGCCAAAC-CACCTG-3';

- rRNA 18S - *left*: 5'-ATAAC-CGTAGTAATTCTAGAG-3'; *right*: 5'-TTGAGACTAGGACG-GTATC-3'.

#### Risultati

Piante di pero di due anni (*Pyrus communis* cv. Abate Fétel, ottenute per micropropagazione) sono state trattate mediante irrorazione dell'intera chioma con una soluzione tamponata di acido salicilico (10 mM). In queste condizioni, l'acido salicilico non si è dimostrato tossico per le foglie. Uno o due giorni dopo il trattamento, un milione di cellule vitali di *E. amylovora* sono state inoculate mediante iniezione nella gemma apicale. Due settimane dopo è stata valutata la comparsa dei sintomi tipici del colpo di fuoco batterico.

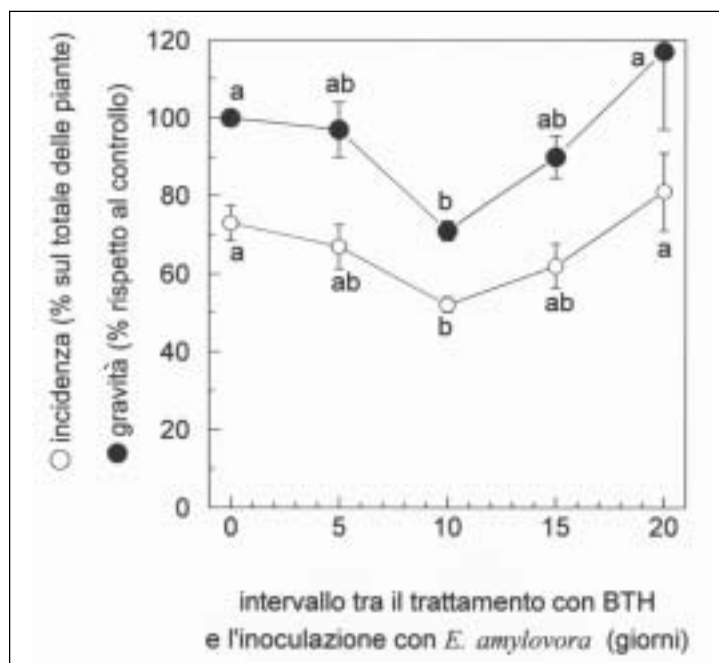
Come riportato in *tabella 1*, il 79% delle piante di controllo mostrava chiari sintomi della malattia, ma questo valore era inferiore del 30% nelle piante trattate con SA 24 ore prima dell'inoculazione. Viceversa, nel-

le piante trattate 48 ore prima dell'inoculazione l'incidenza era paragonabile al controllo. Un andamento analogo è stato osservato valutando i sintomi in termini di gravità (*tab. 1*).

Gli esperimenti con l'acido salicilico avevano un carattere preliminare, ma i dati parzialmente positivi ci hanno indotto a testare il BTH, che rispetto all'acido salicilico è più persistente e meno fitotossico. A questo scopo, più di 500 piante sono state impiegate in esperimenti diversi in cui il BTH, alla concentrazione di 200 mg/l p.a., veniva somministrato da 5 a 20 giorni prima dell'inoculazione con *Erwinia amylovora*. Esperimenti precedenti avevano già indicato che la concentrazione di 200 mg/l p.a. era ottimale e che tempi di incubazione più brevi di 5 giorni non avevano efficacia. La *figura 1* riassume i risultati della sperimentazione: il BTH, se somministrato 10 giorni prima dell'inoculazione, determina una protezione significativa (-30%), sia in termini di minore incidenza che di minore gravità. La protezione assume valori minori e non significativi se il trattamento precede l'inoculazione di soli 5 giorni, o viceversa la precede di 15 o 20 giorni.

Negli esperimenti in cui il trattamento interessava solo le foglie basali, con inoculazione che veniva comunque effettuata a livello della gemma apicale, i risultati erano simili, ma in questo caso anche il trattamento a 15 giorni aveva una significativa, seppur parziale, efficacia (*fig. 2 pag. 136*).

