

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BARI**  
**“ALDO MORO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO,  
DELLA PIANTA E DEGLI ALIMENTI

---

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA DELLE PIANTE  
TESI SPERIMENTALE IN PATOLOGIA VEGETALE

APPLICAZIONE DEGLI AGENTI DI BIOCONTROLLO (BCA)  
*BACILLUS SUBTILIS* E *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*  
PER LA PROTEZIONE DELLA VITE DALLA MUFFA GRIGIA

Relatore:  
Prof. Francesco Faretra

Correlatore:  
Dott.ssa Rita Milvia De Miccolis Angelini

Laureando:  
Saverio Zagaria

---

**Anno Accademico 2012-2013**

## INDICE

	<b>Pag</b>
CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE E SCOPI DELLA TESI	1
CAPITOLO 2 - LA MUFFA GRIGIA	4
2.1. TASSONOMIA E MORFOLOGIA	4
2.2. BIOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA	5
2.3. STRATEGIE DI PROTEZIONE	7
2.3.1. RESISTENZA A FUNGICIDI IN <i>B. CINEREA</i>	10
2.3.2. LOTTA BIOLOGICA	13
CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI	19
3.1. SUBSTRATI	19
3.2. SOLUZIONI E TAMPONI	20
3.3. MESSA A PUNTO DEL METODO MOLECOLARE DI IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI <i>B. SUBTILIS</i> E <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i>	20
3.3.1. ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI DNA	21
3.3.2. DISEGNO DI PRIMER E SONDE SPECIFICI PER I DUE CEPPI DI <i>BACILLUS</i> SPP.	22
3.3.3. QUANTIFICAZIONE IN REAL TIME PCR	25
3.4. SENSIBILITÀ DI <i>B. SUBTILIS</i> E <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> A FUNGICIDI	26
3.5. CAMPI SPERIMENTALI E CAMPIONAMENTI	27
3.6. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ERADICANTE DEI TRATTAMENTI IN PRE-CHIUSURA GRAPPOLO	31
3.7. QUANTIFICAZIONE DELLA RESISTENZA A FUNGICIDI	31
3.8. QUANTIFICAZIONE DELLE POPOLAZIONI DI <i>B. SUBTILIS</i> E <i>B.</i> <i>AMYLOLIQUEFACIENS</i>	32
CAPITOLO 4 - RISULTATI	33
4.1. IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI <i>B. SUBTILIS</i> E <i>B.</i> <i>AMYLOLIQUEFACIENS</i>	33
4.2. SENSIBILITÀ DI <i>B. SUBTILIS</i> E <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> A FUNGICIDI	38
4.3. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ERADICANTE DI TRATTAMENTI IN PRE-CHIUSURA GRAPPOLO	41
4.4. QUANTIFICAZIONE DELLA RESISTENZA A FUNGICIDI	43
4.5. QUANTIFICAZIONE DI <i>B. SUBTILIS</i> E <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> IN CAMPO	46
CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI	49
BIBLIOGRAFIA CONSULTATA	51

## CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE E SCOPI DELLA TESI

I patogeni delle piante sono divenuti un problema per l'uomo da quando è sorta l'agricoltura ed esso, consapevolmente e inconsapevolmente, ha compiuto operazioni che potevano servire a limitare in qualche modo talune malattie.

L'utilizzo di prodotti fitosanitari, utile in molti casi per limitarne i danni, presenta tuttavia alcuni limiti: impatto ambientale, implicazioni tossicologiche sulla sicurezza alimentare e insorgenza di resistenza dei patogeni bersaglio verso le sostanze attive impiegate.

L'insorgenza di resistenza è un problema che non riguarda solo l'agricoltore, il quale resta sprovvisto di mezzi tecnici per contrastare la malattia, bensì ci sono ripercussioni pratiche anche per le aziende agrochimiche, che non riescono ad ammortizzare i costi sostenuti per l'immissione in commercio del prodotto.

Questo problema era maggiormente sentito in passato, in cui si faceva un uso considerevole, spesso eccessivo, di prodotti fitosanitari. Negli ultimi dieci anni la quantità di prodotti fitosanitari distribuiti risulta diminuita del 3,6% (ISTAT, 2010).

Recentemente, si stanno diffondendo sempre più le strategie di protezione integrata, che prevedono un uso razionale dei prodotti fitosanitari, con una conseguente riduzione dell'impatto ambientale e una maggior sicurezza alimentare. Tutto questo viene favorito dalla direttiva CE 128/2009 sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari, che si pone l'obiettivo di far transitare l'intera agricoltura europea in regime di agricoltura integrata entro il gennaio 2014.

Le strategie di protezione integrata prevedono l'adozione di tutti i mezzi a disposizione per massimizzare i benefici, riducendo al minimo i rischi e gli effetti collaterali negativi. Le strategie devono sempre prevedere misure anti-resistenza, come l'uso razionale dei prodotti, l'impiego di alternanze e/o miscele di sostanze attive con diverso meccanismo d'azione, il rispetto delle indicazioni riportate in etichetta, soprattutto relative al numero massimo di trattamenti per stagione. Nell'ambito delle strategie di protezione integrata si stanno diffondendo i mezzi biologici che, peraltro, consentono di ridurre l'impatto ambientale delle produzioni agricole.

Ricorrere a strategie di protezione è necessario soprattutto per i patogeni che causano danni su colture di grande importanza economica, tra cui, molto temuto è *Botrytis cinerea* Pers., anamorfo di *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzl, agente causale della muffa grigia. *B. cinerea* è un fungo ubiquitario e polifago, patogeno su oltre 200 differenti specie vegetali in tutto il mondo (Jarvis, 1977). Nei nostri ambienti, il fungo causa frequentemente perdite di rilevante importanza economica principalmente su vite, fragola e diverse altre specie orticole, frutticole e floricole, soprattutto se coltivate in ambienti protetti; esso è, inoltre, il principale agente di alterazione dei prodotti in post-raccolta, in quanto in grado di accrescersi anche alle temperature di conservazione delle celle frigorifere (Brooks e Cooley, 1917).

L'elevata capacità di adattamento alle più diverse condizioni ambientali che caratterizza *B. cinerea* contribuisce a rendere difficoltosa la gestione della muffa grigia in campo.

*B. cinerea* è un patogeno ad alto rischio di acquisizione di resistenza, come riportato dal FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), un'organizzazione che si occupa della divulgazione di informazioni relative ai problemi di resistenza ai fungicidi ([www.frac.info](http://www.frac.info)). Acquisizione di resistenza nel fungo è stata riportata sia per i composti più tradizionali, quali benzimidazolici e dicarbosimidici, attualmente non più impiegati o impiegati poco frequentemente, sia per fungicidi più recenti introdotti alla fine degli anni '90, quali fenilpirroli, anilino-pirimidine e idrossianilidi. Tuttavia, molto preoccupanti sono le segnalazioni di resistenza ai fungicidi di più recente introduzione, quali gli inibitori della succinato deidrogenasi (SDHI) nonché ai fungicidi QoI, inibitori del complesso III della catena di trasporto degli elettroni, principalmente impiegati come antioidici e antiperonosporici (Rotolo *et al.*, 2010; De Miccolis Angelini *et al.*, 2013).

Il problema della diffusione di ceppi resistenti ai fungicidi comunemente impiegati contro *B. cinerea*, associato alle richieste dei consumatori di disporre di orto-frutta senza o con bassissimi livelli di residui di prodotti fitosanitari, sta focalizzando l'attenzione sull'impiego di agenti di bio-controllo (BCAs, Bio-control Agents). Gli agricoltori, però, utilizzano gli agenti di controllo biologico con il medesimo approccio impiegato per i composti chimici a causa della carenza di informazioni disponibili e indicazioni più dettagliate circa la corretta applicazione degli antagonisti microbici nelle diverse condizioni climatiche e colturali.

Nel presente lavoro di tesi, quindi, sono state effettuate valutazioni sull'insorgenza e diffusione di resistenza a fungicidi in popolazioni di *B. cinerea* in vigneti ad uva da tavola coperti per il postcipo della raccolta; è stato inoltre messo a punto un protocollo per la rilevazione e quantificazione in PCR in tempo reale di popolazioni di due ceppi di *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (QST713) e di *Bacillus amyloliquefaciens* (Fukumoto) Priest *et al.* (D747), due antagonisti microbici alla base di formulati registrati per il contenimento della muffa grigia; lo stesso protocollo è stato infine applicato al fine di monitorare la sopravvivenza in campo dei due antagonisti in vigneti sperimentali del sud Italia.

## CAPITOLO 2 - LA MUFFA GRIGIA

### 2.1. TASSONOMIA E MORFOLOGIA

Il teleomorfo del fungo, secondo Kirk *et al.* (2008), è così classificato: regno *Fungi*, phylum *Ascomycota*, classe *Leotiomycetes*, sottoclasse *Leotiomycetidae*, ordine *Helotiales*, famiglia *Sclerotiniaceae*, genere *Botryotinia*, specie *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel (anamorfo: *Botrytis cinerea* Pers.).

Il micelio di *B. cinerea* è costituito da ife cilindriche, settate, di color brunastro, di diametro variabile tra 11 e 23  $\mu\text{m}$  in funzione del substrato di crescita.

Il micelio è in grado di produrre macro e microconidi. I macroconidi sono inseriti su piccoli sterigmi di conidiofori lunghi circa 2 mm e spessi 16-30  $\mu\text{m}$  (Ellis e Waller, 1974), portanti una cellula basale slargata, ramificati all'estremità, eretti, fascicolati ed olivacei; sono unicellulari, inizialmente globosi, ovoidali o ellittici a maturità, lisci, ialini o di colore marrone chiaro, secchi e idrofobi e misurano 6-18 x 4-11  $\mu\text{m}$  (generalmente 8-14 x 6-9  $\mu\text{m}$ ) (Ellis e Waller, 1974). Inoltre, sono multinucleati e potenzialmente eterocariotici. La colorazione grigia dei conidi in massa conferisce il tipico aspetto grigiastro alle colonie del fungo e motiva il nome “muffa grigia” della malattia.

I microconidi, con la sola funzione di spermazi nella riproduzione sessuale del fungo, sono differenziati sullo spermodochio che appare come una struttura compatta e mucillaginosa a forma di pennello di fialidi o di una singola fialide sessile o munita di corto peduncolo. Le fialidi sono brevi, ingrossate in prossimità della base e rastremate all'apice; i fialoconidi, eterotallici e idrofili, si formano in catene basipete, sono ialini e unicellulari, di 2-3  $\mu\text{m}$  con un'evidente gocciolina mucillaginosa.

*B. cinerea* differenzia sclerozi, strutture di conservazione e resistenza, dapprima biancastri e successivamente bruni, di consistenza dura. Possono essere piani o convessi, misuranti 2-4 x 1-2,5 mm, sebbene la produzione, la forma e le dimensioni sono piuttosto variabili.

