

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTI DI SCIENZE E INGEGNERIA
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRO-
ALIMENTARI (LM-7)

VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA DI INTERVENTI DI
BIOCONTROLLO DELLA MACULATURA BRUNA DEL PERO
IN CAMPO E ANALISI PRELIMINARI DI PUTATIVI FATTORI
DI VIRULENZA DELL' AGENTE EZIOLOGICO
STEMPHYLIUM VESICARIUM

Relatore: Prof.ssa Elodie Vandelle

Correlatori: Dott. Alfonso Cerrato

Dott. PhD Davide Danzi

Laureando: Massimo Gatta VR445212

Anno accademico: 2020/21

INDICE

1	INTRODUZIONE	4
1.1	La coltura del pero	4
1.2	La macula bruna del pero	8
1.2.1	Descrizione della malattia e del suo impatto	8
1.2.2	Suscettibilità	9
1.2.3	Umidità e fattori scatenanti	10
1.3	<i>Stemphylium vesicarium</i>	12
1.3.1	Morfologia di <i>Stemphylium vesicarium</i>	12
1.3.2	Il ciclo sessuale	13
1.3.3	La tossina SV	14
1.4	Fungicidi e resistenze	16
1.4.1	Gestione della malattia	16
1.4.2	Quaderno di campagna	17
1.4.3	Sviluppo di resistenze nel fungo patogeno	21
1.4.4	Le istidine chinasi come target dei fungicidi e resistenza derivata	22
1.5	Organismi di controllo biologico	24
1.5.1	Cosa sono e perché usarli?	24
1.5.2	Funghi come agenti di bio-controllo	25
1.5.3	Batteri come agenti di bio-controllo	27
1.5.4	Sostanze bioattive contro patologie fungine	30
2	SCOPO DELLA TESI	32
3	MATERIALI E METODI	34
3.1	Trattamenti in campo	34
3.1.1	Cattura delle spore	36
3.1.2	Conteggio spore	37
3.1.3	Sviluppo BSPcast	38
3.2	Isolamento <i>Stemphylium vesicarium</i>	39
3.2.1	Estrazione DNA di <i>Stemphylium vesicarium</i>	41
3.2.2	Amplificazione di DNA attraverso PCR Reaction	42
3.2.3	Valutazione della presenza di <i>S. vesicarium</i> in gemme invernali	44
3.2.4	Purificazione campioni	45
3.3	Screening BCA	46
3.4	Antibiogrammi	47
3.5	Valutazione dell'efficacia di diverse molecole vegetali	48

3.6	Identificazione di proteine putative legate all'istidina chinasi.....	48
3.7	Analisi statistica.....	49
3.7.1	Box plot	49
3.7.2	Anova ad una via	50
4	RISULTATI	51
4.1	Valutazione degli effetti del trattamento su conidi, foglie e frutti	51
4.1.1	BSPcast	51
4.1.2	Impatto dei trattamenti sui conidi	52
4.1.3	Valutazione efficacia su foglie e frutti.....	57
4.2	Isolamento <i>S. vesicarium</i> ed identificazione	60
4.2.1	Prima prova di isolamento	60
4.2.2	Seconda prova di isolamento	63
4.2.3	Terza prova di isolamento.....	65
4.2.4	Isolamento di <i>S. vesicarium</i> da gemme invernali.....	67
4.3	Competizioni in vitro ed antibiogrammi	68
4.3.1	Risultati screening BCA.....	68
4.3.2	Antibiogrammi e valutazione della forza dei BCA.....	70
4.3.3	Valutazione dell'efficacia di diverse molecole vegetali.....	71
4.4	Identificazione di proteine putative legate all'istidina chinasi.....	72
5	DISCUSSIONE	76
6	BIBLIOGRAFIA.....	83
7	INDICE FIGURE.....	90
8	INDICE TABELLE	92
9	RINGRAZIAMENTI.....	93

1 INTRODUZIONE

1.1 La coltura del pero

Il pero (*Pyrus*) ha origini lontane e, geograficamente, sono stati definiti due punti principali in cui si è sviluppato e propagato: il Medio Oriente, dove ha avuto origine il *Pyrus communis* (Fig. 1) e la Cina dove vengono maggiormente coltivate le cultivar *Pyrus pyrifolia*, *Pyrus ussu-riensis* e *Pyrus calleryana*. ancora oggi. Oltre a queste aree di origine, il pero viene in maggior misura coltivato in Europa, in accordo con il fatto che si tratta di una coltura che si adatta a regioni temperate e fresche, e che dunque trova la sua zona ideale nella pianura padana. L'Italia risulta essere al primo posto nella classifica dei maggiori produttori di pere nell'Emisfero Nord e a livello mondiale i quantitativi italiani di pere (circa 900.000 t) occupano il terzo posto, preceduti da Cina ed Argentina.



Figura 1 Nella seguente mappa vengono indicati i punti in cui il pero si è sviluppato ed adattato maggiormente

All'interno dell'UE, la produzione italiana, concentrata nelle regioni Emilia-Romagna e Veneto, rappresenta il 30% del totale, seguita da quella spagnola (22%), tedesca (16%) e francese (9%).

Le cultivar maggiormente presenti sul nostro territorio si riducono a poche varietà rispetto a tutte quelle esistenti. Infatti, circa l'85% della produzione è ottenuto da sole 6 colture: Abate, William, Conference, Decana del comizio, Kaiser e Coscia.

La classificazione delle varietà si basa sull'epoca di raccolta, distinguendo cultivar estive ed autunno-invernali. Fra quelle estive possiamo citare la Williams e la Coscia,

mentre tra le varietà autunno invernali troviamo Conference, Abate e Decana del comizio (Tab. 1). (Il nuovo "TASSINARI" 2018)

	Gen	Feb	Mar	Apr	Mag	Giu	Lug	Ago	Set	Ott	Nov	Dic
Williams								●	●	●	●	●
Conference	●	●	●	●	●	●					●	●
Kaiser	●	●	●	●					●	●	●	●
Decana del Comizio	●	●	●							●	●	●
Williams Rosso	●							●	●	●	●	●
Abate Fetel	●	●	●	●					●	●	●	●
Santa Maria							●	●	●	●		

Tabella 1: Periodo di presenza sul mercato (<https://sistemafrutta.it/prodotti.html>)

A livello botanico, la pera è una pianta decidua che solitamente viene fatta crescere fino a 2/3 metri di altezza, ma che in condizioni ideali potrebbe elevarsi fino a 15 metri. Il tronco presenta una corteccia di colore bruno tendente al grigio e la chioma ha una forma piramidale.

Dal punto di vista tassonomico il *Pyrus communis* appartiene alla famiglia delle *Rosaceae* sottofamiglia *Pomoideae*. L'assetto cromosomico di quest'ultima è pari a 17 cromosomi (numero cromosomico di $2n=34$).

Le-fasi fenologiche sono:

- Gemma d'inverno
- Inizio del rigonfiamento
- Apertura delle gemme
- Comparsa dei mazzetti fiorali
- Inizio della fioritura
- Piena fioritura
- Inizio della caduta dei petali
- Fine della caduta dei petali
- Allegagione
- Ingrossamento dei frutti
- Frutti maturi

Le gemme sono di forma conica, rivestite da brattee dette perule, presenti sui rami all'ascella delle foglie o all'apice dei rami, dai quali sporgono. Le gemme possono essere di tipo vegetativo o misto. Quelle vegetative, o a legno, rimangono quiescenti e sono provviste di due sotto-gemme. Quelle miste, invece, hanno una dimensione maggiore, sono più tondeggianti e, al contrario delle prime, contengono un apice vegetativo e l'abbozzo del corimbo fogliare.

L'infiorescenza è un corimbo formato da 7-10 fiori bianchi composti da 5 petali, che successivamente forma un fiore ermafrodita con circa 20 stami. Il gineceo ha un ovario infero, pluricellulare e sincarpico, con 5 stili liberi, ciascuno provvisto di due ovuli. Si noti inoltre che il calice è generalmente presente nelle specie occidentali, mentre è caduco, in generale, nelle specie ornamentali. È ulteriormente rilevante che i fiori centrali fioriscano in ritardo rispetto agli altri ed abbiano scarse probabilità di allegazione.

Le foglie sono decidue e presentano un peduncolo tendenzialmente allungato e ricurvo, che può essere più o meno carnoso. Inoltre, sono glabre e cutinizzate, presentando un margine dentato.

Il frutto (Fig. 2) del pero è un pomo con setti cartilaginei, la cui parte edule è costituita da un ricettacolo florale; ciò lo rende, per definizione, un falso frutto. La polpa è di colore bianco crema, ma può essere anche rossa. Alle volte questa è formata da cellule lignificate, sclereidi, presentando particolari caratteristiche organolettiche. Il vero frutto è il torsolo, con endocarpo cartilagineo delimitato da cinque logge. Questo

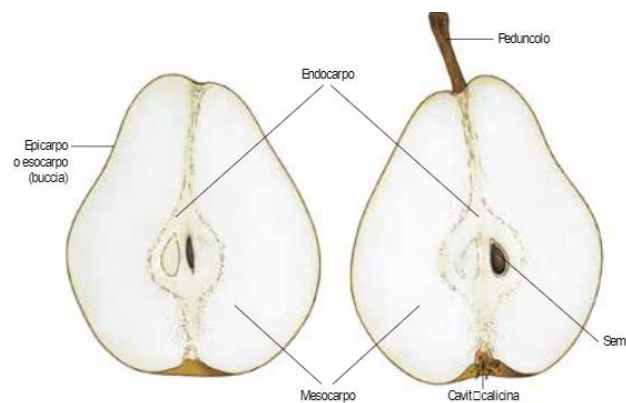


Figura 2: Anatomia del frutto in sezione verticale

presenta fino ad un numero massimo di dieci semi, che hanno un tegumento simile al cuoio e di colore nero bruno.

I rami a frutto del pero, derivanti dalla lignificazione dei germogli, sono il brindillo, la lamburda, la borsa ed il ramo misto. Questi si dividono principalmente in tre categorie: a legno, a frutto o misti.

La differenziazione a fiore, per le *cultivar* estive, inizia tra il 20-30 giugno, mentre gli abbozzi dei sepali si evidenziano nella seconda metà di luglio. Nella prima metà di agosto si possono notare dei petali precoci seguiti, dopo un mese, dall'abbozzo degli stami. Tra la fine di agosto e gli inizi di novembre compaiono i carpelli mentre la micro-sporogenesi, a metà febbraio, precede la fioritura.

La pianta è autoincompatibile per sterilità fattoriale di tipo gametofitico e i suoi frutti consistono in, appunto, gametofiti con impollinazione entomofila. Il frutto del pero è inoltre di tipo climaterico e la temperatura media ottimale estiva favorevole alla sua crescita si estende tra i 20°C e i 25°C; si noti che sopra i 27°C la probabilità di danni ingenti aumenta (Pachioli 2020).

Il periodo di impollinazione è infine compreso tra i due e tredici giorni, mentre la successiva fioritura ha una durata di 10-14 giorni. L'inizio di quest'ultima è previsto per la fine di marzo e, successivamente, a metà aprile.

1.2 LA MACULA BRUNA DEL PERO

1.2.1 Descrizione della malattia e del suo impatto

La macula bruna del pero è una delle più gravi e persistenti malattie fungine che attaccano il pero. Nella zona mediterranea, e soprattutto in Italia, i danni riportati sono ingenti e nei casi più gravi compromettono fino al 90% del raccolto. Secondo il report del servizio fitosanitario dell'Emilia-Romagna, nel 2018, la presenza della macula bruna del pero ha recato ingenti danni alla produzione, portando alla perdita del 60-70% del raccolto. In Italia, si segnalano anche i primi casi riportati, risalenti alla metà degli anni '70 nella zona dell'Emilia-Romagna. La malattia si è poi diffusa negli anni successivi nel resto d'Europa, colpendo Spagna, Francia ed Olanda e, nell'ultimo



Figura 3: Macula bruna (www.italiafruit.net)

decennio, sono stati denunciati casi anche in Giappone. Nel 2019, la situazione è peggiorata, a causa di un periodo prolungato di bagnatura fogliare ed alte temperature. I danni, in questo caso, hanno riguardato fino all'80% della produzione.

La malattia si manifesta con macchie necrotiche marroni sul frutto (Fig. 3), sulle foglie e sui ramoscelli. I sintomi differiscono relativamente allo stadio di sviluppo della pera: in quelle più giovani, le macchie sono localizzate sul calice, mentre nelle pere più mature si trovano anche nella zona equatoriale del frutto. I primi sintomi si manifestano alla fine del periodo primaverile, per poi aggravarsi durante il periodo della raccolta e post-raccolta. (Llorente, et al. 2011)

Inizialmente le macchie sui frutti giovani sono circolari e marroni con un diametro di 1-2 mm, talvolta circondati da un alone rosso, che si estendono fino a 20 mm a frutto maturo e, al contempo, possono costituire una via d'ingresso per funghi necrotrofi come *Alternaria* spp., creando del marciume all'interno della pera. Le macchie presenti sulle foglie, invece, sono più piccole (con un diametro di 1-3 mm) e si osservano nel periodo che va da aprile a maggio, con una frequenza maggiore a giugno (Llorente e Montesinos 2006).

La malattia rende il prodotto non adatto al mercato in quanto le macchie marroni compromettono la commercializzazione del frutto. Inoltre, gli spot possono estendersi

anche a forma di cuneo (Fig. 4) all'interno della pera, e nei casi più gravi, quest'ultima cade prematuramente dall'albero.



Figura 4: *Spot esteso a forma cuneo* (www.agro.basf.it)

L'agente che causa questa malattia è *Stemphylium vesicarium*, un fungo ascomicete noto per causare anche altre malattie in colture erbacee come aglio, cipolla, asparago, alfalafa, soia e mango. Il fungo appartiene alla Classe degli Ifomiceti, nell'Ordine degli *Hyphales* (*Monoliales*). Questo organismo è caratterizzato da conidi neri multicellulari, con una forma da oblunga ad ovale. Questo patogeno produce due tipologie di tossine, SVI ed SVII, di tipo ospite specifico (HST), che sembrano esser i fattori scatenanti dell'infezione. *In vitro*, queste tossine possono esercitare un'azione tossica già a bassissime dosi in cultivar suscettibili, mentre dosi molto elevate non hanno effetto sulle cultivar resistenti (R. B. P. Singh 1999).

1.2.2 Suscettibilità

La suscettibilità al patogeno diminuisce con l'avanzare dell'età fisiologica dei tessuti della pianta; ad esempio, il frutto in fase di allegagione è 40 volte più suscettibile rispetto al frutto in fase di raccolta nelle cultivar di Passe Crassane e Conference. Analogamente le foglie più giovani sono tre volte più suscettibili di quelle vecchie. I periodi di massima suscettibilità per gli alberi sono quelli vegetativi: il primo si situa in tarda primavera ed il secondo si colloca ad inizio autunno. In campo, la maggior parte dei sintomi si evidenzia dopo la raccolta, poiché influenzati da una combinazione di alto inoculo e condizioni metereologiche favorevoli all'infezione, nel periodo che va da fine estate ad inizio autunno (E. Montesinos 1995).

La gravità della malattia dipende anche dal tipo di cultivar: colture diverse, infatti, presentano suscettibilità diverse (Tab. 2).

High	Moderate	Low
Abate Fétel	General Leclerc	Beurre Hardy
Alexandrine	Guyot	Blanquilla
Conference	Kaiser	Grand Champion
Doyeme du Comice	Packam's Triumph	Highland
Duc de Bordeaux	Rocha	Louis Bonne
Passe Crassane	Winter Nellis	Max Red Bartlett
		Santa Maria
		Spadona
		Williams

^z According to inoculation experiments reported using *Stemphylium vesicarium* isolates from France, Italy, and Spain (4,9,26).

Tabella 2: Suscettibilità delle diverse cultivar allo *S. vesicarium*

È stato dimostrato che le *cultivar* di pere Abate Fétel, Crassane e Conference possiedono il maggior grado di suscettibilità, derivante da un'attivazione dei geni di difesa più lenta, che determina una rilevante insorgenza della malattia (Llorente e Montesinos 2006), non dovuta ad una diversità genetica, bensì ad una differenza di tempistiche di attivazione delle vie molecolari (Pereira 2015).

1.2.3 Umidità e fattori scatenanti

Temperatura e umidità sono le variabili che più influenzano la severità della malattia. In letteratura è noto che gli pseudotecii si sviluppano solo con un'alta umidità relativa (RH) >98%, ed una temperatura ottimale che si aggira tra i 10 e i 15°C (I. e. Llorente 2006). Il suo telomorfo, *Pleospora allii*, in autunno si trova nel cotico erboso dove sviluppa gli pseudotecii; questi ultimi, in presenza di alta umidità, differenziano gli aschi che rilasciano poi le ascospore.

I primi pseudotecii maturi si sviluppano tra dicembre e febbraio e la maggior parte di questi presenta aschi maturi da fine gennaio fino al termine di aprile. Le ascospore sono invece rilasciate dagli aschi da febbraio fino a giugno. In questo mese, quando il numero di ascospore è basso appaiono i primi sintomi della malattia. Si noti, dunque, che il periodo in cui le ascospore vengono rilasciate non corrisponde al periodo in cui si sviluppa la malattia.

Non è ancora stato completamente chiarito perché la comparsa di *S. vesicarium* non coincida con i livelli di inoculo delle spore aeree (Fig. 5).

Si ipotizza l'esistenza di due fasi per spiegare questo fenomeno: una fase patogena ed una fase saprofitica. La prima è caratterizzata dall'infezione delle parti aeree della pianta, mentre la seconda dall'infezione del cotico erboso, sia in primavera che in estate. In questo modo, l'intero appezzamento viene invaso dal fungo per tutto l'anno. Si crede, dunque, che il contributo di queste

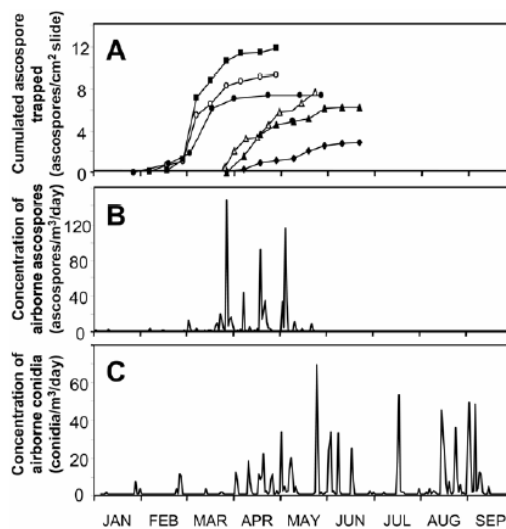


Figura 5: Rappresentazione grafica della presenza di ascospore catturate, ascospore aeree e conidi. Llorente et al. 2006

ascospore alla malattia sia quello di colonizzare in modo saprofitico il cotico erboso. In questo modo, presentandosi le condizioni favorevoli, saranno poi prodotti i conidi che, liberati nell'aria, infetteranno le pere.

Lo sviluppo della malattia è favorito anche dalle condizioni degli impianti. La localizzazione di questi in prossimità di canali o fiumi rappresenta una maggior probabilità di diffusione della malattia. Le reti anti-grandine e anti-cimici posizionate sui lati sono uno dei fattori che aumentano le ore di bagnatura fogliare e, di conseguenza, anche l'umidità, così come l'irrigazione sovra chioma, l'utilizzo di ormonature, pesticidi ed altri trattamenti fogliari (E. M. Montesinos 1995)

1.3 STEMPHYLIUM VESICARIUM

1.3.1 Morfologia di *Stemphylium vesicarium*

Il fungo appartiene alla Classe *Hyphomycetes*, nell'Ordine *Hyphales* (*Moniliales*). Caratterizzato da conidi scuri multicellulari, con forma da oblunga ad ovale. *S. vesicarium* presenta da uno a cinque setti trasversali con una o due serie di setti longitudinali. Uno o, più frequentemente, tre dei setti trasversali, sono maggiori degli altri. La dimensione dei conidi dipende dal ceppo e dalla composizione del mezzo di crescita, ma mediamente varia dai 21 ai 48 μm di lunghezza, e dai 10 ai 22 μm di larghezza. In generale, il rapporto tra queste due dimensioni è compreso tra 1,5 e 2,7 per i conidi sviluppati nel tessuto ospite e tra 2,5 e 3,0 per quelli prodotti su terreni di crescita di laboratorio.

Il micelio aereo di *S. vesicarium* è filamentoso, rado e ialino; i conidiofori sono inoltre eretti, marroni e con un solo conidio terminale. Il teleomorfo di *S. vesicarium* è *Pleospora allii* (Rabenh.) Ces. & De Not, classe *Ascomycetes*, dell'ordine *Pleosporales*. Questo produce pseudotecii globosi, che presentano tinte varianti dal marrone al nero. La dimensione di questi ultimi dipende dal substrato, ma mostra un diametro medio da 100 a 500 μm . Gli aschi sono bitunicati, cilindrici-clavati (131 \times 26 μm) contenenti otto ascospore. Queste sono di colore giallo-marrone, dalla forma ellissoidali che si presenta da oblunga a clavata, con una dimensione media di 32 \times 14 μm . Le ascospore presentano inoltre setti trasversali in un numero compreso tra tre e sette, oltre a un setto longitudinale in ciascuna delle divisioni trasversali (Llorente e Montesinos 2006).

Fino all'emergere delle analisi filogenetiche molecolari, la tassonomia delle specie di *Stemphylium* si basava principalmente sulla morfologia conidiale, comprendendo le variazioni di forma, dimensione, rapporto lunghezza/larghezza, colore, setti e ornamento dei conidi. Ulteriori caratteri morfologici utilizzati nella definizione delle specie includevano la lunghezza del conidioforo e il diametro della cellula apicale terminale. Tuttavia, molti di questi caratteri si sovrappongono tra le specie, rendendo difficile la determinazione di queste ultime. Inoltre, le caratteristiche morfologiche di *Stemphylium spp.* possono variare a seconda delle condizioni ambientali (come la temperatura e il substrato). Per garantire un'identificazione accurata, è dunque

necessario che l'analisi morfologica sia seguita da un'analisi molecolare delle sequenze ITS (*Internal Transcribed Spacer*), geni dell'RNA ribosomiale (rDNA) degli eucarioti, organizzati in gruppi di unità ripetute in tandem, ciascuna costituita da regioni codificanti e spaziatori trascritti e non trascritti. L'unità inizia all'estremità 5' con lo spaziatore trascritto esterno (ETS), seguito a valle dal gene 18S rRNA, lo spaziatore trascritto interno 1 (ITS1), il gene 5.8S rRNA, lo spaziatore trascritto interno 2 (ITS2), il 28S rRNA e termina con lo spaziatore intergenico (IGS). Queste regioni sono fondamentali per l'analisi filogenetica, in particolare, dei funghi (RJ. 1985).

1.3.2 Il ciclo sessuale

Stemphylium vesicarium presenta due forme, sessuata e asessuata. Il suo ciclo vitale si divide quindi in due fasi (Fig. 6). La prima fase, che va da dicembre ad aprile, è quella sessuale. In questo momento il fungo viene identificato come *P. Alii*. Durante l'autunno, si ha poi lo svernamento nel cotico erboso a seguito del quale si ha l'inizio della fase saprofitica dove inizia la maturazione degli pseudotecii. Questi, in seguito, producono gli aschi e le 8 ascospore. Durante il periodo di aprile, gli aschi maturi rilasciano le ascospore a seguito di piogge o venti. Verso la fine della primavera il

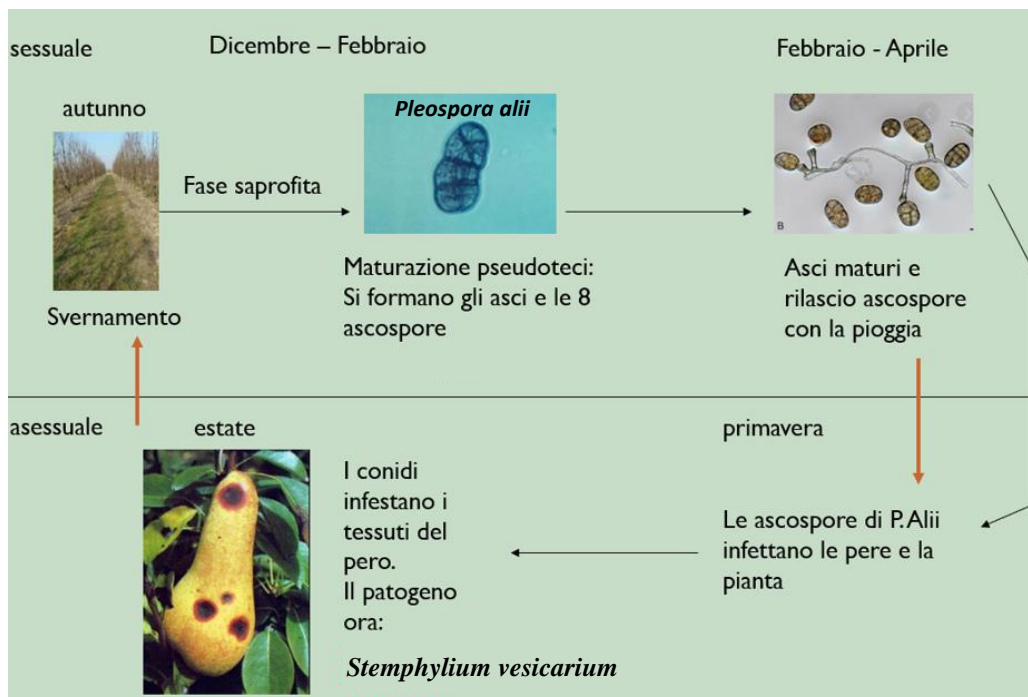


Figura 6: Ciclo sessuale *S. Vesicarium*

fungo, tramite i conidi, infetta la pianta ed inizia così la fase asessuale, durante la quale il microorganismo si identifica come *Stemphylium vesicarium* (Llorente e Montesinos 2006).

1.3.3 La tossina SV

Stemphylium vesicarium presenta due tipologie di tossina HST (*host specific toxin*). Identificate ed isolate utilizzando una cultivar suscettibile ed una resistente, come controllo (R. B. P. Singh 1999). La patogenicità del fungo è stata valutata su diverse pere europee e giapponesi, compresa una coltivazione di asparago, attraverso l'inoculazione delle spore spruzzate sulle foglie e successivamente incubate a 25°C per 24h, per poi contare il numero di lesioni per centimetro quadrato. In seguito, per caratterizzare le tossine, il fungo è stato isolato su terreno solido PDA fino alla sporulazione ed è stata condotta un'analisi analitica in HPLC per isolare le tossine. Una volta ottenute, è stato eseguito il saggio di necrosi fogliare, che consiste nell'applicare diverse diluizioni della tossina dopo aver eliminato lo strato più esterno della foglia con un bisturi. Da questo esperimento è emerso che esistono gradi diversi di sensibilità delle varie cultivar di pero. In particolare, i risultati hanno chiarito quali tossine siano pericolose per le cultivar europee e quali no. Si è evidenziato che le tossine di tipo SVI causano una morte cellulare significativa nelle foglie di cultivar sensibili già dopo un'ora dall'infezione, mentre le tossine di tipo SVII dopo 8-12 ore. Le tossine SVII, quindi, sono dieci volte meno tossiche delle tossine SVI. Entrambe le tossine, tuttavia, causano vene necrotiche alle concentrazioni di 0.001 e 0.1 µg/ml. Le SV hanno un basso peso molecolare, > 5,000 MW, sono stabili termicamente e non sono proteiche. Queste presentano inoltre vari gruppi chimici idrofilici, che ne ricoprono le superfici.

Nello studio di P.Singh et al. 1999, i ricercatori hanno trattato foglie giovani di cultivar sensibili e resistenti con una soluzione contenente tossina ed acqua deionizzata. Questi hanno poi incubato la foglia a 27°C per differenti periodi di tempo da 1 ora fino a 11 ore. In quest'ultima incubazione si sono notate le prime vene di necrosi lungo la foglia. Inoltre, già dopo 3 ore di trattamento (Fig. 9), tramite l'analisi al microscopio, si è rilevato che tra le cellule floematiche erano presenti piccole invaginazioni del

plasmalemma ad entrambe le estremità dei plasmodesmi, al contrario queste rientranze non erano visibili in pere resistenti (Fig. 8). Vicino a queste invaginazioni, dopo 11 ore, sono state trovate delle vescicole del Golgi che apparivano fuse alle membrane plasmatiche del plasmodesma (Fig. 7). Materiali simili ai polisaccaridi sono stati rilasciati dalle vescicole di Golgi fuse negli spazi extracellulari, tra le pareti cellulari e le membrane plasmatiche a livello del plasmodesma. Dopo 23 ore dal trattamento, erano presenti frammenti di membrane (provenienti dalle quelle plasmatiche modificate) e desmotuboli estesi dai plasmodesmi. Queste modificazioni sono simili a quelle prodotte dalle tossine HST di *Alternaria*, come AK-, ACT- e AF-toxin. Il sito *target* della tossina SVI (E. Montesinos 1995) è quindi localizzato sulla membrana plasmatica vicino al plasmodesma. È stato inoltre ipotizzato che la disfunzione della membrana plasmatica indotta dall'HST sopprime l'induzione della resistenza dell'ospite, facilitando quindi l'infezione fungina.

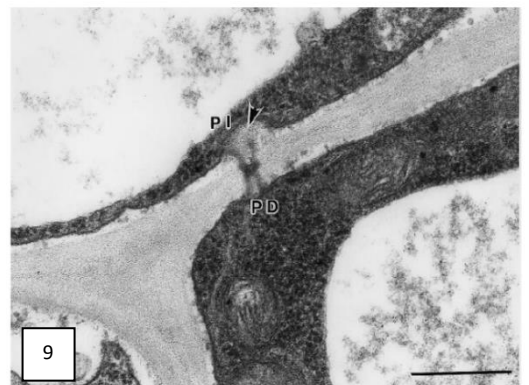
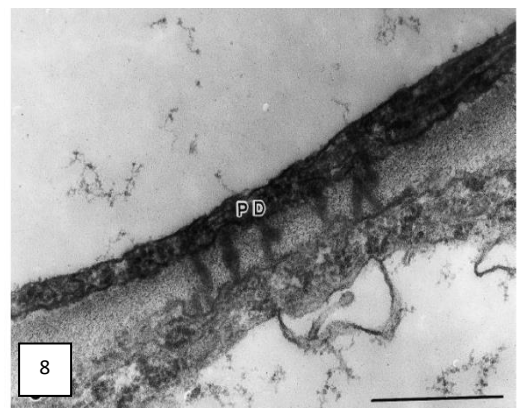


Figura 7: Cellula floematica di una foglia di una pera suscettibile trattata con tossina per 11h (12'00 x). Notare l'accumulo dei frammenti di membrana (MF). Non ci sono anomalie da segnalare nelle vescicole del Golgi (GV), nel nucleo (N), nel plasmodesma (PD),

Figura 8: Membrana plasmatica vicino al plasmodesma (PD) in una cellula floematica di una foglia di una cultivar di pera resistente trattata con una tossina per 6h (40'000 x). P. Singh et Al. 2000

Figura 9: Piccola invaginazione del plasmalemma (PI) nel plasmodesma (PD) in cellule floematiche di foglie di pere suscettibili trattate con tossina (30'000 x). P. Singh et Al. 2000

1.4 FUNGICIDI E RESISTENZE

1.4.1 Gestione della malattia

L'infezione fungina è data dalle ascospore e dai conidi che vengono liberati nell'aria in condizioni favorevoli per il fungo e che si depositano sia sulle foglie, sia nel cotico erboso. I trattamenti, tradizionalmente, vengono fatti dalla caduta dei petali al momento della raccolta. Insieme a metodi chimici vengono inoltre associati anche modelli previsionali come il BSP cast e il BSPspore (E. Montesinos 1995).

