

Risultati del progetto A.Ma.Pero

Novità nella difesa dalla maculatura bruna

Dalle indagini svolte su pereti di Abate Fétel si evidenzia che la semplice presenza epifitica del patogeno non è di per sé predittiva dello sviluppo dei sintomi. Le analisi di laboratorio sulle tossine prodotte da *S. vesicarium* su foglie e frutti hanno confermato la patogenicità della citrinina, unica molecola in grado di indurre sintomatologia evidente sulle foglie

R. Baroncelli, M. Collina,
D. Giovanardi, A. Guerrini,
S. Iacono, M. Menghini, A. Montorsi,
V. Papaiani Ceramelli, L. Solieri,
E. Stefani, M. Tacchini

La pericoltura regionale da diversi anni si trova ad affrontare importanti e gravi sfide legate all'aggravarsi e all'accrescersi di emergenze fitosanitarie indubbiamente connesse ai cambiamenti climatici, fra queste la maculatura bruna causata da *Stemphyllium vesicarium*, che assieme agli attacchi di cimice asiatica (*Halyomorpha halys*) sta compromettendo la sopravvivenza del comparto.



Primi sintomi su foglia
di maculatura bruna

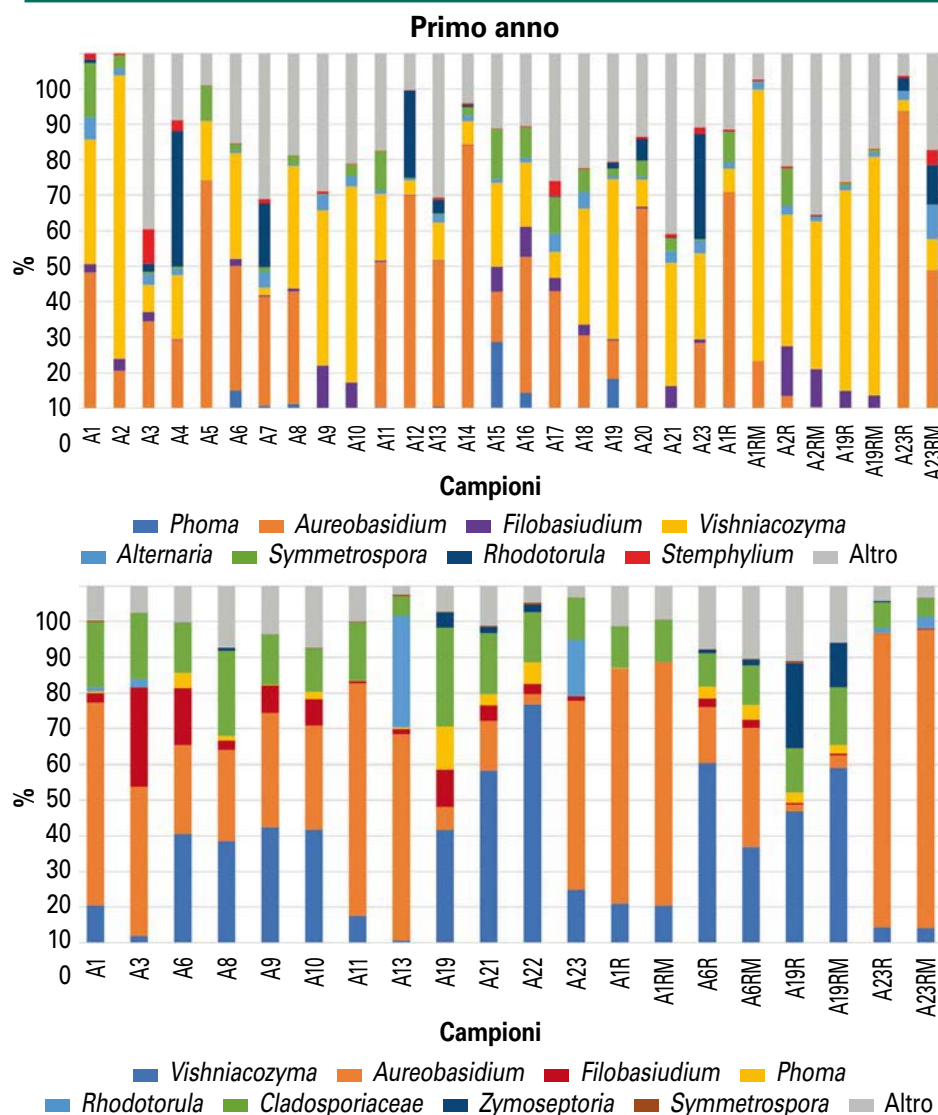
IL PROGETTO A.MA.PERO

È urgente la necessità di trovare nuove tecniche, strumenti e strategie di contenimento delle infezioni di *S. vesicarium* in grado di arginare l'abbattimento dei pereti per insostenibilità economica, con conseguenti gravi ripercussioni sull'intero indotto.

In questo scenario il progetto triennale A.Ma.Pero, che ha preso avvio nel 2023, si è dedicato allo studio di approcci potenzialmente in grado di aprire nuove strade per affrontare una gestione economicamente sostenibile delle coltivazioni di pero nel rispetto delle nuove strategie «Farm to Fork» connesse anche alla mitigazione dei cambiamenti ambientali.

In particolare, gli ambiti di lavoro proposti nel progetto sono finalizzati a ottenere un'approfondita conoscenza sull'identità e sulla struttura delle comunità microbiche epifite presenti su frutti asintomatici e sintomatici della cv Abate Fétel in pereti dell'Emilia-Romagna, in differenti condizioni pedoclimatiche e strategie di difesa, per far luce sul loro ruolo ecologico e correlazione nell'insorgenza della maculatura bruna. L'approfondimento delle conoscenze sulle tossine prodotte dal fungo, dato il loro ruolo epidemiologico centrale, è stato l'altro principale obiettivo del progetto.

GRAFICO 1 - Composizione fungina (abbondanza relativa %) sui campioni di superfici dei frutti di pero nel 2023 e 2024



La lettera «A» identifica l'azienda di provenienza, numerata progressivamente da 1 a 23 (sono incluse esclusivamente le aziende per le quali sono stati ottenuti dati). La lettera «R» indica i campioni asintomatici del secondo campionamento (agosto), mentre «RM» identifica i campioni sintomatici del secondo campionamento.