Gli sclerozi possono dare origine a micelio, conidiofori e conidi o apoteci isolati o in gruppi. Gli apoteci, raramente rinvenuti in natura (Polach e Abawi, 1975), possono

essere ottenuti in condizioni sperimentali di laboratorio (Groves e Draytonf, 1939; Faretra e Antonacci, 1987; Faretra *et al.*, 1988). Nei primi stadi della loro formazione, gli apotecii si presentano concavi e imbutiformi. In seguito, man mano che il cappello si accresce, diviene piatto ed infine convesso e gli apotecii raggiungono un'altezza di 3-10 mm (fino a 25 mm), mostrando un marcato fototropismo positivo. Il disco (cappello) degli apotecii presenta un bordo riflesso, appiattito e di colore bruno, ricoperto da una leggera peluria, di 1,3-3 mm di diametro ed è portato su un peduncolo di lunghezza variabile. L'imenio è formato da aschi cilindrici, arrotondati all'apice, frammisti a parafisi sterili (Groves e Loveland, 1953; Faretra e Antonacci, 1987).

Gli aschi, contenenti otto ascospore, sono cilindrici, pedunculati ed inopercolati, arrotondati alla sommità e misurano 130-140 x 9-12  $\mu\text{m}$ . Le ascospore sono uniseriate, unicellulari, ialine, ellittiche o ovoidali, biguttulate, di dimensioni pari a 8,5-10 x 3,5-4  $\mu\text{m}$  (Ellis e Waller, 1974). Nel primo stadio di sviluppo, questi sono dotati unicamente del nucleo derivante dalla fusione dei nuclei parentali. La meiosi e una successiva divisione mitotica portano alla formazione di otto nuclei, che sono inglobati in una frazione di epiplasma, costituendo, così, le otto ascospore. Ciascuna ascospora diviene multinucleata, a seguito di successive divisioni mitotiche.

Il fungo è in grado di differenziare anche appressori e altre strutture di ancoraggio, che derivano da ramificazioni dicotomiche ripetute di cellule ifali e si presentano come corpi piani, palmati o digitati, costituiti da cellule rettangolari con parete ispessita e scura.

*B. cinerea* differenzia inoltre oidi e clamidospore; queste ultime, localizzate in posizione terminale, hanno forma e dimensione variabile, sono dotati di una doppia parete ispessita e presentano un contenuto denso (Urbach, 1983, 1986).

## 2.2. BIOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA

Il patogeno può penetrare attivamente o passivamente nell'ospite (Holz *et al.*, 2004) ed è in grado di sopravvivere come saprofita (Faretra e Pollastro, 1998).

Il micelio ha andamento generalmente intercellulare ma anche intracellulare e superficiale (Ellis e Waller, 1974). Il patogeno produce enzimi pectolitici che gli

consentono di degradare le lamelle mediane, con conseguente disponibilità delle sostanze necessarie alla crescita micelica ed alla colonizzazione dell'ospite. Il patogeno può produrre anche cellulasi che agiscono sui componenti principali della parete cellulare, nonché altri complessi enzimatici, acidi organici e tossine.

*B. cinerea* presenta un sistema di compatibilità sessuale di tipo eterotallico bipolare (Faretra *et al.*, 1988): gli isolati del fungo possiedono uno dei due idiomorfi (*MATI-1* o *MATI-2*) ubicati nel *locus* della compatibilità sessuale *MATI* ed equamente distribuiti in natura (Faretra e Pollastro, 1993). Un comportamento di tipo omotallico è stato occasionalmente rinvenuto sia in isolati di campo sia in isolati di laboratorio monoascosporici (Faretra *et al.*, 1988; Faretra e Pollastro, 1993).

È un patogeno policiclico. Le condizioni ambientali più favorevoli per il patogeno sono temperature comprese fra 16 e 20°C (Nelson, 1951; Nelson e Amerine, 1957; Louis, 1963) con livelli di umidità relativa del 94-95%. Tuttavia, *B. cinerea* è in grado di causare infezioni anche con temperature nell'intorno di 0°C fino ad oltre 30°C.

I conidi sono in grado di germinare fino a 30 giorni dopo la loro formazione, ma richiedono nutrienti per la crescita del tubulo germinativo sulla superficie dell'ospite (Elad *et al.*, 1996). La ridotta disponibilità di nutrienti causa un ridotto tasso di infezione (Blakeman, 1993; Blakeman e Brodie, 1976; Yunis e Elad, 1993).

#### *Sintomatologia su vite*

Il patogeno è costantemente presente nel vigneto e la sua dannosità dipende dal verificarsi di condizioni umide e piovose (Faretra e Piglionica, 1982; Vercesi e Bisiach, 1982). Per questo motivo il patogeno è importante soprattutto quale agente di marciume del grappolo mentre solo occasionalmente causa infezioni a carico della vegetazione primaverile (Faretra *et al.*, 1996).

Il fungo si può conservare come saprofita su residui vegetali in decomposizione o su altre colture. Su vite sverna come micelio, per lo più nei primi tratti del tralcio, nelle gemme e nelle perule e come sclerozi sui tralci (D'Ercole e Nipoti, 1980). La forma scleroziale diviene frequente ed importante a circa 15°C o a temperature inferiori, è scarsissima a 20°C e sembra non differenziarsi a temperature superiori (Gärtel, 1965).



Al risveglio vegetativo, i giovani germogli possono presentare attacchi apicali che determinano l'imbrunimento e il disseccamento delle foglioline e parte del germoglio. Sui germogli più sviluppati il fungo può causare imbrunimenti dei nodi e degli internodi che possono ricoprirsi della tipica efflorescenza grigia conosciute come "marciume al verde" (fortunatamente poco frequenti nelle nostre condizioni ambientali). Sulle foglie compaiono macchie clorotiche che poi imbruniscono e necrotizzano e, in condizioni di umidità elevata, su di esse può comparire la caratteristica muffa grigia.

Infezioni possono aversi anche sui fiori non ancora allegati, sugli stami e sulle corolle caliptriformi o anche sull'estremità stilare delle bacche, che fungeranno in seguito da vere e proprie fonti di inoculo per le epidemie della tarda estate.

Sul grappolo in via di maturazione e in stretta dipendenza delle condizioni meteorologiche, compare la tipica muffa grigia, causa di ulteriori infezioni grazie ai conidi diffusi dal vento. Risultato caratteristico dell'infezione di *B. cinerea* sulla bacca è un lungo permanere del micelio nella buccia e nell'ipoderma che, così, si distaccano facilmente ("slip skin") dalla polpa sottostante. In seguito il micelio invade la polpa, inizialmente protetta dall'elevata concentrazione zuccherina. Inoltre, nelle cultivar con grappolo compatto o con bacche con epidermide sottile, il fungo può passare, per semplice contatto, da una bacca all'altra compromettendo così l'intero grappolo. I sintomi dell'avvenuta infezione si manifestano con macchie regolari di colore bruno nelle cultivar bianche e livide in quelle nere, dapprima superficiali, che in seguito possono approfondirsi e determinare il collasso dei tessuti ("marciume molle"). In alcuni casi, il fungo, risalendo lungo il peduncolo, può arrivare ad infettare il rachide, causando l'interruzione del flusso dei nutrienti e provocando, in prossimità della maturazione, la disarticolazione ("marciume peduncolare").

### 2.3. STRATEGIE DI PROTEZIONE

I danni causati da *B. cinerea* sono aumentati verso la fine del secolo scorso, quando al fine di incrementare la produzione delle colture, sono state introdotte pratiche agronomiche che indirettamente hanno favorito la diffusione della muffa grigia, rendendo necessaria l'applicazione di fungicidi antibotritici (Belli *et al.*, 2006).

La protezione delle colture da *B. cinerea* comporta difficoltà legate non solo all'efficacia dei programmi di protezione ma anche all'importante problema dei residui che i fungicidi, che è necessario applicare in prossimità della raccolta, possono lasciare nei prodotti destinati al consumo ed alla possibilità di indurre fenomeni di resistenza nel patogeno.

Nell'impostazione dei programmi di protezione è indispensabile rispettare strategie anti-resistenza in modo da preservare, il più a lungo possibile, l'efficacia dei fungicidi, in particolare per i composti di nuova sintesi. La sperimentazione eseguita negli ultimi anni ha evidenziato l'elevata efficacia di programmi di protezione della vite ad uva da tavola basati sull'alternanza di fungicidi con diverso meccanismo d'azione e la possibilità di contrastare efficacemente la malattia limitando l'impiego dei nuovi composti ai momenti di maggior rischio (Santomauro *et al.*, 1997, 1998, 2000, 2013; Rotolo *et al.*, 2010; Dongiovanni *et al.*, 2013a, 2013b).

La protezione integrata è una strategia di gestione delle malattie, basata sull'utilizzo combinato di agenti di biocontrollo, composti chimici ed idonee pratiche agronomiche, che, nel contenimento della muffa grigia, ha permesso di ottenere i risultati migliori (Dubos, 1992; Gullino, 1992; Elad e Stewart, 2004; Brent, 2007).

L'adozione di adeguati mezzi agronomici rappresenta un buon punto di partenza per ridurre il numero di trattamenti chimici per il contenimento della muffa grigia. La finalità degli interventi agronomici è quella di creare un ambiente poco ospitale alla sopravvivenza ed alla diffusione di *B. cinerea*, così da rendere le piante meno recettive al patogeno. È fondamentale, quindi, limitare il verificarsi di condizioni di umidità stagnante favorevole all'insorgenza delle infezioni; su vite la scelta del sesto d'impianto, del sistema di allevamento, dell'orientamento dei filari, nonché le operazioni colturali, quali sfogliatura e potatura verde, permettono un maggiore arieggiamento dei grappoli e migliorano la distribuzione dei prodotti fitosanitari durante i trattamenti.

Particolare attenzione deve essere posta anche al drenaggio del suolo e alle irrigazioni preferendo, tra i diversi metodi irrigui, quello a goccia per la quasi completa assenza di schizzi d'acqua.

È opportuno effettuare concimazioni equilibrate; l'eccessivo impiego di fertilizzanti azotati, soprattutto in quantità non proporzionata rispetto a quelli fosfatici e potassici, può provocare un sensibile incremento della suscettibilità delle piante al patogeno.

La scelta della cultivar in funzione dell'epoca di maturazione riveste notevole importanza in quanto, soprattutto per l'uva da tavola, cultivar a maturazione precoce sfuggono naturalmente al patogeno. Inoltre, cultivar e/o cloni con grappoli più spargoli e bacche a buccia più spessa, risultano meno suscettibili ai danni causati dalla muffa grigia.

La corretta gestione di altre malattie, come l'oidio, o di insetti, come la tignoletta e i tripidi, risulta fondamentale al fine di limitare lesioni sulle bacche, che rappresentano importanti vie di penetrazione di *B. cinerea* nell'ospite.

Relativamente al ricorso ai mezzi chimici per il controllo della muffa grigia, fondamentale risulta il loro impiego razionale, nelle diverse fasi fenologiche, in riferimento alle dosi impiegate ed ai momenti ed alle modalità di applicazione, e nel rispetto delle strategie anti-resistenza.

Ad esempio, per l'impostazione di strategie di protezione da *B. cinerea* su vite ci si può avvalere di due approcci, un metodo "climatico" e/o un metodo "fenologico". Il metodo "climatico" prevede l'esecuzione dei trattamenti quando si ha la concomitanza di temperature medie di almeno 15°C e bagnatura fogliare (almeno 15 mm di pioggia) per almeno 15 ore consecutive, consentendo, quindi, una riduzione del numero dei trattamenti in annate poco piovose (Piglionica, 1979). Il metodo "fenologico", invece, individua i momenti nei quali eventualmente intervenire con i trattamenti in corrispondenza delle seguenti fasi fenologiche: A) fine fioritura; B) pre-chiusura del grappolo; C) invaiatura; D) eventuale ultimo trattamento prima della raccolta.