Si osserva quindi che il BTH ha una certa capacità di indurre in giovani piante di pero, nell'arco di circa 10 giorni, uno stato di minore suscettibilità ad *Erwinia amylovora* inoculata artificialmente, e che l'effetto promosso dal BTH si propaga in modo sistemico all'interno della pianta. Nel valutare questi risultati, è opportuno sottolineare che la procedura di inoculazione utilizzata si è rivelata molto efficace, tale da garantire la comparsa dei sintomi del colpo di fuoco in circa 80% delle piante di controllo a partire dalle due settimane successive all'infezione. Nei periodi successivi, i sintomi tendevano ad aggravarsi anche in piante trattate con BTH, rendendo meno evidenti le differenze tra controlli e trattati. Si poneva quindi il problema di capire in cosa consistesse l'effetto del BTH, da noi registrato come minore comparsa dei sintomi nelle due settimane successive all'infezione. A questo scopo, abbiamo determinato la presenza di cellule vitali di *Erwinia amylovora* nei tessuti di piante trattate con BTH che erano sopravvissute fino a 6 mesi dopo l'inoculazione. Un gruppo di 46 piante con queste caratteristiche è stato analizzato mediante PCR diagnostica. Di queste, 13 (28%) contenevano cellule vitali del patogeno, nonostante in alcuni casi fossero del tutto asintomatiche. Si pone quindi la possibilità che *Erwinia amylovora* possa condurre una vita latente all'interno dell'ospite, in particolare in individui sopravvissuti all'infe-

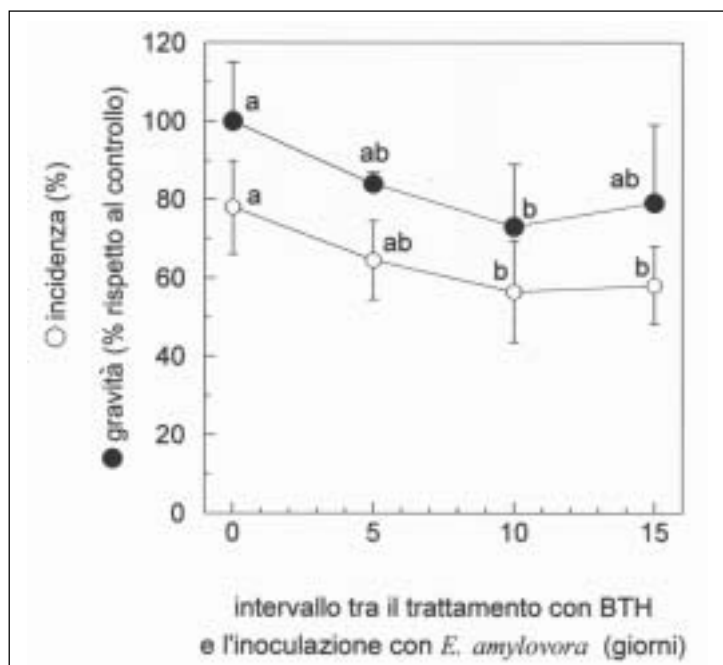


**Figura 1** - Effetto di protezione del BTH su pero inoculato con *Erwinia amylovora*. Piantine micropropagate di 2 anni (*Pyrus communis* cv. Abate Fetel) sono state trattate con BTH (200 mg<sup>l</sup> p.a.) in tempi diversi rispetto alla successiva inoculazione del patogeno mediante iniezione nella gemma apicale. Il trattamento con BTH ha riguardato l'intera chioma della piantine. Due settimane dopo l'inoculazione, i sintomi sono stati monitorati sia in termini di incidenza che di gravità (vedi Materiali e Metodi). Questo esperimento è stato ripetuto due volte con 60 piante per ogni tesi. I risultati presentati corrispondono alla medie con SD dei due esperimenti. Il confronto tra le medie è stato effettuato con il Test di Duncan al livello di significatività di 0,05. Nel grafico, lettere diverse indicano medie significativamente differenti.

zione grazie al trattamento con il BTH.

La capacità del BTH di contenere lo sviluppo di *E. amylovora* nel pero, insieme ai dati di letteratura relativi ad altre combinazioni ospite/patogeno, suggeriscono che il BTH sia in grado di indurre in pero una condizione di resistenza sistemica acquisita (SAR). Per verificare questa ipotesi, abbiamo studiato

l'espressione di un gene correlato alla patogenesi (*PR-1*), marcatore della SAR. Un frammento di cDNA di *PR-1* di *Pyrus communis* è stato quindi clonato mediante RT-PCR e utilizzato come sonda per esperimenti di ibridazione. L'RNA totale è stato estratto a tempi diversi da foglie di piante trattate e non (sia con BTH che con SA). L'RNA è stato anche estratto sia da foglie