INDAGINI SUL MICROBIOTA EPIFITA DEI FRUTTI

Allo scopo sono stati prelevati frutti da 23 pereti di Abate Fétel a gestione integrata e biologica dell'Emilia-Romagna, localizzati a Modena, Ferrara, Bologna, Forlì-Cesena e Ravenna nelle stagioni vegetative 2023 e 2024 attraverso 2 campionamenti/stagione (in giugno su campioni asintomatici e in agosto su campioni sia asintomatici sia sintomatici). Tutti i frutti raccolti (2.655) sono stati utilizzati per ottenere sospensioni ac-

quose contenenti i molteplici microrganismi presenti nel microbiota da sottoporre ad analisi molecolari e isolamenti *in vitro* da parte delle Unità di ricerca dell'Università di Bologna e di Modena e Reggio Emilia. In totale sono stati preparati estratti da 177 campioni (93 nel primo e 84 nel secondo anno). Tali studi sono stati svolti appaiando una tecnica di sequenziamento genico detta *barcoding* a studi microbiologici di culturomica che, partendo dagli estratti vegetali della superficie dei frutti di pero, ha permesso di individuare e ca-

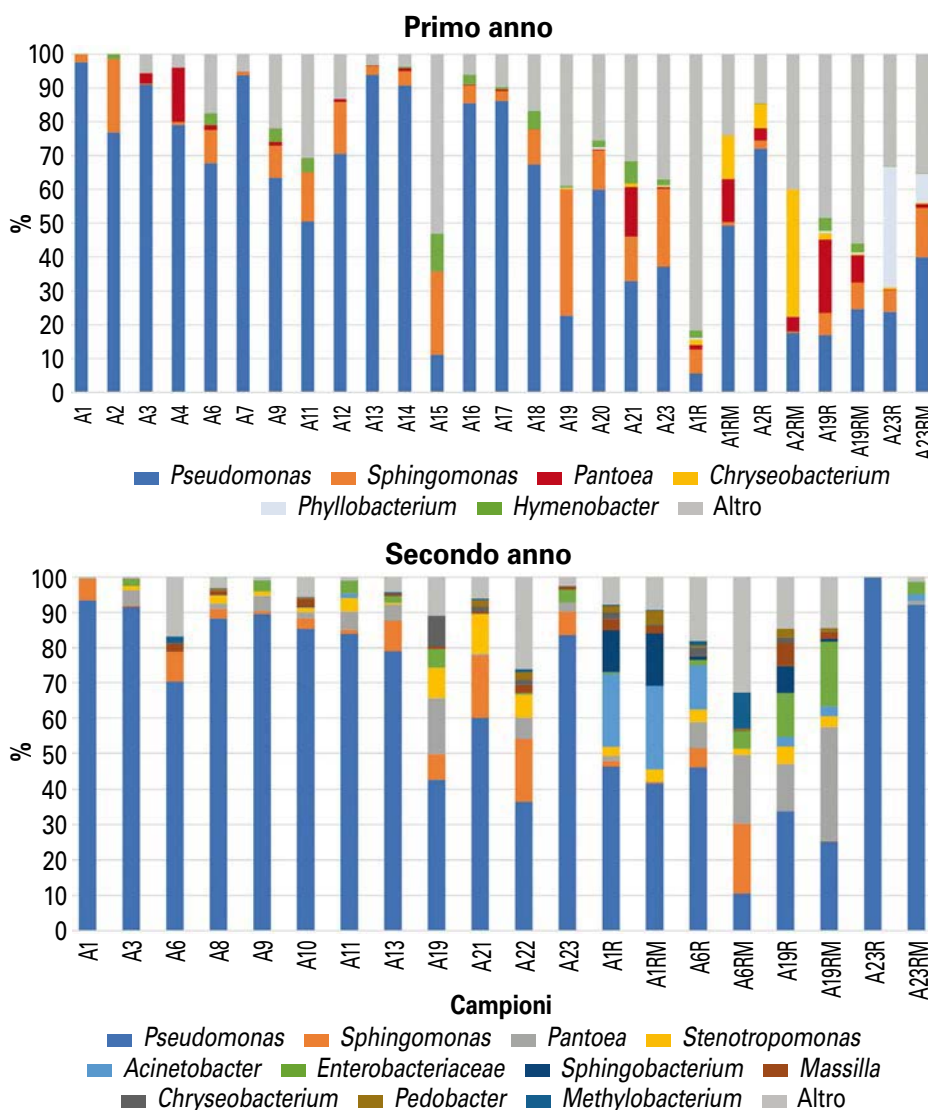
ratterizzare le comunità microbiche naturali, colturali e non, e identificare possibili antagonisti naturali di *S. vesicarium* per mezzo di sperimentazioni *in vitro* e in pianta.

IMPORTANZA DELL'ANALISI MICROBICA EPIFITA. L'analisi della componente microbica epifitica della carposfera rappresenta uno strumento fondamentale per comprendere le interazioni tra pianta, microrganismi e patogeni e per individuare nuove strategie di gestione sostenibile delle malattie. Come è noto, infatti, determinati microrganismi appartenenti alle comunità microbiche naturali del microbiota vegetale si possono sviluppare in modo sinergico e simbiotico, facilitando un maggiore apporto nutritivo alla pianta ospite, stimolando il tessuto vegetale attraverso la produzione di sostanze di crescita ma anche contrastando agenti patogeni, come *S. vesicarium*; tale attività antagonista si esprime attraverso differenti meccanismi di biocontrollo, quali competizione per le sostanze nutritive, occupazione e/o esclusione da nicchie ecologiche favorevoli, produzione di sostanze antimicrobiche (antibiosi), oppure la stimolazione dell'espressione di specifici geni della pianta ospite correlati alla resistenza indotta a stress di tipo biotico.

ANALISI BIOINFORMATICHE

In questo contesto, lo studio ha impiegato un approccio di *metabarcoding*, basato sul sequenziamento delle regioni ITS2 per i funghi e 16S rDNA per i batteri, al fine di caratterizzare in modo integrato la struttura, la composizione e la diversità delle comunità microbiche associate alla superficie dei frutti di pero (Abdelfattah *et al.*, 2018), a prescindere dalla loro vitalità e coltivabilità su substrato nutritivo. In entrambi gli anni di campionamento la comunità fungina è risultata dominata da lieviti basidiomiceti e ascomiceti tipicamente associati ad ambienti epifitici, quali *Vishniacozyma*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula* e *Filobasidium* (grafico 1),

GRAFICO 2 - Composizione procariotica (abbondanza relativa %) sui campioni nel 2023 e nel 2024



La lettera «A» identifica l'azienda di provenienza, numerata progressivamente da 1 a 23 (sono incluse esclusivamente le aziende per le quali sono stati ottenuti dati).

La lettera «R» indica i campioni asymptomatici del secondo campionamento (agosto), mentre «RM» identifica i campioni sintomatici del secondo campionamento.

taxa ampiamente riconosciuti come componenti chiave del microbiota superficiale dei frutti grazie alla loro capacità di tollerare condizioni ambientali avverse, quali irraggiamento UV, fluttuazioni termiche e limitata disponibilità di nutrienti (Buzzini *et al.*, 2017). In particolare, *Aureobasidium pullulans* è noto per la sua elevata plasticità ecologica e per il potenziale antagonista nei confronti di diversi patogeni fungini, inclusi gli agenti di marciumi e maculature dei frutti (Di Francesco *et al.*, 2018). La presenza costante di *S. vesicarium*, sebbene con abbondanze relative generalmente contenute, conferma il suo ruolo di componente del microbiota epifitico della carposfera, come già riportato per il patosistema pero-maculatura bruna (Llorente e Montesinos, 2006; Rossi *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda la componente procariotica, i generi *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Pantoea* (grafico 2) sono risultati dominanti in entrambe le stagioni di studio, in accordo con quanto ampiamente riportato per la fillosfera e carposfera di numerose specie arboree, dove tali batteri svolgono ruoli funzionali che spaziano dalla promozione della crescita vegetale alla competizione con microrganismi fitopatogeni (Vorholt, 2012; Müller *et al.*, 2016). Le analisi di diversità hanno evidenziato un effetto marcato del sistema di gestione agronomica sulla comunità fungina, sia in termini di α - che di β -diversità: i pereti a gestione biologica hanno mostrato una maggiore ricchezza e una differente strutturazione delle comunità rispetto ai sistemi integrati, verosimilmente in relazione al minore impiego di fungicidi e alla conseguente maggiore stabilità delle nicchie ecologiche (Karls-son *et al.*, 2017; Abdelfattah *et al.*, 2021). Al contrario, l'effetto del sistema colturale sulla componente batterica è risultato meno pronunciato, con differenze di α -diversità rilevabili solo in uno dei due anni e assenza di differenze significative di β -diversità, suggerendo una maggiore resilienza delle comunità procariotiche alle pratiche di gestione, come già os-

servato in studi sulla fillosfera di melo e pero (grafici A e B consultabili online all'indirizzo riportato a fine articolo) (Wassermann *et al.*, 2019).