L'integrazione dei due metodi risulta una soluzione molto valida per ridurre i trattamenti e massimizzarne l'efficacia nelle nostre condizioni ambientali.

Un'ampia sperimentazione ha dimostrato l'inutilità, nei nostri areali viticoli, del trattamento in fase A, confermando viceversa l'indispensabilità dei due interventi alla pre-chiusura del grappolo, con funzione eradicante per ridurre l'inoculo del patogeno presente in fase saprofitaria sui residui fiorali, che in seguito restano intrappolati nel grappolo e non sono più raggiungibili dai trattamenti, e nella prima decade di agosto, al

fine di prevenire infezioni che potrebbero essere causate da eventuali temporali estivi. I successivi eventuali trattamenti, invece, devono essere cadenzati in base alle condizioni meteorologiche, della persistenza e dell'intervallo di sicurezza dei fungicidi impiegati.

Nella scelta delle metodologie da adottare si deve tener conto di due esigenze fondamentali: la salvaguardia del consumatore e il rispetto di quegli equilibri ecologici che in molti casi garantiscono un controllo naturale di vari patogeni e fitofagi dannosi per le piante che si vogliono proteggere (Belli *et al.*, 2006). Inoltre, la protezione della coltura deve essere armonizzata al contesto agronomico generale, rivolto, in definitiva, alla produttività ed al risultato economico della coltura (Matta *et al.*, 1996).

In un'ottica di protezione integrata, al fine di contenere l'utilizzo dei mezzi chimici, si potrebbe ricorrere anche ai mezzi biologici. In questi casi, la conoscenza della compatibilità tra fungicidi e agenti biologici è essenziale.

### *2.3.1. Resistenza a fungicidi in B. cinerea*

La resistenza a fungicidi può essere definita come l'adattamento di popolazioni microbiche a condizioni avverse sulla base di modificazioni genetiche che sono trasmissibili ereditariamente alla progenie (Delp e Dekker, 1985).

Il rischio di insorgenza di resistenza a fungicidi è molto influenzato da variazioni genetiche e plasticità evolutiva della specie fungina (De Miccolis Angelini *et al.*, 2012).

I fungicidi attualmente impiegati per il contenimento della muffa grigia sono caratterizzati da uno meccanismo d'azione specifico, e sono quindi maggiormente soggetti a problemi di acquisizione di resistenza da parte del patogeno bersaglio. Tuttavia, molteplici sono i vantaggi correlati alla specificità d'azione, come la possibile azione endoterapica, la selettività, i bassi dosaggi, l'elevata efficacia, lo scarso impatto ambientale e la bassa tossicità per l'uomo.

In base al loro meccanismo d'azione, i fungicidi antibotritici possono essere classificati come interferenti nei processi di: mitosi e divisione cellulare (benzimidazolici, N-fenilcarbammati); trasduzione del segnale (dicarbossimidici, fenilpirroli); biosintesi degli steroli (idrossianilidi); biosintesi della metionina (anilinoipirimidine); respirazione (SDHI, carbossine, QoI); composti ad azione multi-sito, quindi con basso rischio di

acquisizione di resistenza, come la piridinammine fluazinam, attualmente registrato in Italia contro la muffa grigia su vite ad uva da vino ([www.frac.info](http://www.frac.info)).

Fenomeni di acquisizione di resistenza a fungicidi sono molto frequenti in *B. cinerea* ([www.frac.info](http://www.frac.info)). La prima segnalazione di resistenza del fungo a benzimidazolici su ciclamino, in serre tedesche, risale al 1971, dopo soli due anni di applicazione di tali fungicidi (Bollen e Scholten, 1971); analogamente, nei vigneti europei, già dopo tre o quattro anni di trattamenti si osservarono forme di resistenza ai benzimidazolici, tanto da costringere ad una forte limitazione del loro impiego (Leroux e Clerjeau, 1985; Smith, 1988). Le prime segnalazioni di resistenza di *B. cinerea* a dicarbosimidici risalgono alla fine degli anni '70, su fragola (Davis e Dennis, 1979) e vite (Holz, 1979). In assenza di fungicidi alternativi realmente efficaci nel contenere la muffa grigia, l'impiego frequente e continuo di questa classe di composti ha portato ad un costante incremento negli anni della frazione di isolati resistenti (Katan, 1982; Leroux e Clerjeau, 1985; Lorenz, 1988).

Una riduzione della frequenza di rinvenimento di isolati resistenti è stata generalmente osservata in seguito alla sospensione o riduzione dell'impiego dei fungicidi (Pak *et al.*, 1990; Leroux, 1995; Pommer e Lorenz, 1995; Diánez *et al.*, 2002), soprattutto in seguito all'introduzione, negli anni '90, di fungicidi ad attività antibotritica caratterizzati da un differente meccanismo d'azione, quali fenilpirroli e anilinoipirimidine (Gullino *et al.*, 1998, 2000; Bertetti *et al.*, 2008).

Tuttavia, nonostante l'assenza o riduzione di trattamenti con benzimidazolici e dicarbosimidici, isolati di *B. cinerea* resistenti a tali classi di composti sono ancora oggi diffusi su diverse colture, in diverse aree geografiche (Rotolo, 2010; Weber, 2011; Korolev *et al.*, 2011; Leroch *et al.*, 2011; Malandrakis *et al.*, 2011).

Isolati di *B. cinerea* resistenti alle anilinoipirimidine sono stati rilevati a partire dalla fine del secolo scorso in diversi paesi tra cui Francia, Svizzera, Croazia, Cile (Leroux, 2004) e Australia dove, nell'annata 1999-2000, in pochi vigneti la frequenza di rinvenimento è stata del 12% (Sergeeva *et al.*, 2002), mentre più recente (2005) è la prima segnalazione di resistenza a Creta (Grecia), ove sono state riscontrate frequenze prossime al 50% (Myresiotis *et al.*, 2007).

L'uso intensivo di anilino-pirimidine ha però comportato la comparsa e la diffusione di forme di resistenza (Forster e Staub, 1996; Latorre *et al.*, 2002; Petsikos-Panayotarou *et al.*, 2003). Elevate frequenze di rinvenimento, in alcuni casi superiori al 90%, sono state riscontrate anche in Italia, su vite e fragola, soprattutto in campi sottoposti ad un elevato numero (3-7) di trattamenti con anilino-pirimidine per stagione (Rotolo *et al.*, 2010; De Miccolis Angelini *et al.*, 2013).

Recenti sono le segnalazioni di isolati di *B. cinerea* mostranti un basso livello di resistenza al fenilpirrolo fludioxonil (Rotolo *et al.*, 2009; Korolev *et al.*, 2011; Latorre e Torres, 2012; De Miccolis Angelini *et al.*, 2013; Fernandez-Ortuño *et al.*, 2013), classificato come fungicida a basso-moderato rischio di resistenza ([www.frac.info](http://www.frac.info)).

Osservazioni sulla sensibilità di *B. cinerea* all'idrossianilide fenhexamid, fungicida con basso-medio rischio di acquisizione di resistenza ([www.frac.info](http://www.frac.info)), condotte su popolazioni del patogeno mai esposte all'azione del fungicida, hanno permesso di rinvenire isolati del fungo naturalmente resistenti al composto (HydR1) (Suty *et al.*, 1999; Baroffio *et al.*, 2003; Forster *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). L'impiego del fungicida ha comunque portato alla selezione di isolati resistenti (Elad *et al.*, 2008; Kretschmer e Hahn, 2008; Topolovec-Pintaric, 2009) che, nel sud Italia, su fragola, hanno raggiunto anche frequenze pari al 100% (De Miccolis Angelini *et al.*, 2013).

In popolazioni di *B. cinerea* sono state rinvenute forme di resistenza anche verso fungicidi di più recente introduzione. Sin dal 2006, la resistenza al boscalid, classificato dal FRAC come fungicida a medio-alto rischio di acquisizione di resistenza, è stata documentata con una bassissima frequenza in Germania (Stammler *et al.*, 2008), Italia (Bertetti *et al.*, 2008), Grecia (Myresiotis *et al.*, 2008), Spagna e Inghilterra ([www.frac.info](http://www.frac.info)). Tuttavia, recentemente, in seguito ad un più frequente utilizzo, isolati di *B. cinerea* resistenti a boscalid sono stati riportati in numerosi altri paesi (Bardas *et al.*, 2010; Leroch *et al.*, 2011; Weber, 2011; Veloukas *et al.*, 2011; Latorre e Torres, 2012; Fernández-Ortuño *et al.*, 2012; De Miccolis Angelini *et al.*, 2013).

Isolati di *B. cinerea* resistenti ai fungicidi QoI, composti ad elevato rischio di acquisizione di resistenza, ad ampio spettro d'azione, registrati su numerose colture, sono stati rinvenuti per la prima volta in campo, in Germania, su fragola (FRAC, 2007). Isolati resistenti sono riportati in diversi paesi (Giappone, Cina, Europa e USA) (Banno

*et al.*, 2009; Ishii *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009; Bardas *et al.*, 2010; Samuel *et al.*, 2011; De Miccolis Angelini *et al.*, 2012, 2013).

### 2.3.2. *Lotta biologica*

Ricorrere a mezzi biologici può rappresentare un valido aiuto nella gestione delle malattie, soprattutto in un'ottica di agricoltura "sostenibile", attualmente argomento di grande interesse per l'opinione pubblica, che richiede la riduzione dell'uso di prodotti fitosanitari (Caia *et al.*, 1988), per via dei temuti rischi cronici per la salute dell'uomo e dell'impatto ambientale (Basha e Ulaganathan, 2002; Tombolini *et al.*, 1999).

I mezzi biologici si basano sull'impiego di organismi capaci di ostacolare lo sviluppo del patogeno, stabilendo rapporti di iperparassitismo, competizione per nutrienti e spazio, induzione di resistenza nella pianta ospite, antibiosi e produzione di metaboliti inibitori (Elad e Stewart, 2004).

Negli ultimi anni, alcuni microrganismi sono stati oggetto di studio, con risultati talvolta incoraggianti (Dubos, 1992; Elad *et al.*, 1998; Helbig, 2002; Elad e Freeman, 2002; Boff *et al.*, 2002; Elmer e Reglinski, 2006; Utkhede e Mathur, 2006; Kim *et al.*, 2007; Trotel-Aziz *et al.*, 2008; Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Bernard *et al.*, 2010; Zaldua *et al.*, 2010; Antonioli *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Chatterton *et al.*, 2012; Nally *et al.*, 2012).

Anche l'uso di promotori batterici di crescita delle piante (Plant Growth Promoting Bacteria, PGPBs) si è dimostrato un approccio promettente nelle strategie di protezione integrata (Rosslénbroich e Stuebler, 2000).