**Figura 2** - Effetto sistemico del BTH in pero inoculato con *Erwinia amylovora*. Le condizioni sperimentali sono le stesse rispetto all'esperimento di figura 1, eccetto per il BTH che in questo caso è stato somministrato solo alle foglie basali (il resto della chioma era protetto da un schermo durante il trattamento). L'inoculazione è stata fatta regolarmente nella gemma apicale. La registrazione dei sintomi è stata fatta 2 settimane dopo l'inoculazione. L'esperimento è stato fatto su 4 gruppi di 12 piante l'uno per ogni tesi. I risultati sono espressi in forma di media $\pm$ SD. Le eventuali differenze significative determinate dal Test di Duncan con  $P=0,05$  sono evidenziate da lettere diverse a fianco dei punti.

di piante sane che inoculate. Mediante esperimenti di ibridazione è stato possibile valutare i livelli di RNA messaggero per la PR-1, e quindi l'attività del relativo gene. I risultati (si veda in figura 3 un esempio rappresentativo) indicano un'attività rilevabile e costante del gene per la PR-1, non influenzata dai trattamenti né dall'inoculazione del batterio. Le misure di espressione del gene marker PR-1 in pero

non supportano quindi l'ipotesi che l'effetto del BTH sullo sviluppo di *E. amylovora* in questa specie sia mediato da una classica risposta di tipo SAR.

### Discussione

I fenomeni di resistenza indotta contribuiscono alla naturale protezione delle piante nei confronti dei patogeni. Nell'ambito di questa classe di resistenze, la SAR è

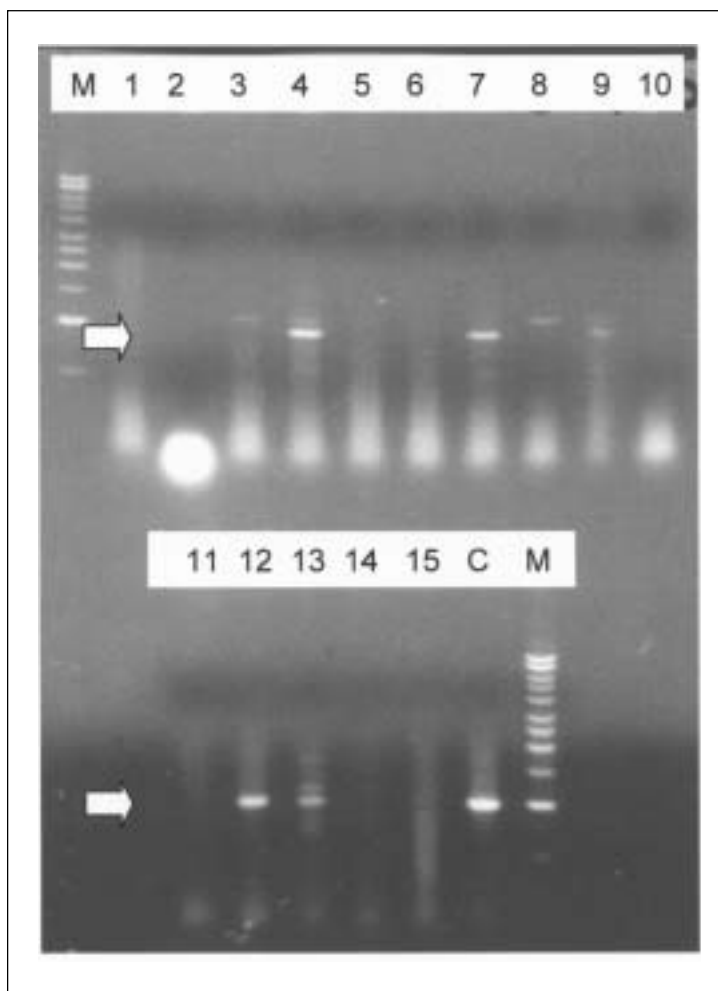
probabilmente la meglio conosciuta e caratterizzata, e molti dei geni e delle proteine coinvolte nel fenomeno sono ora conosciuti (Sticher *et al.*, 1997). Il derivato benzotriazolico acibenzolar-S-metile (CGA 245704, Syngenta; BTH in questo lavoro) induce in grano e in tabacco una classica risposta di tipo SAR, efficace nei confronti di patogeni diversi. In questi e in altri casi, si è osservato che l'instaurarsi della SAR si accompagna ad un incremento di attività di un particolare set di geni. Tra questi sono compresi diversi geni che codificano per proteine correlate alla patogenesi, come la PR-1 (Görlach *et al.*, 1996; Friedrich *et al.*, 1996). Nella cascata di trasmissione del segnale che porta alla SAR, il BTH agisce allo stesso livello, o immediatamente a valle dell'acido salicilico, il più importante segnale fisiologico coinvolto nella SAR.