Secondo (I. e. Llorente 2006) la malattia si dovrebbe trattare con fungicidi diffusi tramite *spray* ogni 7-14 giorni. I fungicidi più usati sono i ditiocarbammati, come thiram e mancozeb. Sono, inoltre, principalmente utilizzati strobilurine e dicarbossimidi, che sono stati banditi dal servizio fitosanitario. I fungicidi sono tuttavia inefficaci a livello curativo, poiché una volta che i conidi sono maturi cominciano a produrre le tossine SV. I fungicidi, dunque, ostacolano solo l'allungamento o la formazione del tubetto germinativo: per questo la loro efficacia è nulla se usati quando quest'ultimo è già ben sviluppato.

Uno studio condotto da (A. Brunelli 2014) offre una panoramica sui fungicidi più usati per controllare lo sviluppo di questa malattia. I risultati ottenuti affermano che l'iprodione è efficace in campo e le prove *in vitro* dimostrano anche che il patogeno non sviluppa resistenze contro questo principio attivo. Tre anni dopo l'uscita dell'articolo, nel 2017, l'iprodione è stato ritirato dal mercato dopo un comunicato del Ministero della Salute ([comunicato del 5 dicembre 2017](#)) e da regolamento (UE) n. 2091/2017, dove viene chiaramente espresso: "In particolare l'EFSA, sulla base della documentazione valutata, ha riscontrato delle criticità legate ad aspetti tossicologici ed ecotossicologici della sostanza attiva e pertanto la Commissione europea ne ha proposto la non approvazione."

Nell'articolo del 2014 venivano considerati anche gli analoghi delle strobilurine, che hanno dimostrato una buona efficacia, soprattutto se abbinate ad un altro fungicida che può essere variabile. Tra il 2012 e il 2013, però, è stata segnalata una ridotta sensibilità alle strobilurine, dimostrando un elevato rischio di resistenza. In fine, il fludioxonil ha dimostrato una buona efficacia (così come il captano, il fluazinam e il fluopyram) senza segnalazione per quanto riguarda le resistenze ed i pericoli ambientali.

1.4.2 Quaderno di campagna

Il Quaderno di Campagna, così come indicato al comma 3 dell'art.42 del DPR n.290/01, è un registro obbligatorio per tutte le aziende agricole che utilizzano prodotti fitosanitari per la difesa delle colture agrarie. Può essere compilato cronologicamente per colture diverse, oppure utilizzando una serie di moduli distinti (uno per ogni singola coltura). All'interno del quaderno di Campagna bisogna riportare l'anagrafica dell'azienda, la denominazione della coltura trattata e la sua estensione espressa in ettari, il prodotto fitosanitario utilizzato, (specificando se di tipo tossico, molto tossico, nocivo, irritante o non classificato) e le sue quantità (esprese in kg o in litri), la data del trattamento e le avversità che hanno reso necessario il trattamento. Il quaderno di campagna di seguito riportato, relativo all'anno 2019/2020, ritrae una panoramica dei fungicidi utilizzati per la coltivazione del campo di pere preso in analisi in questa tesi presso Castelletto di Leno (BS).

NOME	PRINCIPIO ATTIVO	DESCRIZIONE:	EFFICACIE CONTRO:
OSSICLOR 35 WG	<u>COPPER OXYCHLORIDE</u>	fungicida ad azione polivalente che trova impiego nella difesa delle pomacee, drupacee, vite, agrumi, fragola, olivo, colture Orticole	Ticchiolatura (<i>Venturia inaequalis</i>), Cancri rameali (<i>Nectria galligena</i>), Batteriosi (<i>Pseudomonas spp</i>), Colpo di fuoco (<i>Erwinia amylovora</i>)
DELAN 70 WG	DITIANON	Interferisce con la respirazione delle cellule fungine per inibizione dell'attività di enzimi solfidrilici.	Contro ticchiolatura (<i>Venturia pyrina</i>) e cancri del legno (<i>Nectria galligena</i>)
PENNCOZEB	<u>MANCOZEB</u>	prodotto di tipo preventivo ad ampio spettro d'azione.	Ticchiolatura (<i>Venturia inaequalis</i> , <i>Venturia pirina</i>), Maculatura bruna (<i>Stemphylium vesicarium</i> / <i>Pleospora allii</i>), <i>Septoria</i> (<i>Mycosphaerella sentina</i> / <i>Mycosphaerella pyri</i>), <i>Alternaria</i> (<i>Alternaria sp.</i>)
CHORUS	<u>CYPRODINIL</u>	fungicida a base di cyprodinil, principio attivo facente parte della famiglia chimica delle pirimidinamine. Chorus è un fungicida parzialmente sistemico che agisce	ticchiolatura del melo e del pero e la moniliosi delle drupacee

		interferendo sulla biosintesi degli aminoacidi, inibendo la penetrazione del fungo e la crescita sulla superficie e all'interno della foglia.	
ALIETTE	<u>FOSETYL-ALUMINIUM</u>	Il prodotto è un fungicida sistemico, caratterizzato da una grande mobilità nelle piante.	<i>Phytophthora cactorum</i>
ZIRAMIT	<u>ZIRAM</u>	fungicida ad ampio spettro	Risulta efficace contro molte malattie crittogamiche tra cui Bolla, Corineo, Cancro dei rametti, Ticchiolatura, Maculatura bruna, Alternaria, Ruggine, Peronospora, etc.
BELLIS	<u>PYRACLOSTROB IN BOSCALID (FORMERLY NICOBIFEN)</u>	Boscalid e piraclostrobin appartengono a due gruppi chimici distinti, le carbossianilidi e le strobilurine rispettivamente, e posseggono un diverso meccanismo di azione	BELLIS è un fungicida indicato per la lotta contro l'oidio del melo, la ticchiolatura del melo e del pero.
FOLICUR	<u>TEBUCONAZOLE</u>	fungicida sistemico ed inibitore della demetilazione	contro maculatura bruna del pero (<i>Stemphylium vesicarium</i>)
MERPAN	<u>CAPTAN</u>	Esplica un'attività multi-sito. Cioè antiresistenza.	contro maculatura bruna del pero (<i>Stemphylium vesicarium</i>) ed <i>Alternaria alternata</i> .
VISION PLUS	<u>DITHIANON PYRIMETHANIL</u>	associazione fungicida, contenente pyrimethanil, appartenente alla famiglia chimica delle anilinopirimidine, e dithianon, appartenente alla famiglia chimica degli antrachinoni.	attività translaminare e di copertura, con marcata azione preventiva e curativa contro ticchiolatura delle pomacee e maculatura bruna del pero
FLINT MAX	<u>TEBUCONAZOLE TRIFLOXYSTROBIN</u>	Flint Max è un fungicida a base di trifloxystrobin e tebuconazolo ad ampio spettro d'azione	azione preventiva e curativa contro ticchiolatura delle pomacee e maculatura bruna del pero

Tabella 3: Estratto del quaderno di campagna

Un' analisi dei principali principi attivi riportati nel quaderno di campagna (Tab.3):

Mancozeb: Fungicida ad ampio spettro d'azione, che agisce per contatto fogliare. È un composto chimico a struttura polimerica, in cui lo ione zinco è chimicamente legato alla molecola dell'etilenbisditiocarbammato di manganese per mezzo di un legame di coordinazione, che risulta estremamente stabile. Il Mancozeb è completamente diverso, sia chimicamente che biologicamente, da altri ditiocarbammati, in quanto contiene 3 componenti ionici, quali zinco, manganese ed etilenbisditiocarbammato, che si trovano nel formulato all'80% di principio attivo. Questo fungicida è inoltre caratterizzato da un'elevata azione biologica e da una lunga persistenza sulle foglie, (fitogest 2020) e il suo meccanismo agisce contro la produzione delle spore. Questo principio attivo è stato soggetto a molte preoccupazioni, tanto che venne revocato dalla Commissione europea. Questa "ha ritenuto necessario non rinnovare l'approvazione della sostanza attiva Mancozeb in considerazione della classificazione della sostanza attiva quale tossica per la riproduzione (categoria 1B) ed in relazione alle stime di esposizione non alimentare, che superano i valori di riferimento per gli impieghi rappresentativi nei pomodori, nelle patate, nei cereali e nelle viti. Per tali utilizzi, l'esposizione non alimentare al Mancozeb non può essere considerata trascurabile ai fini dell'allegato II, punti 3.6.4 e 3.6.5, del regolamento (CE) n. 1107/2009. La Commissione, tenuto conto dei motivi di preoccupazione constatati, non ha inoltre ritenuto possibile applicare la deroga di cui all'articolo 4, paragrafo 7, del regolamento (CE) n. 1107/2009." (fitosanitario 2009)

Cyprodinil: Fungicida appartenente alla famiglia chimica delle anilinopirimidine, specifico per ticchiolatura e moniliosi. È un composto parzialmente sistemico che agisce interferendo sulla biosintesi degli aminoacidi inibendo la penetrazione del fungo e la crescita sia sulla superficie, sia all'interno della foglia. Il suo meccanismo di azione risulta pertanto diverso sia da quello dei prodotti dicarbosimidici, sia dai benzimidazolici e dai triazoli (fitogest 2020).

Fosetil aluminium: è un fungicida sistemico ad ampio spettro. Il prodotto è dotato di proprietà sistemiche e, grazie alla liberazione di acido fosforoso, agisce sia inibendo direttamente lo sviluppo dei patogeni, sia favorendo lo sviluppo di meccanismi di difesa nella pianta.

Ziram: fungicida ad ampio spettro. Presenta un basso rischio di tossicità per i mammiferi, un rischio moderato per gli uccelli e un rischio elevato per le specie acquatiche.

Strobilurine: Queste molecole agiscono nelle cellule fungine bloccando la respirazione cellulare a livello della catena di trasporto degli elettroni e, di conseguenza, la sintesi di ATP, fonte energetica per tutti i processi biochimici della cellula. In particolare, queste molecole colonizzano stabilmente il sito d'attacco, esterno alla membrana interna del mitocondrio del citocromo C nel complesso III; è quindi impedito il passaggio degli elettroni verso il complesso IV, uno dei responsabili della produzione del differenziale osmotico necessario a produrre ATP. Essendo molecole unisito, sono state inserite tra quelle a rischio medio di resistenza, anche se è molto difficile per un fungo riuscire a modificare una via biochimica così fondamentale senza subire conseguenze letali (Riso italiano 2017). Tuttavia, la contaminazione ambientale e la tossicità non bersaglio (dovuta all'uso a lungo termine delle strobilurine) ha sollevato serie preoccupazioni per la salute pubblica. Ad esempio, secondo l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), l'azossistrobina si trova spesso negli alimenti (EFSA, 2010). Negli ecosistemi sono state riscontrate concentrazioni ambientali di azoxystrobin superiori alla *Regulatory Acceptable Concentration* (RAC), che rappresenta un serio rischio per gli organismi del suolo, quelli acquatici e i mammiferi.

Tebuconazole: è una sostanza attiva della famiglia dei fungicidi triazolici e costituisce un fungicida sistemico, noto come DMI (fungicida inibitore della demetilazione). Ciò significa che il tenuconazolo agisce influenzando le pareti cellulari dei funghi, sopprimendo la crescita degli stessi e la germinazione delle spore. Tale fungicida interferisce anche con la produzione di ergosterolo, una molecola essenziale per la formazione dei funghi. Di conseguenza, quest'ultima viene rallentata e alla fine interrotta. A causa di questa modalità d'azione unica, il tebuconazolo è considerato un fungistatico o un inibitore della crescita, piuttosto che fungicida.

Trifloxystrobin: È un fungicida dotato di proprietà mesosistemiche: una volta depositatosi sulla superficie vegetale, viene prontamente assorbito dallo strato ceroso e volatilizza in modo circoscritto, posandosi nuovamente nelle porzioni contigue

dell'organo trattato; il composto si muove poi all'interno della pianta in senso translaminare. Il comportamento del principio attivo sulla superficie vegetale conferisce al prodotto un'attività sostanzialmente preventiva e prontezza d'azione. L'assorbimento nello strato ceroso lo rende resistente al dilavamento e fornisce alta protezione a foglie e frutti. La volatilizzazione nella fillosfera e la conseguente rideposizione consentono una alternanza dinamica delle diverse fasi del prodotto (legata e libera); questo garantisce quindi una efficace protezione degli organi in accrescimento. (info.agrimag.it 2017).

1.4.3 Sviluppo di resistenze nel fungo patogeno

Anche se la revisione di (A. Brunelli 2014) ha dato un parere favorevole all'utilizzo di fungicidi, non bisogna dimenticare le criticità da questi scatenate. *In primis*, all'inizio degli anni '90 del secolo scorso, furono ripetutamente segnalati casi di resistenza al

TABELLA 1 - Rischio di resistenza dei fungicidi autorizzati in Italia contro maculatura bruna del pero			
Gruppi	Sostanza attiva	Rischio resistenza (FRAC)	Sito di azione
Rameici (inorganico)	Sali a base di ione rame (solfato tribasico, solfato neutralizzato, idrossido)	Basso	Multi-sito
Ditiocarbammati	Mancozeb, metiram, ziram	Basso	Multi-sito
Tioftalimmidici	Captan	Basso	Multi-sito
Chinoni	Dithianon	Basso	Multi-sito
2,6 dinitroaniline	Fluazinam	Basso	Fosforilazione ossidativa
Fosfonati	Fosetyl Aluminium, fosfonato di K	Basso	Stimolazione autodifesa pianta/Attività diretta sul patogeno non ben chiarita
PP (PhenylPyrroles)	Fludioxonil	Da basso a medio	MAP/Istidina- Kinasi – trasduzione di segnale osmotico di membrana
AP (Anilino-Pyrimidines)	Cyprodinil, pyrimethanil	Medio	Biosintesi metionina
Qol (Quinone outside Inhibitors)	Kresoxim-methyl, pyraclostrobin, tryfloxystrobin	Alto	Inibizione del complesso III (catena respiratoria), Citocromo bc1- sito Qo
SDHI (Succinate-dehydrogenase inhibitors)	Boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, isopyrazam, penthiopyrad	da Medio a Alto	Inibizione del complesso II (catena respiratoria), succinato deidrogenasi
DMI (DeMethylation Inhibitors) - SBI (classe I)	Tebuconazole	Medio	Biosintesi steroli (Demetilazione in C14)
Microbiologici	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> ceppo D747	Sconosciuto	Vari (competizione, stimolazione autodifesa pianta)
	<i>Bacillus subtilis</i> ceppo QST 713		

Fonte: Fungicide Resistance Action Committee (FRAC).

Tabella 4: Rischio di resistenza dei fungicidi autorizzati in Italia contro la maculatura bruna del pero

procymidone, poi confermati anche da verifiche in laboratorio. La resistenza era caratterizzata da specifiche mutazioni nel gene di una delle istidine chinasi del fungo. A seguito di questi eventi, il fungicida è stato ritirato dal mercato. *S. vesicarium* presenta tre diversi fenotipi: il primo è sensibile (S) con valori di DE50 intorno a 1 mg/L di sostanza attiva; il secondo è resistente (R), ovvero fenotipi altamente resistenti a procymidone e solo mediamente resistenti nei confronti di iprodione. L'ultimo fenotipo è resistente 2 (R2), altamente resistenti nei confronti sia di procymidone sia di iprodione (M. C. Giulia Alberoni 2005). Studi condotti nei confronti del fludioxonil, da solo o in miscela, avevano registrato una resistenza incrociata con i dicarbossimidici; fortunatamente, questa si era presentata solo nel fenotipo R2 che è piuttosto raro (D. C. Giulia Alberoni 2010). Si segnala inoltre che l'attenzione alle resistenze ed il ritiro dal commercio di alcuni fitofarmaci hanno creato una situazione di carenza di principi attivi, anche se ne sono subentrati nel mercato di nuovi (Tab. 4).

1.4.4 Le istidine chinasi come target dei fungicidi e resistenza derivata

L'istidina chinasi *SvHK1* funghina fa parte dei sistemi a due componenti che fungono da sensori rilevando gli stimoli extracellulari e conseguentemente modulano l'attività dei domini chinasi citoplasmatici tramite auto-fosforilazione. Solo una delle quattro istidine chinasi (HK) appartenenti al gruppo III presenti nel genoma di *S. vesicarium* (Katia Gazzetti 2019) è stata caratterizzata ed annotata (M. C. Giulia Alberoni 2010b) e depositata in banca dati con l'*accession number* ACH90385-1. La proteina è costituita da 1329 aa, presenta 8 domini con 3 profili distinti su un'unica sequenza (fig.10). I primi 6 domini, in azzurro, rappresentano i domini HAMP. Questi domini, attraverso cascate di fosforilazione, trasmettono i cambiamenti conformazionali provocati dalla presenza di un ligando periplasmatico alla chinasi citoplasmatica. (Aravind e Ponting 1999).

Il settimo dominio, in grigio, rappresenta il profilo della chinasi, formata da 224 aa. Questa proteina presenta un dominio molto variabile ed uno altamente conservato sia tra gli eucarioti che tra i procarioti. A seguito di uno stimolo ambientale la proteina chinasi risponde con l'autofosforilazione di un residuo di istidina, per poi trasferire il gruppo fosfato ad un residuo di aspartato nel dominio del regolatore della risposta

(RR). Questo dominio, in arancio, formato da 120 aa, può, per esempio esser legato al DNA e quindi una volta fosforilato funge da fattore di trascrizione.

I sistemi a due componenti possono conseguentemente regolare una cascata di proteine attivate da mitogeni, ovvero MAP chinasi, che modulano l'espressione genica in diverse vie metaboliche (come la risposta allo stress osmotico od ossidativo).

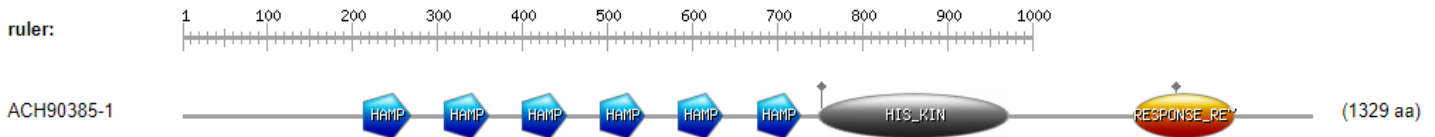


Figura 10: Struttura dell'istidina chinasi fungina ACH90385-1. Ottenuta tramite PROSITE.

Studi recenti hanno evidenziato che sia le dicarbossimidi che i fenilpirroli inducono un accumulo di glicerolo in specie fungine sensibili, suggerendo che questi fungicidi potrebbero interferire con la via di trasduzione del segnale osmotico (Christian Pillonel 1999). Questo determina una serie di fenotipi caratterizzati dal loro grado di resistenza alla dicarbossimide e da aspetti pleiotropici, come la sensibilità osmotica e la resistenza crociata ai fenilpirroli e agli idrocarburi aromatici. Il fenotipo S resistente ha mostrato una transizione nucleotidica che ha portato alla comparsa di una leucina, invece di una fenilalanina, nella posizione 267 della sequenza amminoacidica dell'istidina chinasi. Il fenotipo resistente R1 ha, invece, mostrato una sostituzione di una leucina con una serina nella stessa ripetizione amminoacidica, ma in posizione 290. Il fenotipo resistente R2 non ha mostrato né cambi di amminoacido né alterazioni nucleotidiche rispetto allo stesso sito di R1, ma differenze nel dominio chinasi, in particolare una sostituzione di glutammina in arginina o di treonina in arginina. In *S. vesicarium* le mutazioni che portano alla resistenza alla dicarbossimide dovrebbero quindi essere stabili: saggi competitivi *in vitro* confermano che i ceppi mutati sembrano competitivi quanto quelli non mutati, anche senza la pressione selettiva dei fungicidi. Si presume che queste mutazioni, anche quando sono nella regione *coiled-coil* che nel dominio HK, non causino mai cambiamenti sfavorevoli nella risposta allo stress osmotico e ossidativo e nella *fitness*, rispetto al fenotipo sensibile. I fenotipi resistenti possono, quindi, essere stabili in campo. Inoltre, il loro declino all'interno delle popolazioni può richiedere un lungo periodo di sospensione delle applicazioni di dicarbossimide, soprattutto quando viene selezionato in campo un numero

considerevole di ceppi resistenti. Evitare una selettività forte, utilizzando strategie anti-resistenza, dovrebbe quindi essere una priorità importante per i coltivatori di pere (M. C. Giulia Alberoni 2010b).

1.5 ORGANISMI DI CONTROLLO BIOLOGICO

1.5.1 Cosa sono e perché usarli?

I microrganismi di controllo biologico sono batteri o funghi che portano benefici al suolo e/o alla pianta. Esistono diverse tipologie di microrganismi benefici; ad esempio, nominiamo i BSM (*Beneficial Soil Microorganism*), i PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) e i PGPF (*Plant Growth Promoting Fungi*) (R. K. Jürgen Köhl 2019). Questi organismi garantiscono molteplici benefici, tra cui aumentare la fertilità dei suoli, ridurre gli stress abiotici e biotici delle piante, detossificare e creare matrici complesse che possono favorire la ritenzione dei nutrienti. Microrganismi che colonizzano la pianta competono con i microrganismi patogeni per la sopravvivenza nella stessa nicchia e quindi possono inoltre essere utilizzati come bio-pesticidi. Questi ultimi, come i bio-stimolanti, sono prodotti a base di estratti vegetali, funghi o batteri presenti in natura. Per questo, non provocano danni quali l'inquinamento delle falde acquifere o dell'atmosfera, diminuendo quindi l'impatto delle pratiche agricole sulla salute di esseri umani, piante e animali.

I funghi o batteri utilizzati per impedire infezioni da microrganismi possono agire in due modalità:

- Stimolando il sistema immunitario della pianta attraverso le resistenze sistemiche indotte (ISR)
- Opponendosi ai microrganismi patogeni attraverso la competizione per i nutrienti ed il sito di colonizzazione o attraverso la produzione di molecole antimicrobiche. Questi prendono il nome di "Biological Control Agent" (BCA).

Questa categorizzazione, però, non è vincolante, dato che spesso i microrganismi svolgono entrambe le azioni, fungendo sia da BCA che da induttori del sistema immunitario della pianta. Questi microrganismi possono colonizzare la superficie

radicale, ma anche penetrare nelle parti aeree della pianta. Esistono diversi sistemi di biocontrollo, che si possono raggruppare in base alla loro azione. I meccanismi diretti per esempio si identificano nell'iperparassitismo e l'antibiosi per mezzo di metaboliti antimicrobici.

In modo speculare ai meccanismi diretti esistono anche quelli indiretti. Uno dei più conosciuti è la competizione per i nutrienti e per lo spazio, ovvero il microrganismo che meglio si adatta all'ambiente domina sugli altri perché entra in possesso di più nutrienti. Spesso la lotta per ottenere spazio e nutrimenti sfocia in un fenomeno chiamato "concorrenza". La maggior parte dei patogeni delle piante sono necrotrofi, tuttavia durante alcuni stadi della loro vita vivono come saprofiti sui tessuti vegetali necrotici del suolo. Durante questo stadio dipendono da nutrienti esogeni disponibili nell'ambiente senza aver la possibilità di attaccare e colonizzare organismi vegetali. In questo momento, quindi, possono essere molto vulnerabili in quanto se dovessero mancare i nutrienti non riuscirebbero a crescere e creare le strutture di infezione. I potenziali BCA devono essere in grado di occupare tali nicchie, sopravvivere e consumare rapidamente fonti di nutrienti essenziali per l'infezione da agenti patogeni come zuccheri, pollini ed essudati vegetali sulle superfici delle piante e nei residui vegetali marcescenti in modo che i patogeni non siano in grado di infettare l'ospite non avendo abbastanza nutrienti per svilupparsi (Spadaro 2006).

1.5.2 Funghi come agenti di biocontrollo

I funghi possono avere anche la funzione di agenti di biocontrollo e svolgono la loro azione attraverso diversi sistemi. Tra questi citiamo l'iperparassitismo e l'antibiosi. In particolare, l'iperparassitismo è un'interazione competitiva diretta tra due organismi in cui un organismo infetta l'altro ottenendone nutrimento. Questa modalità è comune tra i funghi, mentre è più rara tra i batteri. (Jeffries 1995). A livello produttivo è conveniente produrre in massa solamente iper-parassiti necrotrofi poiché non ottengono nutrimento solo da cellule ospiti morte ma anche da materia organica comunemente disponibile.

Un fungo molto utilizzato per il biocontrollo, che si è rivelato essere una grande risorsa, è *Trichoderma* in particolare le specie *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. virens* (Asad 2022) (per semplicità parleremo di *Trichoderma sp.*). Questo appartiene alla

famiglia *Hypocreaceae*, i cui funghi manifestano una riproduzione agamica tramite generazione di conidi e svernano per mezzo di clamidiospore, che consistono in tratti ifali ispessiti (Muhammad Usman Ghazanfar 2018).

Tali funghi sono ubiquitari e le loro caratteristiche biologiche e biochimiche sono ormai ben note. Presentano inoltre diversi stili di vita e *habitat*, grazie alla loro strategia trofica costituita da saprofitismo e biotrofismo. La forza di questo genere risiede proprio nel possedere molteplici meccanismi che lo favoriscono nell'utilizzo di diverse fonti di carbonio ed azoto. Questo vanta, inoltre, la capacità di produrre molti composti antimicrobici ed enzimi litici diversi, assicurandosi una nicchia trofica efficiente. Questo fungo manifesta poi un'attività micoparassitica suddivisibile in 4 costituenti (L. Atanasova 2014):

- Attesa della preda (*ambushing*)
- Riconoscimento di quest'ultima (*sensing*)
- Produzione di materiale biochimico per attaccarla (*hunting*)
- Attacco e decomposizione.

Questa specie presenta resistenza a numerose tossine, composti xenobiotici e fungicidi vantando, quindi, efficienti sistemi di detossificazione.

L'applicazione di composti a base di *Trichoderma sp.* genera diversi impatti sulla pianta: a livello morfologico aumenta la lunghezza del germoglio radicale, la biomassa, l'altezza, il numero di foglie e di peli radicali; a livello fisiologico regola positivamente la fotosintesi, conduttanza osmotica, lo scambio di gas, l'assorbimento e l'assimilazione di nutrienti. *Trichoderma sp.* emette inoltre diversi acidi come quello cumarico, glucuronico e citrico, che aiutano l'assimilazione di ioni fosforo, apparentemente inaccessibili nella maggior parte dei terreni. Allo stesso modo aumenta la disponibilità di fosforo, ferro e zinco.

È stato riportato che l'aggiunta di diverse specie di *Trichoderma sp.* nella rizosfera di una pianta ha migliorato la difesa di quest'ultima contro diversi organismi patogeni come virus, batteri e funghi, stimolando l'avvio di diversi meccanismi di resistenza che comprendono principalmente la Resistenza Sistemica Indotta (ISR), la Risposta Ipersensibile (HR) e la Resistenza Sistemica Acquisita (SAR). (Sood 2020)

1.5.3 Batteri come agenti di biocontrollo

Il controllo biologico delle malattie delle piante prevede la soppressione delle popolazioni di patogeni vegetali da parte di altri microrganismi, tra cui anche i batteri. L'applicazione di questi antagonisti prevede *in primis* il loro isolamento e poi la loro produzione ad alta densità su terreni artificiali. I prodotti a base di questi microrganismi possono contenere il batterio vivo oppure solo i metaboliti prodotti dal batterio senza le cellule viventi. A livello di sicurezza ambientale e sanitaria, i primi non presentano un grande problema, poiché la diffusione dei loro metaboliti è regolata dalle condizioni ambientali del luogo che colonizzano; al contrario, l'utilizzo diretto di metaboliti è da tenere in considerazione in quanto si immettono direttamente nell'ambiente molecole potenzialmente dannose in quanto potenziali antibiotici.

Gli agenti di controllo biologico difendono la pianta attraverso diverse modalità d'azione che possono essere di tipo indiretto o diretto rispetto al patogeno (Corné M.J. Pieterse 2014). Anche in questo caso, meccanismi d'azione diretti prevedono fenomeni come l'iperparassitismo, la competizione per le sostanze nutrienti o la produzione di molecole antimicrobiche. Il primo avviene quando i BCA riescono ad invadere e danneggiare il micelio, le spore ed altre strutture biologiche non solo di funghi, ma anche di altri batteri; la secrezione di antibiotici, invece, crea un'area non colonizzabile da altri microrganismi. In particolare, la produzione di metaboliti antimicrobici, per lo più con attività ad ampio spettro, è stata segnalata per batteri di biocontrollo appartenenti principalmente ai generi *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*. In *Bacillus*, sono stati studiati in particolare i lipopeptidi come iturina, surfattina e fengicina (Ongena 2008). L'effetto inibitorio dei metaboliti secondari sulla germinazione delle spore o sulla crescita ifale di funghi fitopatogeni può essere quantificato *in vitro* su terreni nutritivi testando gli effetti dei microrganismi antagonisti coltivati in colture doppie. L'effetto antagonista diretto può derivare dai metaboliti presenti nei surnatanti delle colture di crescita o dai microrganismi stessi.

L'uso di questi microrganismi per il controllo indiretto delle malattie delle piante si basa su una complessa sequenza di eventi nella quale il microrganismo benefico deve inizialmente stabilirsi sull'ospite, trovando le condizioni ideali per la sua crescita. In seguito, viene percepito dalla pianta attraverso recettori specifici che innescheranno

reazioni di difesa rendendola più reattiva in caso di infezione da parte di organismi patogeni (R. K. Jürgen Köhl 2019).