Diversi batteri non fitopatogeni, rizosferici ed endofiti (Smilanick, 1994), sono stati frequentemente riportati utili nella protezione delle piante verso diversi patogeni (van Wees *et al.*, 1997; van Loon *et al.*, 1998; Magnin-Robert *et al.*, 2007; Trotel-Aziz *et al.*, 2008; Compant *et al.*, 2010; Verhagen *et al.*, 2011). In particolare, gli endofiti sono divenuti degli ottimi agenti di lotta biologica per via delle loro abilità di colonizzazione interna dei tessuti delle piante senza causare effetti negativi nel loro ospite (Weller, 1988; Cook, 1993).

Per massimizzare l'efficacia della lotta biologica, sono state sviluppate miscele di batteri che possiedono alta attività nei confronti dei patogeni (Raupach e Kloepper, 1998). L'applicazione di una miscela di BCA biologici, riproducendo una situazione più simile a quella naturale, può migliorarne l'azione di controllo (Duffy e Weller, 1995). In alcune combinazioni, la compatibilità tra BCA può essere un prerequisito per contenere in modo efficace la malattia (Raaijmakers *et al.*, 1995; De Boer *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2004).

Il biocontrollo, essendo il risultato di un'interazione complessa tra ospite, patogeno e BCA, richiede una sintesi di conoscenze di diversa natura, come epidemiologia, ecologia microbica, biochimica e oggi di biologia molecolare (Droby *et al.*, 2009).

Tra gli antagonisti microbici più studiati, buone potenzialità nel contenimento di *B. cinerea* sono state mostrate da funghi filamentosi dei generi *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Ulocladium*. Ad esempio, un livello di protezione interessante è stato conseguito con il ceppo T39 di *Trichoderma harzianum* Rifai, la cui azione antagonista è dovuta alla competizione ma anche alla produzione di sostanze antibiotiche e ad un'azione iperparassitaria (Elad e Kapat, 1999). Nel genere *Ulocladium*, invece, il fungo saprofito *Ulocladium atrum* (Preuss) Sacc. è in grado di colonizzare i tessuti necrotici ed inibire la colonizzazione e la produzione di conidi da parte di *B. cinerea* su diverse colture (Köhl *et al.*, 1995, 2000), inclusa la vite (Roudet e Dubos, 2000), mentre *Ulocladium oudemansii* EG Simmons colonizza i residui floreali riducendo l'incidenza della malattia (Reglinski e Kingstone, 2001; Elmar *et al.*, 2003).

Risultati positivi sono stati mostrati anche da batteri e lieviti, quali *Candida oleophila* (Montrocher) e *Kloeckera apiculata* (Rees) Janke (ceppo 34-9) in grado di contenere le infezioni di *B. cinerea* su bacche d'uva in post-raccolta (Lima *et al.*, 1997; Long *et al.*, 2005) e specie appartenenti al genere *Bacillus*.

Il genere *Bacillus*, appartenente al phylum *Firmicutes*, include batteri Gram-positivi, a forma di bastoncino, caratterizzati da un basso contenuto di GC (Ludwing *et al.*, 2008). Sono state descritte più di 100 specie di *Bacillus* (Madigan e Martinko, 2006). Presente ovunque in natura, il genere *Bacillus* include specie patogene e non.

*Bacillus* spp. possono produrre diversi metaboliti secondari con attività antibiotica ad ampio spettro (Kunst *et al.*, 1997; Strobel, 2003); per questo molteplici studi sono stati



condotti al fine di poterli impiegare come BCA (Lee *et al.*, 2006). Alcuni ceppi, soprattutto appartenenti alle specie *B. subtilis* e *B. amyloliquefacens*, sono riportati come antagonisti microbici di vari patogeni, tra cui *B. cinerea* (Danielsson *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Arrebola *et al.*, 2010; Grover *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2011; Seiichi *et al.*, 2011; Shu-Bin *et al.*, 2012). Risultati interessanti per il controllo dello stesso patogeno sono stati anche riportati per altre specie quali, ad esempio, *Bacillus brevis* Migula e *Bacillus licheniformis* (Weigmann) Chester (Seddon, 2000; Lee *et al.*, 2006).

*B. subtilis* è uno dei batteri più utilizzati non solo in agricoltura, ma anche in medicina e nell'industria alimentare (Ongena e Jacques, 2008; Cutting, 2011). È stato il primo biofungicida cui è stato riconosciuto un ampio spettro d'azione; esso svolge unicamente un'azione preventiva e può essere applicato sia da solo, sia alternato con fungicidi convenzionali.

Molte sostanze ad azione antifungina sono state caratterizzate ed identificate come peptidi antibiotici (Katz e Demain, 1977) prodotti da specie del genere *Bacillus*, che comprendono micobacillina (Majumdar e Bose, 1958; Sengupta *et al.*, 1971), iturina (Isogai *et al.*, 1982), bacillomicine (Besson *et al.*, 1977; Peypoux *et al.*, 1981), surfactina (Kluge *et al.*, 1988), micosubtilina (Peypoux *et al.*, 1976; Besson e Michel, 1990), fungistatina (Korzybski *et al.*, 1978), subsporina (Ebata *et al.*, 1969) e rizocitina (Kluger *et al.*, 1990). *Bacillus* spp. producono anche chitinasi, enzimi degradatori della parete cellulare (Frändberg e Schnürer, 1994) e alcune proteine antifungine (Kim e Chung, 2004; Kavitha *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007).

Tra i metaboliti secondari prodotti da specie di *Bacillus* vi sono lipopeptidi con specifica attività contro funghi patogeni (Wang *et al.*, 2007), bassa tossicità, alta biodegradabilità e basso impatto ambientale (Chen *et al.*, 2008). La produzione di lipopeptidi, avviene durante le prime fasi di sporulazione, nella maggior parte delle specie del genere *Bacillus* (Slimene *et al.*, 2012). È stato constatato che i peptidi antibiotici, la cui sintesi è sotto il controllo del gene della sporulazione *Spo0A*, sono anche implicati nel processo di sporulazione (Marahiel *et al.*, 1993; Grossman, 1995).

Sulla base delle proprietà strutturali, i lipopeptidi isolati da filtrati di *B. subtilis* sono stati divisi in 3 gruppi: surfactina, fengicina (o plipastatina) e iturina (Slimene *et al.*, 2012). I gruppi surfactina e fengicina sono composti da un  $\beta$ -idrossi acido grasso e 7-10

$\alpha$ -aminoacidi, mentre il gruppo dell'iturina A comprende un  $\beta$ -amino acido grasso e 7  $\alpha$ -aminoacidi (Slimene *et al.*, 2012). La presenza del  $\beta$ -amino acido grasso è la caratteristica più importante del gruppo dell'iturina A e la distingue dalle altre (Tsuge *et al.*, 2001).

In *B. subtilis*, i lipopeptidi contenenti acidi grassi a lunga catena sono potenzialmente più attivi (Touré *et al.*, 2004; Slimene *et al.*, 2012). La tossicità fungina aumenta con l'aumentare della lunghezza della catena dell'acido grasso (C17 è 20 volte più attivo di C14). Tuttavia, l'elevata attività antifungina potrebbe anche essere legata alla presenza di composti non ancora identificati, come recentemente è stato descritto per un nuovo tipo di fengicina (Hu *et al.*, 2007).

I lipopeptidi interagiscono con la membrana citoplasmatica causando la formazione di pori (Slimene *et al.*, 2012). Dall'interazione specifica con gli steroli di membrana, l'iturina è capace di distruggere la membrana citoplasmatica del fungo, creando canali trans-membrana che inducono il rilascio di ioni (come ad esempio  $K^+$ ) che porta ad uno squilibrio osmotico interno (Hsieh *et al.*, 2008). Le fengicine possono facilmente interagire con i componenti lipidici della membrana citoplasmatica fungina come l'ergosterolo e alterarne struttura e permeabilità in modo dose-dipendente (Deleu *et al.*, 2005). Aranda *et al.* (2005) hanno osservato che le surfactine possono distruggere e solubilizzare la membrana plasmatica.

I lipopeptidi possono agire sinergicamente, come suggeriscono diversi studi sulle combinazioni surfactina-iturina, surfactina-fengicina e iturina-fengicina. Così, Roogsawang *et al.* (2002) hanno dimostrato che ceppi di *B. subtilis* come RB14, YBS e ATCC6633 co-producevano surfactina e iturina A, surfactina e plipastatina B1, e surfactina e micosubtilina, rispettivamente. Iturine e fengicine esercitano una forte attività antimicotica e inibiscono la crescita di diversi patogeni delle piante, mentre le surfactine agiscono in sinergia con le iturine (Leclère *et al.*, 2005).

Gli antibiotici prodotti da *Bacillus* spp. sono caratterizzati da bassa tossicità verso gli organismi superiori (Strobel, 2003).

Oltre all'antibiosi, altro importante meccanismo messo in atto dai BCA è la competizione per nutrienti e spazio (Demoz e Korsten, 2006; Sharma *et al.*, 2009; Osman *et al.*, 2011). Prima dell'inizio della germinazione, diversi funghi, compreso *B.*

*cinerea*, attraversano una fase saprofitaria temporanea sulla superficie dei frutti e delle foglie, e durante questa fase, sono più sensibili alla competizione per i nutrienti (Mari *et al.*, 1996).

Negli ultimi anni, un'attenzione considerevole è stata focalizzata sull'induzione di resistenza come un importante fenomeno che si ottiene quando le piante sviluppano una maggiore capacità di difesa dovuta ad un'adeguata elicitazione di meccanismi di difesa (Trotel-Aziz *et al.*, 2008). Le reazioni indotte possono essere ristrette a tessuti localizzati al sito di elicitazione o possono essere espressi sistemicamente in tutto il tessuto o nell'intera pianta.

La resistenza sistemica indotta da batteri (ISR o SAR), che è stata dimostrata in diverse piante contro un ampio spettro di patogeni, è un altro importante meccanismo di azione dei *Bacillus* spp. (Hammerschmidt e Kuc, 1995; Van Loon *et al.*, 1998; Magnin-Robert *et al.*, 2007).

In alcuni casi, la ISR è associata con l'espressione di alcuni geni di difesa come quelli che codificano le proteine legate alla patogenesi (PR) (ad esempio le chitinasi), la fenilalanina ammonio liasi (PAL) e lipossigenasi (LOX) (Maurhofer *et al.*, 1994; Van Loon e Van Strien, 1999). La LOX è richiesta per la sintesi di precursori degli jasmonati, composti che possono agire come fattore segnale nelle risposte di difesa della pianta (Creelman e Mullet, 1997; Pieterse *et al.*, 1998). La PAL è un enzima chiave coinvolto nella sintesi di acido salicilico e di composti fenolici noti per ridurre l'incidenza della malattia attraverso attività antifungina e stimolazione di risposte di difesa nella pianta (Lee *et al.*, 1995; Reymond e Farmer, 1998; Shadle *et al.*, 2003).

Un aumento dell'attività chitinasica è stata associata con la resistenza di diverse cultivar di vite a malattie fungine (Derckel *et al.*, 1998; Giannakis *et al.*, 1998; Aziz *et al.*, 2003). Alcune chitinasi di vite esibiscono proprietà antifungine attraverso la loro attività idrolitica (Salzman *et al.*, 1998).

La prestazione di molti BCA può non essere comparabile a quella di un buon fungicida, sebbene alcuni BCA abbiano riportato un'efficacia simile a quella di un composto chimico (Mukerji e Garg, 1988; Bélanger *et al.*, 1994; Elad e Chet, 1995).