Gli studi di questo genere condotti su piante arboree sono ancora poco numerosi. Recenti acquisizioni tuttavia concordano nel suggerire che la SAR sia una prerogativa anche della piante arboree. Recentemente è stato per esempio riportato che il BTH protegge il melo dall'infezione di *E. amylovora*. Nel caso della cv. Jonathan, trattamenti ripetuti alla concentrazione di 75 mg $l^{-1}$  p.a. hanno protetto significativamente le piante dalle infezioni naturali di *Erwinia*, e in semenzali di Fuji, il BTH ha ridotto l'estensione dei cancri corticali provocati dal batterio inoculato artificialmente (Maxson-

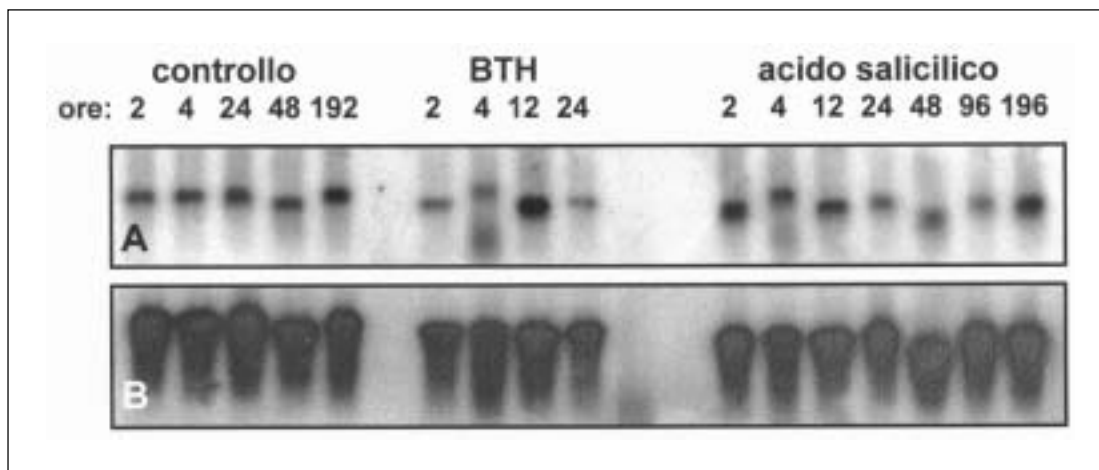
Stein *et al.*, 2002). In un'altra prova, il BTH si è rivelato efficace su semenzali, astoni e piante mature di Golden Delicious, con protezioni massime del 75% nel caso dei semenzali (Brisset *et al.*, 2000). In questi esperimenti condotti su melo, l'effetto del BTH era anche associato alla sovraespressione di alcuni geni che codificano per proteine correlate alla patogenesi, tra queste compresa la PR-1.

Su pero i dati sono ancora meno abbondanti. È stato tuttavia riportato l'effetto del BTH su pero giapponese (*Pyrus pyrifolia*), reso meno suscettibile ad alcune malattie fungine (Ishii *et al.*, 1999). Siccome non si è osservato alcun effetto diretto del composto sui patogeni, l'ipotesi avanzata è stata che il BTH sia un induttore della SAR nel pero giapponese, e che la SAR agisca sfavorevolmente sullo sviluppo dei patogeni considerati.

Noi abbiamo osservato che il BTH, se fornito alle piante di *Pyrus communis* 10 giorni prima dell'inoculo di *Erwinia amylovora*, determina una significativa seppure parziale protezione. L'effetto è sistemico e il BTH potrebbe avere nel pero lo stesso ruolo dell'acido salicilico, il messaggero fisiologico della SAR. A causa delle diverse condizioni sperimentali adottate, non è possibile comparare rigorosamente i risultati da noi ottenuti su pero, con quelli ottenuti da altri gruppi su melo, ma l'impressione generale è che il BTH abbia su melo un'efficacia maggiore. Siccome non abbiamo os-



**Figura 3** - Determinazione di *E. amylovora* mediante PCR. Per i dettagli sperimentali si veda la sezione Materiali e Metodi. I segmenti di tessuto di fusto sono stati prelevati da piantine che 6 mesi prima erano state trattate con BTH e successivamente inoculate con *E. amylovora*. Il prelievo è stato fatto solo su piante che erano sopravvissute per 6 mesi dopo l'inoculazione, e che non presentavano sintomi particolarmente evidenti (in alcuni casi erano asintomatiche). La figura mostra un tipico gel di agarosio dei prodotti di PCR ottenuti da colonie batteriche derivanti da 15 piante con le suddette caratteristiche. In questo esempio, 5 piante contenevano cellule vitali di *E. amylovora* (corsie 4,7,9,12,13). La freccia indica la posizione del frammento amplificato (0,9 kb). Nelle corsie indicate con la lettera M sono stati caricati dei marcatori di DNA (DNA ladder 1 kb, Sigma). Nella corsia C è stato caricato il prodotto di una reazione di controllo in lo stampo era rappresentato dal ceppo 1077/7 di *E. amylovora*.