Il mercato globale dei prodotti fitosanitari utilizzati in tutto il mondo per garantire la resa delle colture era stato stimato a 26,7 miliardi di dollari nel 2005 ed i pesticidi assorbono la maggior parte di questo mercato. L'uso di prodotti chimici, però, ha cominciato la sua lenta discesa nel 2000, con l'entrata sul mercato di nuovi prodotti più sicuri e rispettosi dell'ambiente, come i biopesticidi che rappresentavano allora solo il 2,5% delle vendite agricole totali, con un tasso di crescita del 10% annuo (Thakore 2006).

Come menzionato precedentemente, *Agrobacterium*, *Bacillus*, e *Pseudomonas* sono i maggiori MBCA, ma tra questi *Bacillus subtilis* è il microrganismo maggiormente utilizzato. I microrganismi di questo genere essendo in grado di produrre spore, risultando così i migliori candidati per lo sviluppo di biopesticidi. Le spore, infatti, hanno un'elevata resistenza alla scarsa umidità, necessaria per la formulazione dei prodotti (Marc Ongena 2008).

Più recentemente, è stata studiata più nel dettaglio l'ISR indotta da *Bacillus* spp. in relazione alle piante coltivate (Choudhary DK 2008), mettendo così in evidenza i meccanismi e le possibili applicazioni dell'ISR nel controllo biologico dei microrganismi patogeni. Vari ceppi delle specie *Bacillus* sono noti come potenziali elicitori di ISR e mostrano una significativa capacità di riduzione dell'incidenza o della gravità di varie malattie su diversi ospiti (Kloepper JW 2004). Per citare un esempio, nello studio di (Yan 2002) è stata valutata l'induzione dell'ISR da parte di *B. pumilus* SE34 su linee di pomodoro con varie mutazioni nelle vie di trasduzione del segnale di difesa. L'ISR, quindi, è stata indotta nelle linee *NahG*, che convertono l'acido salicilico endogeno, ma non nella linea NR/NR insensibile all'etilene o nella linea *df1/df1* insensibile all'acido jasmonico. Questi risultati sono coerenti con gli studi condotti con diversi ceppi di *Pseudomonas* spp. che mostrano come l'ISR sia tipicamente indipendente dall'acido salicilico (SA), non inducendo quindi l'attivazione dell'espressione del gene *PR1a* che codifica per una proteina di patogenesi, tipico marcatore della via SA-dipendente.

Si ritiene dunque che le piante abbiano la capacità di acquisire un livello maggiore di resistenza ai patogeni dopo essere state esposte a stimoli biotici forniti da molti PGPR e questo è noto come ISR mediata dai rizobatteri (Choudhary et al.2007).

I bacilli hanno dedicato tra il 5 e l'8% del loro genoma alla biosintesi di metaboliti secondari. Tra questi, le molecole più importanti per il biocontrollo sono peptidi, lipopetidi, composti polichetidici, batteriocine e siderofori. I lipopetidi hanno un processo di sintesi molto complesso caratterizzato da sintetasi peptidiche non ribosomiali e grandi complessi enzimatici con struttura modulare. Hanno un ampio spettro di attività antagonista diretta o indiretta contro batteri, funghi e virus patogeni delle piante. A questo gruppo appartengono importanti antibiotici come la bacitracina che ha una forte attività contro altri batteri Gram positivi. Infine, la produzione di questi lipopeptidi contribuisce al movimento mediante *swarming* e alla capacità di formare biofilm, fenomeni indispensabili ai batteri per la colonizzazione di una nicchia ecologica. Lo *swarming*, infatti, è la capacità dei batteri di muoversi in gruppi multicellulari su una superficie solida o semi solida attraverso l'uso dei flagelli e secernendo sostanze tensioattive per ridurre la tensione superficiale (Kearns 2010). Il biofilm, invece, è una matrice extracellulare autoprodotta che incapsula le cellule e ne facilita l'adesione alle superfici (Sofia Arnaouteli 2021). Con l'evoluzione, i batteri hanno sviluppato metodi per inibire la produzione di biofilm di altri batteri per conquistare più spazio e nutrienti. Il *quorum sensing* è un sistema di regolazione trascrizionale dipendente dalla densità cellulare, ovvero un meccanismo che molte cellule batteriche della stessa specie utilizzano per comunicare tra di loro, da questo deriva la produzione di biofilm. L'inibitore di *quorum sensing* (Quorum Sensing Inhibitor, QSI) ideale è una molecola a bassa massa molecolare la cui attività provoca una significativa riduzione dell'espressione dei geni QS-controllati. In secondo luogo, l'inibitore deve avere un alto grado di specificità per il regolatore QS (cioè l'omologo LuxR) senza effetti collaterali tossici né sui batteri né su un eventuale ospite eucariotico (Rasmussen T. B 2005). Una strategia utilizzata è l'inattivazione o la completa degradazione delle molecole segnale generate. Ciò può essere ottenuto con diversi metodi: degradazione chimica, distruzione enzimatica e metabolismo degli acilomoserina lattoni che servono da segnale di attivazione del QS. La lattonolisi degli AHL, cioè apertura dell'anello, può essere ottenuta anche mediante attività enzimatica.

I membri del genere *Bacillus*, inclusi *B. cereus*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis*, producono un enzima, AiiA, specifico per la degradazione degli AHL (Lee S. J 2002). L'attività di questi enzimi riduce la quantità di molecole segnale AHL bioattive catalizzando la reazione di apertura dell'anello e bloccando la produzione di biofilm (Thomas B. Rasmussen 2006).

Le batteriocine, invece, sono peptidi sintetizzati per via ribosomiale con attività antimicrobica. Queste sono piccole proteine anfifiliche termostabili che agiscono contro le cellule bersaglio, principalmente attraverso l'interazione con l'involucro cellulare (Djordje Fira 2018).

1.5.4 Sostanze bioattive contro patologie fungine

Gli estratti vegetali sono una valida alternativa alle molecole sintetiche, in quanto costituiscono un'importante fonte di sostanze bioattive con attività fungicida. Queste sostanze sono spesso attive contro un numero limitato di specie bersaglio specifiche, ma sono biodegradabili in prodotti non tossici e potenzialmente adatte all'uso in programmi di gestione integrata (Moo-key Kim 2003).

Dato il grande ventaglio di sostanze bioattive presenti sul mercato, in questo resoconto ne verranno prese in considerazione solo tre: curcumina, epiagalocatechina-gallato e quercetina.

La curcumina (fig.11) è un composto fenolico naturale ottenuto dalla *Curcuma longa*, usata comunemente come colorante e spezia.

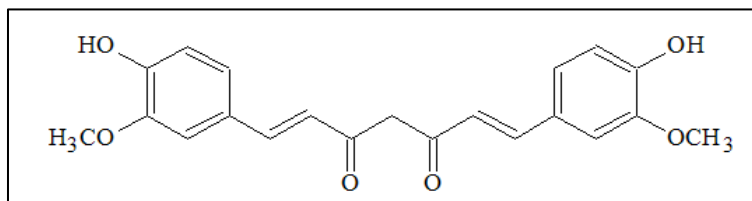


Figura 11: Struttura della curcumina

Questa sostanza non viene tenuta in considerazione solo nell'ambito agricolo, ma anche in quello medico, poiché è un promettente agente terapeutico grazie al suo potere antiossidante, antiinfiammatorio, antimicrobico ed antitumorale. La scelta della curcumina come sostanza bioattiva contro *S. vesicarium* è nata dalla scoperta che diversi funghi fitopatogeni, come *Alternaria alternata*, presentano una spiccata sensibilità verso questa sostanza (Kim 2003). Diverse prove di laboratorio hanno

evidenziato come la curcumina promuova l'accumulo di ROS in *B. cinerea* in modo dose-dipendente, così come l'alterazione delle concentrazioni di potassio questo suggerisce, che la permeabilità della membrana cellulare venga o sia modificata dalla curcumina (Hua 2019).

Un'altra promettente molecola è l'epigallocatechina-gallato (fig.12 A), un polifenolo che si trova nel tè verde e che ha un effetto antimicrobico contro i batteri orali, intestinali e di origine alimentare. Ben nota è la sua attività antimicotica contro *Candida albicans*, in particolare se abbinata ad agenti antimicotici di sintesi (Bong Joo Park 2011). Recentemente è stata studiata l'applicazione del tè verde per diminuire l'incidenza del marciume molle delle carote, causato da *Pectobacterium*

spp. Questi trattamenti hanno evidenziato un basso grado di macerazione e perdite contenute di elettroliti, con un mantenimento elevato di beta-carotene (Manoharan Melvin Joe 2017).

Infine, la quercetina (fig. 12 B) fa parte del gruppo dei flavonoidi ed è conosciuta per essere un comune metabolita secondario nelle piante superiori come cipolla e broccoli. Questa molecola presenta uno spiccato carattere antiossidante, dato dalla presenza della sostituzione dell'idrossile (-OH) e dell'anello B di tipo catecolico. Queste caratteristiche chimiche permettono alla molecola di avere potere anticancerogeno e antiinfiammatorio. (Senay Ozgen 2016)

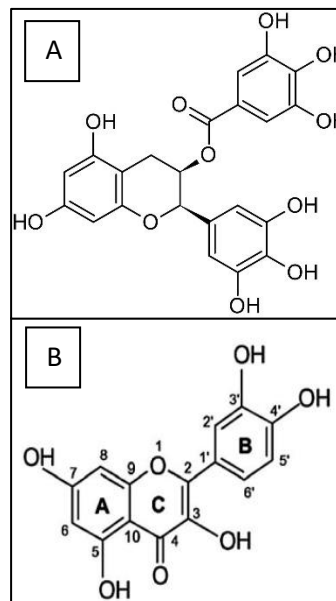


Figura 12: A) Struttura dell'epigallocatechin gallato (da abcam). B) Struttura quercetina da (Senay Ozgen 2016)

2 SCOPO DELLA TESI

La macula bruna della pera è una patologia di interesse economico in particolare per l'Europa, anche se negli ultimi anni sono stati segnalati casi in Giappone ed America. Le pratiche agronomiche fino ad ora utilizzate per contrastare questo patogeno, pur avendo diminuito in alcuni casi l'incidenza della malattia, non hanno ancora dato risultati soddisfacenti a fronte delle perdite attuali di raccolto. Anche la ricerca scientifica in questo campo è ancora acerba sia sulla biologia del patogeno che sulle modalità con cui infetta la pianta.

Pertanto, il primo obiettivo di questo lavoro di tesi, nato dalla collaborazione tra l'azienda Symbiagro s.r.l e l'Università degli studi di Verona, è quello di valutare in campo due strategie di controllo della malattia, ovvero i) un trattamento a base di *Trichoderma sp.*, noto agente di biocontrollo, e ii) un trattamento a base di estratto vegetale. Prendendo in considerazione la conta delle spore aeree di *S. vesicarium*, nonché la frequenza di comparsa di macchie necrotiche e la percentuale di necrosi su frutti e foglie, rispettivamente, si è voluto così valutare l'efficacia di biofungicidi sviluppati dall'azienda per capire in quale punto del ciclo di patogenicità andranno ad agire. I dati così ottenuti dovrebbero consentire di sviluppare un piano di lotta integrata funzionale alle caratteristiche del prodotto migliorandone anche la formulazione in base alle evidenze sperimentali derivanti dai test in campo.

Il secondo obiettivo che questa tesi si propone di raggiungere è quello di individuare ed isolare il patogeno presente nel campo sperimentale. Individuare il patogeno autoctono risulta di fondamentale importanza in quanto, rispetto ad un ceppo acquistato, potrebbe presentare caratteristiche differenti. Inoltre, valutare la sua presenza in gemme invernali potrebbe portare ad una rivalutazione delle pratiche agricole che fino ad ora hanno indirizzato tutto l'interesse al trattamento del cotico erboso. Inoltre, contemporaneamente, verranno isolati ed identificati potenziali organismi di controllo biologico, provenienti da campioni dello stesso areale, che verranno valutati tramite test *in vitro*. L'isolamento di ceppi indigeni, infatti, permette di ottenere un *pool* di microrganismi che sono già adattati all'ambiente di riferimento, aumentando così l'efficacia contro i microrganismi patogeni, grazie ad una capacità di colonizzazione maggiore rispetto ai ceppi non autoctoni.

Oltre allo screening di BCA è stata valutata anche l'attività dei fungicidi usati in campo contro *S.vesicarium* attraverso lo sviluppo di antibiogrammi. Grazie a questi dati sarà possibile valutare, almeno *in vitro*, l'efficacia dei fungicidi, utilizzati per il controllo del patogeno, rispetto a prodotti di nuova generazione, valutando anche diverse molecole derivanti da estratti vegetali.

Infine, il lavoro verrà completato con l'analisi *in silico* di alcuni geni noti per il loro ruolo nella patogenicità/virulenza fungina in modo da preparare il campo a future analisi volte a migliorare le conoscenze relative alle modalità di infezione.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Trattamenti in campo

Tra aprile ed agosto sono stati effettuati in campo due trattamenti sperimentali contro la macula bruna del pero utilizzando prodotti in fase di sviluppo dell'azienda Symbiagro s.r.l. Sono stati valutati due prodotti: uno a base di *Trichoderma* ed uno contenente un particolare stratto vegetale. Il campo si trova a Castelletto, in provincia di Brescia (Fig.13). Il proprietario, Azienda Agricola Ortofrutticola Malleier, ha fornito 143 piante di pero (Fig. 14. A), cultivar Abate Fétel. Il filare confina ad Est con alberi di mele,



Figura 13: Foto satellitare del pereto di Castelletto (BS). Da: Google Earth

ad Ovest con altri alberi di pere abate, a Nord con un canale idrico ed un muro che lo divide dalle abitazioni, mentre a Sud non ha ostacoli ed ha campo libero. Il filare sperimentale si trova nel punto più lontano dal canale e dal muro, in modo tale da non aver dati influenzati dall'aumento di umidità derivante dalla vicinanza del corso d'acqua. L'area del campo è 8440 m². Il filare utilizzato per i test si distende per 164,83 metri. Questo è stato diviso in 23 sezioni o parcelle da 7 metri l'una delimitate da un palo in cemento. Si è deciso di utilizzare tre parcelle per ogni trattamento, in modo da avere un triplicato, ma solo due per il non trattato, a causa della non disponibilità di ulteriori sezioni. Il resto del campo è stato considerato come controllo, cioè segue il normale *iter* di trattamento del pereto. L'esperimento prevede l'utilizzo dei prodotti Symbiagro in sostituzione ai fungicidi usati contro la macula bruna del pero, tutti gli altri trattamenti verranno svolti come in tutto il resto del campo. Le parcelle non trattate sono porzioni di pereto dove non vengono applicati i fungicidi contro *S. vesicarium*

Trattamenti	Controllo	Non trattato	Trattato 1	Trattato 2
Fungicidi specifici per <i>S.vesicarium</i>	+	-	-	-
Trattamenti routinari	+	+	+	+
Trattamento con <i>Trichoderma spp.</i>	-	-	+	-
Trattamento con estratto vegetale	-	-	-	+

Tabella 5: Piano sperimentale dei trattamenti in campo. Per trattamenti routinari si intendono tutti i trattamenti che normalmente vengono fatti compresi anche i fungicidi ma per altre malattie

(Tab.5). I trattamenti sono stati eseguiti manualmente con una pompa a spalle una volta a settimana, da inizio marzo fino a fine luglio. La pompa a spalle è stata accuratamente lavata ad ogni cambio di trattamento. I prodotti sono stati nebulizzati su foglie e frutti. La formulazione del prodotto a base di *Trichoderma*, infatti, è stata concepita per dare una particolare densità al preparato, per testare come si sarebbe comportato a livello epifitico, rispetto alle classiche applicazioni sul cotico. Utilizzando un codice colore le parcelle sono state divise nel seguente modo:

- Rosso: non trattato o testimone
- Giallo: botanicals
- Verde: prodotto a base di *Trichoderma*

Il campo presenta un sistema di irrigazione a goccia (fig. 14.B) ed un sistema rompi brina che viene attivato ogni 15 giorni per 7/8 ore attraverso un sistema di nebulizzazione. Il cotico del pereto viene tagliato ogni due settimane circa e verso la stagione primaverile/estiva vengono aperte le reti anti-grandine. Attraverso la Rete

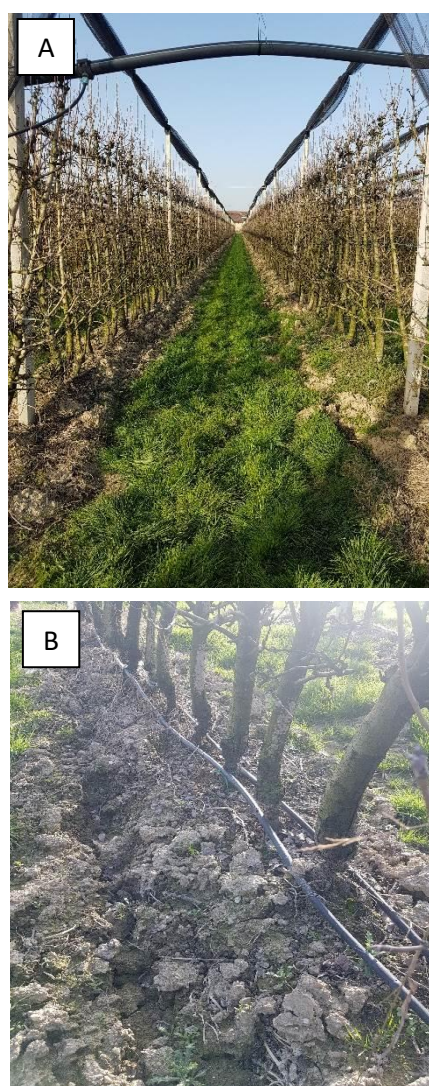


Figura 14: A) Filare di pere del campo di Castelletto (BS). B) Impianto di irrigazione a goccia.

agrometeorologica provincia di Brescia è stato fornito un collegamento ad una stazione che dista circa un km ed ha fornito dati come la temperatura media, umidità relativa, bagnatura fogliare oraria e dati pluviometrici.

3.1.1 Cattura delle spore

Per valutare la quantità di spore nell'aria è stato utilizzato un metodo gravimetrico che consiste di un vetrino dotato di girandola (Fig. 15), per essere indirizzato in base al vento. Questo viene coperto da uno strato sottilissimo di grasso di vaselina tecnica (CFG) ed installato a 30 centimetri (Fig. 16) dal suolo per una settimana. Per ogni trattamento sono stati installati 3 vetrini, uno per parcella per un totale di 12 vetrini, che, a fine settimana, sono stati analizzati al microscopio ottico ad ingrandimento 10x. Questo metodo è simile al metodo Durham del 1946 ma con delle modifiche: la soluzione utilizzata per coprire il vetrino proviene da una soluzione di stock con caratteristiche in linea alle esigenze di questo campionamento e il vetrino viene letto ogni 7 giorni. Ovviamente questo metodo ha dei limiti cioè che non può valutare il volume d'aria campionato o calcolare la concentrazione nell'aria delle particelle campionate. (Vittorio Rossi 2007)

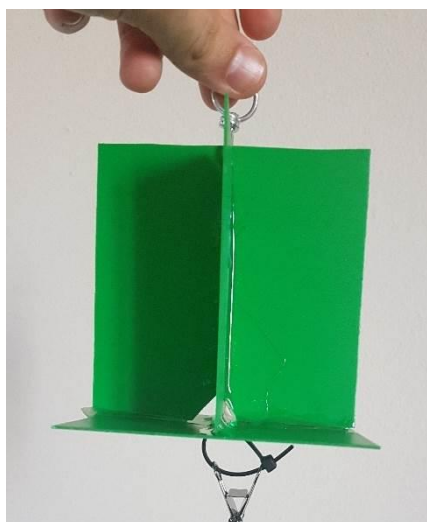


Figura 15: Supporto vetrino capta spore



Figura 16: Capta-spore posizionato a 30 cm da terra

3.1.2 Conteggio spore

I vetrini di campionamento sono stati trasportati dal campo al laboratorio in un contenitore costruito appositamente per far sì che questi non si toccassero andando a contaminarsi vicendevolmente (Fig. 17).

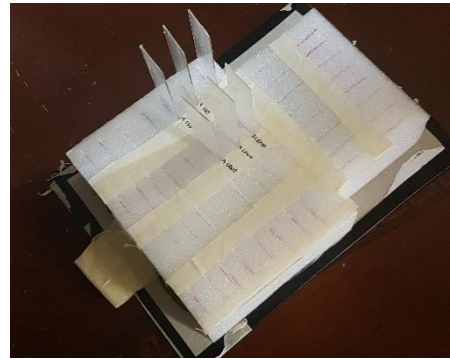


Figura 17: Porta vetrini

I vetrini sono stati letti con il metodo dei campi tangenti (Fig. 18). Il vetrino è stato diviso nel seguente modo:

- La parte del vetrino che era a contatto con il gancio a molla è stata adibita ad etichetta.
- Al centro del vetrino è stato disegnato un rettangolo di conta diviso in 4 parti ognuna di queste larga al pari del campo dell'oculare.

Il conteggio per campi tangenti permette di esaminare un certo numero di aree circolari tangenti fra loro e disposte su tutta la lunghezza della strisciata. Il numero dei campi deve permettere di ottenere una superficie di lettura almeno del 15% (ISPRA 2015).

Sono state contate quindi due linee continue utilizzando un ingrandimento 10X e



Figura 18: Rappresentazione grafica della struttura del vetrino e dei metodi di lettura. (ARPAT)

contando sia le spore di *Stemphylium* che di *Alternaria*. Per riconoscere le spore di *Stemphylium* è stata utilizzata la descrizione riportata nell'articolo di (Llorente & Montesinos, 2006) e delle immagini del (ARPAT s.d.).

3.1.3 Sviluppo BSPcast

Il BSP-Cast è un modello di tipo empirico in grado di determinare quando le condizioni ambientali risultano favorevoli per lo sviluppo dell'infezione da *S. vesicarium* e della malattia. Il modello previsionale elaborato sulla base di questi parametri è stato validato sia in Italia che in Spagna nel biennio 1993-1994 (E. M. Montesinos 1995). Ulteriori validazioni sono state effettuate in Italia e in Spagna in 11 sperimentazioni dal 1995 al 1997 (V. P. Llorente I. 2000). Il modello come input presenta la durata di bagnatura fogliare (W) e temperatura media (T) a partire dalle ore 08.00 fino alle ore 08.00 del giorno successivo, restituendo un valore di gravità della malattia secondo l'equazione:

$$\log_{10}(S)=f(T, W) \quad \text{(Equazione 1)}$$

Si può calcolare quindi un indice di rischio (R) che varia da 0 a 1, viene calcolato dividendo il risultato dell'equazione (1) per il valore di gravità massimo ottenibile ai valori ottimali di bagnatura e temperatura (pari a 3.7942).

$$\text{Indice di rischio (R)} = S/3.7942 \quad \text{(Equazione 2)}$$

Il CR, ovvero l'indice di rischio cumulato, viene calcolato sommando i valori R degli ultimi 3 giorni. Tale indice viene utilizzato come soglia di intervento per i trattamenti. I parametri R e CR vengono calcolati giornalmente. Il momento più opportuno per iniziare la consultazione ricade nel periodo di aprile - maggio in cui le piante cominciano ad essere maggiormente suscettibili alla malattia.

Il modello BSP-Cast può risultare utile per evidenziare i periodi a basso rischio e quindi aumentare l'intervallo tra un trattamento e il successivo.

Le soglie di intervento migliori, in grado quindi di ridurre il numero di trattamenti mantenendo al contempo inalterata la resa produttiva, oscillano tra il valore 0.4 e 0.5.

Il maggiore limite del modello è rappresentato dalla mancanza di efficaci sostanze attive (s.a.) ad azione curativa contro la macula bruna. Ciò nonostante, le prove sperimentali hanno dimostrato l'efficacia dell'utilizzo del modello previsionale anche con le s.a. oggi disponibili. (Regione Emilia-Romagna 2012)

3.2 Isolamento *Stemphylium vesicarium*

Per isolare *S. vesicarium* sono stati raccolti dal campo di Castelletto, nel mese di marzo, diversi campioni come: ramoscelli, gemme, cotico e foglie per cercare di identificare in modo precoce il fungo. Nei mesi tra giugno e settembre, invece, sono stati raccolti campioni di pere infette.

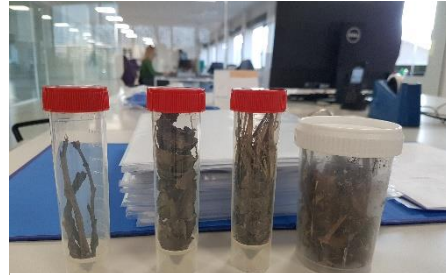


Figura 19: Da 50 ml contenenti i campioni presi dal campo

Durante il primo campionamento, quello di marzo, i campioni sono stati raccolti e conservati separatamente in tubi da 50 ml (fig. 19). Una volta portati in laboratorio sono stati disinfettati sotto cappa biologica secondo il seguente protocollo:

- i campioni vengono scelti e tagliati con un bisturi per formare pezzi più piccoli.
- Primo lavaggio di 5' in candeggina diluita 1 a 3
- Tre lavaggi di 3' in acqua distillata sterile
- I campioni poi vengono piastrati in PDA (potato dextrose agar). La piastratura viene fatta sia mettendo direttamente un pezzo di campione su PDA, sia strisciando il campione. (fig. 20.A)
- Il campione viene poi incubato a temperatura ambiente (22°C c.a) in sacchetti di plastica per mantenere l'umidità

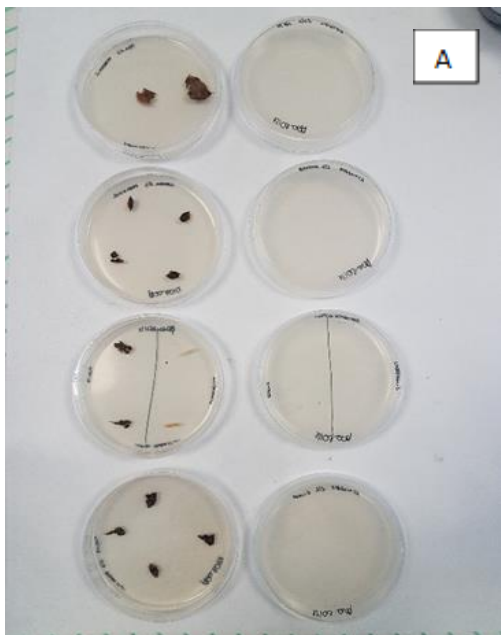


Figura 20: Piastre di campioni su PDA. A) campioni al momento della piastratura. B) Dopo una settimana di crescita.

Dopo una settimana di crescita (fig 20. B) i funghi sono stati re-isolati, prelevando colonie singole e seminandole nuovamente su PDA (39g/l, codice: 70139, prodotto da Sigma-Aldrich).

Durante il mese di settembre sono stati raccolti campioni di pere infette. L'isolamento è stato effettuato presso l'Università degli studi di Verona nei laboratori di Patologia Vegetale. Le pere raccolte sono state disinfettate (Fig. 21) con

metodo descritto in precedenza. Con un bisturi sterile si è andati ad asportare un cubo, con lati di 0,5 cm, dal perimetro della zona della macchia prodotta da *Stemphylium*, poiché nel centro, nero, si crea una zona necrotica che potrebbe esser stata colonizzata da altri microrganismi saprofiti. La piastra viene messa a temperatura ambiente con 12h di luce e 12h di buio per circa 10 giorni. Quando il fungo raggiunge un diametro di circa 9 centimetri viene ripropagato su un'altra piastra di PDA. La ripropagazione avviene tagliando con un bisturi sterile un cubo di pochi millimetri (Fig. 22) che comprenda un quarto, circa, di bordo del fungo e tre quarti di PDA pulito. Il pezzetto di PDA così ottenuto viene posto al centro di una nuova piastra. (Fig. 23)



Figura 21: Pere preparate per essere disinfettate



Figura 23: Ripropagazione del fungo tramite bisturi

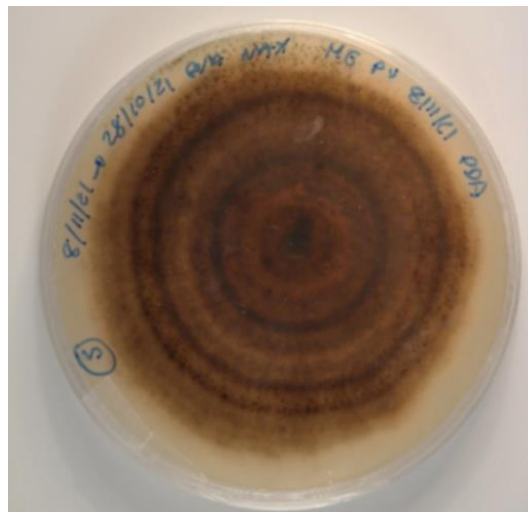


Figura 22: Piastra 10 giorni dopo la ripropagazione

3.2.1 Estrazione DNA di *Stemphylium vesicarium*

Lo scopo dell'estrazione di DNA dal fungo è quello di ottenere del DNA genomico su cui effettuare una PCR (*polymerase chain reaction*) per stabilire l'identità del fungo. L'estrazione del DNA da funghi è stata eseguita in due diverse modalità: nei laboratori Symbiagro attraverso il kit NucleoSpinR Microbial DNA e nei laboratori universitari attraverso la messa a punto di un protocollo.

Kit NucleoSpinR Microbial DNA:

La coltura fungina viene centrifugata in una eppendorf cercando di ottenere un pellet con un peso umido di circa 40 mg massimo, per essere usato come materiale campione. Viene scartato il surnatante. Si aggiungono 100 µl di tampone di eluizione BE per risospendere le cellule.

La sospensione cellulare viene trasferita nel NucleoSpin® Bead Tube Type C per lisare il campione. Si Aggiungono 40 µl di Buffer MG, successivamente 10 µl di Liquid Proteinase K e si chiude il Tube. Viene agitato il NucleoSpin® Bead Tube per 12 minuti sul vortex alla frequenza massima di 30 Hertz.

Centrifugare NucleoSpin® Bead Tube per 30 s a 11.000 x g per pulire il coperchio.

Si aggiustano le condizioni di legame al DNA aggiungendo 600 µl di Buffer MG e vortex per 3s dopo di che si centrifuga per 30 secondi a 11.000 x g.

Si trasferire il surnatante sul NucleoSpin® Microbial DNA Column, collocato in un Collection Tube di 2 ml. Questo permette il legame del DNA estratto alla colonna. Si centrifuga per 30 secondi a 11.000 x g, dopo di che si vuota il Collection e si mette il NucleoSpin® Microbial DNA Column in un nuovo Collection Tube di 2 ml

Lavare la membrana di silice:

1. 1 ° lavaggio: Aggiungere 500 µl di Buffer BW. Centrifugare per 30 s a 11.000 x g. Svotare il Collection tube e riattaccarlo al NucleoSpin® Microbial DNA Column.
2. 2 ° lavaggio: Aggiungere 500 µl di Buffer B5 alla colonna e centrifugare per 30 s a 11.000 x g. Svotare il Collection tube e riattaccarlo al NucleoSpin® Microbial DNA Column.