Ci sono diverse motivazioni che causano la scarsa diffusione della lotta biologica e di queste le più importanti sono: i) disponibilità a basso costo di fungicidi chimici efficaci

e di facile applicazione; ii) condizioni microclimatiche sulla superficie delle piante non favorevoli alla sopravvivenza e attività del BCA (Fokkema e Schippers, 1986); iii) minore efficacia, in generale, mostrata dai BCA rispetto ai fungicidi chimici, e soprattutto, incostanza nei risultati e ristretto spettro di attività; iv) le formulazioni e la distribuzione di preparati biologici sono considerate più difficoltose rispetto ai fungicidi di sintesi (Elad *et al.*, 1996).

Un problema ricorrente della lotta biologica ai patogeni è la variabile efficacia dei BCA (Elad e Stewart, 2004). I microrganismi che mostrano una buona attività di biocontrollo *in vitro* o in test biologici spesso mostrano comportamenti inconsistenti *in vivo* o in condizioni di campo (Tombolini *et al.*, 1999). Variazioni climatiche riscontrate in pieno campo, interazioni con altri microrganismi o sostanze chimiche, e qualità instabile del prodotto potrebbero essere alcune delle principali cause della ridotta efficacia dei BCA in campo (Elad e Stewart, 2004). La riduzione dell'efficacia può anche essere causata da variazioni di sensibilità dei patogeni. Ad esempio, Li e Leifert (1994) hanno osservato che dopo 10 applicazioni consecutive del batterio *B. subtilis* ceppo CL27 contro *B. cinerea*, l'efficacia della produzione di antibiotici da parte dell'agente di biocontrollo si era ridotta drasticamente.

## CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

### 3.1. SUBSTRATI

Sono stati impiegati i seguenti substrati (dosi per litro di acqua distillata):

- Agar acqua (AA): 20 g agar tecnico Oxoid N. 3;
- Agar nutritivo (AN): 5 g bacto-peptone; 3 g estratto di lievito Difco; 17 g bacto-agar Difco;
- Agar estratto di malto (MEA): 20 g estratto di malto Oxoid; 20 g agar Oxoid N. 3;
- Agar patata destrosio (PDA): 200 g di patate pelate, lavate e tagliate a pezzetti sono state tenute a 60°C per un'ora; al decotto, filtrato su garza, sono stati addizionati 20 g di glucosio e il pH è stato eventualmente aggiustato a 6,5 con NaOH o HCl; 20 g di agar Oxoid N. 3;
- Substrato minimale (MM): 10 ml di soluzione A (10 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100  $\text{ml}^{-1}$  acqua); 10 ml di soluzione B (20 g di  $\text{NaNO}_3$ ; 5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 g  $\text{FeSO}_4$ ; 100 ml acqua); 1 ml di soluzione micronutritiva (Sanderson e Srb, 1965) (9 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 58,5 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 1,95 mg KI; 9 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 7,6 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ; 822 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 139,8 mg  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 300  $\text{ml}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}$ ); 20 g di glucosio; 20 g di agar Oxoid N. 3;
- Substrato minimale acetato (AcMM): MM privo di glucosio, addizionato di 5 g  $\text{l}^{-1}$  di sodio acetato, 0,01 M di citrato e portato a pH 6,0 con KOH;
- Substrato di Luria-Bertani (LB): 10 g triptone-peptone Difco; 5 g estratto di lievito Difco; 10 g NaCl; il substrato è stato portato a pH 7,0 e addizionato di 15 g di bacto-agar Difco quando necessario;
- Substrato semi-selettivo per *B. subtilis* (V8): 326 ml di succo vegetale V8 (Campbell Soup Co, USA), 33 g NaCl, 0,8 g destrosio, portato a pH 5,2 con NaOH; il substrato è stato addizionato di 16 g di bacto-agar Difco. Dopo la sterilizzazione, il substrato è stato addizionato di 45 mg cicloesimide e 22,5 mg

polimixina B, antibiotici in grado di inibire lo sviluppo di funghi e batteri Gram-negativi (Kinsella *et al.*, 2009).

### 3.2. SOLUZIONI E TAMPONI

- Tampone di lisi (Llop *et al.*, 1999): 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 250 mM NaCl; 0,5% (p/v) SDS; 2% polivinilpirrolidone (Carlo Erba Reagents S.r.l., Italia);
- TE: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0;
- TAE: 0,04 mM Tris-base; 0,02 M CH<sub>3</sub>COOH; 0,001 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0.

### 3.3. MESSA A PUNTO DEL METODO MOLECOLARE DI IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI *B. SUBTILIS* E *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

La definizione di un protocollo molecolare per la rilevazione e quantificazione di *B. subtilis* ceppo QST713 e *B. amyloliquefaciens* ceppo D747 è stata finalizzata al monitoraggio delle popolazioni dei due antagonisti in campo.

Il metodo è stato messo a punto su DNA estratto e purificato da colture pure dei due ceppi e da sospensioni di lavaggio di bacche di cv. Italia inoculate artificialmente.

In dettaglio, per l'estrazione di DNA da *Bacillus* spp., singole colonie batteriche sono state isolate dai formulati commerciali Serenade Max (Bayer CropScience, 15,67% sostanza attiva, polvere bagnabile; il prodotto formulato contiene  $5,13 \times 10^{10}$  UFC/g) e Amylo-X (Biogard-CBC, 25% s.a., granuli idrodispersibili; il prodotto formulato contiene  $5 \times 10^{10}$  UFC/g), disciolti in acqua distillata sterile, distribuiti su capsule Petri da 100 mm di diam contenente LB agarizzato e incubati per 16-18 h a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  al buio. Le stesse sono quindi state impiegate per inoculare 20 ml di LB liquido contenuto in beute da 100 ml, posto ad incubare in agitazione (150 rpm) per 12-14 h a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  al buio. Aliquote di 2 ml delle sospensioni batteriche così ottenute sono state sottoposte ad estrazione e purificazione di DNA.

Per le sospensioni di lavaggio, ciascun campione, costituito da 30 bacche artificialmente inoculate (con l'ausilio di un nebulizzatore distribuendo una sospensione di biofungicida, la cui concentrazione era pari a  $1-2 \times 10^{11}$  UFC/l) è stato posto in una beuta, contenente 300 ml di acqua distillata sterile addizionata di 0,05% Tween 20, e tenuto in agitazione a 120 rpm per 15-30 min; successivamente, aliquote (40 ml) dell'acqua di lavaggio così ottenuta sono state centrifugate a 14.000 rpm per 15 min e, dopo aver rimosso il surnatante, i campioni sono stati sottoposti ad estrazione e purificazione di DNA seguendo il protocollo di seguito descritto.

### *3.3.1. Estrazione e purificazione di DNA*

Per l'estrazione e purificazione di DNA è stato seguito il protocollo descritto da Llop *et al.* (1999) opportunamente modificato (Martinez *et al.*, 2002). In particolare, il precipitato, ottenuto come riportato sopra, è stato risospeso in 0,5 ml di tampone di lisi mediante agitazione su vibro mulino (mod. MM 301, Retsch, Haan, Germania; 30 oscillazioni al sec) per 5 min. Dopo centrifugazione a 12.000 rpm per 10 min, l'estratto è stato purificato per due volte con pari volume di fenolo:cloroformio (1:1) e quindi precipitato con pari volume di isopropanolo per 30 min a  $-80^{\circ}\text{C}$ , lavato con etanolo al 70%, asciugato sotto vuoto e dissolto in 50  $\mu\text{l}$  di acqua ultrapura sterile.

Il DNA è stato quindi purificato su colonnine di polivinilpolipirrolidone (PVPP) (Schena e Ippolito, 2003). In dettaglio, in provette da 0,5 ml, con un piccolo foro alla base, poste in eppendorf da 2 ml, sono stati addizionati una goccia di "glass beads" in TE e PVPP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in polvere. Le colonnine sono state compattate addizionando, in due tempi successivi, 400 e 200  $\mu\text{l}$  di acqua distillata sterile, ciascuno seguito da centrifugazione a 3.000 rpm per 3 min. La soluzione di DNA (50  $\mu\text{l}$ ) è stata addizionata sulla colonnina così ottenuta, e centrifugata a 3.000 rpm per 3 min.

Il DNA così estratto è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) che ha consentito di determinarne la concentrazione in  $\text{ng ml}^{-1}$  e l'assorbanza a 230, 260 e 280 nm.

### 3.3.2. Disegno di primer e sonde specifici per i due ceppi di *Bacillus* spp.

Sono state impiegate coppie di primer riportate in bibliografia come specifiche per *B. subtilis* (Joshi e McSpadden Gardener, 2006; Kwon *et al.*, 2009) o per il “*Bacillus subtilis* group” (*B. subtilis*, *Bacillus pumilus* Meyer and Gottheil, *Bacillus atrophaeus* Nakamura, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*) (Wattiau *et al.*, 2001) o disegnate con l’ausilio del programma Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000) su sequenze specifiche di *B. amyloliquefaciens* disponibili in banche dati nucleotidiche dell’NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tutti i primer sono stati sintetizzati da Sigma-Aldrich (Haverhill, GB). Le sequenze dei primer, le condizioni di impiego (temperatura di appaiamento) e le dimensioni dell’amplicone generato in PCR convenzionale e/o in tempo reale sono riportate in Tabella 1.

Le reazioni di amplificazione in PCR convenzionale sono state eseguite in un volume di 50  $\mu$ l. La miscela di reazione era composta come di seguito indicato: 1x LA PCR<sup>TM</sup> Buffer II (Mg<sup>2+</sup> free) (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Giappone); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Takara Bio Inc.); 0,2 mM di ciascun deossiribonucleotide (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Takara Bio Inc.); 2 U di TaKaRa LA Taq<sup>TM</sup> (Takara Bio Inc.); 0,1  $\mu$ M di ciascun primer (senso e antisenso); 100 ng di DNA stampo.

Il termociclatore, GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA), è stato programmato come segue: 95°C per 5 min, seguiti da 30 cicli, ciascuno dei quali consistente di una fase a 95° per 1 min, una a 50-65°C per 1 min ed una a 72°C per 1 min e, infine, 7 min a 72°C.

I prodotti PCR sono stati purificati su Quantum Prep PCR Kleen Spin Columns, in accordo alle indicazioni del fornitore (Bio-Rad Laboratories), e visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio.

In dettaglio, aliquote di 2-10  $\mu$ l dei prodotti di amplificazione purificati, addizionate di 0,25% bromofenolo blu, 0,25% xilene cianolo, 40% di saccarosio, in acqua bidistillata, sono state caricate su gel di agarosio all’1,5% (Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories) e fatte correre in tampone TAE (1x) per 110 min a 110 V, in camera elettroforetica per gel orizzontale sommerso (Sub-Cell Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories). Come indicatore delle dimensioni dei frammenti di DNA amplificati è stato impiegato il 100 bp DNA Ladder (New England Bio-Labs, Beverly,



USA) che, nelle condizioni adottate, origina 12 bande corrispondenti a valori compresi fra 100 e 1.500 bp. Per quantificare la concentrazione in DNA dei prodotti da sottoporre a sequenziamento, è stato anche impiegato un indicatore di massa molecolare (Precision Molecular Mass Ruler, Bio-Rad Laboratories), con 5 bande di 10-100 ng.