Le analisi mirate sull'abbondanza relativa di *S. vesicarium* non hanno invece evidenziato differenze statisticamente significative né in funzione del sistema di gestione né in relazione all'incidenza della malattia, indicando che **la semplice presenza epifitica del patogeno non è di per sé predittiva dello sviluppo dei sintomi e che la dinamica della maculatura bruna è fortemente modulata da fattori ambientali ed epidemiologici** (Llorente e Montesi-

nos, 2006; Rossi *et al.*, 2005).

Al contempo, l'analisi delle abbondanze dei principali taxa fungini ha mostrato una chiara differenziazione tra i sistemi colturali: *Aureobasidium* e *Rhodo-rotula* sono risultati più abbondanti nei campioni provenienti da impianti a gestione integrata, mentre *Vishniacozyma* e *Filobasidium* hanno caratterizzato maggiormente i sistemi biologici, suggerendo un effetto selettivo delle pratiche agronomiche su specifici gruppi funzionali. Le analisi di co-occorrenza (SparCC) hanno evidenziato nel primo anno una debole ma significativa correlazione negativa tra *S. vesicarium*

e *Symmetrospora*, ipotizzando una possibile competizione ecologica, mentre la correlazione positiva (quindi apparentemente reciprocamente favorevole) con *Pseudomonas* potrebbe riflettere una semplice co-occorrenza legata a condizioni ambientali favorevoli piuttosto che un'interazione diretta, in accordo con i limiti interpretativi di tali approcci (Faust e Raes, 2012).

Nel complesso, **i risultati indicano che il sistema di gestione agronomica agisce principalmente modulando la struttura complessiva del microbiota epifittico piuttosto che influenzando direttamente l'abbondanza del patogeno.** Tale riorganizzazione delle comunità microbiche potrebbe avere ricadute indirette sulla dinamica della malattia attraverso meccanismi di competizione, esclusione ecologica e interazioni funzionali.

L'identificazione di taxa potenzialmente antagonisti nei confronti di *S. vesicarium* rafforza le prospettive di sviluppo di strategie di biocontrollo basate sulla gestione del microbiota, in linea con approcci di difesa sostenibile e integrata (Berg *et al.*, 2017). Studi futuri, integrando analisi funzionali e dati ambientali ad alta risoluzione, potranno contribuire a chiarire i meccanismi ecologici alla base di tali interazioni e a valutarne il reale potenziale applicativo in campo.

ANALISI MICROBIOLOGICHE SU SUBSTRATI DI COLTIVAZIONE ARTIFICIALE

Gli studi sulla flora microbica coltivabile si sono inizialmente concentrati sulla quantificazione della frazione coltivabile su substrati agarizzati selettivi, specifici rispettivamente per lieviti e batteri, e sulla creazione di un'estesa biobanca comprendente quasi 1.000 isolati microbici. Tutti i microrganismi isolati sono stati poi sottoposti a saggi di antagonismo *in vitro*, finalizzati a valutare la produzione di sostanze antifungine inibenti ceppi di *S. vesicarium* isolati da pere con sintomi tipici di maculatura bruna, raccolte in diverse province dell'Emilia-Romagna.



Foto 1 Sintomi diffusi di maculatura bruna sul frutto maturo in pre-raccolta che incidono in modo evidente sulla produzione

L'analisi quantitativa delle cariche microbiche (batteri e lieviti), ottenuta aggregando i dati delle stagioni colturali 2023 e 2024, ha evidenziato una maggiore rappresentatività e numerosità della frazione coltivabile batterica rispetto a quella dei lieviti in entrambi i periodi di campionamento (grafico C online). Dal punto di vista ecologico, si è inoltre osservata una tendenza a **una maggiore abbondanza microbica nei frutti provenienti da aziende biologiche rispetto a quelle gestite con approcci integrati; lo stesso è stato osservato comparando le comunità microbiche ottenute da frutti sani rispetto a quelli sintomatici,** questi ultimi caratterizzati da una minore ricchezza di microrganismi associati. Tale differenza nella composizione del microbiota potrebbe essere riconducibile all'uso di fungicidi di sintesi nelle strategie di difesa integrata, uso che ha impattato sull'abbondanza delle comunità fungine di lieviti, come emerso anche da considerazioni riportate negli studi bioinformatici, pur in assenza di effetto diretto sull'entità dei danni ai frutti provocati da *S. vesicarium*. Inoltre, l'elevata eterogeneità dei campioni e la comunque limitata rappresentatività della frazione coltivabile rispetto al microbioma totale, hanno presumibilmente ridotto la capacità di discriminare fra le variabili descritte precedentemente, come già evidenziato per approcci di culturomica (Sarhan *et al.*, 2019).

Parallelamente, l'intera biobanca è stata sottoposta a saggi di antibiosi *in vitro* verso *S. vesicarium*, consentendo la classificazione degli isolati microbici in

distinte classi di antagonismo per la crescita del micelio fungino (MGI %). La distribuzione delle classi è risultata simile tra sistemi di gestione biologica e integrata; tuttavia, nei frutti sani è stata rilevata una maggiore abbondanza di batteri con marcato antagonismo rispetto ai frutti sintomatici, suggerendo un loro possibile ruolo ecologico nel contenimento della maculatura bruna in campo (Hass e Keel, 2003) (grafico 3). L'identificazione degli isolati microbici mediante sequenziamento di geni costitutivi, e successive analisi comparative di omologia di sequenze in banche dati di genomica internazionali, ha evidenziato tra i taxa più rappresentati e abbondanti i generi *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Pantoea* spp.; per i lieviti, i taxa più comuni sono stati *A. pullulans*, *Rhodotorula* spp. e *Metschnikowia* spp., come riportato nel grafico 4.

I taxa batterici *Pseudomonas* e *Pantoea* sono risultati dominanti sui frutti di pero anche dalle analisi bioinformatiche sopra descritte che trovano ulteriore conferma in precedenti ricerche scientifiche (Duvenage *et al.*, 2017).

In merito al genere *Bacillus*, i risultati conseguiti hanno evidenziato una sua maggiore rappresentatività e abbondanza rispetto ad altri taxa quali *Pseudomonas*. Questo risultato può essere spiegato dalla velocità di crescita e potenziale di competizione del genere *Bacillus* su substrato agarizzato, come riportato anche in precedenti studi di culturomica del microbiota residente sulla superficie dei frutti di specie arboree differenti, quali il melo (Ottesen *et al.*, 2009).