Per asciugare la membrana si centrifuga la colonna per 30 secondi a 11.000 x g.

Si posiziona la NucleoSpin® Microbial DNA Column in un'epENDORF nucleasi-free da 1,5 ml (non fornita) e aggiungere 100 µl di Buffer BE alla colonna per eluire. Incubare a T ambiente per 1 minuto e centrifugare per 30 s a 11.000 x g.

Estrazione di DNA genomico tramite protocollo modificato

Per l'estrazione del DNA fungino è stato seguito il protocollo proposto da (Abbas Nasehi 2014) con l'apporto di una modifica. La modifica che è stata introdotta nasce dall'esigenza di frantumare ulteriormente le membrane del fungo per avere una miglior performance di estrazione del DNA.

L'Extraction Buffer è composto da 3% di SDS, 0,5 mM di EDTA, 1M di NaCl e 0,1 mM di Tris-HCl pH 8.0.

La cattura del micelio avviene bagnando il fungo con una soluzione di H₂O distillata e tween 80 allo 0.05%. La superficie del fungo viene grattata con un'ansa sterile. La sospensione ottenuta viene trasferita in un'epENDORF da 1,5 ml e centrifugata a 3000 g per 5'. Il pellet ottenuto, scartando il supernatante, può essere utilizzato subito o conservato a -80°C.

Si aggiungono 200 µl di EB a 10ng di sospensione di micelio e si vortexa 15 secondi. Si aggiunge, in seguito, 200 µl di Fenolo/cloroformio (1:1) e si pone il campione a 65°C per 5'. Una volta riportato a temperatura ambiente si centrifuga a freddo (4°C) per 5' a 10'000g. Il supernatante viene trasferito in un nuovo tubo al quale viene aggiunto un uguale volume di etanolo puro e si mescola bene. Si pone il campione a -20°C per 20'. Dopo questa fase si centrifuga il campione a 4°C per 10' a 10'000 g. A questo punto avvengono due lavaggi con 500 µl di etanolo al 75% freddo seguiti da una centrifuga a 10'000 g per 5'. Infine, il pellet viene risospeso in 30 µl di acqua milliQ.

3.2.2 Amplificazione di DNA attraverso PCR Reaction

Per identificare a livello molecolare i campioni raccolti sono state eseguite delle PCR. Nei laboratori Symbiagro come polimerasi è stata utilizzata una Invitrogen™ Platinum™ II Taq Hot-Start DNA Polymerase che è una Taq DNA polimerasi ingegnerizzata. Questa mostra una maggiore resistenza agli inibitori della reazione provenienti da materiale campione o da step di purificazione del DNA. L'attività della

polimerasi è bloccata a temperatura ambiente e si riattiva dopo la fase iniziale di denaturazione a 94 °C. Questo “Hot start” automatico fornisce maggiore sensibilità, specificità e resa, mentre consente il montaggio della reazione a temperatura ambiente. A causa della composizione unica del Platinum™ II PCR buffer, la temperatura di annealing è di 60 °C. La Platinum™ II Taq DNA Polymerase si estende per 1 kb in 15 secondi. La fase di estensione può essere prolungata senza effetti negativi sulla specificità.

Sono stati utilizzati diversi primers in base alla necessità:

Per amplificare il gene 16S dei batteri sono stati utilizzati i primer (Magalhães Cruz L 2001):

- fY1 → 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'
- rY3 → 5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3'

Amplificano a 1487pb. Con le seguenti condizioni:

Step	Temperatura	Tempo	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	94°C	2 m	1
Denaturazione	94°C	15 s	35
Annealing	60°C	15 s	
Estensione	68°C	30 s	
Conservazione	4°C	infinito	

Per amplificare gli ITS (Internal transcribed spacer) dei funghi (Tony Vancov 2009):

- ITS1F → 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA-3'
- ITS4R → 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Amplificano un frammento tra le 500 e le 600 pb. Con le seguenti condizioni:

Step	Temperatura	Tempo	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	95°C	5m	1
Denaturazione	94°C	30s	35
Annealing	52°C	30s	
Estensione	72°C	1m	
Estensione finale	72°C	8m	
Conservazione	4°C	infinito	

Per identificare il fungo come *Stemphilym vesicarium*: ci siamo avvalsi dell'articolo (S. T. Koike 2013) utilizzando i primer:

- Gdp_er-Fw → GCCAAGCAGTTGGTTGTG
- Gdp_intU → CGC GGC GGT TGG AGG CCA TTT

Il prodotto di amplificazione ha una dimensione di 399 pb.

Step	Temperatura	Tempo	Ripetizioni
Denaturazione iniziale	94°C	5m	1
Denaturazione	94°C	30s	35
Annealing	57°C	1m	
Estensione	72°C	1.5m	
Estensione finale	72°C	3m	
Conservazione	4°C	infinito	

La specificità dei primer è stata testata prima *in-silico* con Primer-BLAST. La presenza di SNPs è stata risolta allineando i primer con il software Multialin sul genoma di *S. vesicarium* recentemente sequenziato (K. D. Gazzetti 2019).

3.2.3 Valutazione della presenza di *S. vesicarium* in gemme invernali

Durante il mese di febbraio 2022 sono state campionate dal campo di Castelletto gemme provenienti dalle diverse parcelle. Il campionamento è stato randomizzato raccogliendo gemme nella parte alta, media e bassa di ogni parcella e creando un sacchetto diverso per ogni trattamento. In laboratorio dai quattro pool di gemme, rappresentanti i trattamenti, sono state pescate casualmente e triturate in un mortaio con azoto liquido per estrarre il DNA genomico. Dopo di che sono stati raccolti 250 mg di campione in un tubo da 2ml. Al campione sono stati aggiunti 1ml di buffer. Il buffer è stato creato precedentemente preparando Tris-HCL Ph8 100Mm, EDTA Ph8 10Mm, NaCl 1,4 M, CTAB 3,5%, PVP 1,50% e beta-mercaptoetanol 1,50%. Una volta miscelato bene buffer e campione, la soluzione viene fatta scaldare a 65°C per trenta minuti, mescolando ogni dieci minuti i campioni. Finita l'incubazione il procedimento è il seguente: aggiungere 800µl di cloroformio, miscelare vigorosamente e centrifugare alla massima velocità per dieci minuti. Togliere il super natante, quantificarlo in un nuovo tubo, aggiungere la stessa quantità di cloroformio e centrifugarlo per 10 minuti alla massima velocità. Separare di nuovo il super natante ed aggiungere 0.7 volumi di isopropanolo 100%. Incubare per due ore a -20°C. Dopo di che centrifugare a 13.000 rpm per quindici minuti a 4°C. eliminare il super natante ed aggiungere 400µl di ETOH 75% e centrifugare a 6000 rpm per dieci minuti. I campioni vengono lasciati sotto cappa per far sciugare l'ETOH. Risospendere il campione in Tris-HCL 100mM ed EDTA 1Mm. Dopo di che viene eseguito il

trattamento RNAsico. Si aggiungono 1µl di RNAsi A 1mg/ml ogni 10 µl di campione. I campioni vengono incubati a 37°C per trenta minuti.

In seguito, è stata eseguita una PCR sul DNA genomico precedentemente estratto utilizzando due coppie di primer: GDP-er e GDP-intU e SVHKFw (5'-TAA GGA ATA CGG CAG CCA GGG AAG C-3') e SVHKRe (5'-CGA GAA CGG AAT CTC CTC CAT GAC C-3') (M. C. Giulia Alberoni 2010b). La corsa elettroforetica è stata eseguita su un gel di agarosio al 2%.

3.2.4 Purificazione campioni

I campioni vengono fatti correre su un blocco di gel di agarosio all' 1,5% e TAE 1X. Attraverso l'elettroforesi i campioni, dopo esser stati inseriti in un pozzetto del gel, corrono verso il polo positivo. Finita la corsa dei campioni sul gel, questi vengono letti al trans-illuminatore UV ed eventualmente, processati per il loro sequenziamento. La purificazione dei campioni avviene con l'ausilio del Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up che consente di purificare frammenti di DNA ottenuti con reazioni di PCR ma anche da campioni in gel di agarosio. Nel caso in cui dall'amplificato siano presenti più bande, è necessario individuare la banda di interesse al trans-illuminatore e tagliarla con un bisturi. Una volta tagliato il gel in eccesso si solubilizza il campione. Per ogni 100 mg di agarosio sono stati aggiunti 200 µl di Buffer NT1. Il campione viene incubato per 5/10 minuti a 50°C vortexandolo ogni 2/3 minuti fino a quando è completamente sciolto. Viene inserito il NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column nel Collection Tube (2 ml) e caricati fino a 700 µl di campione. Centrifugare per 30 secondi a 11'000 x g. Il refluo viene scartato e la colonna viene riposta nella provetta di raccolta. Caricare il campione rimanente se necessario e ripetere la fase di centrifugazione. Per lavare la membrana di silice si aggiungono 700 µL di Buffer NT3 al NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifugare per 30 secondi a 11'000 x g. Scartare il refluo e rimettere la colonna nel tubo di raccolta. L'asciugatura della membrana di silice avviene attraverso la centrifuga di 1 minuto a 11'000 x g per rimuovere il Buffer NT3 completamente. Il DNA puro viene eluito in condizioni di bassa salinità con un tampone di eluizione leggermente alcalino NE (5 mM Tris / HCl, pH 8,5). Il servizio di sequenziamento avviene presso un ente esterno, Microsynth-SeqLab. Per ottenere un sequenziamento di qualità è necessario garantire 18 ng di

amplificato per ogni 100 bp. Una volta sequenziato il campione si legge attraverso il software programma DNASTar, Lasergene.

3.3 Screening BCA

Le competizioni in vitro sono esperimenti che hanno come scopo dimostrare la capacità di un organismo rispetto ad un altro/i di colonizzare un'area. Il terreno deve essere ottimale per tutti i microrganismi presenti su di esso. Nei laboratori Symbiagro si è voluta testare l'efficacia di batteri che sono stati isolati durante l'isolamento di *S. vesicarium* da campo. La loro efficacia è stata testata su di un ceppo di *S. vesicarium* acquistato, MUCL3822, derivante dalla micoteca "Belgian Coordinated Collection of Microorganism BCCM/MUCL Agro-food & Environmental Fungal Collection". Le piastre di PDA (39g/l, codice: 70139, prodotto da Sigma-Aldrich) sono state divise in due: da un lato sono stati piastrati 50 µl di un microrganismo e dall'altro lato 50 µl di *S. vesicarium*. I 50 µl sono stati prelevati, utilizzando una spatola sterile, direttamente da piastre fresche dove è stato fatto crescere il microrganismo. Le piastre sono state fatte crescere a 22°C con 12h di luce e 12h di buio per circa una settimana/dieci giorni. Il risultato è di tipo qualitativo perché i fattori che sono presenti in piastra sono minimizzati rispetto a fattori che possono presentarsi in campo aperto. Nei laboratori dell'Università si è cercato di mettere a punto un metodo che potesse gettare le basi per individuare una migliore strategia per saggiare il potere di biocontrollo dei BCA. I batteri C1N9, C2N9 e C2N5 (C identifica uno dei tre campionamenti, mentre N il numero del ceppo isolato da ogni campionamento) sono stati fatti crescere da stab in terreno LB liquido, la cui composizione in g/l prevede 10g di tryptone, 5g di estratto di lievito e 10g di NaCl, la soluzione deve esser portata a pH 7.5 dopo di che si aggiungono 15g di Agar. I campioni vengono lasciati a 28°C in agitazione *over night*. Dopo di che sono stati centrifugati per cinque minuti a 4500 rpm ed il supernatante è stato scartato. Il pellet batterico è stato risospeso in 4 ml di LB liquido. La concentrazione desiderata di colonie è di 2×10^8 cfu/ml, quindi, i batteri vengono preparati all'OD 0,4. In seguito, viene preparata piastra di PDA poi forata in quattro punti egualmente distanti dal centro 2,5 cm (Fig. 24). I fori sono stati eseguiti con un fora-tappi sterile di 0.6 cm di diametro. In due fori è stato inserito 50 µl di campione

batterico, negli altri due il terreno LB liquido come controllo, ed al centro viene messo il fungo prelevato come disco miceliare di 0.6cm da una piastra “fresca” in crescita attiva (Jing Chen 2021). Le piastre sono state incubate a 20°C per 10 giorni con 12 ore di luce e 12 di buio ed alta umidità.

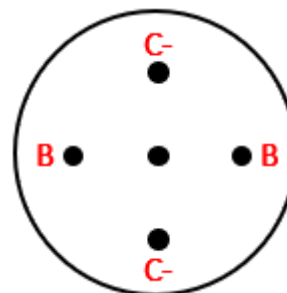


Figura 24: Design della piastra per il posizionamento die campioni. B identifica i pozzetti contenenti il controllo. T identifica i pozzetti contenenti il trattamento.

3.4 Antibiogrammi

Lo scopo degli antibiogrammi è quello di valutare quanto un microrganismo sia resistente o meno ad una data molecola o farmaco/fitofarmaco. La procedura prevede la preparazione di un terreno adatto al microrganismo che si vuole studiare. Una volta seminato il microrganismo in piastra, questa viene divisa in tante sezioni quanti sono i principi attivi che si vogliono studiare, per un massimo di quattro. Ogni sezione ospiterà un dischetto di carta sterile sul quale verranno depositati 10 µl del principio attivo che si vuole valutare. Il tutto si va ad incubare alla temperatura e tempo adeguati in base al microrganismo. Per il test contro *S. vesicarium* sono stati scelti sette prodotti formati da sette principi attivi diversi. Cinque di questi prodotti sono commerciali (Vision +, Nandomaxi, Bellis, Syllit 65 e Sercadis) e due sono prodotti di Symbiagro s.r.l (Sybiagro *Trichoderma* e Symbiagro estratto vegetale). I quantitativi di utilizzo consigliati dei prodotti commerciali sono stati rapportati per esser utilizzati in 100 ml. Dati per ogni fungicida sono riportati in tabella 6.

Nome	Quantitativo consigliato	Quantitativo per 100ml
Vision +	1,2 l/ha	0,12 µl
Nandomaxi	100 ml/hl	100 µl
Bellis	0,8 kg/ha	0,08µl
Syllit 65	120 g/Hl	0.12µl
Sercadis	300 ml/ha	30µl
Symbiagro <i>Trichoderma</i>	5 g/l	0,5 µl
Symbiagro estratto vegetale	7 g/l	0,7g

Tabella 6: Quantitativo di fungicida utilizzato in 100ml

3.5 Valutazione dell'efficacia di diverse molecole vegetali

Per testare molecole vegetali come quercetina, epigallocatechina gallato (EGCG), curcumina ed estratto vegetale Symbiagro non diluito contro *S. vesicarium* è stato eseguito un saggio in vitro. La piastra è stata predisposta come in figura (Fig. 24). Le molecole fungine sono state preparate partendo dalle MIC (Minima Concentrazione Inibente) riportate in tabella 7. Al fine dell'esperimento sono state valutate le molecole con una MIC ridotta della metà.

Molecola Vegetale	Mic Microrganismo	Referenza
Curcumina	256 µg/ml <i>Candida spp.</i>	(Jin Chen 2016)
EGCG	250 µg/ml <i>Candida albicans</i>	(Masatomo Hirasawa 2004)
Quercetina	505 µg/ml <i>Aspergillus flavus</i>	(Yang D 2020)

Tabella 7: Molecole vegetali utilizzate e MIC relativa all'organismo su cui sono state testate.

3.6 Identificazione di proteine putative legate all'istidina chinasi

Le conoscenze dei meccanismi molecolari di infezione di *S. vesicarium* sono ancora acerbi e lo stato dell'arte sotto questo aspetto si riduce ad una manciata di articoli. Di seguito si è cercato di individuare dei geni correlati all'istidina chinasi in modo da individuare un pool genico che in futuro potrà essere utile a sondare i meccanismi di virulenza del fungo.

Nell'articolo (Gazzetti, et al. 2019) è riportato che sono state individuate, in *S. vesicarium*, quattro istidine chinasi ipoteticamente coinvolte nei meccanismi di virulenza, delle quali solo una è stata depositata in banca dati sotto il codice: EU711371.1. Utilizzando il software MULTIALIGN si è provato ad allineare la sequenza SvHK1 con quella di *S. lycopersici*, fungo patogeno filogeneticamente vicino a *S. vesicarium* e con una letteratura più abbondante. L'output indica che le proteine sono quasi identiche quindi possiamo ipotizzare che se questa istidina chinasi fosse coinvolta nella virulenza di *S. lycopersici* allora potrebbe essere coinvolta anche nella virulenza di *S. vesicarium*.

Avvalendoci del software STRING, inserendo la sequenza HK1 di *S. lycopersici*, possiamo visualizzare un ipotetico complesso cooperativo di proteine legate a HK1 nella virulenza. Una volta ottenuto il network di proteine legate ad HK1, sono state scelte le proteine più interessanti tra quelle proposte basandoci su dati trovati in

letteratura. per ogni proteina è stata scaricata in formato FASTA la sequenza nucleotidica corrispondente che è stata poi utilizzata come query per la ricerca sul genoma di *S. vesicarium* (Gazzetti, et al. 2019) attraverso il database BLASTn. facendo abbiamo creato un piccolo pool di geni da controllare durante un processo infettivo

3.7 Analisi statistica

3.7.1 Box plot

Il box plot (Fig. 25) è una rappresentazione grafica dei dati che descrive la distribuzione di un campione attraverso indici di dispersione e posizione. Gli elementi fondamentali di un box plot sono: la mediana dei dati che è rappresentata da una linea centrale delimita i dati che stanno al di sopra o al di sotto di questa, se i dati sono simmetrici la mediana è al centro della scatola. La parte inferiore e superiore della scatola indicano il 25° e 75° percentile. La lunghezza della scatola è la differenza tra i due percentili e si chiama range interquartile (IQR). Le linee che si estendono a partire dalla scatola sono chiamate baffi e rappresentano la variazione dei dati attesa e si estendono per 1,5 volte dall'IQR dalla parte superiore e inferiore della scatola. I dati che si posizionano oltre i baffi sono chiamati *outliers* cioè dati più che si posiziona al di là della variazione attesa. (Discovery, JMP Statistical .)

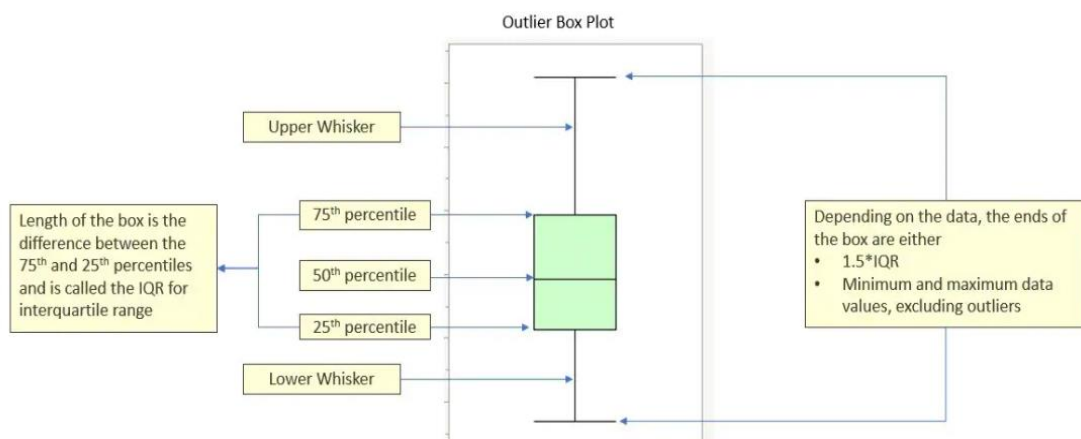


Figura 25: struttura di un Boxplot.

3.7.2 Anova ad una via

Utilizzando il software Rstudio è stata calcolata l'Anova ad una via. L'analisi della varianza a una via in genere viene usata quando si ha un'unica variabile indipendente, o fattore, e si vuole verificare se eventuali variazioni o diversi livelli di tale fattore abbiano un effetto misurabile su una variabile dipendente. Nel confrontare le medie di tre o più gruppi, l'Anova indica se almeno una coppia di medie presenta differenze significative, ma non è in grado di identificare di quale coppia si tratti. Inoltre, per funzionare bisogna che la variabile dipendente sia normalmente distribuita in ciascuno dei gruppi e che la variabilità all'interno del gruppo sia simile per tutti i gruppi. Si andrà a valutare quindi l'ipotesi nulla (H_0) in base alla quale le medie di tre o più popolazioni sarebbero uguali, contro l'ipotesi alternativa (H_1) secondo cui almeno una media sarebbe diversa (jmp s.d.).

Conducendo analisi multiple sulla stessa variabile dipendente, la possibilità di commettere un errore di tipo I aumenta, aumentando così la probabilità di arrivare a un risultato significativo per puro caso. Per correggere questo, o proteggere dall'errore di tipo I, è stato applicato l'algoritmo di Bonferroni basata sul test t-Student.

4 RISULTATI

4.1 Valutazione degli effetti del trattamento su conidi, foglie e frutti

4.1.1 BSPcast

Il grafico in figura 26 è stato costruito sulla conta del numero di spore catturate dai vetrini captaspore ogni settimana. Risulta evidente come la linea gialla, il controllo, insieme alla linea blu, il non trattato, siano le parcelle con il numero più alto di spore. Al contrario nei trattamenti con *Trichoderma* ed estratto vegetale il numero di spore risulta essere molto più basso. È noto come bagnatura fogliare svolga un ruolo chiave nella dispersione delle spore. Nel seguente grafico, infatti, è stata aggiunta la media oraria della bagnatura fogliare settimanale (linea azzurra con pallini) alla conta delle spore totali. Risulta quindi evidente come l'aumento delle spore sia strettamente correlato all'aumentare della bagnatura fogliare e come anche i trattamenti Symbiagro (arancio e grigio) seguano l'andamento della bagnatura fogliare ma con picchi di spore notevolmente più bassi rispetto agli altri. Questo indica che, a pari condizioni di bagnatura fogliare, i trattamenti a base di BCA ed estratto vegetale funzionano meglio come deterrente contro le spore.

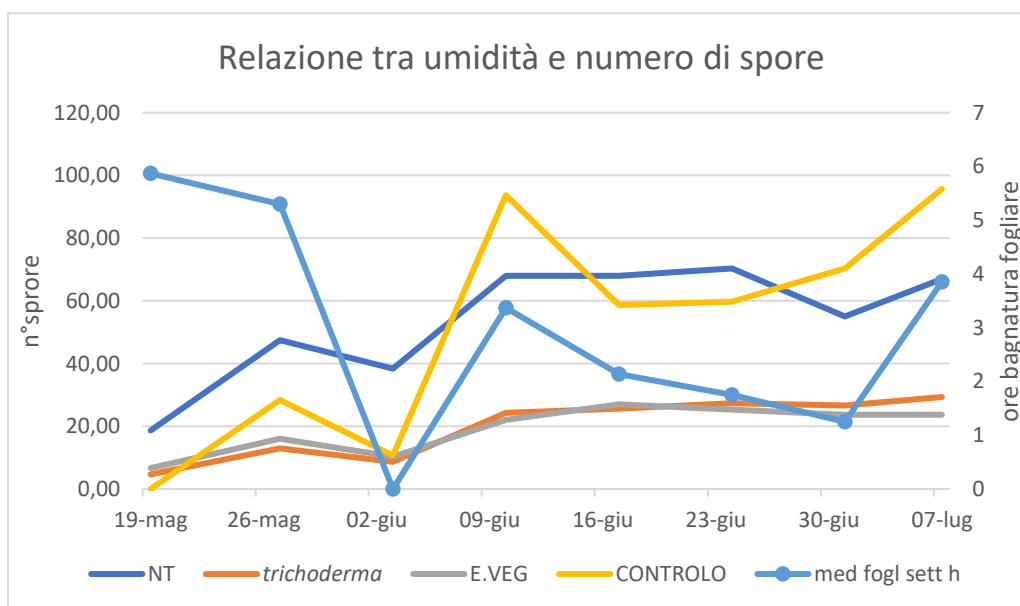


Figura 26: relazione tra umidità e numero di spore.

Su queste basi è stato calcolato il BSPcast per prevedere l'andamento della malattia nel tempo. Il valore per la soglia di allarme è stato fissato a 0,5 (E. Montesinos 1995), ovvero il limite oltre il quale è utile utilizzare un trattamento per bloccare l'infezione. Il grafico ottenuto (Fig. 27) indica all'operatore il momento in cui ci sarà una concentrazione maggiore di spore nell'aria. Grazie a questo modello predittivo è possibile diminuire il numero di trattamenti con fungicida, operando quindi solo nei momenti in cui la probabilità di infezione sarà più alta. In questo modo vengono ridotti sia l'inquinamento ambientale dato dai fungicidi sia la possibilità di sviluppo di resistenze.

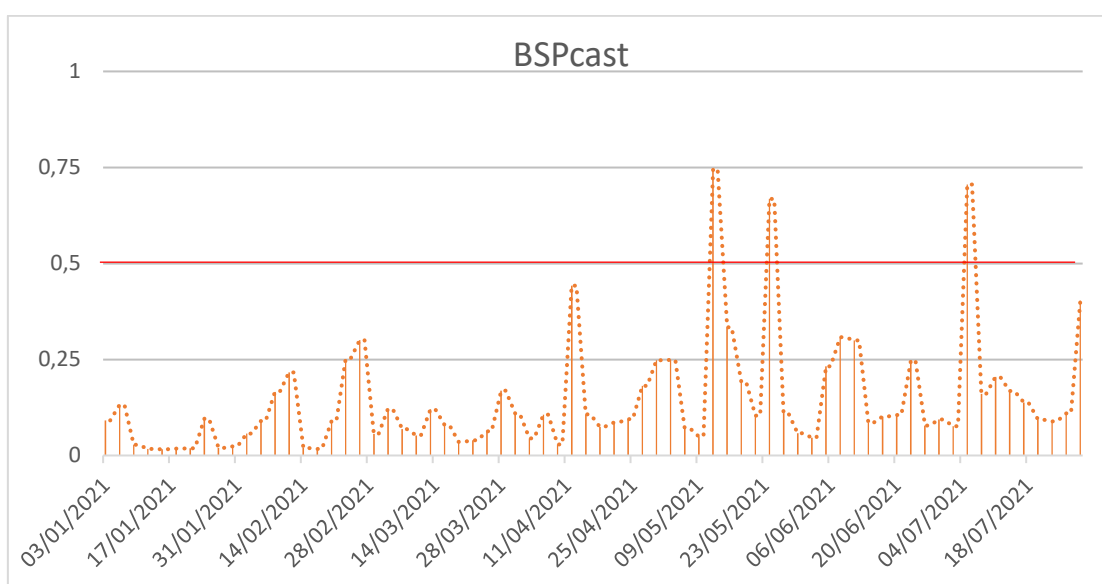


Figura 27: BSP-cast. soglia di allarme fissata a 0,5 (E. Montesinos 1995)

4.1.2 Impatto dei trattamenti sui conidi

La cattura delle spore è avvenuta una volta a settimana da inizio marzo fino a metà luglio. Le prime spore sono state individuate il 19 maggio e l'ultima conta è avvenuta il 7 luglio. La conta delle spore è stata eseguita in triplicato per ogni parcella di trattamento considerando sia le spore di *S. vesicarium* da sole sia le spore di *S. vesicarium* ed *Alternaria sp.* insieme, in modo da avere un quadro generale della situazione e valutare se i dati di entrambe le conte fossero tra loro coerenti. I vetrini sulle parcelle "controllo" sono stati aggiunti il 27 maggio.

Infine, per distinguere la morfologia di *S. vesicarium* dalle altre spore si è fatto riferimento alla letteratura (Poursafa, Ghosta e Javan-Nikkhah 2016).

Le conte sono riportate nella tabella sottostante (Tab. 8)

Conta spore totali	19- mag	27- mag	03- giu	10- giu	17- giu	24- giu	01- lug	07- lug
NT A	30	60	65	80	70	83	65	60
NT B	10	35	30	60	65	57	70	73
NT C	16	-	20	64	69	71	30	68
Trichoderma A	5	9	12	37	31	42	27	25
Trichoderma B	1	20	6	24	27	30	22	34
Trichoderma C	8	10	5	12	19	10	31	29
Estratto vegetale A	5	30	15	-	25	30	24	18
Estratto vegetale B	7	10	10	22	31	25	27	31
Estratto vegetale C	8	8	6	-	25	21	20	22
Controllo A	-	23	9	130	71	65	71	99
Controllo B	-	7	13	70	65	61	67	107
Controllo C	-	55	10	81	40	53	73	81

Tabella 8: Conteggio delle spore di *S. vesicarium* ed *Alternaria* sp.

Le caselle vuote corrispondono a dati per i quali non è stato possibile riportare i risultati della conta a causa della condizione illeggibile dei vetrini, causata probabilmente dal contatto di qualche insetto di grande taglia o da detriti prodotti dalla manutenzione del cotico.

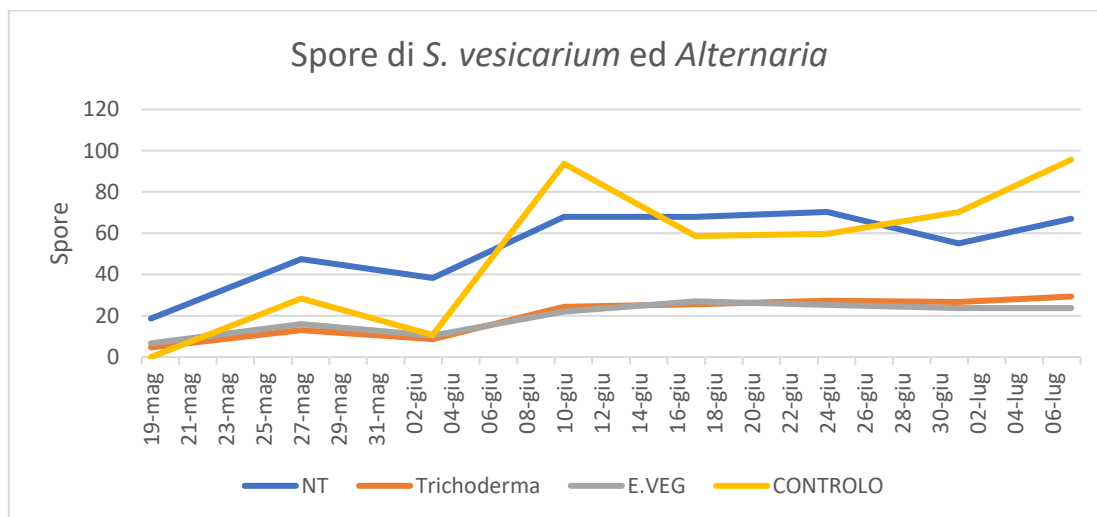


Figura 28: Grafico che indica l'andamento delle spore di *S. vesicarium* ed *Alternaria* nelle diverse parcelle.