Dopo la corsa, i gel sono stati colorati con 1 mg l<sup>-1</sup> di bromuro di etidio in acqua bidistillata per 60 min e decolorati in acqua bidistillata per 10 min. L'immagine dei gel, posti su un transilluminatore UV, è stata digitalizzata mediante telecamera ad integrazione (sistema Gel Doc 1000, Bio-Rad Laboratories).

I singoli ampliconi ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento diretto da Macrogen Europe (Olanda). Le sequenze ottenute da ciascuno dei due ceppi di *Bacillus* sp. sono state analizzate e confrontate impiegando il programma ClustalW (The European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK; [www://www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)).

Per il disegno di sonde TaqMan e coppie di primer da impiegare in PCR in tempo reale, specifiche per ciascuno dei due ceppi di *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens*, è stato utilizzato il programma Primer Express 3.0 (Life Technologies, Applied Biosystems).

Tabella 1. Coppie di primer impiegate per il sequenziamento di frammenti di geni in *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*.

Coppia di primer		Sequenza	Gene	Riferimento bibliografico	Temperatura di appaiamento (°C)	Dimensione dell'amplicone (bp)
<i>yticP</i>	yticP-F	5'-GCTTACGGGTTATCCCGC-3'	Trasportatore ABC	Kwon <i>et al.</i> (2009)	50	460
	yticP-R	5'-CCGACCCCATTTTCAGACATATC-3'				
<i>yndJ</i>	yndJ-F	5'-CAGAGCGACAGCAATCACAT-3'	Proteina di membrana	Joshi e McSpadden	52	212
	yndJ-R	5'-TGAATTTTCGGTCCGCTTATC-3'				
<i>bioA</i>	bioA-F	5'-TTCCACGGCCATTCCTATAC-3'	Adenosilmetionina aminotransferasi	Gardener (2006)	52	210
	bioA-R	5'-TTTGTCCCCTTATCCTGCAC-3'				
<i>Bsub</i>	Bsub5F	5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3'	16S rRNA	Wattiau <i>et al.</i> (2001)	65	595
	Bsub3R	5'-CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC-3'				
<i>Bamy</i>	Bamy1F	5'-AAGGCAAGCCTAGCGAAAAT-3'	16S rRNA	NCBI (codice di accesso HE617159.1)	60	166
	Bamy1R	5'-CACATCGCTGTGCGATTTAT-3'				

### 3.3.3. Quantificazione in real-time PCR

Le reazioni di amplificazione in PCR in tempo reale sono state effettuate in un termociclatore CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) e successivamente analizzate impiegando il programma CFX Manager™ versione 1.0.

Le curve standard per la quantificazione di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* sono state costruite amplificando il DNA estratto da diluizioni decimali ( $10^2$ - $10^9$  cellule) delle sospensioni batteriche ottenute come precedentemente descritto, opportunamente quantificate in camera Thoma e/o mediante conteggio in piastre contenenti il substrato (V8) semi-selettivo per *B. subtilis*. In dettaglio, aliquote (100 µl) delle sospensioni batteriche impiegate sono state distribuite su capsule Petri da 100 mm di diam contenenti il substrato e incubati per 7 giorni a  $28\pm 1^\circ\text{C}$  al buio. Acqua ultra pura è stata impiegata come controllo negativo. Per ciascun campione sono state effettuate due repliche.

Nello specifico, per la quantificazione con SYBR Green, le reazioni di amplificazione sono state eseguite in un volume di 25 µl contenente: 12,5 µl di 2x iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories); 0,5 µM di ciascun primer e 2 µl di DNA stampo. Il termociclatore è stato così impostato: una prima fase a  $95^\circ\text{C}$  per 3 min, seguita da 40 cicli a  $95^\circ\text{C}$  per 10 sec e  $52$ - $65^\circ\text{C}$  (in funzione delle coppie di primer impiegate, Tabella 1) per 45 sec; infine è stata analizzata la curva di melting, generata da 1 min a  $95^\circ\text{C}$  e 80 fasi successive, di 10 sec ciascuna, a temperature crescenti (incremento di  $0,5^\circ\text{C}/\text{fase}$ ), a partire da  $55^\circ\text{C}$ .

Per la quantificazione con sonde TaqMan è stato impiegato DNA pre-amplificato con la coppia di primer *yndJ*, in PCR classica (5 min a  $95^\circ\text{C}$ , seguiti da 15 cicli a  $95^\circ\text{C}$  per 30 sec, a  $52^\circ\text{C}$  per 30 sec e a  $72^\circ\text{C}$  per 30 sec e, infine, 7 min a  $72^\circ\text{C}$ ), con una miscela di reazione (25 µl) così composta: 2 µl di DNA estratto, 1x GoTaq® Flexi Buffer (Promega Co., Madison, USA); 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 75 µM di ciascun nucleotide (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Promega Co.); 0,75 U di GoTaq® DNA polymerase (Promega Co.); 0,5 µM di ciascun primer.

Le reazioni di amplificazione in PCR quantitativa (qPCR) sono state eseguite in un volume di 12,5 µl contenente: 1 µl di DNA pre-amplificato, 6,25 µl di 2x SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories); 0,5 µM di ciascun primer; 0,25 µM di

ciascuna sonda. Il termociclatore è stato impostato come segue: una prima fase a 95°C per 3 min, seguita da 40 cicli a 95°C per 10 sec e 58 o 59°C per 45 sec.

Per verificare la specificità del metodo messo a punto è stato impiegato DNA estratto da specie di batteri (*Pantoea agglomerans* Beijerinck (Gavini *et al.*), *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Pseudomonas sp. 1 fluorescens* Migula, *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula, *Serratia fonticola* Gavini *et al.*), lieviti (*Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud) e funghi (*B. cinerea*, *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom, *Aspergillus niger* Tiegh., *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*) comunemente presenti su bacche d'uva. Il DNA fungino impiegato era stato estratto e purificato come descritto da De Miccolis Angelini *et al.* (2010).

#### 3.4. SENSIBILITÀ DI *B. SUBTILIS* E *B. AMYLOLIQUEFACIENS* A FUNGICIDI

È stata valutata la risposta di sensibilità della crescita di colonie di *B. subtilis* (ceppo QST713) e *B. amyloliquefaciens* (ceppo D747) a fungicidi comunemente impiegati nel vigneto con funzione antibotritica. I formulati impiegati sono descritti in Tabella 2.

In dettaglio, aliquote (1 ml) delle sospensioni di ciascun formulato, Serenade Max (Bayer CropScience) e Amylo-X (Biogard-CBC), in acqua distillata sterile ( $3 \times 10^8$  cellule di *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens*) sono state distribuite uniformemente sulla superficie di capsule Petri (100 mm diam) contenenti AN. Aliquote (70 o 200  $\mu$ l) di sospensioni in acqua distillata sterile di ciascuno dei fungicidi da saggiare sono state depositate in fori di 6 o 10 mm di diam, rispettivamente, praticati con l'ausilio di un foratappi nel substrato precedentemente inoculato. Tre differenti concentrazioni di ciascun formulato sono state impiegate: quella corrispondente alla dose di campo prevista dall'etichetta e due sue diluizioni, pari rispettivamente al 50% e al 25%. Inoltre, aliquote di 15  $\mu$ l di sospensione di ciascun fungicida, alle tre differenti concentrazioni, sono state impiegate per imbibire dischetti di carta bibula sterile di 6 mm di diam (Oxoid Susceptibility Dishes) che sono, quindi, stati posti sulla superficie di capsule Petri contenenti AN inoculato con i due batteri come precedentemente descritto.

Dopo 12, 24 e 48 h di incubazione al buio a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  sono stati misurati gli aloni di inibizione.

Tabella 2. Formulati impiegati nelle prove di inibizione di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* a fungicidi.

Formulato commerciale	Sostanza Attiva		Produttore	Dose di etichetta (kg o l/ha)	Dose impiegata nella prova (g o ml/hl)
	Nome	%			
Teldor Plus	Fenhexamid	42,8	Bayer Crop Science	1-1,5	150
Switch	Cyprodinil+ Fludioxonil	37,5+25	Syngenta Crop Protection	0,8	80
Chorus	Cyprodinil	50	Syngenta Crop Protection	0,75	75
Scala	Pyrimethanil	37,4	BASF Italia	2	200
Geoxe	Fludioxonil	50	Syngenta Crop Protection	1	100
Cantus	Boscalid	50	BASF Italia	1-1,2	120
Rovral WG	Iprodione	75	BASF Italia	1	100
Coprontal WG	Ossicloruro tetrarameico	32	Syngenta Crop Protection	2,5-4,5	350
Funguran – OH 250 SC	Idrossido di rame	19,2	Certis Europe	2,8	280
Banjo	Fluazinam	40,2	Makhteshim Agan Italia	1-1,5	150

### 3.5. CAMPI SPERIMENTALI E CAMPIONAMENTI

Le valutazioni sull'efficacia eradicante di trattamenti con *B. subtilis* ceppo QST713 (Serenade Max, Bayer CropScience) e *B. amyloliquefaciens* ceppo D747 (Amylo-X, Biogard-CBC,) nella fase fenologica di pre-chiusura del grappolo, e sulla diffusione di ceppi resistenti a fungicidi in popolazioni di *B. cinerea* a seguito di diversi programmi di trattamenti antibotritici, sono state condotte in due vigneti ad uva da tavola, allevati a tendone e coperti con teli plastici per il posticipo della raccolta. Il primo vigneto, cv. Red Globe, era ubicato nell'agro di Castellaneta Marina (TA) (campo 1); il secondo, cv. Italia, era in agro di Casamassima (BA) (campo 2). Per entrambi i campi sperimentali è stato adottato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con 4 ripetizioni e parcelle costituite da 8-10 piante.

Le valutazioni sull'evoluzione delle popolazioni dei due BCA sono state effettuate in un vigneto ad uva da tavola cv. Italia, sito in agro di Adelfia (BA) (campo 3), allevato a tendone e coperto per il posticipo della raccolta. Le applicazioni dei BCA sono state eseguite su gruppi di due piante replicati tre volte.

I programmi di protezione, con i fungicidi impiegati, dosi e date dei trattamenti, sono riassunti nelle Tabelle 3 (campo 1), 4 (campo 2) e 5 (campo 3).

I trattamenti sono stati eseguiti con pompe a zaino a motore (Arimitsu Mod. SD251K) impiegando un volume di distribuzione equivalente a 1000 l/ha.

Le valutazioni sull'efficacia eradicante in fase di pre-chiusura del grappolo sono state effettuate su campioni di residui floreali, raccolti da tutti i grappoli dalle tesi 1-3, 7-11 (campo 1) e 1-3, 6 (campo 2), 5-7 giorni dopo i trattamenti.

Le valutazioni sulla resistenza di *B. cinerea* a fungicidi sono state effettuate su campioni costituiti da 30-100 porzioni (1-3 bacche) di grappoli naturalmente infetti mostrandoti evidenti sporificazioni del fungo, prelevati dalle singole parcelle di ciascuna tesi dei campi sperimentali 1 e 2. I campionamenti sono stati effettuati in data 23 novembre 2012 (campo 1) e 3 dicembre 2012 (campo 2).