**Figura 4** - Espressione del gene *PR-1*. Questo esperimento di ibridazione (*Northern blotting*) mostra la presenza di RNA messaggero per una isoforma di *PR-1* in funzione di trattamenti a tempi diversi con BTH (200 mg/l p.a.) o SA (10 mM), in piante successivamente inoculate con *E. amylovora*. A: ibridazione su membrana con sonda marcata per la *PR-1*. B: come nel settore A, ma per controllo la sonda per la *PR-1* è stata sostituita dalla sonda corrispondente all'RNA ribosomiale 18S

servato alcuna alterazione nell'espressione di uno dei principali marker della SAR noi non possiamo concludere che l'effetto del BTH sullo sviluppo del patogeno sia ascrivibile ad una condizione di tipo SAR. Tuttavia dobbiamo ricordare che a tutt'oggi si conoscono 14 famiglie diverse di proteine correlate alla patogenesi e che molte di queste famiglie comprendono numerosi membri al loro interno. (Van Loon and Van Strien, 1999). È possibile che in pero la *PR-1* che noi abbiamo clonato non sia rappresentativa della SAR, e non è escluso che altre proteine di tipo PR siano comunque sovraespresse per partecipare alla resistenza da noi osservata.

### Conclusioni

La protezione garantita dal BTH in pero infetto da *Erwinia amylovora* è risultata nei nostri esperimenti quantitativamente limitata, ma l'efficacia del composto deve essere giudicata in relazione alle condizioni di inoculazione particolarmente pesante che sono state adottate. Non possiamo escludere che nel caso di infezioni naturali, il BTH possa conferire livelli di protezione superiori. Tuttavia occorre sottolineare che in un numero significativo di casi, noi abbiamo evidenziato la presenza di cellule vitali di *Erwinia amylovora* in piante di pero asintomatiche. Queste piante erano so-

pravvissute per mesi successivi all'infezione grazie al trattamento preventivo con BTH, e nella maggior parte dei casi non presentavano sintomi evidenti di malattia.

È necessario che questa preoccupante potenzialità del BTH di indurre in pero la capacità di ospitare *Erwinia amylovora* in forma latente sia opportunamente valutata nel corso di studi futuri.

*Ringraziamo il Prof. Mazzucchi per averci fornito il ceppo 1077/7 di Erwinia amylovora nonché utili consigli su vari aspetti di questo lavoro. Ringraziamo il Prof. Bazzi per le utili*



### T C A R T S B A Systemic resistance induced by Bion (acibenzolar-S-methyl) in pear cv. Abate Fetel inoculated with *Erwinia amylovora*

The benzothiazole derivative acibenzolar-S-methyl (BTH; Bion, Syngenta), a well known chemical inducer of systemic acquired resistance (SAR), has been tested for its activity in the protection of pear (*Pyrus communis* cv. Abate Fetel) from fire blight caused by the artificial inoculation of *Erwinia amylovora*. Two-year-old pear plants sprayed with BTH 10 days before inoculation were partially protected from fire blight, both in terms of incidence and severity (-30%). The effect of BTH proved to be systemic. However, a significant portion (28%) of BTH-treated plants showing little or no symptoms 6 months after inoculation still harboured viable *Erwinia amylovora* cells, as judged by PCR-based detection. Salicylic acid, known to be physiologically implicated in the onset of SAR, gave a similar protection as BTH when sprayed 24 h before inoculation.

In several plants species systemic acquired resistance has been shown to correlate with the overexpression of a defined set of genes coding for pathogenesis-related proteins (PR). However, the expression of a member of the PR-1 family in pear plants treated with BTH and salicylic acid and successively inoculated with *Erwinia amylovora* was found to be constitutive and unaffected by treatments. These results therefore suggest that molecules other than this typical SAR marker may be implicated in the BTH-induced systemic resistance of pear against *Erwinia amylovora*.

indicazioni sulla determinazione di *E. amylovora* per PCR. Il Servizio Fitosanitario Regionale ha contribuito con la messa a disposizione delle serre.