Nel grafico (Fig. 28) sono state inserite le medie giornaliere delle repliche di ogni parcella trattata.

Dal grafico ottenuto si nota come la parcella controllo (in giallo) e la parcella non trattata (blu) presentino il numero maggiore di spore aeree. Al contrario i due

trattamenti: estratto vegetale (in grigio) e *Trichoderma spp.* (in arancio) presentano tra di loro una quantità simile di spore, minore rispetto al controllo e non trattato.

Lo stesso grafico è stato prodotto utilizzando i dati delle conte di solo *Stemphylium vesicarium* (tab. 9).

Conta spore <i>S. Vesicarium</i>	27- mag	03-giu	10- giu	17- giu	24- giu	01- lug	07-lug
NT A	30	14	50	45	41	45	50
NTB	20	3	29	30	25	30	36
NTC	18	5	38	34	35	17	29
<i>Trichoderma A</i>	4	5	13	11	15	18	16
<i>Trichoderma B</i>	4	2	4	15	17	15	21
<i>Trichoderma C</i>	5	1	10	8	6	9	11
Estratto vegetale A	13	5	7	9	11	13	15
Estratto vegetale B	7	5	11	17	15	13	11
Estratto vegetale C	6	4	-	12	10	9	13
Controllo A	10	3	110	50	40	17	44
Controllo B	7	5	40	45	35	40	61
Controllo C	27	5	51	31	27	38	33

Tabella 9: Conta delle spore di *S. vesicarium* nelle diverse parcelle trattate.

Dalla media delle spore giornaliere di ogni trattamento si ottiene un grafico (fig. 29) molto simile al precedente (fig. 28). Anche in questo caso le parcelle controllo e non trattato si presentano con il numero maggiore di spore rispetto al trattamento con estratto vegetale, *Trichoderma spp.* Da questi grafici (fig.28 e 29) si evidenzia come i

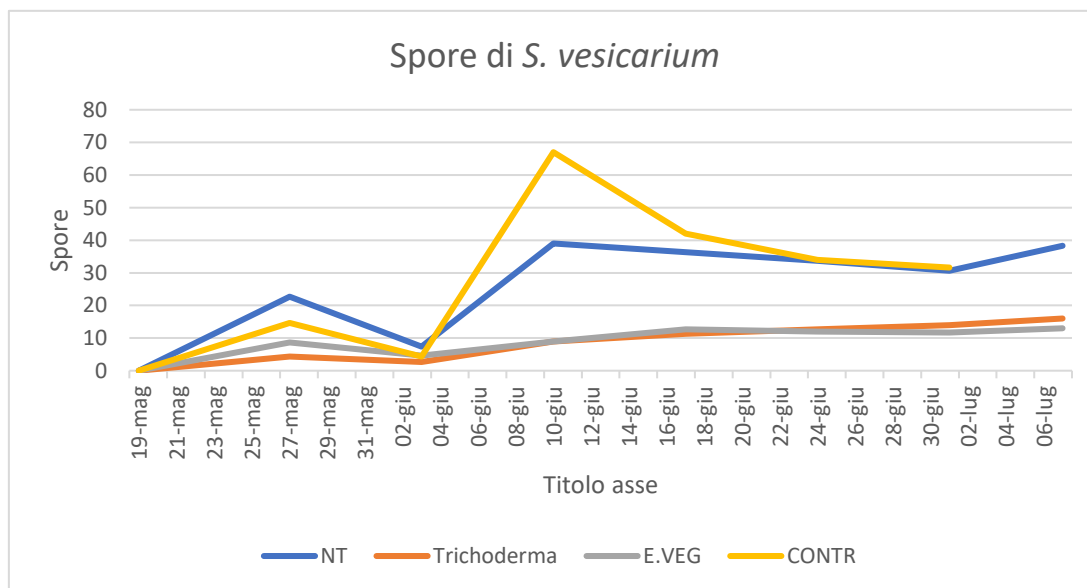


Figura 29: Andamento giornaliero medio delle spore di *S. vesicarium* per ogni parcelle di trattamento.

trattamenti Symbiagro riescano a diminuire il numero di spore rispetto ai trattamenti classici.

Bisogna tenere in considerazione come l'utilizzo di un vetrino come captaspore al posto di quello volumetrico ci ha permesso, per quanto possibile, di avere un dato qualitativo specifico per ogni trattamento. Utilizzando un captaspore professionale non saremmo riusciti a discriminare le spore per ogni parcella sia perché quest'ultimo aspira una grande quantità d'aria indipendentemente dalle parcelle, sia perché il costo è estremamente elevato rispetto ai vetrini.

I set di dati precedenti (tab.8 e tab.9) sono stati elaborati con Rstudio (fig.30 e 31).

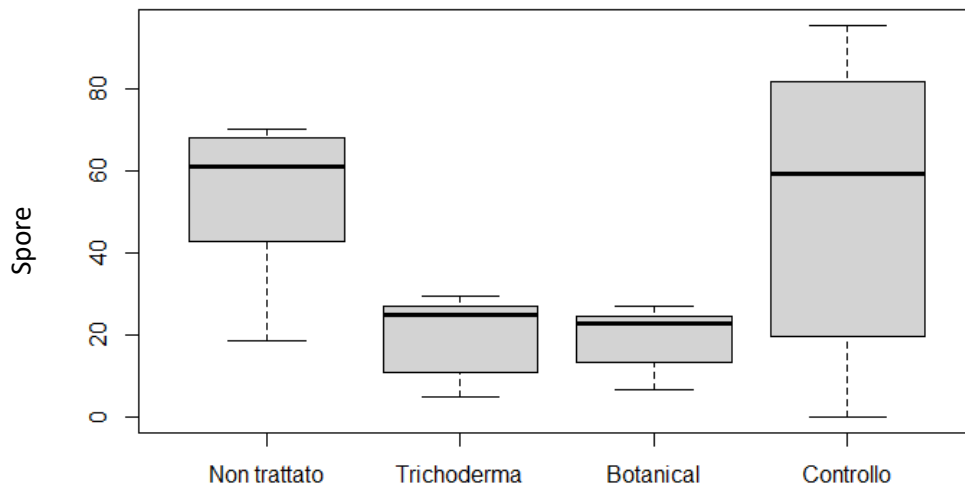


Figura 30: boxplot spore *S. vesicarium* e *Alternaria*. La linea nera rappresenta la mediana.

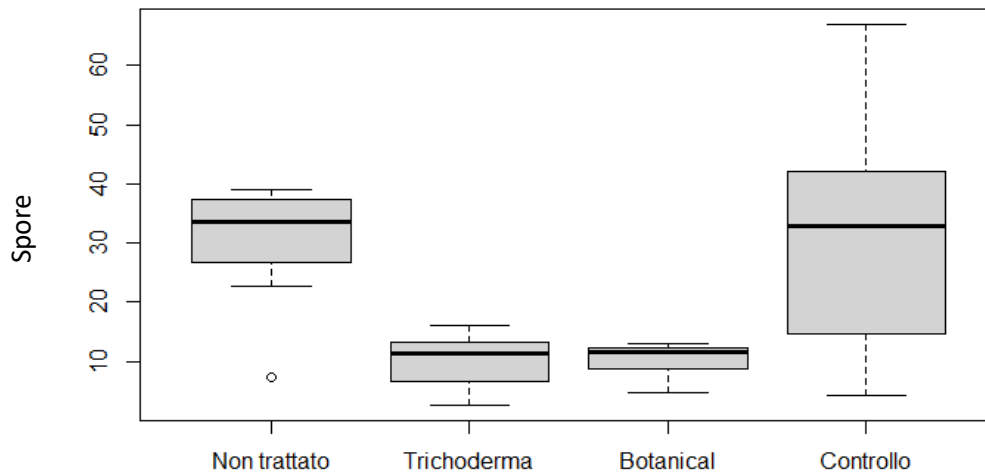


Figura 31: boxplot spore *S. vesicarium*. La linea nera rappresenta la mediana.

In entrambi i grafici risulta chiaro come le mediane del non trattato e del controllo siano molto simili, così come le mediane del prodotto a base di *Trichoderma* ed estratto vegetale.

In entrambi i test è risultato che l'ipotesi nulla (H0) viene rigettata e si accetta l'ipotesi alternativa (H1) secondo la quale almeno una media sarebbe diversa. Infatti, nella conta delle spore di entrambi i funghi, il *p-value* è pari a 0.00147 e nella conta delle spore di *S. vesicarium* il *p-value* è pari a 0,0021, evidenziando una solida significatività statistica del dato. In seguito, è stato applicato ai dati il test-t aggiustato con l'algoritmo di Bonferroni. Dai dati ottenuti sono stati elaborati i seguenti grafici (fig. 32 e 33)

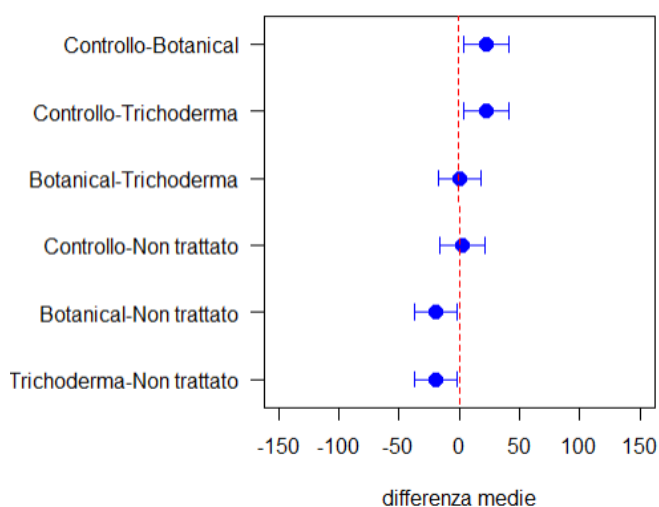


Figura 32: differenza tra le medie di due trattamenti diversi nel conteggio delle spore di *S.vesicarium*.

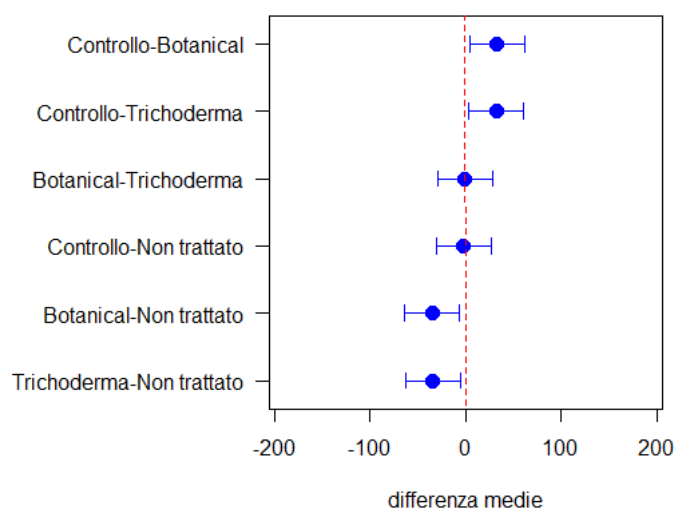


Figura 33: differenza tra le medie di due trattamenti diversi nel conteggio delle spore di *S. vesicarium* ed *Alternaria*

Dati, dunque, i precedenti risultati è evidente come ci sia una differenza significativa tra le medie dei trattamenti Symbiagro rispetto alle medie della parcella trattata con fungicidi classici e quella non trattata. Inoltre, i due trattamenti Symbiagro sembrano avere un'attività simile tra loro nel diminuire il numero di spore in quanto le medie sono pressoché simili tra loro, come anche sono simili le medie ottenute per la parcella non trattata e del controllo. Questa seconda osservazione desta dei preoccupanti sospetti in quanto utilizzare fungicidi in un campo già gravemente colpito dalla malattia sembra non esser di alcun aiuto. Infatti, la parcella utilizzata come controllo positivo (fungicida) ha dato risultati simili al campo non trattato in termini di quantità di spore.

4.1.3 Valutazione efficacia su foglie e frutti

Durante il mese di settembre, in concomitanza con la raccolta, sono state campionate pere e foglie. Un totale di novanta foglie è stato raccolto in modo casuale per ogni trattamento, ovvero 10 foglie dal basso, 10 dal centro e 10 dall'alto per un totale di 30 foglie per ognuna delle tre repliche. Volendo dunque considerare la percentuale di necrosi fogliare, è stata prodotta una tabella (fig. 34) per facilitarne la classificazione.



Figura 34: Tabella di riferimento per la percentuale di macchia necrotica sulla superficie fogliare.

Trattamento	0-10%	10-20%	20-30%	30-40%	40-50%	50-60%	60-70%	70-80%	80-90%	90-100%	Tot. foglie
<i>Trichoderma</i>	16	11	12	4	0	2	1	1	2	1	50
Estratto vegetale	20	18	7	2	0	0	0	2	1	0	50
NT	24	16	2	2	0	1	1	2	2	0	50
Controllo	13	11	4	8	1	1	1	2	5	4	50

Tabella 10: Percentuale di macchia necrotica per ogni parcella trattata.

Per facilitare l'interpretazione della distribuzione dei dati (tab. 10) sono stati inseriti in un Boxplot (fig. 35) e, per verificare una possibile differenza significativa tra i vari trattamenti, è stato applicato il test ANOVA ad una via seguito da un t-test con l'algoritmo di Bonferroni (fig. 36)

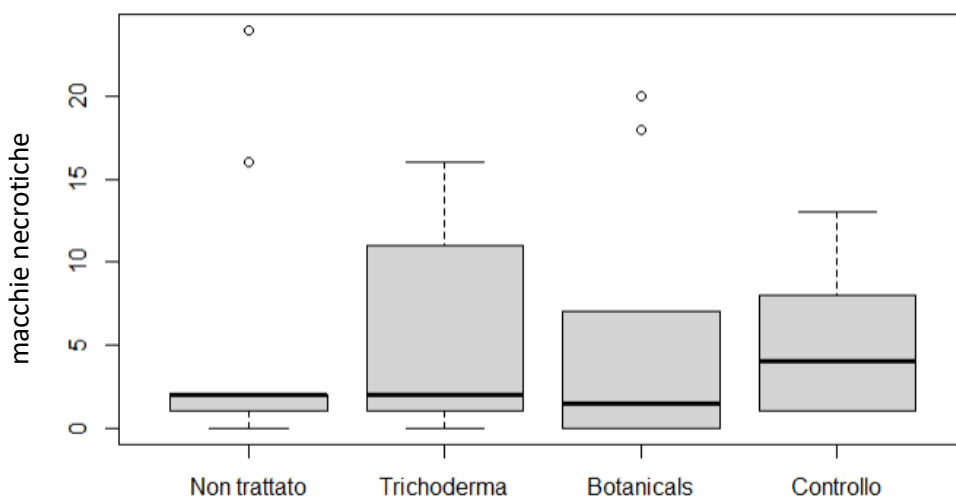


Figura 35: Boxplot rappresentante la distribuzione dei dati delle macchie necrotiche. La linea in nero è la mediana.

Il boxplot suggerisce come le mediane dei vari trattamenti siano piuttosto simili tra loro. Infatti, l'output del test ANOVA presenta un p-value di 1 quindi l'ipotesi nulla (H_0) viene accettata, dimostrando che le medie dei trattamenti non sono statisticamente significative.

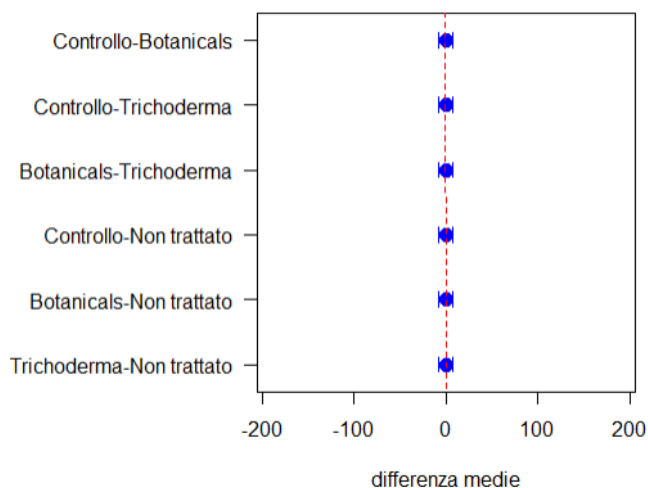


Figura 36: Differenza tra le medie di due trattamenti diversi.

Questo risultato conferma che i trattamenti non hanno avuto effetto

significativo sulla riduzione della percentuale necrotica fogliare.

Infine, i frutti sono stati campionati (Tab. 11) raccogliendo in modo arbitrario in basso, al centro ed in alto tre pere per parcella di trattamento, per un totale di nove pere per ognuna delle tre repliche. Il numero piuttosto basso di pere campionate è stato causato dalle gelate di aprile che hanno rovinato i fiori nascenti facendo crollare la produzione. A livello statistico, dunque, ci si è avvalsi degli stessi test utilizzati precedentemente per la conta della superficie necrotica fogliare.

Trattamenti	Numero Di Spot Sulle Pere								
<i>Trichoderma</i>	1	9	9	18	19	10	23	50	4
Estratto Vegetale	10	26	17	9	34	14	25	5	33
Nt	3	9	8	6	13	3	3	15	61
Controllo	30	22	19	9	6	9	13	6	24

Tabella 11: Numero di spot sulle pere.

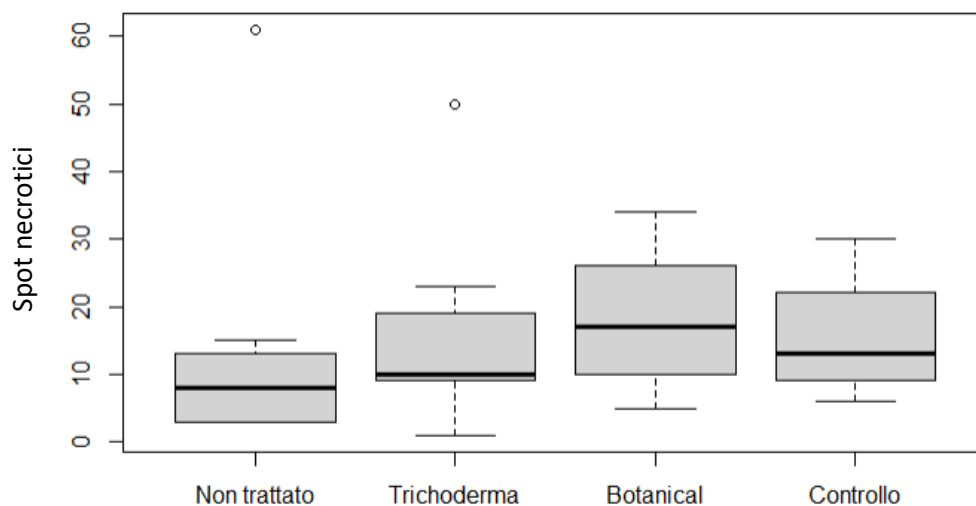


Figura 37: Boxplot spot pere nelle diverse parcelle. La linea nera rappresenta la mediana.

Il boxplot (fig. 37) suggerisce come le mediane dei vari trattamenti siano piuttosto simili tra loro. Il test ANOVA ad una via, infatti, rivela che il p-value è pari a 0.839 accettando così l'ipotesi nulla (H_0) che indica come non ci sia una

differenza significativa tra i vari trattamenti. Il t-test, aggiustato con l'algoritmo di Bonferroni, dimostra per l'appunto che i confronti tra i vari campioni non si discostano dalla media in modo significativo (fig. 38).

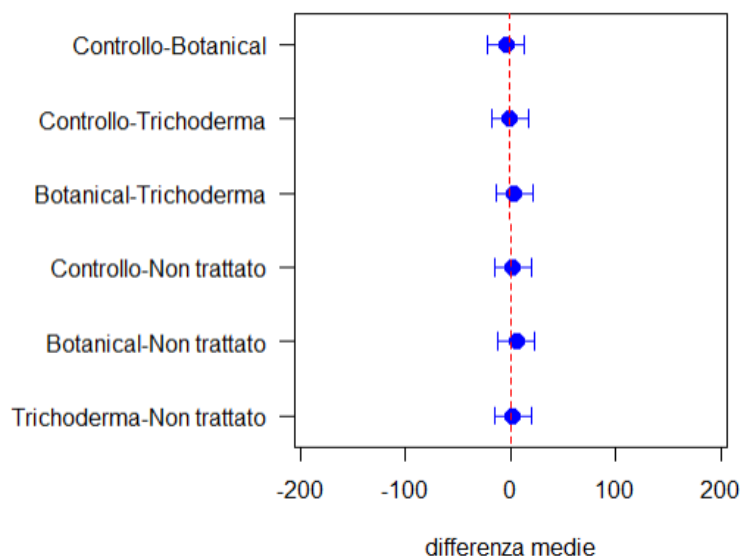


Figura 38: Differenza tra le medie dei diversi trattamenti.

Bisogna notare, però, come le medie della parcella controllo positivo (fungicida) e della parcella controllo negativo (non trattata) siano risultate essere non statisticamente differenti, sia nella conta della superficie necrotica che degli spot sulle pere. Questo suggerisce che i fungicidi ad ora utilizzati nella difesa contro la macula bruna non siano così efficaci, aumentando quindi il rischio che il loro utilizzo massiccio possa condurre allo sviluppo di resistenze, oltre ad un inquinamento ambientale e delle falde acquifere.

4.2 Isolamento *S. vesicarium* ed identificazione

L'isolamento di *S. vesicarium* è avvenuto in tre momenti diversi:

- Prima prova di isolamento: durante il mese di marzo
- Seconda prova di isolamento: durante il mese di giugno
- Terza prova di isolamento: durante il mese di ottobre

4.2.1 Prima prova di isolamento

Per la prima prova di isolamento (fig. 39) si è partiti da materiale raccolto in campo, quale pezzi di pera marcescenti, cotico, gemme, ramoscelli e foglie. Il materiale è stato piastrato secondo il seguente ordine:

1. Striscio di pera 1
2. Striscio di pera 2
3. Pezzi di pera
4. Pezzi di cotico (sterpaglia)
5. Foglie cadute sul cotico
6. Sterpaglia
7. Striscio foglie
8. Pezzi foglie
9. Striscio gemma
10. Pezzi di gemma 1
11. Pezzi di gemma 2

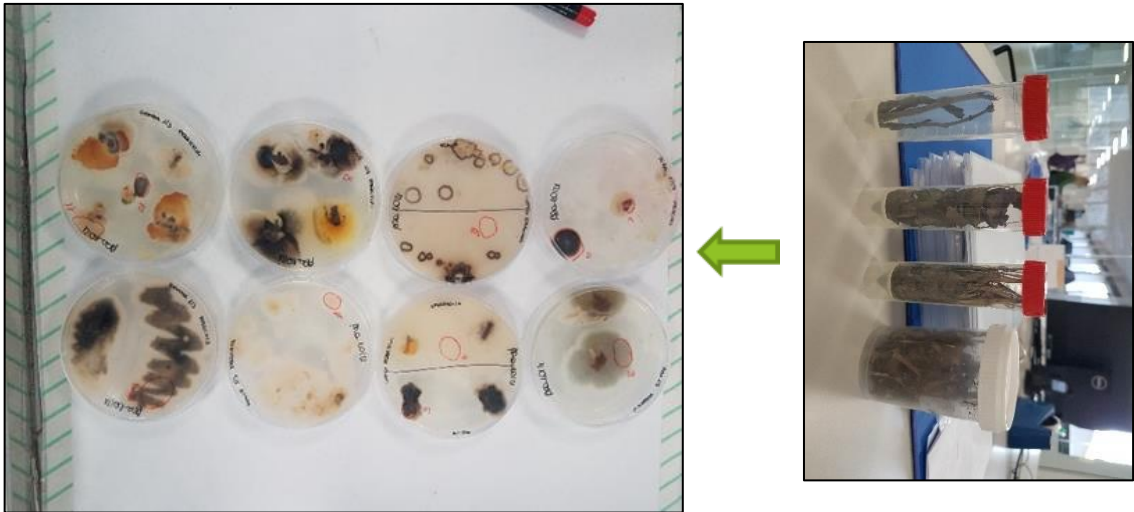
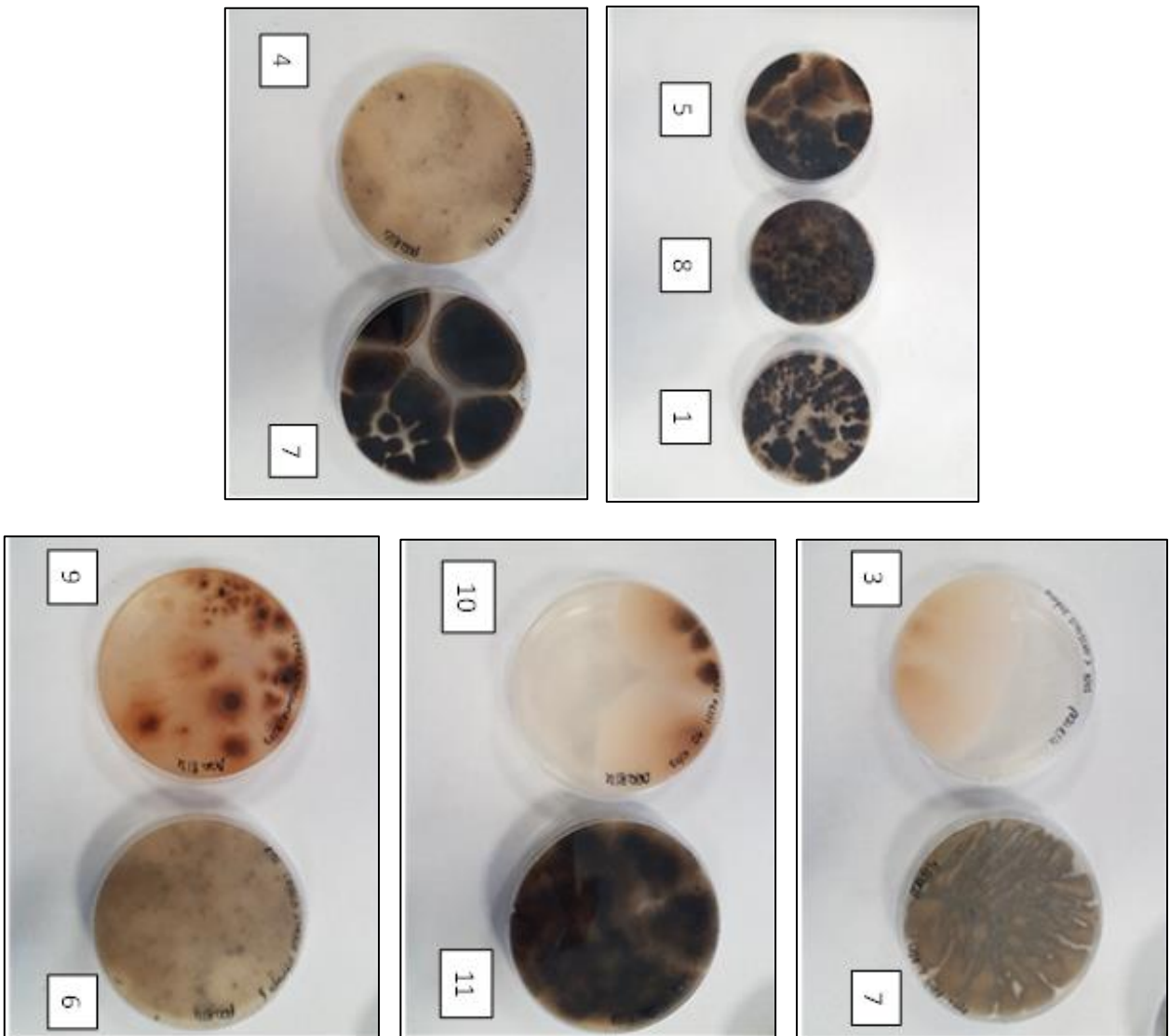


Figura 39: Primo isolamento



Sulla base della morfologia, è stato deciso di estrarre il DNA dei campioni 1, 3, 4, 5, 6, 9 e 11 (fig. 39). Altri funghi o batteri presenti nelle piastre sono stati trattati come potenziali antagonisti naturali del patogeno. In seguito all'estrazione del DNA, sono state condotte due diverse PCR, una sugli ITS (fig. 40) per identificare i funghi ed una sul 16S (Magalhães Cruz L 2001) per identificare i batteri (fig. 41).

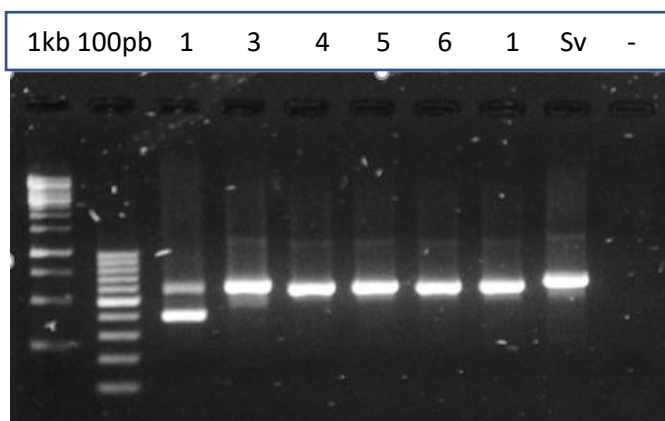


Figura 40: PCR con primer per amplificare gli ITS

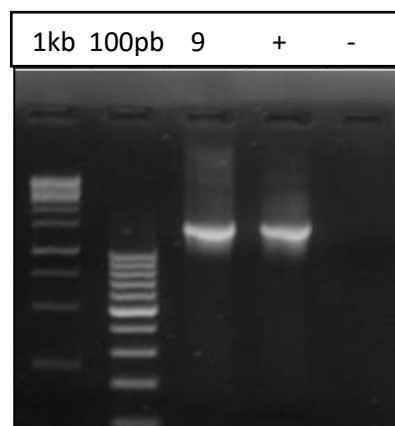


Figura 41: PCR con primer per amplificare il 16s

L'esito di entrambe le PCR è accettabile in quanto i campioni amplificati con i primer disegnati sull'ITS dovrebbero posizionarsi ad un'altezza compresa tra 500 e 600 pb (Tony Vancov 2009) per essere considerati funghi ed i campioni amplificati con i primer disegnati sul gene 16S dovrebbero amplificare una regione di 1487 pb per essere considerati batteri.

In seguito, le bande sono state purificate direttamente dalla reazione di amplificazione, tranne per il campione 1 per il quale i due ampliconi ottenuti sono stati purificati da gel. Gli esiti del sequenziamento sono riportati in tabella n°12.