L'andamento delle popolazioni di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* è stato verificato su campioni, costituiti da 30 bacche, raccolti da ciascuna ripetizione delle tre tesi a confronto nel campo sperimentale n. 3 (controllo non trattato, due trattamenti consecutivi con Serenade Max o con Amylo-X), in 8 differenti tempi: 3 ore, 3, 6 e 9 giorni dopo il primo trattamento; 3 ore, 3, 6, 9 giorni dopo il secondo trattamento. Un campione di 30 bacche è stato prelevato anche da ciascuna delle tesi del campo n. 2, 30 giorni dopo l'ultimo trattamento.

Tabella 3. Programmi di protezione saggianti nel campo 1.

Tesi N.	Programmi d'intervento	Concentrazione di s.a. e formulazione*	Dosi (g o ml/ha)	Date dei trattamenti
1	Testimone non trattato	-	-	-
2	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012; 03.10.2012; 12.10.2012; 19.10.2012; 26.10.2012; 02.11.2012; 09.11.2012; 16.11.2012
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(25%; 5x10 <sup>10</sup> UFC/g) WG	2000	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012; 03.10.2012; 12.10.2012; 19.10.2012; 26.10.2012; 02.11.2012; 09.11.2012; 16.11.2012
4	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012
	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
5	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012
	Boscalid	(50%) WG	1200	03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(25%; 5x10 <sup>10</sup> UFC/g) WG	2000	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012
	Boscalid	(50%) WG	1200	03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
7	<i>B. subtilis</i> + Pyrimethanil	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB + (400 g/l) SC	4000+2000	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012; 03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
8	<i>B. subtilis</i> + Boscalid	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB + (50%) WG	4000+1200	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012 03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
9	<i>B. amyloliquefaciens</i> + Boscalid	(25%; 5x10 <sup>10</sup> UFC/g) WG + (50%) WG	4000+1200	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012 03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
10	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012 03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
11	Boscalid	(50%) WG	1200	27.06.2012; 09.08.2012; 04.09.2012 03.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012
12	Boscalid	(50%) WG	1200	27.06.2012; 09.08.2012
	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	04.09.2012; 03.10.2012
	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	23.10.2012; 09.11.2012
13	Boscalid	(50%) WG	1200	27.06.2012; 09.08.2012
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(25%; 5x10 <sup>10</sup> UFC/g) WG	2000	04.09.2012; 03.10.2012
	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	23.10.2012; 09.11.2012

\*PB: polvere bagnabile, WG: granuli idrodispersibili, SC: soluzione concentrata.

Tabella 4. Programmi di protezione saggiati nel campo 2.

Tesi N.	Programmi d'intervento	Concentrazione di s.a. e formulazione*	Dosi (g o ml/ha)	Date dei trattamenti
1	Testimone non trattato	-	-	-
2	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	29.06.2012; 13.08.2012; 05.09.2012; 04.10.2012; 12.10.2012; 19.10.2012; 26.10.2012; 02.11.2012; 09.11.2012; 16.11.2012; 23.11.2012; 30.11.2012
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(25%; 5x10 <sup>10</sup> UFC/g) WG	2000	29.06.2012; 13.08.2012; 05.09.2012; 04.10.2012; 12.10.2012; 19.10.2012; 26.10.2012; 02.11.2012; 09.11.2012; 16.11.2012; 23.11.2012; 30.11.2012
4	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	29.06.2012; 13.08.2012; 05.09.2012
	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	04.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012; 23.11.2012
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(25%; 5x10 <sup>10</sup> UFC/g) WG	2000	29.06.2012; 13.08.2012; 05.09.2012
	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	04.10.2012; 23.10.2012; 09.11.2012; 23.11.2012
6	Boscalid	(50%) WG	1200	29.06.2012
	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	13.08.2012
	Fenhexamid	(42,74%) SC	1500	05.09.2012
	Pyrimethanil	(400 g/l) SC	2000	04.10.2012
	Fenhexamid	(42,74%) SC	1500	23.10.2012
	Fluopyram	(500 g/l) SC	500	09.11.2012
	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	23.11.2012; 30.11.2012

\*PB: polvere bagnabile, WG: granuli idrodispersibili, SC: soluzione concentrata.

Tabella 5. Programmi di protezione saggiati nel campo 3.

Tesi N.	Programmi d'intervento	Concentrazione di s.a. e formulazione*	Dosi (g o ml/ha)	Date dei trattamenti
1	Testimone non trattato	-	-	-
2	<i>Bacillus subtilis</i>	(15,67%; 5,13x10 <sup>10</sup> UFC/g) PB	4000	18.10.2012 27.10.2012
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	(25%; 5x10 <sup>10</sup> UFC/g) WG	2000	18.10.2012 27.10.2012

\*PB: polvere bagnabile, WG: granuli idrodispersibili.



### 3.6. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ERADICANTE DEI TRATTAMENTI IN PRE-CHIUSURA GRAPPOLO

È stata valutata l'attività eradicante del trattamento eseguito nella fase fenologica della pre-chiusura del grappolo dei BCA *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* nei confronti di *B. cinerea* e altri patogeni che possono colonizzare i residui floreali in fase saprotrofica. I residui floreali, raccolti per ciascuna tesi, sono stati distribuiti in piastre Petri contenenti AA o posti in camere umide. I campioni erano costituiti da 100-400 residui floreali per tesi. Dopo 7 giorni di incubazione a  $21\pm 1^\circ\text{C}$  al buio, con l'ausilio dello stereomicroscopio, è stato effettuato il riconoscimento delle specie fungine sviluppatesi ed è stata quindi valutata la frequenza di diffusione di *B. cinerea*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. e *Rhizopus* spp.

### 3.7. QUANTIFICAZIONE DELLA RESISTENZA A FUNGICIDI

L'eventuale presenza di conidi di *B. cinerea* resistenti alle classi di antibiotritici impiegati nei campi sperimentali è stata valutata sulla base della capacità degli stessi di germinare su substrato agarizzato addizionato di fungicidi (Faretra *et al.*, 1989).

La frequenza di resistenza ad anilinopirimidine (AP) e fungicidi SDHI, è stata determinata impiegando pyrimethanil (AP,  $1\text{ mg l}^{-1}$ ), boscalid e fluopyram (SDHI,  $10\text{ mg o ml l}^{-1}$ ) a concentrazioni idonee a discriminare fra isolati sensibili e resistenti. Pyrimethanil, in forma di prodotto tecnico, è stato disciolto in dimetilsulfossido (DMSO), mentre i formulati commerciali contenenti boscalid (Cantus, BASF Agro, 50% s.a., granuli idrodispersibili) o fluopyram (Luna privilege, Bayer CropScience,  $500\text{ g l}^{-1}$  s.a., sospensione concentrata) sono stati sospesi in acqua distillata sterile. I fungicidi sono stati aggiunti ai substrati, MM (pyrimethanil) o AcMM (boscalid e fluopyram), portati a  $45\text{-}50^\circ\text{C}$  dopo la sterilizzazione in autoclave.

Campioni dei conidi del patogeno presenti su bacche d'uva naturalmente infette sono stati raccolti utilizzando un captaspore (Tervet *et al.*, 1951). Parte dei conidi costituenti ciascun campione è stata sospesa in acqua distillata sterile contenente 0,05% di Tween 20. La concentrazione delle sospensioni così ottenute, verificata con l'ausilio di un vetrino contaglobuli (camera Thoma), è stata aggiustata a  $10^6$  conidi  $\text{ml}^{-1}$ .

Aliquote di 10 µl delle sospensioni conidiche sono state deposte, in due repliche, su dischetti di MM tal quale o addizionato di pyrimethanil e AcMM tal quale o addizionato di boscalid o fluopyram. I dischetti sono stati sistemati su vetrini portaoggetti e posti in camera umida a 21±1°C al buio.

Dopo 16 (pyrimethanil) o 48 (boscalid o fluopyram) ore di incubazione al buio a 21±1°C, la germinazione è stata bloccata e i conidi sono stati fissati e colorati con lattofenolo-blu di cotone. Con l'ausilio di un microscopio ottico è stato effettuato il conteggio di tre repliche di 100 conidi scelti a caso per ciascuna parcella.

### 3.8. QUANTIFICAZIONE DELLE POPOLAZIONI DI *B. SUBTILIS* E *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

Le valutazioni sull'evoluzione delle popolazioni dei due antagonisti, in campi sperimentali sottoposti a trattamenti con i formulati commerciali Serenade Max e Amylo-X, sono state effettuate mediante l'applicazione del metodo molecolare (qPCR) prima descritto. Nello specifico, il DNA estratto e purificato (paragrafo 3.3.1) da sospensioni di lavaggio di campioni di bacche è stato quantificato in real-time PCR impiegando sonde TaqMan specifiche per *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (paragrafo 3.3.3).

## CAPITOLO 4 - RISULTATI

### 4.1. IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI *B. SUBTILIS* E *B. AMYLOLIQUEFACIENS*

Il DNA, estratto e purificato da sospensioni di lavaggio di bacche di uva inoculate artificialmente con *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens* è stato amplificato in real-time PCR quantitativa.

Nelle valutazioni preliminari, la quantificazione del DNA è stata effettuata con SYBR Green, impiegando coppie di primer già riportate in bibliografia (Wattiau *et al.*, 2001; Joshi e McSpadden Gardener, 2006; Kwon *et al.*, 2009) o opportunamente disegnate. Tra le diverse coppie di primer impiegate, la coppia *yndJ* è risultata molto sensibile, rilevando la presenza di DNA di entrambe le specie di *Bacillus* intorno al decimo ciclo di amplificazione; essa è stata pertanto selezionata per le successive reazioni di amplificazione in PCR quantitativa (Tabella 6). La coppia *Bsub*, invece, sebbene in grado di rilevare la presenza di DNA già dal sesto ciclo di amplificazione, è stata scartata a causa delle elevate dimensioni (595 bp) dell'amplicone.

La coppia di primer *yndJ* è risultata specifica per *Bacillus* sp., seppur non in grado di discriminare tra *B. subtilis* (curva standard in Figura 1) e *B. amyloliquefaciens* (curva standard in Figura 2), consentendo di rilevare sino a  $8 \times 10^3$  Unità Formanti Colonie (UFC) per grammo di uva.

Al fine di migliorare la specificità e sensibilità del metodo, le sequenze dei geni *ytcP*, *yndJ*, *bioA* e la regione 16S di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* sono state amplificate e sequenziate. Sulle sequenze ottenute sono state disegnate sonde TaqMan e le relative coppie di primer, tra cui sono state selezionate quelle da impiegare nelle reazioni di amplificazione in nested-real-time PCR. Con l'impiego delle sonde TaqMan (Tabella 7), specifiche per *B. subtilis* ceppo QST713 (Serenade Max) (curva standard in Figura 3) e *B. amyloliquefaciens* ceppo D747 (Amylo-X) (curva standard in Figura 4) in nested-real-time PCR, è stato possibile rilevare e quantificare fino a 8 UFC/g uva.