Tra i lieviti coltivabili *in vitro* e identificati molecularmente è stata riscontrata la dominanza dei taxa *Aureobasidium pullulans* e *Metschnikowia* spp., confermando i risultati ottenuti da precedenti studi di culturomica della carposfera di pero (Janakiev *et al.*, 2022). Inoltre, in linea con i risultati delle analisi di *metabarcoding*, *Rhodotorula* spp. si è confermato uno dei generi fungini dominanti residenti la carposfera. I principali taxa della frazione microbica coltivabile *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.,

Pantoea spp. per i batteri e *A. pullulans*, *Metschnikowia* spp. e *Rhodotorula* spp. per i lieviti, sono ampiamente descritti in letteratura per le loro possibili proprietà di promozione della crescita in pianta e come potenziali antagonisti di agenti fitopatogeni.

Ulteriori studi molecolari basati sull'analisi di similarità di sequenza e su tecniche di DNA *fingerprinting* hanno escluso che gli isolati di *Bacillus* spp. e *A. pullulans* ottenuti in questo studio derivassero dall'applicazione di formulati commerciali contenenti tali microrganismi.

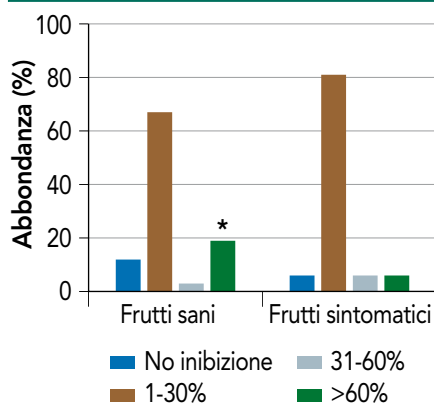
Sulla base dei risultati di antibiosi *in vitro* un set di microrganismi, appartenenti ai taxa dominanti e caratterizzati da una elevata attività antagonista *in vitro*, è stato selezionato e sottoposto a ulteriori valutazioni *in vitro* contro diversi ecotipi di *S. vesicarium*, confermando in questo modo il proprio potenziale antagonista.

Successivamente, le sperimentazioni condotte in pianta nel corso del triennio, sia in condizioni controllate su frutti sia di semi-campo su foglie di astoni, hanno dimostrato come l'applicazione di sospensioni acquose di tali possibili candidati antagonisti determini una significativa riduzione della gravità della maculatura bruna (grafico 5).

La caratterizzazione *in vitro* dell'attività di promozione della crescita della pianta ha inoltre evidenziato, per alcuni ceppi microbici selezionati, la capacità di produrre ammoniaca, siderofori, biofilm, nonché di solubilizzare il fosforo, meccanismi potenzialmente coinvolti sia nel controllo del patogeno, sia in un'interazione sinergica e simbiotica pianta-microrganismo (Berg *et al.*, 2017).

È stata inoltre valutata la tolleranza dei candidati antagonisti a concentrazioni crescenti di ioni rame (fino a 200 ppm), indicativa di una possibile compatibilità d'uso con disciplinari di gestione biologica o integrata della malattia che prevedano l'impiego di composti rameici. I risultati ottenuti durante la sperimentazione hanno quindi permesso di identificare almeno 4 ceppi altamente pro-

GRAFICO 3 - Inibizione *in vitro*, secondo 4 classi quantitative, del micelio di *S. vesicarium* (2023-2024) (1)



(1) Esercitata da batteri isolati da frutti sani e con sintomi di maculatura bruna, raccolti durante il 2° campionamento delle stagioni colturali 2023 e 2024. L'asterisco indica la maggiore abbondanza percentuale di batteri con marcato antagonismo (MGI >60%) in frutti sani (19%), rispetto ai frutti sintomatici (6%).

mettenti come antagonisti naturali di *S. vesicarium*, appartenenti rispettivamente ai taxa *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *A. pullulans* e *Rhodotorula* sp.

Infine, durante l'ultimo anno di sperimentazione, è stata condotta una prova pilota per lo sviluppo di un bioformulato a base di chabasite contenente il microrganismo antagonista *Pseudomonas* sp., in collaborazione con l'azienda italiana Symbiagro srl, specializzata nel settore biostimolanti e bioprotettori naturali. I risultati, seppur preliminari, hanno confermato la compatibilità del microrganismo antagonista con i co-formulanti, la sua stabilità e vitalità nel tempo, la sua capacità di colonizzazione della fillosfera in astoni di pero in condizioni di semi-campo, e l'efficacia di biocontrollo di *S. vesicarium* sui frutti in ambiente controllato.

Nel complesso, i risultati ottenuti pongono solide basi scientifiche per il possibile sviluppo e valutazione del potenziale applicativo di antagonisti microbici naturali nella gestione sostenibile della maculatura bruna del pero, in linea con le strategie europee «Farm to Fork» e con gli obiettivi di mitigazione dell'impatto ambientale dei sistemi agricoli.

ANALISI DEL COMPLESSO TOSSIGENO DI *S. VESICARIUM*

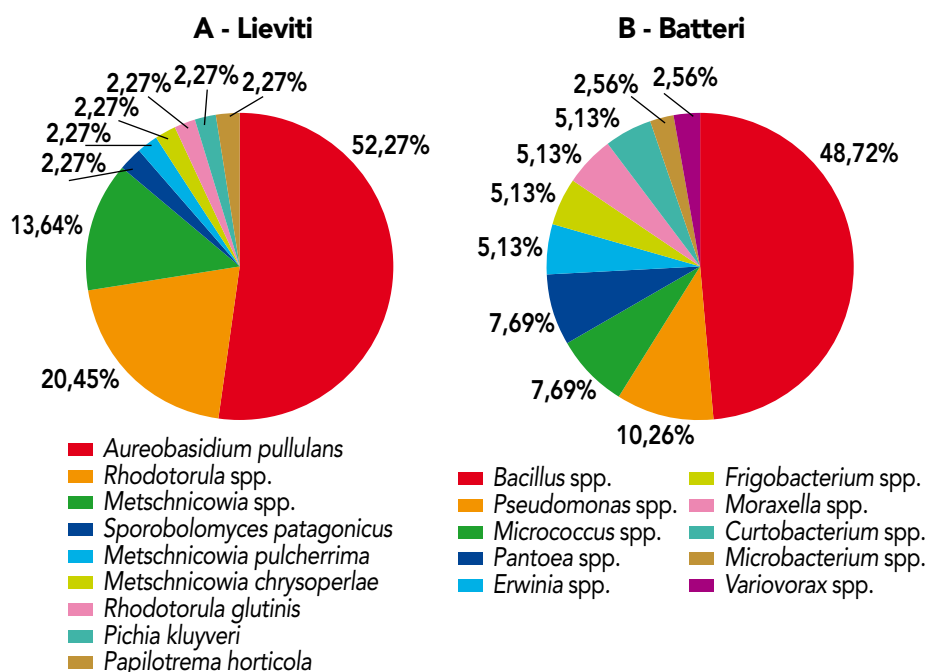
Lo stato dell'arte relativo alla conoscenza delle tossine di *S. vesicarium* è lacunoso e privo di evidenze univoche sulla loro struttura chimica. Sebbene una ricerca scientifica nata da una collaborazione tra un gruppo di ricerca danese e uno italiano (Andersen *et al.*, 1995) abbia ipotizzato il coinvolgimento di composti quali stenfilina, stenfiperilenolo, stenfilossina II e stenfolo, tali attribuzioni rimangono speculative in quanto basate esclusivamente su analisi preliminari (ultravioletto-visibile), prive del supporto di indagini in grado di definirne con precisione la struttura chimica (es. spettroscopia di risonanza magnetica e spettrometria di massa). Ricerche successive (Singh *et al.*, 1999; Tanahashi *et al.*, 2017) hanno confermato l'attività biologica di alcune frazioni purificate dal filtrato liquido di *S. vesicarium*, denominate SVI e SVII, senza tuttavia riuscire a definirne l'identità molecolare.