Campione	Organismo	Lunghezza in pb	Contig	Esito sequenziamento
1 A	Fungo	-	-	-
1 B	Fungo	-	-	-
3	Fungo	161	1	<i>Penicillium sp.</i>
4	Fungo	583	1	<i>Nigrospora sp.</i>
5	Fungo	539	2	<i>Alternaria alternata</i>
				<i>Nigrospora sp.</i>

6	Fungo	580	1	<i>Nigrospora sp.</i>
11	fungo	612	1	<i>Alternaria arborescens</i>
9	Batterio	1391	1	<i>Pseudomonas sp.</i>

Tabella 12: Esiti sequenziamento dei microrganismi rilevati nel primo isolamento.

4.2.2 Seconda prova di isolamento

La seconda prova di isolamento (fig.42), invece, è avvenuta durante il mese di giugno dove c'è stata la possibilità di raccogliere pere infette da *S. vesicarium*, foglie con macchia necrotica, spore aeree e foglie presenti sul cotico.

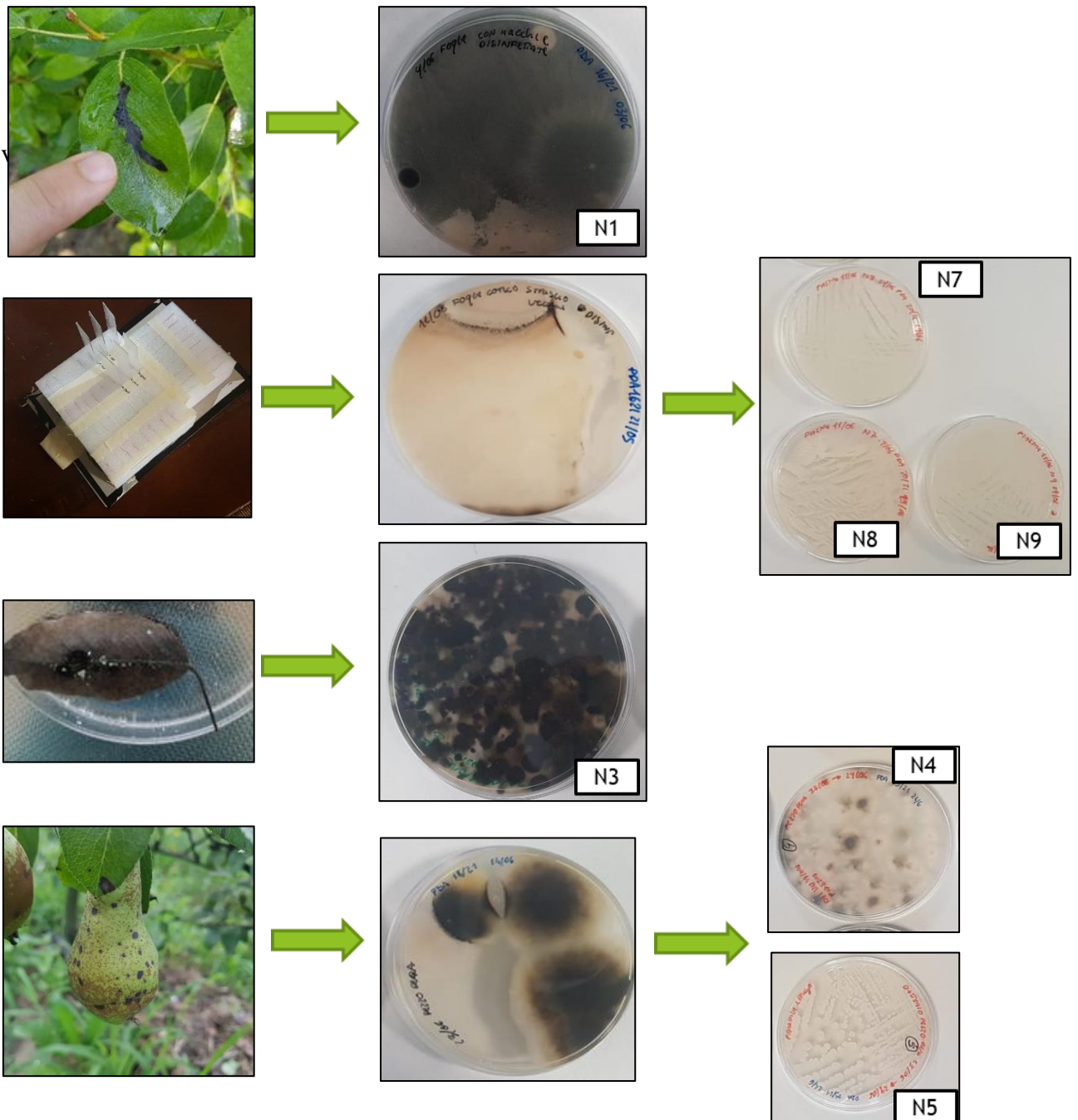


Figura 42: Seconda prova di isolamento.

In seguito alla crescita su piastra è stato estratto il DNA dei campioni per eseguire delle analisi PCR sulle sequenze ITS (fig.44), del gene 16S (fig. 43) e del gene *GDP* (fig. 45) per identificare *S. vesicarium*.

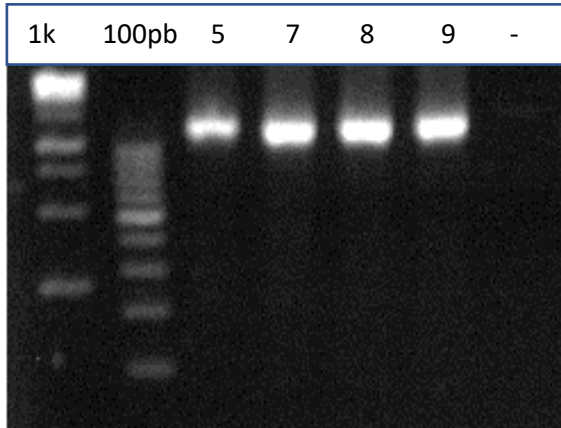


Figura 43: PCR con primer per identificare il 16S.

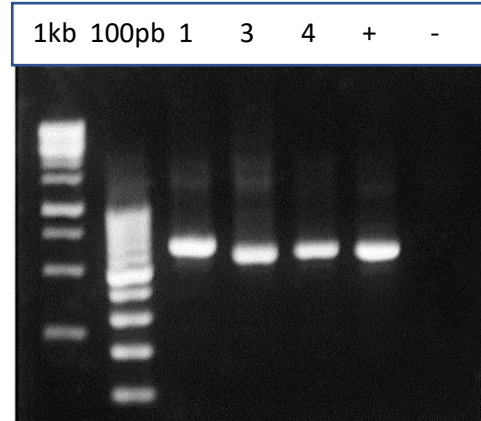


Figura 44: PCR utilizzando i primer per identificare gli ITS.

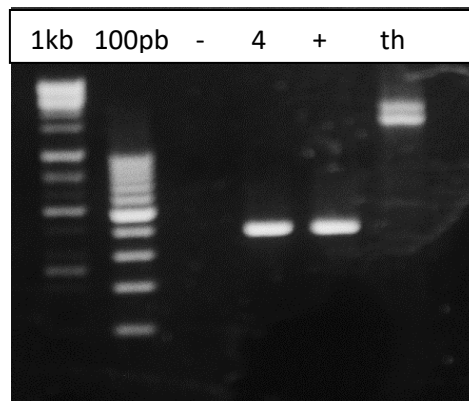


Figura 45: PCR utilizzando i primer per identificare *S. vesicarium*. Th rappresenta un campione di *Trichoderma* utilizzato come controllo negativo.

Tutte le reazioni PCR hanno dato dei riscontri positivi, in particolare la PCR eseguita con i primer specifici del gene *GDP* che ha confermato l'identità del campione n°4 come *S. vesicarium* poiché l'amplicone mostra una lunghezza pari a 399pb (fig. 45). In seguito, tutti i campioni sono stati purificati e preparati per il sequenziamento (tab. 13). I risultati hanno confermato la presenza di *S. vesicarium*, già anticipata dalla PCR sul gene *GDP*. Inoltre, sono stati identificati anche possibili BCA nei campioni 5 e 9.

Campione	Organismo	Contig	Esito
1	Fungo	1	<i>Trichoderma sp.</i>
3	Fungo	-	-
4	Fungo	1	<i>Stemphylium vesicarium</i>
5	Batterio	2	<i>Bacillus.*</i>
			<i>Bacillus.*</i>
7	Batterio	1	<i>Bacillus.*</i>
8	Batterio	1	<i>Bacillus.*</i>
9	Batterio	1	<i>Bacillus *</i>

Tabella 13: Risultati sequenziamento seconda prova di isolamento. *omissione del nome completo per mantenere il segreto aziendale.

4.2.3 Terza prova di isolamento

La terza prova di isolamento (fig. 46) è stata condotta nel mese di ottobre e sono stati piastrati solo campioni di pere infette, ma con un protocollo differente da quello usato nelle prove precedenti. Inoltre, è stato utilizzato un bisturi ritagliando una porzione ai bordi della macchia, al contrario degli isolamenti precedenti per i quali era stata gratta la superficie della macchia con un'ansa sterile. In questo modo è stata aumentata la probabilità di avere un isolato puro.

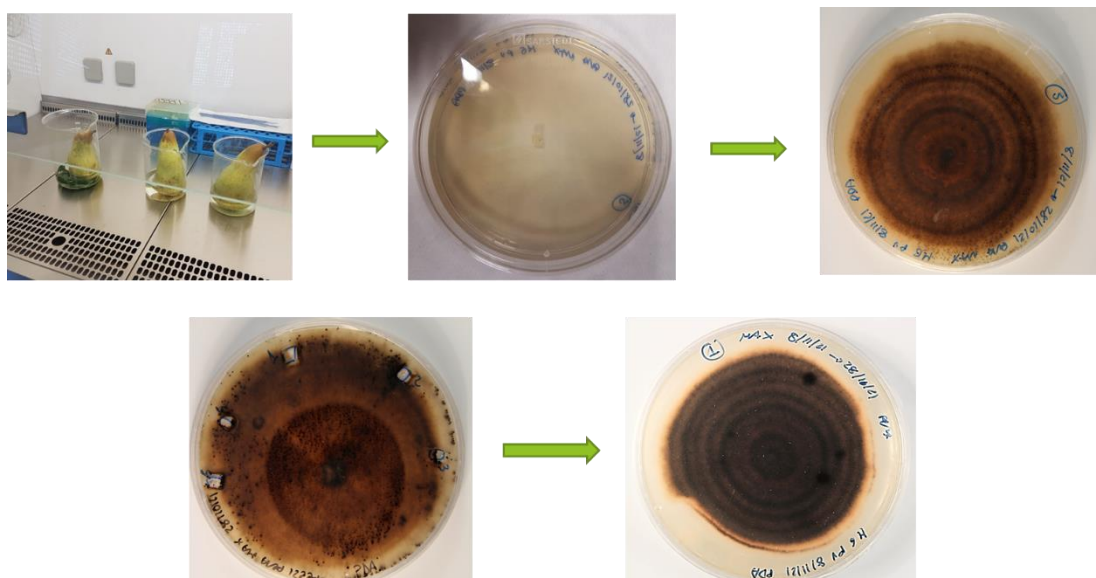


Figura 46: Terza prova di isolamento.

Innanzitutto, è stata ottimizzata la sequenza dei primer utilizzati per la PCR sul gene *GDP*, valutando la presenza di eventuali SNP. Per amplificare *S. vesicarium*, sono quindi stati utilizzati i primer Gdp_er-Fw (GCCAAGCAGTTGGTTGTG) e Gdp_intU-Rw (CGCGGCGGTTGGAGGACATTT) che producono un amplicone di 399pb (S. T. Koike 2013).

La sequenza è stata prima convalidata *in silico* attraverso la banca dati Primer-BLAST inserendo entrambi i primer. L'output ha dato il seguente risultato (Fig. 47):

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCAAGCAGTTGGTTGTG	18	57.26	55.56	6.00	4.00
Reverse primer	CGCGGCGGTTGGAGGACATTT	21	66.13	61.90	5.00	2.00

Products on target templates
 >MK675745.1 Stemphylium vesicarium isolate On16-499 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) gene, partial cds

product length = 399
 Forward primer 1 GCCAAGCAGTTGGTTGTG 18
 Template 620 603

Reverse primer 1 CGCGGCGGTTGGAGGACATTT 21
 Template 222C..... 242

Figura 47: Output primer blast.

In questo modo il programma ha segnalato la presenza di uno SNP nel primer Reverse, in particolare una citosina al posto di una adenina. Per validare questo aspetto è stata scaricata la sequenza *target* dei primers, utilizzando il codice identificativo MK675745.1.

In questo modo è stata appurata la presenza dello SNP nel primer Reverse. A questo punto è stata eseguita la PCR sia su campioni di *S. vesicarium* cresciuti su agar (campioni A, B, C), sia su campioni di fungo cresciuti su *tomato agar* (TA, TB, TC) (fig. 49).

In seguito, sono state eseguite ulteriori prove allineando i primer sul genoma di *S. vesicarium* recentemente sequenziato da (Gazzetti, et al. 2019).

In questo caso, oltre alla conferma dello SNP nel primer *reverse*, si nota anche la presenza di uno SNP nel primer *forward*, che consiste in una guanina al posto di una adenina. Questo nuovo SNP è stato trovato allineando il primer *forward* e il gene con l'ausilio del programma MultiAlign (Fig. 48).

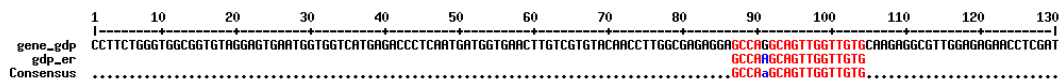


Figura 48: Output del software MultiAlign. In alto: la sequenza del gene. Al centro: la sequenza del primer. In basso: la sequenza consensus

Al netto di questa analisi è stata disegnata questa nuova coppia di primer:

- Gdp-er GCC **A**AG CAG TTG GTT GTG → GCC **A**GG CAG TTG GTT GTG
- Gdp-intU: CGC GGC GGT TGG AGG **A**CA TTT → CGC GGC GGT TGG AGG **C**CA TTT

I risultati della PCR eseguiti con il primer *reverse* (Gdp-intU) corretto dallo SNP e il primer *forward* (Gdp-er) non corretto ha dato il seguente risultato (fig. 49). È stato osservato un amplicone di circa 399 pb in tutti i campioni, tranne il TC, confermando l'identità di *S. vesicarium* nei campioni positivi.

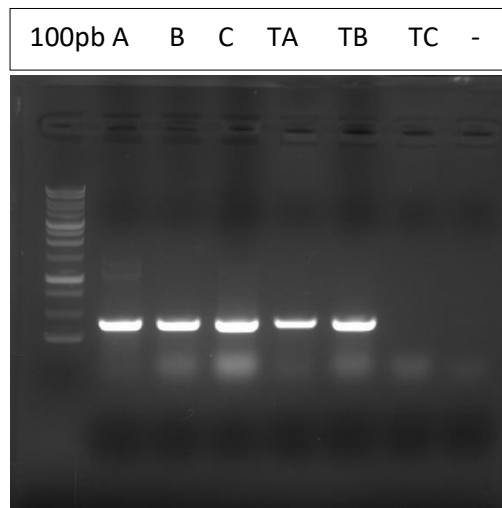


Figura 49: PCR sui GDP. A, B, C *S. vesicarium* cresciuti su PDA. TA, TB, TC *S. vesicarium* cresciuto su tomato agar.

4.2.4 Isolamento di *S. vesicarium* da gemme invernali

Il DNA genomico estratto da gemme è stato analizzato al nanodrop, dando i risultati riportati in tabella 13.

Tabella 13: Quantificazione DNA genomico estratto da gemme.

Campione	ng/μl	260/280	260/230
<i>Trichoderma spp</i>	106	2,11	1,69
Estratto vegetale	80,6	1,98	1,09
Non trattato	114,6	2,13	1,66
Parcella controllo	184,8	2,11	1,67

I campioni della PCR (fig. 50) sono stati caricati nel seguente ordine: *trichoderma spp.* (tr), estratto vegetale (e.v), non trattato (nt), parcella controllo (c), campione positivo (*S. vesicarium* isolato in laboratorio) e campione negativo. Nella parte sinistra della PCR sono stati fatti correre i campioni amplificati con i primer sul gene *GDP* e a destra i campioni amplificati con i primer disegnati sul gene *SvHK1*. Tutti i campioni sono risultati positivi, anche se con intensità diversa, nella PCR con primer sul gene *GDP*. La lunghezza dell'amplicone è di circa 500 pb, mentre la lunghezza attesa è di 399 pb, ed alcuni campioni presentano bande aspecifiche. Per quanto riguarda la PCR eseguita

con i primer disegnati sul gene *SvHK1*, i campioni mostrano un amplicone di lunghezza molto simile a quella del campione positivo. Questi risultati indicano quindi che, con una certa sicurezza, i campioni isolati fanno almeno parte del genere *Stemphylium* poiché sono positivi sia per il gene *GDP* che per il gene *SvHK1*. La lunghezza diversa degli ampliconi potrebbe indicare l'appartenenza ad una specie diversa da *vesicarium*. Il sequenziamento degli ampliconi ottenuti permetterebbe di confermare la presenza del patogeno anche nelle gemme, cambiando così il punto di vista sui trattamenti fino ad ora concentrati sul cotico.

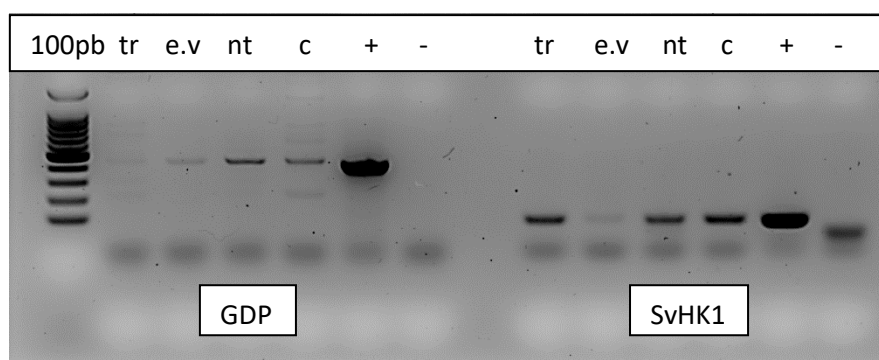


Figura 50: PCR sul DNA genomico estratto da gemme utilizzando a sinistra i primer GDP e a destra i primer SvHK1. *trichoderma spp.* (tr), estratto vegetale (e.v), non trattato (nt), parcella controllo (c), campione positivo (*S. vesicarium* isolato in laboratorio) e campione negativo.

4.3 Competizioni in vitro ed antibiogrammi

4.3.1 Risultati screening BCA

L'isolamento di *S. vesicarium* nonché di altri funghi e batteri come possibili BCA hanno permesso di condurre dei saggi di competizione *in vitro* per valutare la competitività dei microrganismi rispetto al patogeno. Infatti, nella seconda prova di isolamento (fig. 42), sono stati osservati fenomeni interessanti con alcuni batteri che sembravano essere dei potenziali BCA, come i numeri 5, 7, 8, e 9. Il numero 5, in particolare, è risultato interessante in quanto presente tra due colonie di *S. vesicarium* (fig. 42 n5), creando una propria nicchia e bloccando la crescita del fungo.

I risultati dell'esperimento (fig. 51) confermano quindi l'efficacia del batterio numero 5. Si può notare anche come il fungo numero 4, ed i batteri numero 8 e 9 siano dei buoni colonizzatori rispetto a *S. vesicarium*.

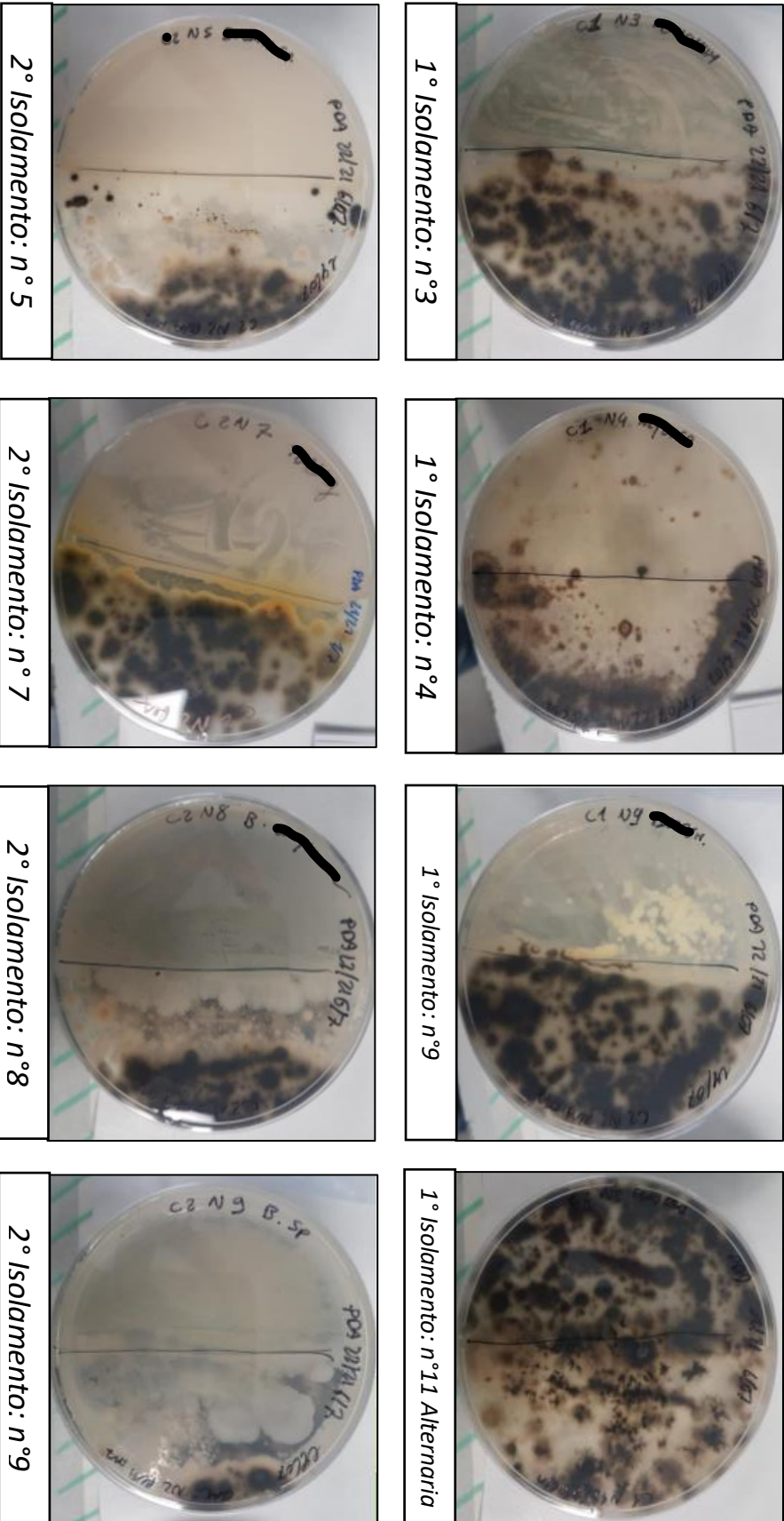


Figura 51: Esperimento di competizione in vitro.

4.3.2 Antibiogrammi e valutazione della forza dei BCA

I risultati degli antibiogrammi dimostrano chiaramente come solo uno dei cinque fungicidi, nella fattispecie Nandomaxi® (fig. 52), funzioni *in vitro* contro *S. vesicarium*. Questi dati evidenziano chiaramente come l'utilizzo di fungicidi non sembri essere una soluzione efficace al problema della macula bruna del pero.

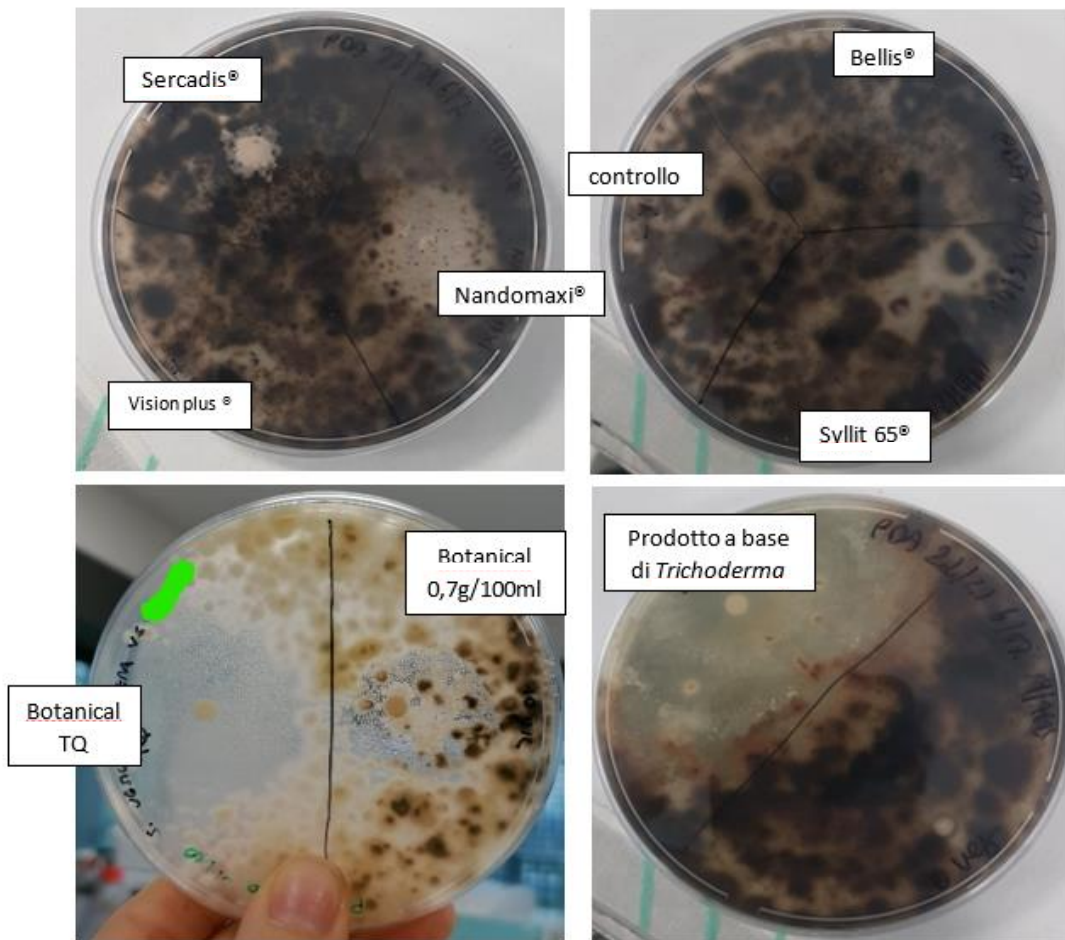


Figura 52: Antibiogrammi con fungicidi utilizzati durante la stagione produttiva contro *S. vesicarium*.

Nella figura 54 sono riportati i risultati del test di valutazione dei potenziali BCA ritenuti i migliori, ovvero C2N5 e C2N9. Come controllo negativo è stato utilizzato il batterio C1N9, che in un primo *screening* non sembrava avere proprietà inibitorie rispetto alla crescita di *S. vesicarium*. Nella figura 53, il batterio C1N9 si è comportato esattamente come nella figura 51, cioè non ha dimostrato una buona capacità di colonizzazione ma sembra che sia in grado, comunque, di contrastare la crescita del fungo probabilmente producendo molecole antifungine. Gli altri batteri, batteri, invece hanno dimostrato una buona capacità di controllo biologico.