#### Bibliografia

Bareswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K., (1992) *Sensitive and species-specific detection of Erwinia amylovora by polymerase chain reaction analysis*. Applied Environmental Microbiology 58, 3522-3526

Brisset M-N., Cesbron S., Thomson SV., Paulin J-P., (2000) *Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight*. Europe-

an Journal of Plant Pathology 106, 529-536

Eastgate JA., (2000) *Erwinia amylovora: the molecular basis of fireblight disease*. Molecular Plant Pathology 1, 325-329

Friedrich L., Lawton K., Ruess W., Masner P., Specker N., Gut Rella M., Meier B., Dincher S., Staub T., Uknes S., Métraux J-P., Kessmann H., Ryals J., (1996) *A benzothiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco*. The Plant Journal 10, 61-70

Görlach J., Volrath S., Knauf-Beiter G., Hengy G., Beckhove U., Kogel K-H., Oostendorp M., Staub T., Wrad E., Kessmann

H., Ryals J., (1996) *Benzothiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat*. Plant Cell 8, 629-643

Ishii H., Tomita Y., Horio T., Narusaka Y., Nakazawa Y., Nishimura K., Iwamoto S., (1999) *Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA245704) to cucumber and Japanese pear diseases*. European Journal of Plant Pathology 105, 77-85

Mauch-Mani B., Métraux J-P., (1998) *Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack*. Annals of Botany 82, 535-540

- Maxson-Stein K., He S-Y., Hammerschmidt R., Jones AL., (2002) *Effect of treating apple trees with acibenzolar-S-methyl on fire blight and expression of pathogenesis-related protein genes*. Plant Disease 86, 785-790
- Nawrath C., Métraux J-P., (1999) *Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation*. Plant Cell 11, 1393-1404
- Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J-P., (1997) *Systemic acquired resistance*. Annual Review of Phytopathology 35, 235-270
- Van Loon IC. and Van Strein EA., (1999) *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins*. Physiological Molecular Plant Pathology 55, 85-97

## INDICE

<b>Prefazione</b>	pag.	3
<b>Presentazione</b> (G. AGAROSS)	pag.	5
<b>La frutticoltura in Emilia-Romagna dopo il colpo di fuoco batterico</b> (I. PONTI, A. CALZOLARI, F. FINELLI)	pag.	7

### INNOVAZIONE VARIETALE

<b>Miglioramento genetico del pero per la resistenza ad <i>Erwinia amylovora</i></b> (L. RIVALTA, M. BERGAMASCHI, S. SIRRI)	pag.	13
<b>Qualità dei frutti di cultivar e selezioni resistenti al colpo di fuoco batterico</b> (S. PREDIERI, E. GATTI, F. RAPPARINI, G. BERTAZZA, M. GOVONI)	pag.	23

### EPIDEMIOLOGIA

<b>Variabilità genomica di ceppi di <i>Erwinia amylovora</i> associati a infezioni su piante ospiti diverse</b> (P. MINARDI, M. MORBIO, U. MAZZUCCHI)	pag.	37
<b>Tempi di sopravvivenza di <i>Erwinia amylovora</i> sui frutti e sui loro contenitori nel periodo post-raccolta</b> (P. CERONI, V. BABINI, F. TRAVERSA, U. MAZZUCCHI, P. MINARDI)	pag.	45
<b>Sopravvivenza endofita di <i>Erwinia amylovora</i> in astoni di pero asintomatici</b> (F. TRAVERSA, M. MORBIO, S. MUCINI, U. MAZZUCCHI)	pag.	53
<b><i>Erwinia amylovora</i> e api: sopravvivenza nell'alveare e disseminazione</b> (A.G. SABATINI, E. CARPANA, M. ALEXANDROVA, C. PORRINI, C. BAZZI)	pag.	61
<b>Rilevazione di <i>Erwinia amylovora</i> nell'ambiente mediante api</b> (S. GHINI, S. GIROTTI, F. BARONI, G. CELLI, C. BAZZI, C. PORRINI, A. CALZOLARI, M. MUSIANI, A.G. SABATINI)	pag.	69

## INDIRIZZI DI DIFESA

- Aspetti della lotta chimica al colpo di fuoco batterico del pero*** pag. 85  
(C. BAZZI, G. SPONZA, A. BRUNELLI, P. GIANATI)
- Batteri antagonisti: prospettive di lotta biologica al colpo di fuoco batterico*** pag. 97  
(C. BAZZI, F. RAMILLI, E. BIONDI, G. SPONZA)
- Approcci agronomici per ridurre la suscettibilità del pero al colpo di fuoco batterico*** pag. 107  
(M. TOSELLI, D. MALAGUTI, E. BALDI, A. LUCCHI, G. SORRENTI,  
B. MARANGONI, C. BAZZI, G. SPONZA)
- Controllo del colpo di fuoco batterico del pero mediante l'impiego del prohexadione-Ca: alcune indicazioni sperimentali*** pag. 119  
(C. ANDREOTTI, E. SABATINI, F. SPINELLI, G. COSTA)
- Resistenza sistemica indotta da Bion (acibenzolar-s-metile) in pero cv. Abate Fetel inoculato con Erwinia amylovora*** pag. 131  
(F. SPARLA, L. ROTINO, M.C. VALGIMIGLI, P. PUPILLO, P. TROST)