LE INDAGINI SVOLTE DALL'UNIVERSITÀ DI FERRARA E DI BOLOGNA.

Partendo da queste premesse, i gruppi di ricerca dell'Università di Ferrara e di Bologna hanno avviato uno studio riprendendo e verificando i risultati di precedenti lavori scientifici (Singh *et al.*, 1999; Tanahashi *et al.*, 2017). In una prima fase sono stati analizzati i liquidi di coltura di ceppi patogeni del pero SV173 e SV1115, appartenenti alla collezione dell'Università di Bologna. Da questi materiali sono state ottenute diverse frazioni che, in un primo momento, sembravano in grado di provocare lievi alterazioni sulle foglie di astoni di pero.

Per comprendere meglio la natura di queste sostanze, i ricercatori hanno effettuato **analisi chimiche basate su tecniche di separazione e identificazione molecolare ad alta precisione** (cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione - UPLC-HR-MS). I dati ottenuti hanno evidenziato la presenza di composti come nucleosidi, aminoacidi e piccoli peptidi, molecole che con ogni probabi-

GRAFICO 4 - Abbondanza relativa (%) dei taxa di appartenenza degli isolati di lieviti e batteri identificati molecularmente (¹)



(¹) Mediante sequenziamento di geni costitutivi e successive analisi comparative di omologia di sequenze in banche dati di genomica internazionali.

lità derivavano dal terreno di coltura utilizzato per far crescere i microrganismi. Questa «interferenza di fondo» (o «effetto matrice») rende difficile individuare eventuali tossine prodotte dal patogeno. Per chiarire il **ruolo di tali composti, sono stati condotti saggi di tossicità** applicando singole sostanze (fenilalanina, adenosina, adenina, triptofano) su foglie di pero della varietà Abate Fétel, coltivate in condizioni controllate di serra. I risultati non hanno mostrato alcun effetto dannoso, indicando che queste molecole, da sole, non sono responsabili dei sintomi osservati.

INDIVIDUARE LE SOSTANZE TOSSICHE PRODOTTE DAL PATOGENO. In una fase successiva dello studio la ricerca è stata indirizzata verso nuovi approcci sperimentali per individuare le sostanze tossiche prodotte dal patogeno (metaboloma tossigeno), cercando di ridurre le interferenze dovute ai componenti del terreno di coltura. **L'obiettivo era ottenere un quadro più chiaro dell'insieme delle molecole potenzialmente coinvolte nei sintomi osservati sulle piante.**

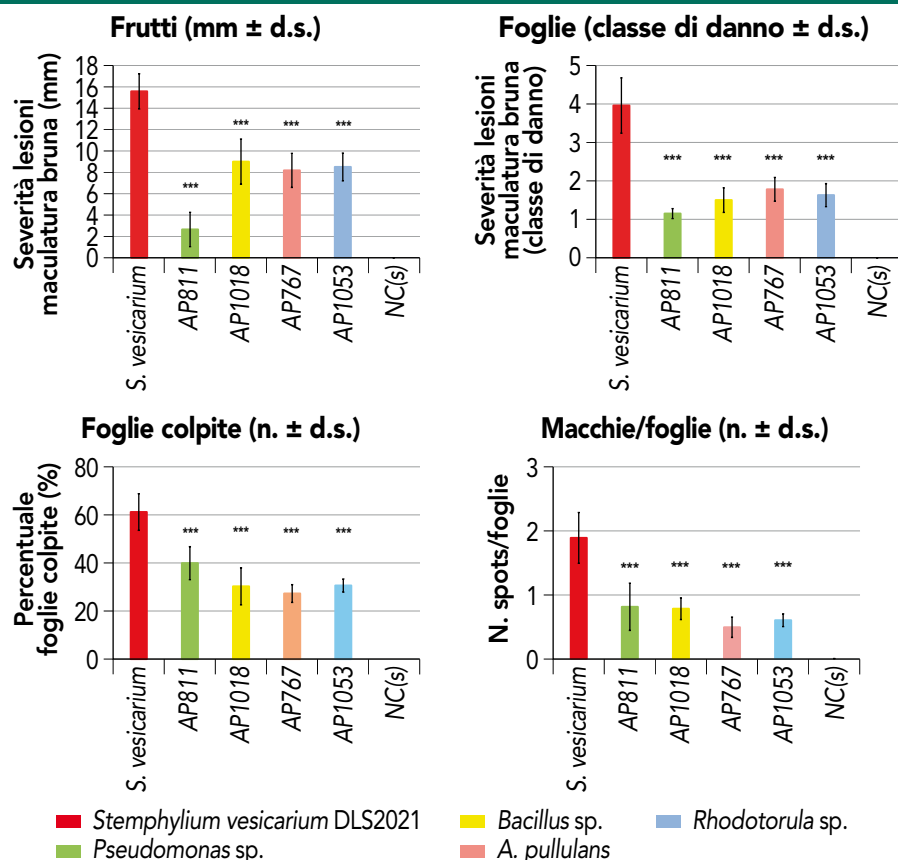
Attraverso l'impiego della tecnica UPLC-HR-MS sono stati caratterizzati diversi tipi di campioni: estratti ottenuti da colture dei due ceppi su substrato solido ed estratti di acque di germinazione dei conidi e di tessuti vegetali (foglie e frutti) che avevano sviluppato maculatura a seguito dell'inoculazione con i ceppi virulenti. La caratterizzazione è stata confrontata con campioni di controllo non inoculati che avevano il ruolo di distinguere le molecole effettivamente legate all'attività del fungo. Le analisi hanno permesso di identificare alcune tossine già note in letteratura scientifica, come l'altersolanolo A, rilevato nelle colture su terreno solido, e la macrosprorina 7-O-solfato e la citrinina, individuate nelle acque di germinazione delle spore. Si tratta di composti considerati «non specifici dell'ospite», cioè capaci di esercitare un'azione tossica su diverse specie vegetali. È interessante notare che, fino a oggi, la citrinina non era mai stata segnalata nel genere *Stemphylium*. Parallelamente, lo studio dei tessuti che hanno sviluppato maculatura bruna su foglie e frutti di Abate Fétel ha rivela-

to alterazioni metaboliche riconducibili allo stress biotico, quali l'incremento di acido jasmonico e 12-ossosfitodienico e di derivati ossidati di acidi grassi. I saggi biologici condotti dall'Università di Bologna su foglie e frutti di Abate Fétel hanno, infine, **confermato la patogenicità della citrinina, unica molecola in grado di indurre sintomatologia evidente sulle foglie.**