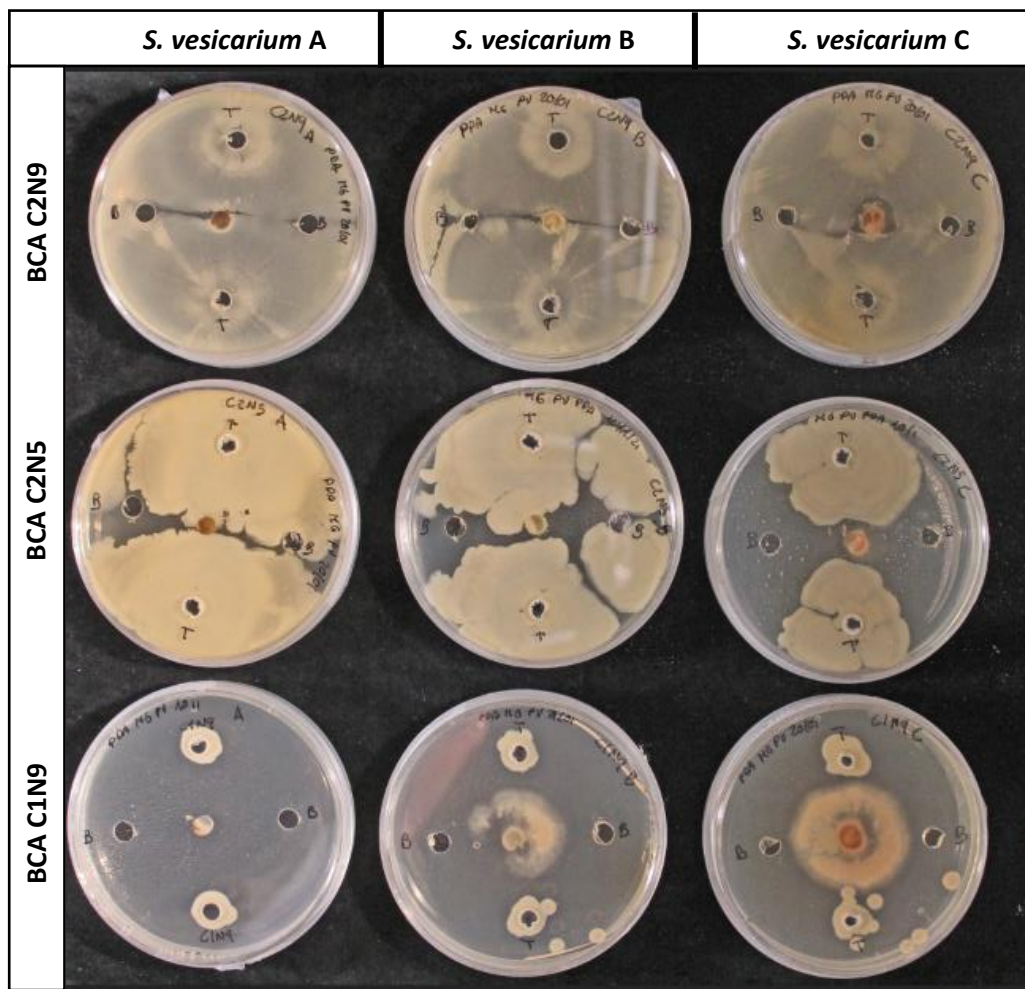


Figura 53: Valutazione e test dei BCA migliori C2N5 e C2N9 e del peggiore C1N9 usato come controllo

4.3.3 Valutazione dell'efficacia di diverse molecole vegetali

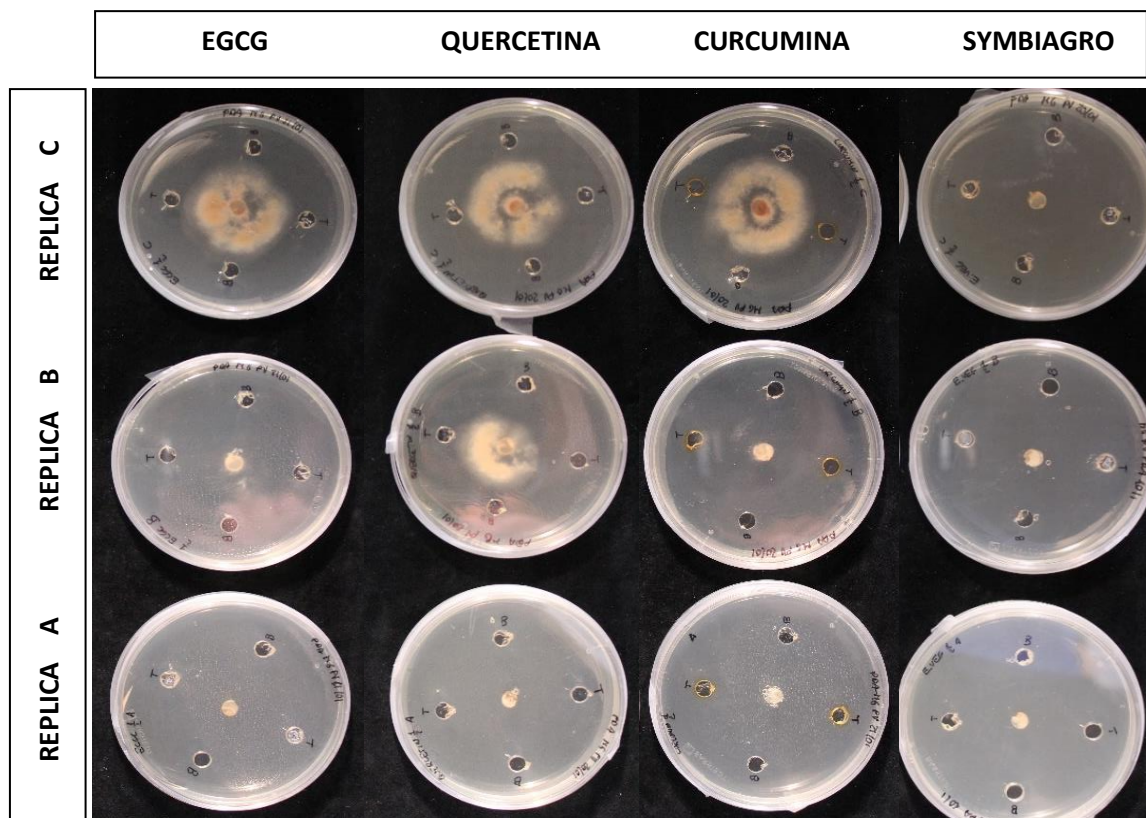


Figura 54: Valutazione dell'efficacia di molecole naturali di origine vegetale nell'inibire la crescita di *S. vesicarium*. Le sostanze sono state utilizzate ad una concentrazione pari a MIC 1/2.

Nella figura 54 sono mostrati i risultati della valutazione dell'effetto di diverse molecole naturali di origine vegetale sulla crescita di *S. vesicarium*, utilizzate ad una concentrazione pari alla metà della concentrazione minima inibente (MIC). Il piano sperimentale prevedeva la presenza di due pozzetti (ai lati) come controllo negativo verso i quali il fungo avrebbe dovuto crescere, mentre le sostanze contenute nei pozzetti in alto e in basso avrebbero potuto inibire la crescita del fungo (Jing Chen 2021). Nella nostra prova preliminare, l'inibizione sembra interessare l'intera piastra in maniera uguale, suggerendo quindi una possibile diffusione delle molecole/estratti saggiati. Sarà quindi importante ottimizzare la procedura per valutare in maniera più significativa la capacità di queste molecole vegetali di inibire la crescita di *S. vesicarium*. Ciò nonostante, risulta evidente come l'estratto vegetale Symbiagro abbia un'azione inibitoria superiore rispetto alle altre molecole.

4.4 Identificazione di proteine putative legate all'istidina chinasi

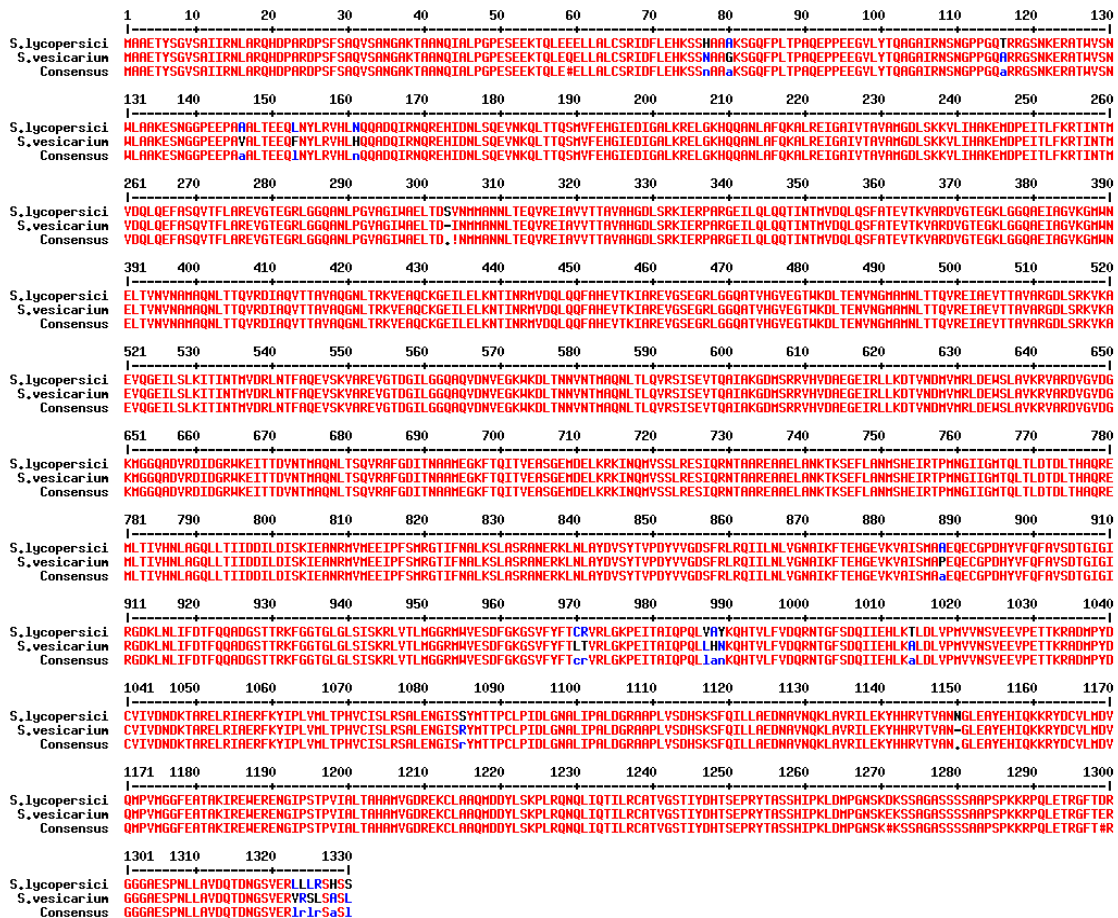
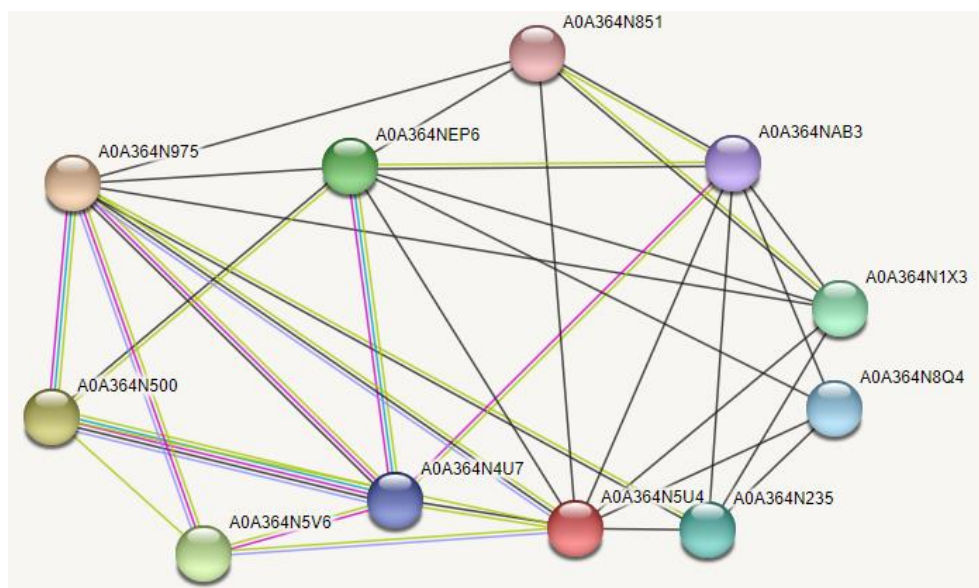


Figura 55: Allineamento HK1 di *S. lycopersici* ed *S. vesicarium*.

L'istidina chinasi, individuata da Gazzetti, et al. 2019, di *S. vesicarium* è stata allineata con quella di *S. lycopersici* ha dato il risultato in figura fig.55.

Le due sequenze mostrano una percentuale di similarità molto elevata, consentendo quindi di utilizzare la sequenza di *S. lycopersici* come base di studio per ottenere dati robusti su cui lavorare.

Utilizzando tale proteina, è stato possibile, con il programma STRING, identificare un network di 10 proteine con possibili interazioni con l'HK (fig. 56). Tra tutte le interazioni, però, solo otto sono supportate sperimentalmente, la maggior parte, invece, derivano da omologie con proteine di altri organismi.



Edges:

Edges represent protein-protein associations
associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding to each other.

Known Interactions

- from curated databases
- experimentally determined

Predicted Interactions

- gene neighborhood
- gene fusions
- gene co-occurrence

Others

- textmining
- co-expression
- protein homology

Your Input:

A0A364N5U4 Two-component histidine kinase (1330 aa)

Predicted Functional Partners:

	Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]	Score
A0A364N975 Two-component response regulator SSK1p				•			•	•	0.783
A0A364N500 Pbs2-type map kinase kinase								•	0.665
A0A364N5V6 Osmolarity two-component system protein sln1								•	0.581
A0A364NEP6 RhoGAP-domain-containing protein				•					0.546
A0A364N1X3 PROCN-domain-containing protein				•					0.521
A0A364N235 Cation-transporting ATPase; Belongs to the cation transport ATPase (P-type) (TC 3.A.3) family. Type V subfamily.				•					0.497
A0A364N8Q4 RmlC-like cupin				•					0.496
A0A364N4U7 Mitogen-activated protein kinase							•		0.494
A0A364NAB3 Snf2 family atp-dependent chromatin-remodeling factor snf21				•					0.493
A0A364N851 E3 ubiquitin-protein ligase; Ubiquitin ligase protein which is a component of the N-end rule pathway. Recognizes and bind...				•					0.492

Figura 56: Output STRING

Le proteine individuate, dunque, hanno le seguenti funzioni (tab. 14):

Tabella 14: Funzione molecolare delle proteine identificate.

<i>PROTEINA</i>	<i>ACCESSION NUMBER</i>	<i>FUNZIONE</i>
Two-component response regulator SSK1p	A0A364N975	Comporta l'autofosforilazione di un'istidina chinasi e il trasferimento del gruppo fosfato ad un aspartato che poi agisce come donatore di fosforo alle proteine regolatrici della risposta.
RhoGAP-domain-containing protein	A0A364NEP6	Trasduzione del segnale
PROCN-domain-containing protein	A0A364N1X3	mRNA splicing, via spliceosoma
Cation-transporting ATPase 4	A0A364N235	Attività di trasporto transmembrana Atp binding Nucleotide-3p activity
RmlC-like cupin	A0A364N8Q4	RmlC (dTDP (deossitimidina difosfato)-4-deidroramnosio 3,5-epimerasi) è un enzima dTDP-zucchero isomerasi coinvolto nella sintesi di l-ramnosio, un saccaride necessario per la virulenza di alcuni batteri patogeni. (Giraud 2000)
Proteina chinasi attivata da mitogeni HOG1	A0A364N4U7	la protein chinasi attivata dallo stress correlata a Hog1 è centrale per il rilevamento e la segnalazione dello stress nei funghi patogeni.
Snf2 family atp-dependent chromatin-remodeling factor snf21	A0A364NAB3	Rimodellamento cromatina.
E3 ubiquitin-protein ligase	A0A364N851	Catalizza il trasferimento dell'ubiquitina al substrato proteico.

Attraverso una ricerca in letteratura è stato notato che alcune di queste proteine sembrano avere una funzione importante nella virulenza di alcuni funghi. Per esempio, è stato dimostrato che il dominio RhoGAP è fondamentale in alcuni stadi dello sviluppo e della patogenesi di *M. oryzae*. Invece, è stato riportato che MoRgal è specificamente associato alla conidiatura e allo sviluppo dell'appressorio (Wenyu Ye 2014).

Nello stesso modo, Hog1 è tra le proteine di rilevamento e segnalazione dello stress più conservate in diverse specie fungine ed è un fattore di virulenza chiave in molti agenti patogeni fungini umani (Day AM 2018).

5 DISCUSSIONE

L'Italia è al primo posto nella classifica dei maggiori produttori di pere dell'Emisfero Nord e al terzo posto a livello mondiale con circa 900.000 t, preceduta solo da Cina ed Argentina. Purtroppo, la cultivar Abate Fétel, che ricopre un'importante fetta del mercato italiano, è molto suscettibile alla maculatura bruna del pero, causata dal fungo patogeno *Stemphylium vesicarium*. Il quale, secondo il report del servizio fitosanitario dell'Emilia-Romagna, ha causato nel 2018 una perdita che, in alcuni casi, è risultata riguardare circa il 60-70% del raccolto, rappresentando quindi un danno economico notevole per i produttori di pere. Fino ad ora le strategie di difesa contro la macula bruna della pera si sono concentrate sull'utilizzo del modello predittivo BSPcast e sulla sanificazione del cotico, dove il telomorfo di *S. vesicarium* sverna e rilascia le spore nell'aria. Benché studi relativi alla malattia abbiano dato risultati positivi, questa tutt'ora persiste e reca ingenti danni. Inoltre, diversi studi hanno sottolineato come alcuni fungicidi siano causa di resistenze. Perciò, complici anche le preoccupazioni concernenti la loro tossicità, spesso questi vengono tolti dal mercato e sostituiti con nuovi principi attivi.

Risulta, quindi, evidente come da una parte ci sia il bisogno di irrobustire le conoscenze riguardanti la biologia di questo patogeno, attraverso la ricerca di base, e dall'altra ci sia la necessità di valutare l'efficacia di metodi di lotta più innovativi e sostenibili, come l'implementazione di molecole vegetali e prodotti a base di organismi di controllo biologico (BCA).

I risultati ottenuti dalla cattura delle spore e dalla conta delle macchie, sia su foglia che su frutto, rivelano degli aspetti che sarebbe interessante approfondire. *In primis*, infatti, si sottolinea come i risultati della conta delle spore mostrino una differenza tra i trattamenti Symbiagro ed i trattamenti classici (Fig. 33 e 33), mentre nella conta della superficie necrotica e delle macchie sul frutto la differenza tra i trattamenti non sussista (fig. 36 e 38). Questa differenza è data dal fatto che, da una parte, i fungicidi non bloccano la formazione delle spore (Montesinos e Llorente 2006) e, dall'altra, il campo di riferimento era già gravemente malato negli anni precedenti, rendendo quindi molto più difficile avere un riscontro positivo sul frutto.

Dato che i fungicidi non agiscono preventivamente sulle spore ma bloccano la formazione del tubetto germinativo, è evidente come il loro utilizzo a cadenza di dieci giorni sia poco mirato. Infatti, non in tutti i periodi la presenza delle spore è tale da infettare la pianta. Alla luce delle potenzialità del fungicida e del danno ambientale causato, è evidente come il supporto del BSPcast aiuti gli agricoltori ad usare in modo mirato il fitofarmaco, senza incidere in modo negativo sull'ambiente (V. P. Llorente I. 2000). Purtroppo, questa accortezza non viene sempre rispettata, tanto che i produttori stessi dei fungicidi sottolineano come uso ottimale l'applicazione sul campo ogni dieci giorni circa.

Dati i risultati ottenuti, sembrerebbe opportuno integrare all'uso di fungicidi l'uso di biofungicidi. In questo modo, applicando questi ultimi all'inizio della primavera, si potrebbe ridurre il numero di spore e di conseguenza il potenziale infettivo; ciò permetterebbe di diminuire le applicazioni di fungicidi di sintesi, massimizzando così la loro efficacia e riducendo anche la possibile comparsa di nuovi ceppi fungini resistenti in campo. Esperimenti simili, tuttavia, richiedono una maggiore superficie sperimentale, una migliore randomizzazione ed un certo numero di anni per valutare che le condizioni siano dovute all'esperimento e non al caso. In questo modo, si potrebbe ad esempio analizzare come l'uso di biofungicidi influisca sul microbiota del suolo. Questo aspetto infatti è da tenere in considerazione, in quanto nel terreno sono presenti microrganismi che hanno ruoli fondamentali nella nutrizione vegetale, contribuiscono alla biodiversità ambientale e potrebbero essere alterati da trattamenti intensivi.

In alcuni casi, le biotecnologie hanno permesso di sviluppare nuove soluzioni per risolvere problemi non superabili con la chimica di sintesi classica. Un esempio è stato l'utilizzo di un micovirus per il controllo di *Cryphonectria parasitica*. Il micovirus è un virus a RNA a filamento positivo, la cui infezione inibisce la crescita e la sporulazione del fungo, privandolo della possibilità di infettare le piante ospite (Rigling 2018). Nel caso riportato in questo lavoro di tesi, un'evidenza positiva è che i trattamenti con agenti di biocontrollo, o molecole di origine vegetale, non hanno particolari controindicazioni per quanto riguarda il rischio ambientale o gli insetti impollinatori. La sicurezza che, almeno apparentemente, questi prodotti sembrano possedere, dovrebbe quindi incentivarne l'utilizzo e la sperimentazione.

Gli antibiogrammi (Fig. 51 e 53) hanno mostrato come i fungicidi utilizzati abbiano una scarsa capacità di contrastare il fungo patogeno, almeno *in vitro*; infatti, solo un fungicida, Nandomaxi, ha inibito significativamente la crescita del micelio in piastra. Al contrario, la ricerca di BCA ha portato ad isolare due batteri, C2N5 e C2N9, che hanno mostrato una fortissima azione di biocontrollo contro il patogeno (Fig. 51 e 53), un risultato che muove ad approfondire, in futuro, il loro meccanismo di azione. È auspicabile poter definire se sia il batterio stesso che, colonizzando, limita la crescita del patogeno oppure se questo produca metaboliti secondari con azione antifungina. Inoltre, sarebbe opportuno orientare la ricerca anche sull'ottimizzazione di tecniche di *screening*, sia per il rilevamento di BCA, sia per valutare in modo oggettivo e quantificabile la loro capacità di esser degli agenti di biocontrollo.

I prodotti a base di BCA, come visto, hanno un grandissimo potenziale, ma sono sicuramente da migliorare ed hanno dei limiti. Il punto fondamentale da tenere in considerazione è che l'applicazione di un BCA deve, per quanto possibile, essere circoscritta nel luogo in cui questo viene isolato. Infatti, un fungo o un batterio isolato in una zona diversa da quella in cui viene applicato, potrebbe avere difficoltà a adattarsi ad un nuovo ambiente e a svilupparsi. Ciò comporterebbe il rischio di una ridotta capacità di conquistare un areale a discapito del patogeno. Se il luogo di applicazione coincide invece con quello dell'isolamento, è inoltre possibile preservare la biodiversità microbica e fungina autoctona di un agroecosistema. L'utilizzo in modo indiscriminato di BCA provenienti da luoghi profondamente differenti rischia di portare a commettere nuovamente gli errori già perpetrati in passato. Ne è un esempio famoso il caso della coccinella cinese o arlecchino (*Harmonia axyridis*), di origine asiatica; questa venne introdotta intenzionalmente negli Usa nel 1916 come agente di controllo biologico di afidi e cocciniglia. Le coccinelle sono insetti predatori di altri parassiti e considerati, dunque, estremamente utili; la loro diffusione pareva dunque un'idea tutt'altro che rischiosa. Questa coccinella, tuttavia, oltre che di parassiti, si cibava delle larve delle sue simili e di altri insetti utili, prendendo inevitabilmente il sopravvento su questi. Inoltre, ha causato anche gravi danni economici, alterando il sapore del vino: la coccinella si insidiava infatti nei grappoli d'uva, dove rilasciava tossine (Koch R.L. 2007). Quindi, oltre alla possibile perdita di efficacia,

l'introduzione di un BCA proveniente da una zona geografica diversa, comporta dei rischi ambientali da non sottovalutare.

Negli ultimi anni, l'interesse verso le molecole di origine vegetale è cresciuto esponenzialmente. Quelle utilizzate in questo lavoro, rispetto ai fungicidi classici, hanno dimostrato di avere un forte potenziale inibitorio contro il patogeno (fig. 54). In particolar modo, l'estratto vegetale Symbiagro, anche utilizzato ad una concentrazione pari alla metà della MIC, è riuscito a bloccare quasi totalmente la crescita del fungo *in vitro*. Sarebbe utile, in futuro, individuare un buon metodo di *screening* di molecole naturali, al fine di sviluppare prodotti basati sulla combinazione di più molecole con diversi meccanismi di azione.

Negli ultimi anni, gli studi riguardanti *S. vesicarium* si sono focalizzati sull'analisi della relazione tra umidità e fungo, oltre che sul trattamento del cotico. Considerando il Nord Italia, dove si concentra la maggior parte della peri-coltura, nei mesi primaverili, l'umidità aumenta notevolmente, a causa del clima molto umido. Inoltre, viene nebulizzata acqua sulle piante, per quasi sette ore, per contrastare le gelate notturne. Si effettuano anche trattamenti con fungicidi, ormonizzanti, pesticidi e fertilizzanti, la maggior parte dei quali sono liquidi e contribuiscono ad aumentare l'umidità e la bagnatura fogliare. Quindi le piante di pero per tutta la primavera rimangono costantemente bagnate, favorendo lo sviluppo della malattia (E. Montesinos 1995). Il secondo filone di studi si concentra sull'asportazione del cotico per eliminare le forme del fungo svernanti (Llorente, I., et al. 2010). È così risultato evidente come l'asportazione del manto erboso e il trattamento con *Trichodema spp.* abbia agevolato la produzione diminuendo l'incidenza della malattia, anche se non ancora in modo soddisfacente. Altri studi propongono di seminare piante a foglia larga sul cotico; queste fungerebbero da vera e propria barriera, in modo da impedire alle spore di raggiungere il pero.

Una soluzione efficace potrebbe essere quindi quella di unire queste strategie in modo tale da sfruttare i miglioramenti che ognuna di queste apporta alla coltura, in linea con quanto proposto nella difesa integrata. Un esempio potrebbe esser quello di prediligere un'irrigazione a goccia arricchita di molecole di origine vegetale che contrastino il fungo, facendo attenzione a non andare a sovraccaricare la pianta di stimoli e ridurre la produzione. Questo approccio potrebbe essere associato alla messa a dimora di

piante a foglia larga trattate periodicamente con BCA, come *Trichoderma spp.*, e l'utilizzo di fungicidi solo nei periodi a maggior rischio indicati dal BSPcast.

L'ipotesi della presenza del patogeno all'interno delle gemme apre ad una serie di considerazioni piuttosto interessanti. La prima tra tutte riguarda il ciclo vitale del patogeno e l'importanza che viene data allo svernamento del cotico. Se il patogeno, infatti, non svernasse solo nel cotico ma si trovasse già nelle gemme e quindi sui nuovi rami, allora sarebbe utile pensare ad un trattamento preventivo sia prima della chiusura delle gemme in autunno e sia all'apertura di queste durante la primavera. La seconda considerazione riguarda il miglioramento del metodo diagnostico per individuare il patogeno in modo univoco e rapido.

A livello biologico la ricerca legata a questo patogeno è ancora agli inizi. Fortunatamente grazie al sequenziamento del genoma condotto da (K. D. Gazzetti 2019) si apre la possibilità di condurre studi più precisi, per esplorare i meccanismi molecolari che orchestrano la comunicazione ospite-patogeno in questo patosistema. Per questo motivo la ricerca di geni correlati all'istidina chinasi del fungo (tab. 15) rappresenta una strada interessante per cominciare ad indagare i meccanismi legati alla virulenza di *S. vesicarium*. La letteratura che riguarda la co-espressione di geni è limitata, anche per quanto riguarda *Stemphylium lycopersici*. Infatti, per analizzare le interazioni tra le proteine individuate ed il loro ruolo nel *network* è necessaria una buona ricerca bibliografica. Come si vede dal grafico (fig.57), ottenuto utilizzando il software STRING, non esistono co-espressioni osservate in letteratura per *S.*

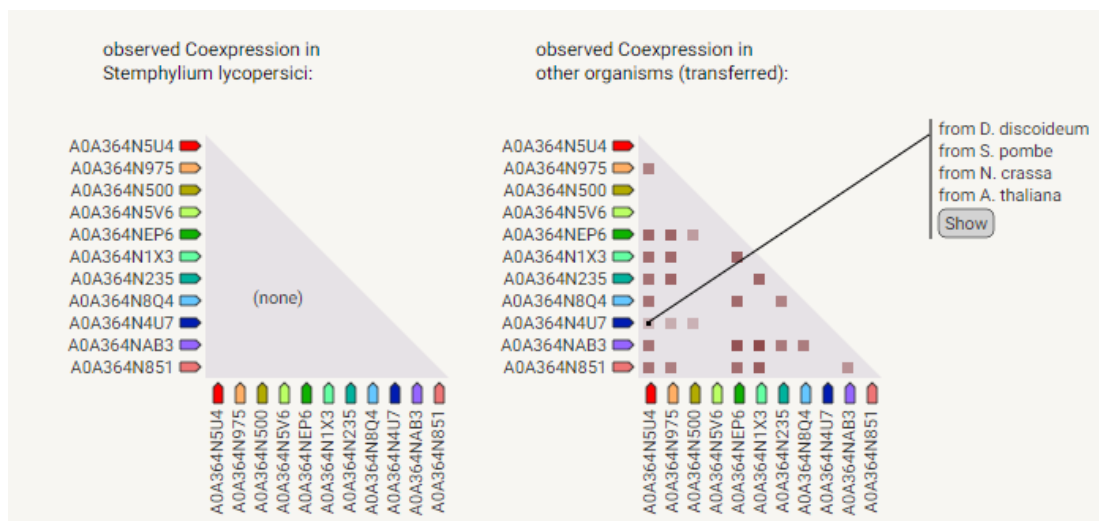


Figura 57: Output STRING, analisi di co-espressione

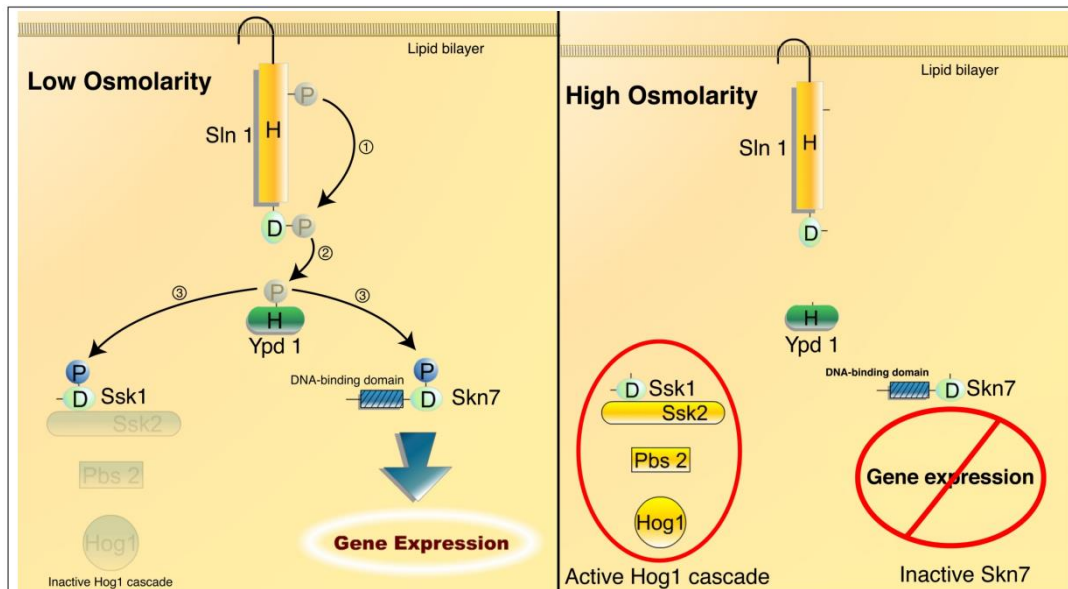


Figura 58: Phosphorelay signaling

lycopersici. Al contrario, in funghi più conosciuti come *Neurospora crassa*, è possibile trovare informazioni circa la funzione di alcune proteine e la loro regolazione.