## IL SITO CRPV

[www.crpv.it](http://www.crpv.it): Informazioni e Servizi on-line



### La struttura

Il Sito è articolato in specifiche Sezioni e servizi dedicati alle numerose attività condotte dal Crpv. Accanto ad una sintetica descrizione dell'Ente e della sua componente associativa, sono infatti disponibili e costantemente aggiornati gli appuntamenti alle manifestazioni organizzate dal Crpv e le informazioni relative ai risultati delle attività di ricerca, sperimentazione e diffusione coordinate dal Crpv.



### Sperimentazione vegetale in Emilia-Romagna

In questa Sezione, accanto ad una breve descrizione delle Aziende Sperimentali operanti sul territorio regionale, vengono presentati i risultati delle prove sperimentali condotte secondo protocolli comuni. Per ciascuna specie oggetto di sperimentazione e per ogni anno di attività, sono state realizzate una serie di pagine che consentono la visualizzazione dei risultati secondo livelli successivi di approfondimento e dettaglio, fino ad arrivare alla consultazione dei dati rilevati presso i singoli campi sperimentali.



### Vitivinicoltura

In questa Sezione sono raccolte tutte le informazioni che riguardano la vite e il vino. Lo strumento proposto consente di accedere a molte delle informazioni che è necessario conoscere e che riguardano non solo gli aspetti agronomici e fitosanitari ma anche legislativi e tecnologici, presupposto fondamentale per una vitivinicoltura di qualità. La Sezione per rispondere appieno a queste molteplici esigenze è stata così strutturata: Ricerca e sperimentazione, Documentazione, L'esperto risponde, Legislazione, Disciplinari di produzione integrata e Lieviti.

### L'evoluzione

La nuova versione di [www.crpv.it](http://www.crpv.it) avrà l'aspetto e le funzionalità di un Portale Web, dove verranno integrati nuovi servizi così da migliorare la fruibilità da parte degli utenti, con i quali si vuole creare un rapporto ancora più stretto. Ciascun utente avrà la possibilità di personalizzare i contenuti in base al proprio profilo, che verrà gestito e mantenuto in costante aggiornamento sulle pagine di Crpv.it. Grazie ad un servizio di mailing list, gli utenti potranno ricevere notizie personalizzate in base all'area di interesse prescelta e memorizzata nel proprio profilo. Verrà introdotto un motore di ricerca, accessibile da ciascuna pagina di Crpv.it, che renderà più facile il reperimento delle informazioni; sarà inoltre possibile per l'utente personalizzare il formato con cui verranno proposti i risultati della ricerca.

## ARCHIVIO VARIETA' FRUTTICOLE

### La nuova Banca Dati delle Varietà Frutticole



Dal costante confronto tecnico fra gli sperimentatori delle Aziende: Cisa Mario Neri di Imola, Marani di Ravenna, Martorano 5 di Cesena e Terre Naldi di Faenza, e le strutture di ricerca vivaistiche e produttive dell'Emilia-Romagna e non, sono scaturiti gli elementi che consentono di stilare un ben determinato profilo sul comportamento vegeto-produttivo delle varietà. L'Archivio Varietà Frutticole contiene infatti informazioni sulle caratteristiche della pianta e del frutto (compresi alcuni dati qualitativi di laboratorio), integrate da un giudizio agronomico riassuntivo, fornisce inoltre informazioni sull'origine genetica e geografica delle cultivar, su eventuali protezioni brevettuali e sulla loro disponibilità nell'ambito del circuito della certificazione genetico-sanitaria.

#### Le prime 200 varietà per pesco, pero, melo e albicocco

Nella Banca Dati Varietale sono archiviate in modo relazionale le informazioni relative alle varietà per le quali le attività sperimentali, coordinate dal Crpv e condotte dalle Aziende Sperimentali Regionali, consentono di stilare un profilo oggettivo definitivo.



La strutturazione del database, alimentato direttamente dai tecnici sperimentatori, consente all'utente di costruire tabelle riassuntive personalizzate (schede pomologiche) ma soprattutto di condurre ricerche semplici (nome, tipologia, costitutore, concessionario, epoca di fioritura, epoca di maturazione, pezzatura prevalente, parametri analitici, ecc.) e avanzate (tipologia + epoca di fioritura, tipologia + epoca di maturazione, ecc.).