Infine, lo studio delle tossine è stato integrato con un approccio basato sulla metabolomica comparativa, mettendo a confronto i ceppi patogeni per il pero (SV173 o SV1115) con un ceppo isolato da melo, risultato non patogeno per il pero (M981). Questo confronto ha evidenziato le differenze metaboliche tra microrganismi capaci o meno di provocare sintomi sulla coltura del pero. Le analisi genomiche, condotte in uno studio parallelo presso l'Università di Bologna, avevano suggerito la presenza di sequenze potenzialmente coinvolte nella patogenicità, in particolare quelle in grado di codificare proteine con ripetizioni TPR (tetratricopeptidi). Tali proteine sono state considerate possibili fattori di aggressività, anche alla luce di quanto già noto per altri funghi fitopatogeni (es. genere *Alternaria*), nei quali sono state descritte come tossine specifiche per l'ospite (Meena e Samal, 2019). Su questa base sono stati preparati estratti proteici ottenuti da colture dei ceppi cresciuti su terreni solido e liquido, successivamente testati presso l'Università di Bologna su astoni di pero. Sebbene le prove non abbiano prodotto sintomi chiaramente riconducibili a un'infezione, la ricerca proseguirà oltre la durata del progetto con l'obiettivo di ottenere frazioni proteiche più purificate e risultati più facilmente interpretabili.

Sono stati anche preparati estratti con solventi a vario grado di polarità per valutare la differente composizione chimica dei due ceppi. L'analisi delle sostanze volatili ha evidenziato un comportamento differente: nelle foglie inoculate con il ceppo non patogeno M981 è stato osservato un aumento di *trans*-2-esenale,

GRAFICO 5 - Riduzione della gravità di maculatura bruna con sospensioni acquose di *Pseudomonas* sp. AP 811, *Bacillus* sp. AP 1018 e di *A. pullulans* AP767 e *Rhodotorula* sp. AP1053 in ambiente controllato su frutti e foglie; e in semi-campo su foglie di astoni per incidenza e severità



I valori sono espressi come media di 3 repliche e le barre rappresentano la deviazione standard (d.s.). Asterischi evidenziano una differenza significativa (unpaired t-test: *** $p \leq 0,001$) nella riduzione della gravità della malattia rispetto al testimone inoculato con il solo *S. vesicarium*.

mentre nelle foglie inoculate con il ceppo patogeno SV173 la concentrazione di questa molecola diminuiva. Questo composto è noto che aumenti, rispetto ai normali livelli fisiologici, in presenza di una risposta di difesa della pianta ed è quindi associato a meccanismi di resistenza all'infezione (Wakai *et al.*, 2019). Lo studio dei metaboliti secondari ha infine messo in luce due molecole chiave, la curvularina e la deidrocurvularina, responsabili delle principali differenze tra i ceppi analizzati. Si tratta di composti già segnalati in altri funghi patogeni come tossine non specifiche dell'ospite (Meepagala *et al.*, 2016; Aly *et al.*, 2010), ma mai descritti in precedenza per *S. vesicarium*. Anche su questo fronte le attività di ricerca continueranno oltre la conclusione del progetto, per chiarire ulteriormente il ruolo di questi

metaboliti nel processo infettivo. La caratterizzazione chimica dell'insieme di molecole prodotte da *S. vesicarium* si è rivelata particolarmente complessa, anche a causa della scarsità di indicazioni in letteratura sulle sostanze direttamente responsabili della maculatura bruna del pero. Questo ha reso lo studio delle possibili tossine un percorso articolato, che ha richiesto l'impiego di diversi approcci sperimentali. Nonostante queste difficoltà, le conoscenze metabolomiche acquisite ci hanno consentito di individuare alcune categorie molecolari patologiche o potenzialmente patologiche che verranno studiate oltre la fine del presente progetto. L'obiettivo sarà approfondire le differenze tra i metabolomi dei ceppi SV173 e M981 e individuare nuove potenziali tossine, sia specifiche sia non specifiche per l'ospite.

UN LAVORO PROMETTENTE DA PROSEGUIRE

I risultati ottenuti all'interno di questo triennio di ricerche sono estremamente interessanti seppure non ancora traducibili in un impiego pratico. Le indagini verranno proseguite allo scopo di contribuire a una gestione più oculata e sostenibile della maculatura bruna.

Riccardo Baroncelli, Marina Collina Salvatore Iacono Massimiliano Menghini

Dipartimento di scienze e tecnologie agro-alimentari, Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Davide Giovanardi, Alessandro Montorsi Viola Papaiani Ceramelli Lisa Solieri, Emilio Stefani

Dipartimento di scienze della vita Centro di ricerca interdipartimentale Biogest-Siteia Università di Modena e Reggio Emilia

Alessandra Guerrini, Massimo Tacchini

Dipartimento di scienze della vita e biotecnologie - Tecnopolo Terra&Acqua Università di Ferrara

Studi finanziati dalla Regione Emilia-Romagna nell'ambito della legge reg. 17 del 27-10-2022 – Tipo di operazione «Interventi urgenti a sostegno del settore agricolo, agroalimentare, ittico e delle bonifiche». Art. 1 «Interventi per l'innovazione del settore agricolo ed agroalimentare» – Progetto «A.Ma.Pero - Approcci innovativi indirizzati a contrastare la maculatura bruna del Pero».

Le tematiche trattate e sviluppate nel progetto A.Ma.Pero sono state sollecitate dal Comitato tecnico di UNAPera, Consorzio che organizza e gestisce tutta l'attività di ricerca e sperimentazione su questa specie; tutti i risultati citati in questa nota sono stati esplicitati in opportuni incontri tecnici organizzati da UNAPera e dedicati alla specifica tematica.

Si ringraziano il Cisup (Center for instrument sharing, Università di Pisa) e il Dipartimento di scienze, chimiche, farmaceutiche e agrarie (Università di Ferrara) per l'acquisizione e la parziale elaborazione di dati UPLC-HR-MS.

Questo articolo è corredato di bibliografia/ contenuti extra. Gli Abbonati potranno scaricare il contenuto completo dalla Banca Dati Articoli in formato PDF su: www.informatoreagrario.it/bdo

Novità nella difesa dalla maculatura bruna

Bibliografia

Abdelfattah A., Malacrinò A., Wisniewski M., Cacciola S. O., Schena L. (2018). Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies. *Biological Control*, 120, 1-10.

Abdelfattah A., Wisniewski M., Droby S., Schena L. (2016). Spatial and compositional variation in the fungal communities of organic and conventionally grown apple fruit at the consumer point-of-purchase. *Horticulture research*, 3.

Abdelfattah, A., Freilich, S., Bartuv, R., Zhimo, V. Y., Kumar, A., Biasi, A., ... & Droby, S. (2021). Global analysis of the apple fruit microbiome: are all apples the same?. *Environmental Microbiology*, 23(10), 6038-6055.

Aly A.H., Debbab A., Edrada-Ebel R.A., Müller W.E.G., Kubbutat M.H.G., Wray V., Ebel R., Proksch P. (2010). Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Stemphylium botryosum* isolated from *Chenopodium album*. *Mycosphere* 2010, 1(2), 153-162.

Andersen B., Solfrizzo M., Visconti A. 1995. Metabolite profiles of common *Stemphylium* species. *Mycological Research* 1995, 99(6), 672-676. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80526-1](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80526-1)

Berg G., Köberl M., Rybakova D.,

Müller H., Grosch R., Smalla K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93 (5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix050>

Buzzini P., Turchetti B., Yurkov A. (2017). Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? *Yeast*, 35, 487-497.