Il *network* individuato contiene alcune proteine che sono strettamente correlate al sistema dell'istidina chinasi. Infatti, SSK1p è un *response regulator* della via di trasduzione del segnale Sln1-Ypd1-Ssk1. Questa via viene attivata in situazioni di bassa osmolarità, dove Sln1 autofosforila un residuo di istidina all'interno del dominio catalitico della chinasi. Il gruppo fosfato viene trasferito ad un residuo di aspartato che successivamente viene trasferito ad un residuo di istidina nel gruppo Ypd1, un dominio fosforelay. In fine, il gruppo fosfato viene trasferito ad un residuo di aspartato nel dominio ricevente Ssk1, il regolatore della risposta, completando il fosforelay His-Asp-His-Asp. Questo sistema controlla la risposta allo stress osmotico attraverso Hog1 (*High osmolarity glycerol response*), altra proteina individuata nel network, responsabile dell'attivazione di una cascata di proteine chinasiche attivate da mitogeno (MAPK). Quindi, quando la cellula si trova in condizioni di bassa osmolarità, l'istidina chinasi Sln1 si attiva e il regolatore di risposta Ssk1 è fosforilato e, quindi, disattivato. In questo modo Ssk1 non può attivare Hog1. Quando, invece, l'osmolarità esterna si alza, Sln1 si disattiva; di conseguenza, la forma non fosforilata di Ssk1 stimola la via Hog1 attivando la cascata MAPK. Questa andrà a regolare un set di geni target coinvolti nella sintesi di glicerolo e nella risposta allo stress (fig. 58) (Santos JL 2001). Tra gli output ottenuti da STRING è interessante analizzare la funzione del dominio Rho-GAP. In generale, i Rho-GAP sono coinvolti nella regolazione di processi

biologici critici di crescita polarizzata nelle cellule fungine, che vanno dal controllo del ciclo cellulare alla morfogenesi cellulare. Tuttavia, la specificità e le funzioni dei Rho-GAP nei funghi patogeni delle piante non sono ben comprese (Wenyu Ye 2014). È stato ben documentato che due vie di trasduzione del segnale conservate, che coinvolgono una proteina chinasi dipendente dall'AMP ciclico (PKA) e una proteina chinasi attivata dal mitogeno (MAPK), sono necessarie per la formazione dell'appressorio e per il riconoscimento della superficie in *Magnaporthe oryzae*. (Guotian Li 2012).

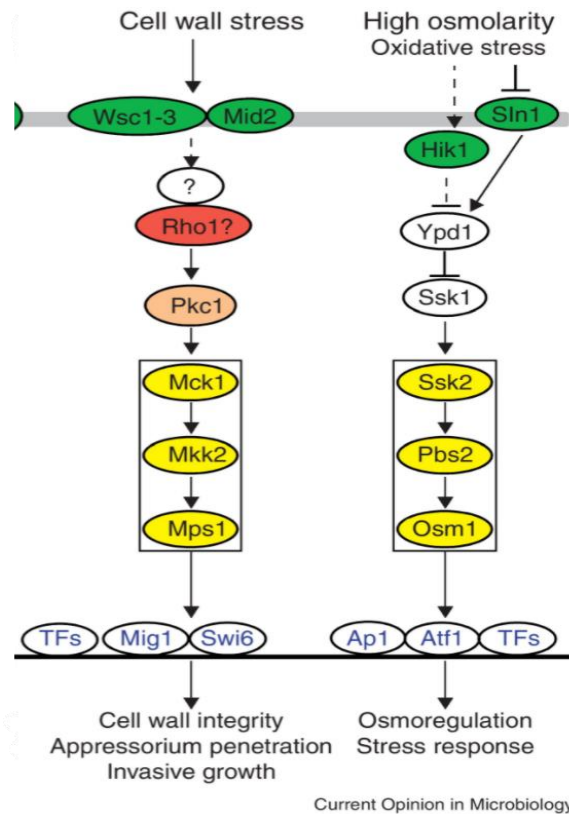


Figura 59: Principali vie di segnalazione coinvolte nella morfogenesi correlata all'infezione in *M. oryzae*

Risulta interessante notare come nell'immagine 59, tratta dall'articolo prima citato, le principali vie di trasduzione del segnale presentate, coinvolte nella morfogenesi correlata all'infezione in *M. oryzae*, siano presenti anche nel nostro *network*. Possiamo quindi concludere che la ricerca di proteine legate alla virulenza ha aperto delle vie molto interessanti che meritano di essere approfondite per cercare di caratterizzare al meglio il meccanismo molecolari di infezione di *S. vesicarium*.

In questi ultimi anni sta aumentando la consapevolezza di come i vecchi modelli di difesa basati sulla chimica di sintesi, non siano più sostenibili a livello ecologico. La formulazione di biopesticidi quindi richiede una collaborazione ancora più stretta tra il campo dell'agronomia e quello della ricerca di base. Quest'ultima fornisce conoscenze fondamentali per sviluppare nuovi approcci combinati, nell'ottica di una lotta integrata, tenendo conto delle peculiarità dei meccanismi di infezione di ogni microrganismo.

6 BIBLIOGRAFIA

- <https://www.solutionsstores.com/tebuconazole>.
- A. Brunelli, A. Pirondi, I. Portillo*, M. Vignini*, F. Vigna*,. «Aggiornamenti Sperimentali Sull'attivit  Di Vecchi E Nuovi Fungicidi Contro La Maculatura Bruna Del Pero (*Stemphylium Vesicarium*).» *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2014: 109-118.
- A. Poursafar, Y. Ghosta, M. Javan–Nikkhah. «A taxonomic study on *Stemphylium* species associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in Iran.» *Mycologia Iranica*, 2016: 99-109.
- Abbas Nasehi, Jugah Kadir. « Analysis of genetic and virulence variability of *Stemphylium lycopersici* associated with leaf spot of vegetable crops.» *European Journal of Plant Pathology*, 2014.
- Ariano, Renato. *Il campionamento aereobiologico*. s.d.
- ARPAT. «Progetto: Monitoraggio spore fungine in ambienti agricoli.» s.d.
- Asad, Saeed Ahmad. «Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review.» *Ecological Complexity*, 2022.
- Bong Joo Park, Hideaki Taguchi, Katsuhiko Kamei, Tetsuhiro Matsuzawa, Suong-Hyu Hyon and Jong-Chul Park. «In Vitro Antifungal Activity of Epigallocatechin 3-O-Gallate against Clinical Isolates of Dermatophytes.» *Yonsei Med J.* , 2011: 52(3): 535–538.
- Catlett, † Olen C. Yoder,‡ and B. Gillian Turgeon*. «Whole-Genome Analysis of Two-Component Signal Transduction Genes in Fungal Pathogens.» *Eukaryot Cell.*, 2003.
- Choudhary DK, Johri BN. «Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). » *Microbiol Res*, 2008: 493-513.
- Christian Pillonel, Thomas Meyer. «Effect of Phenylpyrroles on Glycerol Accumulation and Protein Kinase Activity of *Neurospora crassa*.» *Pesticide Science*, 1999: 229-236.
- Collina, Marina. «Maculatura bruna, la situazione delle resistenze ai fungicidi.» *L'Informatore Agrario*, 2020: 33-35.
- Corn  M.J. Pieterse, Christos Zamioudis, Roeland L. Berendsen, David M. Weller, Saskia C.M. Van Wees, and Peter A.H.M. Bakker. «Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes.» *Annu. Rev. Fitopatolo*, 2014: 52, 347–375.
- Day AM, McNiff MM, da Silva Dantas A, Gow NAR, Quinn J. «Hog1 Regulates Stress Tolerance and Virulence in the Emerging Fungal Pathogen *Candida auris*. » *mSphere*, 2018.

- Discovery, JMP Statistical. *JMP Statistical Discovery*.
https://www.jmp.com/it_it/statistics-knowledge-portal/exploratory-data-analysis/box-plot.html.
- Djordje Fira, Ivica Dimkić, Tanja Berić, Jelena Lozo, Slaviša Stanković. «Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species.» *Journal of Biotechnology*, 2018.
- E. Montesinos, C. Moragrega, I. Llorente, P. Vilardell, A. Bonaterra, I. Ponti, R. Bugiani, P. Cavanni, A. Brunelli. «Development and Evaluation of an Infection Model for *Stemphylium vesicarium* on Pear Based on Temperature and Wetness Duration.» *Phytopathology*, 1995.
- fitogest. *fitogest.imagelinenetwork.com*. 2020.
<https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/sostanze-attive/ciprodinil/514>.
- —. *fitogest*. 2020. <https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/sostanze-attive/mancozeb/192>.
- fitosanitario. *www.fitosanitario.pr.it*. 2009.
https://www.fitosanitario.pr.it/files/5016/1070/9171/revoca_mancozeb.pdf.
- Gazzetti, Katia, Elena L. Diaconu, Irene M. Nanni, Alessandro Ciriani, e and Marina Collina. «Genome Sequence Resource for *Stemphylium vesicarium*, Causing Brown Spot Disease of Pear.» *IS-MPMI*, 2019.
- Giraud, MF., Leonard, G., Field, R. et al. «RmlC, the third enzyme of dTDP-L-rhamnose pathway, is a new class of epimerase.» *Nat Struct Mol Biol*, 2000: 398-402.
- Giulia Alberoni, Davide Cavallini, Marina Collina & Agostino Brunelli. «Characterisation of the first *Stemphylium vesicarium* isolates resistant to strobilurins in Italian pear orchards.» *European Journal of Plant Pathology*, 2010: 453-457.
- Giulia Alberoni, Marina Collina*, Davide Pancaldi and Agostino Brunelli. «Resistance to dicarboximide fungicides in *Stemphylium vesicarium* of Italian pear orchards.» *European Journal of Plant Pathology*, 2005: 211–219.
- Giulia Alberoni, Marina Collina, Catherine Lanen, Pierre Leroux & Agostino Brunelli. «Field strains of *Stemphylium vesicarium* with a resistance to dicarboximide fungicides correlated with changes in a two-component histidine kinase.» *European Journal of Plant Pathology*, 2010b: 171-184.
- González-Mendoza, D. «A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi.» *Genetics and Molecular Research*, 2010.
- Guotian Li, Xiaoying Zhou, Jin-Rong Xu,. «Genetic control of infection-related development in *Magnaporthe oryzae*.» *Current Opinion in Microbiology*, 2012: 678-684.
- HEIN, INGO. «The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions.» *Mol Plant Pathol*, 2009.

- Hua, Chenyan. «Curcumin Induces Oxidative Stress in Botrytis cinerea, Resulting in a Reduction in Gray Mold Decay in Kiwifruit.» *J. Agric. Food Chem.*, 2019.
- *Il nuovo "TASSINARI"*. REDA, 2018.
- *info.agrimag.it*. 2017. <https://info.agrimag.it/principi-attivi/5400/trifloxystrobin#tab-caratteristiche>.
- ISPRA, Manuali e Linee Guida 151/2017. «POLLnet- linee guida per il monitoraggio aereobiologico.» 3 11 2015.
- Jeffries, P. «Biology and ecology of mycoparasitism.» *Can. J. Bot.*, 1995: 73, 1284–1290.
- Jin Chen, Zheng-Min He, Feng-Ling Wang, Zheng-Sheng Zhang, Xiu-zhen Liu, Dan-Dan Zhai, Wei-Dong Chen,. «Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections.» *European Journal of Pharmacology*,, 2016: 33-42.
- Jing Chen, Lifang Hu, Na Chen, Ruimin Jia, Qing Ma and Yang Wang*. «The Biocontrol and Plant Growth-Promoting Properties of Streptomyces alfalfae XN-04 Revealed by Functional and Genomic Analysis.» *Frontiers in Microbiology* , 2021.
- jmp. jmp. s.d. (https://www.jmp.com/it_it/statistics-knowledge-portal/one-way-anova.html).
- Jürgen Köhl, Rogier Kolnaar and Willem J. Ravensberg. «Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy.» *Plant Sci.*, 2019.
- Katia Gazzetti, Elena L. Diaconu, Irene M. Nanni, Alessandro Ciriani, and Marina Collina. «Genome Sequence Resource for Stemphylium vesicarium, Causing Brown Spot Disease of Pear.» *The American Phytopathological Society (APS)*, 2019.
- Kearns, Daniel B. «A field guide to bacterial swarming motility.» *Nature Reviews Microbiology* , 2010: 8, pages 634–644.
- Keller, Harald. «Disease susceptibility in the Zig-Zag model of host–microbe interactions: only a consequence of immune suppression?» *Mol Plant Pathol*, 2016.
- Kim, Moo-key, Choi, Gyung-ja, Lee, Hoi-seon. «Fungicidal Property of Curcuma longa L. Rhizome-Derived Curcumin against Phytopathogenic Fungi in a Greenhouse.» *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003: Vol.51(6), p.1578-1581.
- Kloepper JW, Ryu C-M, Zhang S. «Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus spp.» *Phytopathology* , 2004: 1259-1266.
- Koch R.L., Galvan T.L. «Bad side of a good beetle: the North American experience with Harmonia axyridis.» In *From Biological Control to Invasion: the Ladybird Harmonia axyridis as a Model Species*, di Galvan T.L. Koch R.L. Dordrecht: Springer, 2007.

- Koike, Steven T. «Stemphylium Leaf Spot of Parsley in California Caused by Stemphylium vesicarium.» *The American Phytopathological Society*, 2013.
- L. Atanasova, Lea. «Ecophysiology of Trichoderma in Genomic Perspective 10.1016/B978-0-444-59576-8.00002-3.» 2014.
- Lee S. J, Park S. Y, Lee J. J, Yum D. Y, Koo B. T, Lee J. K. «Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis* . .» *Appl Environ Microbiol*, 2002: 3919–3924.
- Llorente I., Vilardell P., Bugiani R., Gherardi I., Montesinos E., «Evaluation of BSPcast Disease Warning System in reduced fungicide use programs for management of brown spot of pear.» *Plant Dis*, 2000.
- Llorente, I., Vilardell, A., Vilardell, e P. et al. «Control of brown spot of pear by reducing the overwintering inoculum through sanitation.» *Eur J Plant Pathol*, 2010: 128, 127–141.
- Llorente, Isidre e Montesinos. «Brown Spot of Pear: An emerging disease of economic importance in Europe.» *Plant disease*, 2006.
- Llorente, Isidre, C. Moragrega, L. Rruz, e E. Montesinos. «An update on control of brown spot of pear.» *Trees*, 2011: 239-245.
- Lugtenberg, B., and Kamilova, F. «Plant-growth-promoting rhizobacteria.» *Annu. Rev. Microbiol.*, 2009: 63, 541–556.
- Magalhães Cruz L, de Souza EM, Weber OB, Baldani JI, Döbereiner J, Pedrosa Fde O. «16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill).» *Appl Environ Microbiol.*, 2001: 2375-2379.
- Manoharan Melvin Joe, Mohinutheen Chanbhasa, Allen John Henry, Abitha Benson. «Treatment of carrots with spent green tea extract reduces the soft rot of *Pectobacterium spp.*» *Archives of Phytopathology and Plant Protection* , 2017: 491-503.
- Marc Ongena, Philippe Jacques. «Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol.» *trends in Microbiology*, 2008.
- Maria Lodovica Gullino, Federico Tinivella, and. «mancozeb pastr, present and future.» *Plant Disease*, 2010.
- Marzialetti, Silvia. «Pere, ancora un anno di crisi: produzione al minimo storico.» *il sole 24 ore*, 14 ottobre 2021.
- Masatomo Hirasawa, Kazuko Takada. «Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*.» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004: Pages 225–229.
- Montesinos, e Llorente. «Brown Spot of Pear: An emerging disease of economic importance in Europe.» *Plant disease*, 2006: 1368-1375.

- Montesinos, E., Moragrega, C., Llorente, I., Vilardell, P., Bonaterra, A., Ponti, I., Bugiani, R., Cavanni, P., Brunelli, A., «Development and evaluation of an infection model for *Stemphylium vesicarium* on pear based on temperature and wetness duration.» *Phytopathology* , 1995: 586-592.
- Montesinos, Emilio. «Susceptibility of selected European Pear cultivars to infection by *Stemphylium vesicarium* and influence of leaf and fruit age.» *The American Phytopatological Society*, 1995: 471-473.
- Montesinos, Llorente e. «, Brown Spot of Pear: An emerging disease of economic importance in Europe .» 2006.
- Moo-key Kim, Gyung-ja Choi, and Hoi-seon Lee. «Fungicidal Property of *Curcuma longa* L. Rhizome-Derived Curcumin against Phytopathogenic Fungi in a Greenhouse.» *J. Agric. Food Chem.*, 2003.
- Muhammad Usman Ghazanfar, Mubashar Raza, Waqas Raza, Misbah Iqbal Qamar. «TRICHODERMA AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENT, ITS EXPLOITATION IN AGRICULTURE: A REVIEW.» *Plant Protection*, 2018.
- Not, (Rabenh.) Ces. & De. «(Rabenh.) Ces. & De Not.» s.d.
- Ongena, M., e Jacques, P. «Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol.» *Trends Microbiol.*, 2008: 16, 115–125.
- P. Singh, P. Park, R. Bugiani, P. Cavanni, H. Nakajima, M. Kodama, H. Otani, K. Kohmoto. «Effects of Host-Selective SV-Toxin from *Stemphylium vesicarium*, the Cause of Brown Spot of European Pear Plants, on Ultrastructure of Leaf Cells.» *Laboratory of Plant Pathology, Tottori University, Japan*, 1999: 87-93.
- Pachioli, Silvero. *Guida alla coltivazione e difesa melo e pero. roseto degli Abruzzi (TE)*, 2020.
- Pereira, Vanessa Tolentino. «Mechanisms of resistance/tolerance of *Pyrus communis*.» *Agroforest Syst*, 2015: 991-1017.
- Poursafa, A., Y. Ghosta, e M. Javan–Nikkhah. «A taxonomic study on *Stemphylium* species associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in Iran.» *Mycologia Iranica*, 2016.
- Rasmussen T. B, Bjarnsholt T, Skindersoe M. E, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M. «Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. .» *J Bacteriol*, 2005: 1799–1814 .
- Regione Emilia-Romagna. 2012. <https://agricoltura.regione.emilia-romagna.it/fitosanitario/temi/difesa-sostenibile-delle-produzioni/previsione/funghi-e-batteri/bsp-cast-brown-spot-pear-cast>.
- Regione Emilia-Romagna. *agricoltura.regione.emilia-romagna.it*. 27 novembre 2012. <https://agricoltura.regione.emilia-romagna.it>

romagna.it/fitosanitario/temi/avversita/schede/avversita-per-nome/maculatura-bruna/maculatura-bruna-del-pero-scheda.

- Rigling, D., & Prospero, S. «Cryphonectria parasitica, the causal agent of chestnut blight: Invasion history, population biology and disease control.» *Molecular Plant Pathology*, 2018: 19(1), 7–20. .
- Riso italiano . <https://www.risoitaliano.eu/>. 11 ottobre 2017 . <https://www.risoitaliano.eu/>.
- RJ., GERBI SA. MacIntyre. « Evolution of ribosomal DNA, Molecular evolutionary genetics.» *New York Plenum Press*, 1985: 419-517.
- Santos JL, Shiozaki K. «Fungal histidine kinases.» *Sci STKE.*, 2001.
- Sellitto, Vincenzo Michele. *I microrganismi utili in agricoltura*. Edagricole-New Business Media, 2020.
- Senay Ozgen, Ozgur Kivilcim Kilinc, Zeliha Selamoglu. «Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review.» *Turkish Journal of Agriculture*, 2016: 4(12): 1134-1138.
- Sofia Arnaouteli, Natalie C. Bamford, Nicola R. Stanley-Wall & Ákos T. Kovács. «Bacillus subtilis biofilm formation and social interactions.» *Nature Reviews Microbiology* , 2021: 19, pages600–614.
- Sood, Monika. «Trichoderma: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent.» *Plants (Basel)*, 2020.
- Spadaro, D., and Droby, S. «Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. » *Trends Food Sci. Technol.*, 2006: 47, 39–49.
- Statistical tools for high-throughput data analysis. *Statistical tools for high-throughput data analysis*. . <http://www.sthda.com/english/wiki/one-way-anova-test-in-r>.
- Thakore, Y. «The biopesticide market for global agricultural use.» *Industrial Biotechnology*, 2006: 2(3), 194-208.
- Thomas B. Rasmussen, Michael Givskov. «Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects.» *Micrbiology society*, 2006.
- Tony Vancov, Brad Keen. «Tony Vancov, Brad Keen.» *FEMS Microbiology Letters*, 2009: 91-96.
- van Loon, L. C., and Glick, G. R. 2004. «Increased plant fitness by rhizobacteria.» *Molecular Ecotoxicology of Plants*, 2004.
- Vittorio Rossi, Elisabetta Patteri, Riccardo Bugiani. «Sources and seasonal dynamics of inoculum for brown spot disease of pear.» *Eur J Plant Patho*, 2007.
- Wenyu Ye, Xiao Chen, Zhenhui Zhong, Meilian Chen, Lei Shi, Huakun Zheng, Yahong Lin, Dongmei Zhang, Guodong Lu, Guangpu Li, Jisheng Chen, Zonghua

- Wang,. «Putative RhoGAP proteins orchestrate vegetative growth, conidiogenesis and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*.» *Fungal Genetics and Biology*, 2014: 37-50.
- Yan, Z., Reddy, M. S., Ryu, C.-M., McInroy, J. A., Wilson, M., and. « Induced systemic resistance against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria.» *Phytopathology* , 2002: 92:1329-1333.
 - Yang D, Wang T, Long M, Li P. «Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine.» *Oxid Med Cell Longev*, 2020.
 - Yanmei Feng^{1, 2}, Yaohua Huang^{1,2}, Hui Zhan^{1,2}, Pankaj Bhatt^{1,2} and Shaohua Chen^{1,2*}. «An Overview of Strobilurin Fungicide Degradation:Current Status and Future Perspective.» *Front. Microbiol.*, 2020.

7 INDICE FIGURE

- Figura 1 Nella seguente mappa vengono indicati i punti in cui il pero si è sviluppato ed adattato maggiormente	4
- Figura 2: Anatomia del frutto in sezione verticale	6
- Figura 3: Macula bruna (www.italiafruit.net)	8
- Figura 4: <i>spot</i> esteso a forma cuneo (www.agro.basf.it).....	9
- Figura 5: rappresentazione grafica della presenza di ascospore catturate, ascospore aeree e conidi. Llorente et al. 2006	11
- Figura 6: Ciclo sessuale <i>S. Vesicarium</i>	13
- Figura 7: Cellula floematica di una foglia di una pera suscettibile trattata con tossina per 11h (12'00 x). Notare l'accumulo dei frammenti di membrana (MF). Non ci sono anomalie da segnalare nelle vescicole del Golgi (GV), nel nucleo (N), nel plasmodesma (PD),	15
- Figura 8: Membrana plasmatica vicino al plasmodesma (PD) in una cellula floematica di una foglia di una cultivar di pera resistente trattata con una tossina per 6h (40'000 x). P. Singh et Al. 2000	15
- Figura 9: Piccola invaginazione del plasmalemma (PI) nel plasmodesma (PD) in cellule floematiche di foglie di pere suscettibili trattate con tossina (30'000 x). P. Singh et Al. 2000.....	15
- Figura 10: Struttura dell'istidina chinasi fungina ACH90385-1. Ottenuta tramite PROSITE.	230
- Figura 11: struttura dell'epigallocatechin gallato (da abcam)	23
- Figura 12: A) Struttura dell'epigallocatechin gallato (da abcam). B) Struttura quercitina da (Senay Ozgen 2016)	31
- Figura 13: Foto satellitare del pereto di Castelletto (BS). Da: Google Earth	34
- Figura 14: A) filare di pere del campo di Castelletto (BS). B) Impianto di irrigazione a goccia.	35
- Figura 15: Supporto vetrino capta spore	36
- Figura 16: Capta-spore posizionato a 30 cm da terra.....	36
- Figura 17: porta vetrini.....	37
- Figura 18: Rappresentazione grafica della struttura del vetrino e dei metodi di lettura. (ARPAT).....	37
- Figura 19: da 50 ml contenenti i campioni presi dal campo	39
- Figura 20: Piastre di campioni su PDA. A) campioni al momento della piastratura. B) Dopo una settimana di crescita.....	39
- Figura 21: Pere preparate per essere disinfettate.....	40
- Figura 23: Piastra 10 giorni dopo la ripropagazione	40
- Figura 22: ripropagazione del fungo tramite bisturi.....	40
- Figura 24: design della piastra per il posizionamento die campioni. B identifica i pozzetti contenenti il controllo. T identifica i pozzetti contenenti il trattamento.....	47
- Figura 25: struttura di un Boxplot.	49
- Figura 26:relazione tra umidità e numero di spore.....	51
- Figura 27: BSP-cast. soglia di allarme fissata a 0,5 (E. Montesinos 1995)	52
- Figura 28: Grafico che indica l'andamento delle spore di <i>S. vesicarium</i> ed <i>Alternaria</i> nelle diverse parcelle.....	53

- Figura 29: Andamento giornaliero medio delle spore di <i>S. vesicarium</i> per ogni parcella di trattamento.	54
- Figura 30: boxplot spore <i>S. vesicarium</i> e <i>Alternaria</i> . La linea nera rappresenta la mediana.	55
- Figura 31: boxplot spore <i>S. vesicarium</i> . La linea nera rappresenta la mediana.	55
- Figura 32: differenza tra le medie di due trattamenti diversi nel conteggio delle spore di <i>S.vesicarium</i>	56
- Figura 33: differenza tra le medie di due trattamenti diversi nel conteggio delle spore di <i>S. vesicarium</i> ed <i>Alternaria</i>	56
- Figura 34: tabella di riferimento per la percentuale di macchia necrotica sulla superficie fogliare.....	57
- Figura 35: boxplot rappresentante la distribuzione dei dati delle macchie necrotiche. La linea in nero è la mediana.	58
- Figura 36: differenza tra le medie di due trattamenti diversi.	58
- Figura 37: boxplot spot pere nelle diverse parcelle. La linea nera rappresenta la mediana.	59
- Figura 38: differenza tra le medie dei diversi trattamenti.	59
- Figura 39: Primo isolamento.....	61
- Figura 40: PCR con primer per amplificare ITS.....	62
- Figura 41: PCR con primer per amplificare 16S.....	62
- Figura 42: seconda prova di isolamento.....	63
- Figura 43: PCR con primer per identificare il 16S.....	64
- Figura 44: PCR utilizzando i primer per identificare gli ITS.....	64
- Figura 45: PCR utilizzando i primer per identificare <i>S. vesicarium</i>	64
- Figura 46: terza prova di isolamento.....	65
- Figura 47: output primer blast.....	66
- Figura 48: Output del software MultiAlign. In alto: la sequenza del gene. Al centro: la sequenza del primer. In basso: la sequenza consensus.....	66
- Figura 49: PCR sui GDP. A, B, C <i>S. vesicarium</i> cresciuti su PDA. TA, TB, TC <i>S. vesicarium</i> cresciuto su <i>tomato agar</i>	67
- Figura 50: PCR sul DNA genomico estratto da gemme utilizzando a sinistra i primer GDP e a destra i primer SvHK1. <i>trichoderma spp.</i> (tr), estratto vegetale (e.v), non trattato (nt), parcella controllo (c), campione positivo (<i>S. vesicarium</i> isolato in laboratorio) e campione negativo.....	68
- Figura 51: Esperimento di competizione <i>in vitro</i>	69
- Figura 52: antibiogrammi con fungicidi utilizzati durante la stagione produttiva contro <i>S. vesicarium</i>	70
- Figura 53: valutazione e test dei BCA migliori C2N5 e C2N9 e del peggiore C1N9 usato come controllo	71
- Figura 54: Valutazione dell'efficacia di molecole naturali di origine vegetale nell'inibire la crescita di <i>S. vesicarium</i> . Le sostanze sono state utilizzate ad una concentrazione pari a MIC 1/2.	71
- Figura 55: Allineamento HK1 di <i>S.lycopersici</i> ed <i>S. vesicarium</i>	72
- Figura 56: output STRING.....	73
- Figura 57: output STRING, analisi di co-espressione.....	80

- Figura 58: Phosphorelay signaling.....	81
- Figura 59: principali vie di segnalazione coinvolte nella morfogenesi correlata all'infezione in <i>M. oryzae</i>	82

8 INDICE TABELLE

- Tabella 1: Periodo di presenza sul mercato (https://sistemafrutta.it/prodotti.html)	5
- Tabella 2: Suscettibilità delle diverse cultivar allo <i>S. vesicarium</i>	10
- Tabella 3: Estratto del quaderno di campagna	18
- Tabella 4: Rischio di resistenza dei fungicidi autorizzati in Italia contro la maculatura bruna del pero.....	21
- Tabella 5: Piano sperimentale dei trattamenti in campo. Per trattamenti routinari si intendono tutti i trattamenti che normalmente vengono fatti compresi anche i fungicidi ma per altre malattie.....	35
- Tabella 6: Quantitativo di fungicida utilizzato in 100ml	47
- Tabella 7: Molecole vegetali utilizzate e MIC relativa all'organismo su cui sono state testate.	48
- Tabella 8: Conteggio delle spore di <i>S. vesicarium</i> ed <i>Alternaria sp.</i>	53
- Tabella 9: Conta delle spore di <i>S. vesicarium</i> nelle diverse parcelle trattate.	54
- Tabella 10: Percentuale di macchia necrotica per ogni parcella trattata.	57
- Tabella 11: Numero di spot sulle pere.	59
- Tabella 12: Esiti sequenziamento dei microrganismi rilevati nel primo isolamento.	63
- Tabella 14: Quantificazione DNA genomico estratto da gemme.....	67
- Tabella 15: Funzione molecolare delle proteine identificate.	74

9 RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo mio percorso formativo desidero ricordare e ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato e supportato con suggerimenti e osservazioni costruttive. Ringrazio, soprattutto, la mia relatrice la professoressa Elodie Vandelle che mi ha appoggiato sin dal principio accogliendo la mia proposta di tesi e guidato nel suo svolgimento fino alla fine.

Devo anche la mia riconoscenza al dott. PhD Davide Danzi, che mi ha aiutato nello svolgimento degli esperimenti, per i suoi preziosi consigli e per il suo costante aiuto. Ringrazio, inoltre, il dott. Alfonso Cerrato che mi ha dato la possibilità di entrare a far parte di questo interessantissimo progetto e per il suo aiuto nel portarlo a termine. Con l'occasione, ringrazio anche tutto il gruppo del laboratorio aziendale, in particolare, la responsabile Dott.ssa Eleonora Pegoiani; i ragazzi della produzione e la direzione amministrativa.

Ringrazio l'Azienda Agricola Ortofrutticola Malleier per aver gentilmente messo a disposizione gli alberi di pere e senza la quale gran parte di questa esperienza non sarebbe potuta esistere.

Per i consigli, il supporto e la grandissima disponibilità dimostrata devo ringraziare il Dottor. Riccardo Bugiani.

Non posso non menzionare la mia famiglia, in particolare, i miei genitori che da sempre mi sostengono nella realizzazione dei miei progetti. Non finirò mai di ringraziarvi per avermi permesso di arrivare fin qui.

Un doveroso grazie lo devo anche a mio fratello, per il suo aiuto ed i suoi consigli.

Ringrazio anche la mia ragazza per essermi stata vicina in questi mesi ed avermi supportato in tutti i momenti.

Infine, voglio ringraziare tutti i miei amici per essere stati sempre presenti anche durante questa ultima fase del mio percorso di studi. Grazie per aver ascoltato i miei sfoghi, grazie per tutti i momenti di spensieratezza.

Grazie infinite a tutti voi.