**Consultate la nuova Banca Dati delle Varietà Frutticole  
www.crpv.it**



tel: 0547.347164, fax: 0547.346142  
e-mail: ortofrutticola@crpv.it

## ARCHIVIO FITOFARMACI

### La nuova Banca Dati Fitofarmaci



Lo sforzo organizzativo messo in atto dal Crpv ha portato al coinvolgimento diretto delle ditte produttrici e distributrici di fitofarmaci, che ha permesso l'inserimento dei prodotti commerciali più in uso riguardanti, in modo particolare, i principi attivi contemplati nei Disciplinari di produzione integrata dell'Emilia-Romagna. Le attività dei prossimi mesi saranno volte al completamento dell'inserimento dei formulati utilizzati nonché all'aggiornamento delle etichette fornite direttamente dalle ditte produttrici. La peculiarità dell'Archivio Fitofarmaci è determinata dalle notevoli competenze che supportano il partner informatico Net-Agree nella fase di interpretazione delle etichette; che ha portato ad una forte azione sinergica con agronomi e fitoiatri presenti non solo all'interno di Crpv ma anche di Catev, riconosciuto centro di saggio.

#### Le prime 1300 etichette dei formulati commerciali più utilizzati

Il servizio della Banca Dati Fitofarmaci che il Crpv mette a disposizione dei propri utenti contiene tutte le informazioni strutturate in modalità relazionale relative ai formulati commerciali impiegati per la difesa fitosanitaria, il controllo delle infestanti, il controllo dello sviluppo vegeto-produttivo, ecc.



L'attività di archiviazione delle singole informazioni presenti nelle etichette e l'inserimento di queste nel data base messo a punto, permette all'utente di effettuare delle ricerche sul contenuto dei dati. In particolare è possibile effettuare le consultazioni per le seguenti chiavi di ricerca: Nome Fitofarmaco, Nome Principio Attivo, Frasi di rischio, Residui dei principi attivi compatibili per una determinata coltura, Relazione in base all'avversità e alla coltura, Etichetta, ecc.

**Consultate la nuova Banca Dati Fitofarmaci**  
[www.crpv.it](http://www.crpv.it)



tel: 0547.347164, fax: 0547.346142  
 e-mail: ortofrutticola@crpv.it

## RINTRACCIABILITA'

### La Soluzione Software per la Rintracciabilità



Partendo dal know-how acquisito con la rintracciabilità del pomodoro da industria, le soluzioni che si propongono fanno riferimento ad un modello di raccolta dei dati e di gestione del loro reperimento altamente configurabile e aperto a modifiche di configurazione delle linee di lavorazione del prodotto: situazione tipica delle aziende del settore agroalimentare, che si caratterizzano per l'estrema dinamicità ed eterogeneità.

#### Il sistema informativo proposto

Per poter soddisfare le esigenze delle aziende che affrontano il complesso tema della rintracciabilità del prodotto, occorre approntare soluzioni che complete e dinamiche e che prevedano l'impiego coordinato di sistemi informatici per la raccolta dei dati e la gestione trasparente e sicura delle informazioni.



#### Il Software

**Rintraccio pomodoro: il software per la raccolta dei dati nell'industria di trasformazione.** Si caratterizza per alcuni aspetti di fondamentale importanza che, da un punto di vista tecnologico e operativo, ne fanno un sistema efficiente ed efficace producendo una grossa soddisfazione da parte delle aziende che lo utilizzano.

- La configurabilità cioè la possibilità di adattarsi, attraverso la fase di design del sistema, alle diverse realtà aziendali e alle evoluzioni che possono avvenire nell'ambito delle stesse nel corso degli anni.
- Il completo controllo nella gestione dei dati relativi all'intero processo produttivo: il sistema è in grado di gestire le informazioni verso l'esterno (rintracciabilità) ma anche verso l'interno fornendo un valido supporto al miglioramento dell'organizzazione aziendale attraverso, ad esempio, il controllo delle varie fasi di lavorazione, la gestione ottimale delle non conformità e la possibilità di effettuare delle elaborazioni statistiche per migliorare la programmazione produttiva.

#### Il Portale

**www.rintracciabilita.it: il portale di consultazione dei dati.** Rappresenta il servizio gestito in outsourcing da Crpv e Net-Agree che consente, attraverso la tecnologia Internet, di regolare il flusso di dati e di contatti. L'utente potrà accedere alle informazioni sui prodotti, attraverso un sistema di password concordato con l'associazione di riferimento che renderà disponibili informazioni diversificate a seconda della tipologia di utenza.



tel: 0547.347164

fax: 0547.346142

e-mail: ortofrutticola@crpv.it