Haas, D. and Keel, C. (2003) Regulation of Antibiotic Production in Root-Colonizing *Pseudomonas* spp. and Relevance for Biological Control of Plant Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 117-153. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>

Di Francesco A., Martini C., Mari M. (2018). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *European Journal of Plant Pathology*, 150, 1-15.

Duvenage F.J., Duvenage S., Du Plessis E.M., Volschenk Q., Korsten L. Viable bacterial population and persistence of foodborne pathogens on the pear carpoplane. *J Sci Food Agric*. 2017, 97(4): 1185-1192. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7847>

Faust K., Raes J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 538-550.

Llorente I., Montesinos E. (2006).

Brown spot of pear: an emerging disease of economic importance in Europe. *Plant disease*, 90(11), 1368-1375.

Janakiev T., Berić T., Stević T., Staneković S., Bačić J., Majstorović H., Fira D., Dimkić I. 2022. The Microbiome of the 'Williams' Pear Variety Grown in the Organic Orchard and Antifungal Activity by the Autochthonous Bacterial and Yeast Isolates. *Microorganisms*, 10(7), 1282. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071282>

Karlsson I., Friberg H., Kolseth A.K., Steinberg C., Persson P. (2017). Agricultural factors affecting *Fusarium* communities in wheat kernels. *International Journal of Food Microbiology*, 252, 53-60.

Meena M., Samal S. (2019). Alternaria host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. *Toxicol Reports* 2019,6, 745-758, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.021>.

Meepagala K.M., Johnson R.D. Duke S.O. (2016). Curvularin and Dehydrocurvularin as Phytotoxic Constituents from *Curvularia intermedia* Infecting *Pandanus amaryllifolius*. *J Agric Chem and Environ* 2016, 5, 12-22. doi: 10.4236/jacen.2016.51002

Müller D.B., Vogel C., Bai Y., Vorholt J.A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual Review of Genetics*, 50, 211-234.

Ottesen A.R., White J.R., Skaltsas D.N., Newell M.J., Walsh C.S. (2009). Impact of organic and conventional management on the phyllosphere microbial ecology of an apple crop. *J Food Prot.*, 72(11): 2321-2325. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.11.2321>

Ross, V., Bugiani R., Giosué S., Natali P. (2005). Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot disease of pears, in relation to weather conditions. *Aerobiologia*, 21(3), 203-216.

Sarhan M.S., Hamza M.A., Youssef H.H. et al. (2019). Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture

media - A review. *J Adv Res.*, 2019, 19: 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.002>

Singh P., Bugiani R., Cavanni P., Nakajima H., Kodama M., Otani H., Kohmoto K. (1999). Purification and Biological Characterization of Host-Specific SV-Toxins from *Stemphylium vesicarium* Causing Brown Spot of European Pear. *Phytopathology*, 1999, 89(10), 947-953.

Tanahashi M., Okuda S., Miyazaki E., Parada R. Y., Ishihara A., Otani H., Osaki-Oka K. (2017). Production of host-selective SV-toxins by *Stemphylium* sp. Causing brown spot of European pear in Japan. *Journal of Phyto-*

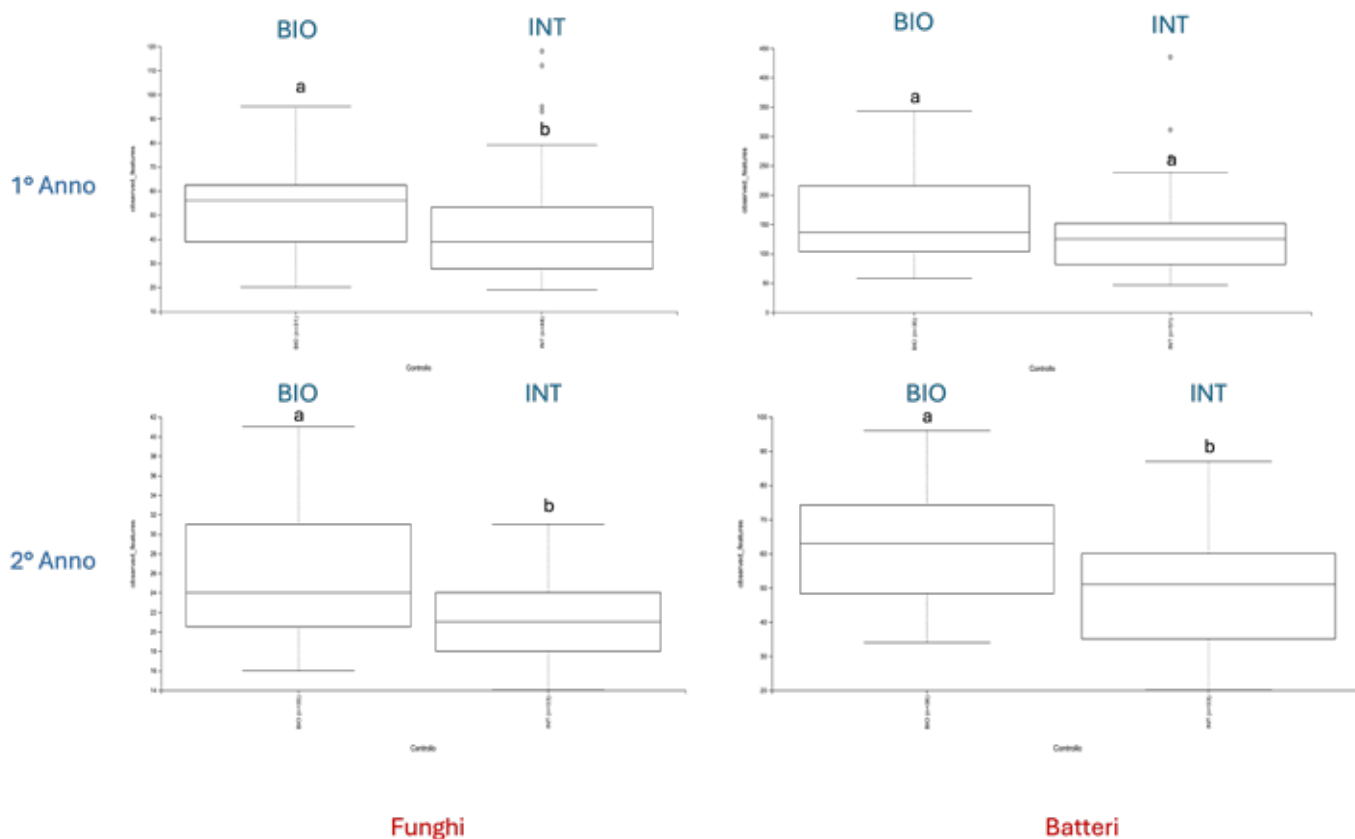
pathology, 165(3), 189-194.

Wakai J., Kusama S., Nakajima K., Kawai S., Okumura Y., Shiojiri K. (2019) Effects of trans-2-hexenal and cis-3-hexenal on post-harvest strawberry. *Scientific Reports* 2019, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46307-4>

Vorholt J.A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 828-840.

Wassermann B., Müller H., Berg G. (2019). An apple a day: which bacteria do we eat with organic and conventional apples?. *Frontiers in microbiology*, 10, 475179.

GRAFICO A - Grafici di alfa-diversità dei campioni del primo (in alto) e del secondo anno (in basso)



Lettere differenti indicano una differenza significativa fra i gruppi.

GRAFICO B - Grafici di beta-diversità dei campioni del primo (in alto) e del secondo anno (in basso)

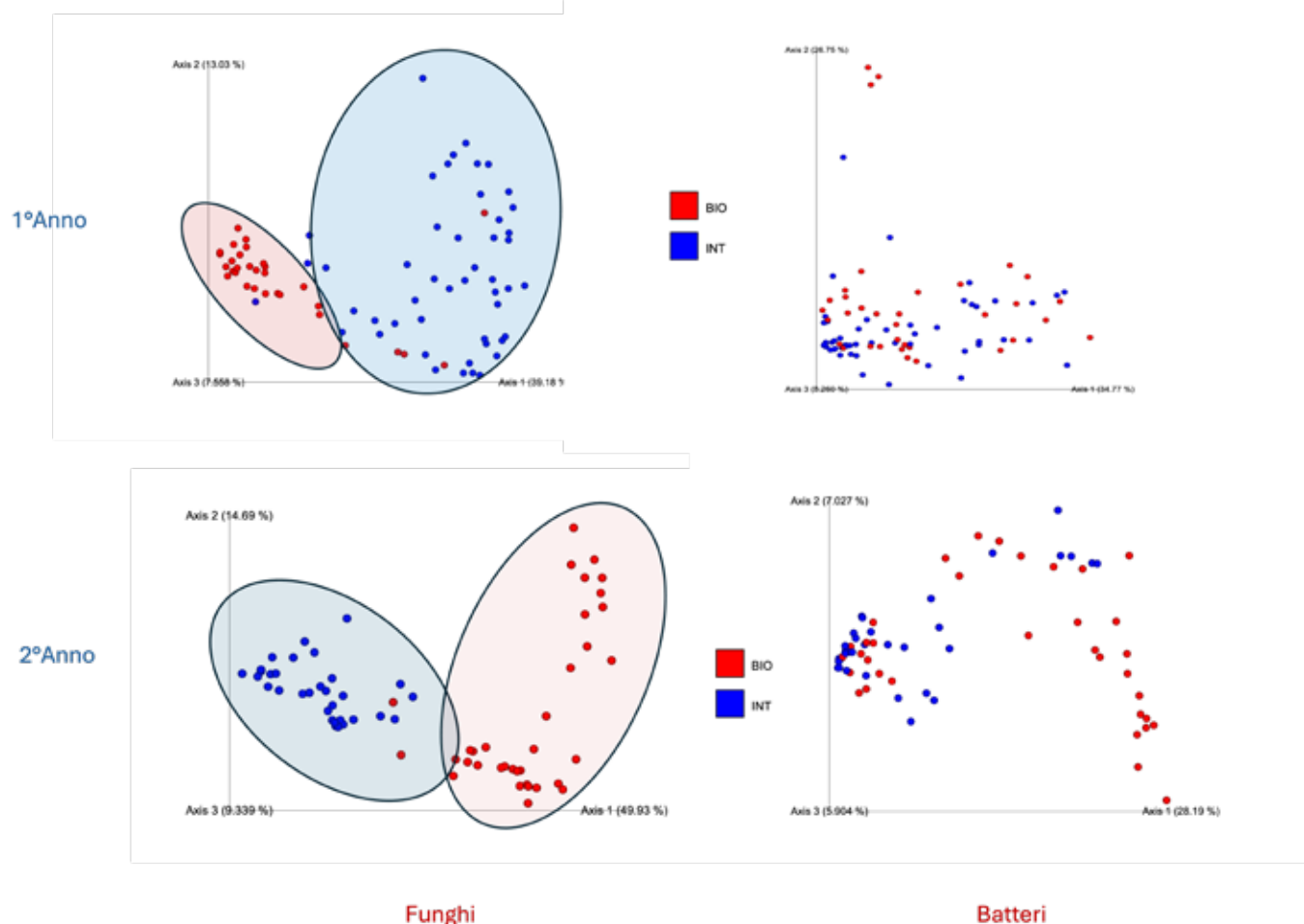
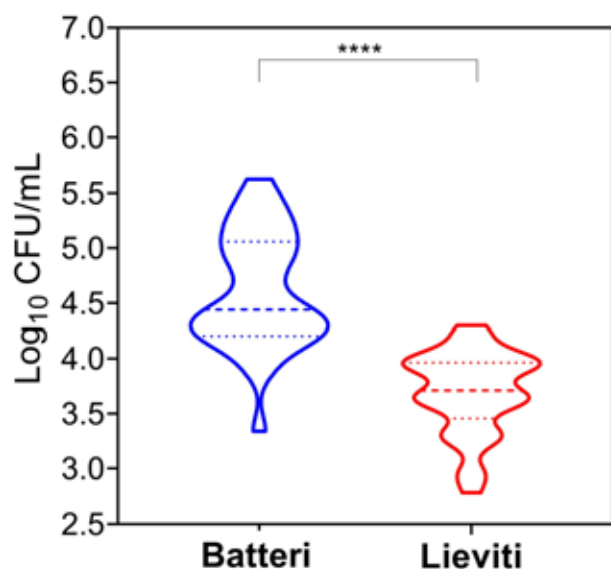
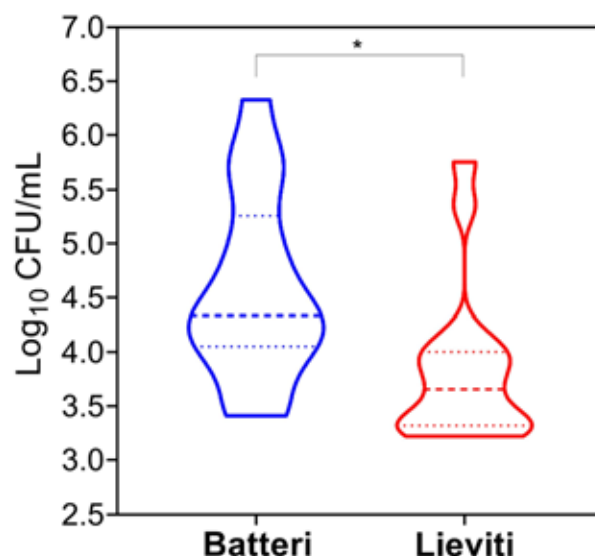


GRAFICO C - Analisi statistica dei dati aggregati per il 1° e 2° campionamento delle stagioni colturali 2023 e 2024 relativi alla quantificazione della frazione microbica coltivabile della carposfera di pero cv Abate Fétel

A) Batteri vs. Lieviti - 1° campionamento (2023-2024)



B) Batteri vs. Lieviti - 2° campionamento (2023-2024)



L'INFORMATORE AGRARIO

www.informatoreagrario.it



Edizioni L'Informatore Agrario

Tutti i diritti riservati, a norma della Legge sul Diritto d'Autore e le sue successive modificazioni. Ogni utilizzo di quest'opera per usi diversi da quello personale e privato è tassativamente vietato. Edizioni L'Informatore Agrario S.r.l. non potrà comunque essere ritenuta responsabile per eventuali malfunzionamenti e/o danni di qualsiasi natura connessi all'uso dell'opera.