Il metodo è risultato specifico, in quanto nelle condizioni di amplificazione messe a punto, il DNA estratto da specie di batteri (*P. agglomerans*, *P. fluorescens*, *P. sp. 1*

*fluorescens*, *P. putida*, *S. fonticola*), lieviti (*A. pullulans*) e funghi (*B. cinerea*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp.), comunemente presenti su bacche d'uva, non ha prodotto alcun amplicone.

Tabella 6. Rilevazione di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* in real-time PCR con SYBR Green.

Campione	Coppia di primer									
	<i>yticP</i>		<i>yndJ</i>		<i>bioA</i>		<i>Bsub</i>		<i>BamyI</i>	
	Ct (a diverse temperature di appaiamento)									
	60°C	52°C	60°C	52°C	60°C	52°C	60°C	65°C	60°C	65°C
<i>B. subtilis</i>	N/A	28,75	11,53	9,40	27,44	23,38	7,21	7,12	13,43	12,27
<i>B. amyloliquefaciens</i>	N/A	29,43	11,03	11,20	27,57	24,20	6,67	6,56	13,07	12,03
Controllo negativo (acqua ultrapura)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A: non amplificato.

Tabella 7. Coppie di primer e sonde TaqMan impiegate per la quantificazione di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* in nested-real-time PCR.

Specie batterica	Coppia di primer e sonda	Sequenza	Temperatura di appaiamento (°C)	Dimensione dell'amplicone (pb)
<i>B. subtilis</i> ceppo QST713	BS_yndJ-F	5'-AATGACCGTGCTCCATCTGTAA-3'	58	74
	BS_yndJ-R	5'-TTCCGATCTTTAACGGATTGCT-3'		
	BS_yndJ-S	5'-AACCCGTTTCTCCCGTATGATCCTGC-3'		
<i>B. amyloliquefaciens</i> D747	BA_yndJ-F	5'-CCGGCGAAATCAAATAATGAC-3'	59	67
	BA_yndJ-R	5'-GGCAGGATCATACGGGAGAA-3'		
	BA_yndJ-S	5'-TGCTCCACCGGTAAAGTCCGCG-3'		

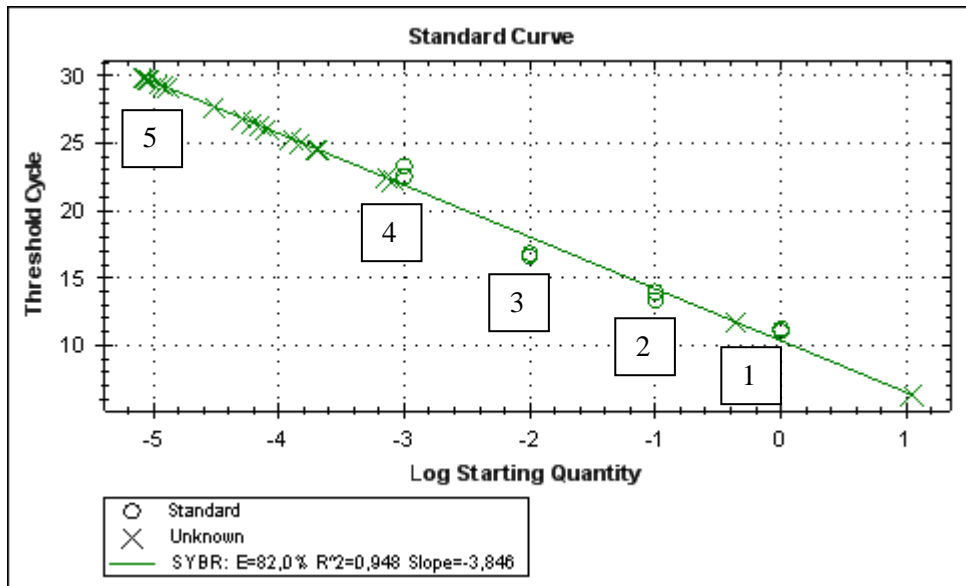


Figura 1. Curva standard per *B. subtilis* ottenuta in reazioni di amplificazione in PCR quantitativa con SYBR Green e la coppia di primer *yndJ*. Campioni 1-5: DNA estratto da sospensioni contenenti da  $10^9$  a  $10^5$  cellule batteriche (diluizioni decimali).

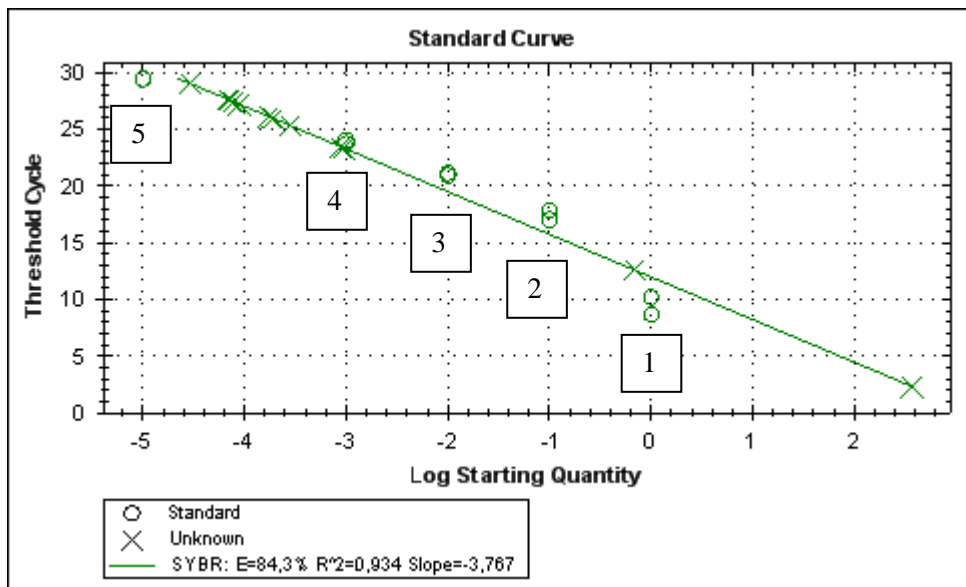


Figura 2. Curva standard per *B. amyloliquefaciens* ottenuta in reazioni di amplificazione in PCR quantitativa con SYBR Green e la coppia di primer *yndJ*. Campioni 1-5: DNA estratto da sospensioni contenenti da  $10^9$  a  $10^5$  cellule batteriche (diluizioni decimali).

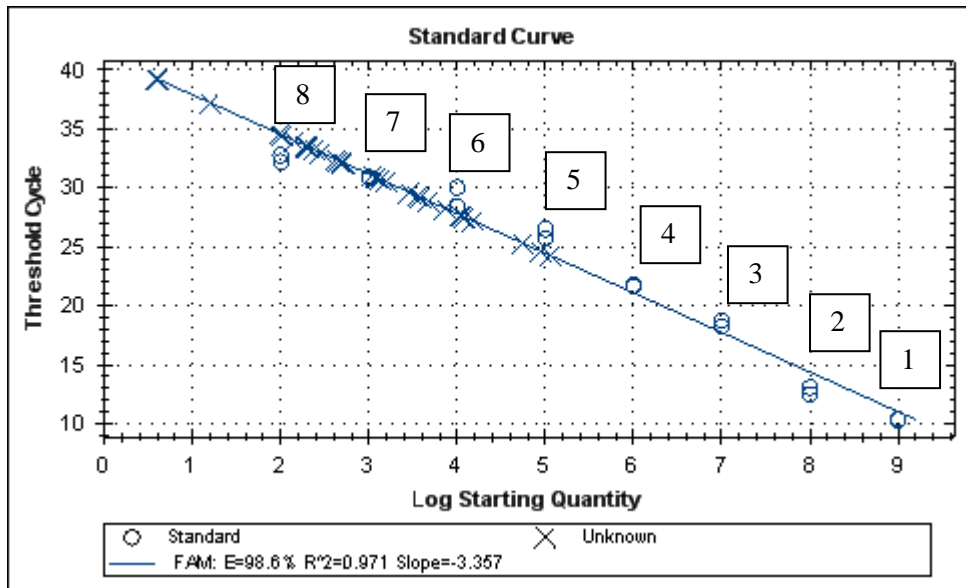


Figura 3. Curva standard ottenuta in reazioni di nested-real-time PCR con sonda TaqMan specifica per *B. subtilis* ceppo QST713. Campioni 1-8: DNA estratto da sospensioni contenenti da  $10^9$  a  $10^2$  cellule batteriche (diluizioni decimali).

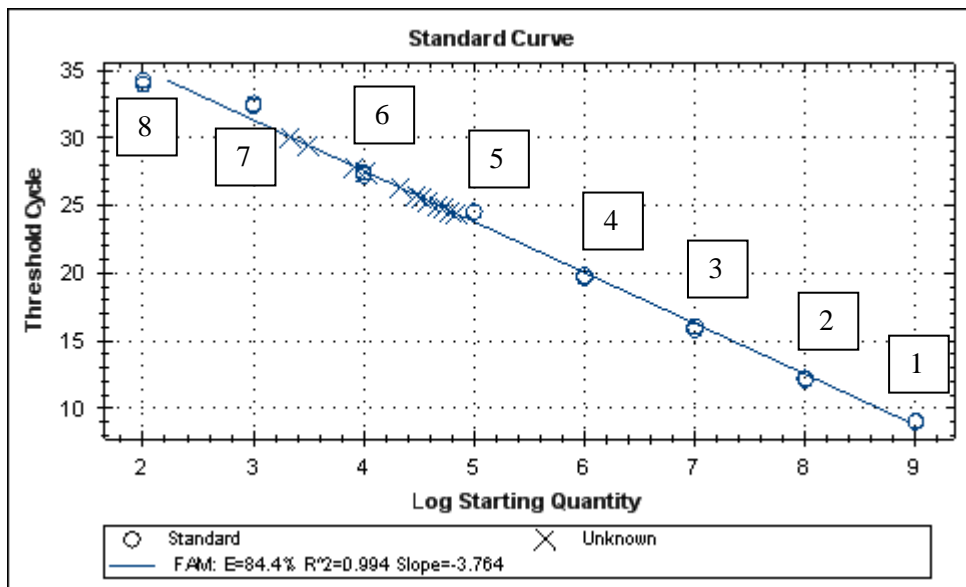


Figura 4. Curva standard ottenuta in reazioni di nested-real-time PCR con sonda TaqMan specifica per *B. amyloliquefaciens* ceppo D747. Campioni 1-8: DNA estratto sospensioni contenenti da  $10^9$  a  $10^2$  cellule batteriche (diluizioni decimali).

#### 4.2. SENSIBILITÀ DI *B. SUBTILIS* E *B. AMYLOLIQUEFACIENS* A FUNGICIDI

Al fine di valutare la compatibilità dei due BCA con antibiottrici di sintesi, è stata valutata la risposta della crescita di colonie di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* su substrato agarizzato addizionato con formulati commerciali di fungicidi alla concentrazione di impiego in campo e a concentrazioni ridotte (50 e 25%).

L'inibizione sulla crescita di ciascun batterio è stata valutata impiegando dischetti di carta bibula sterile di 6 mm di diametro imbibiti con 15 µl di sospensione di ciascun fungicida da saggiare, posti sulla superficie di capsule Petri contenenti AN e inoculate con le sospensioni batteriche, e, in alternativa, applicando i fungicidi (70 o 200 µl) in fori di 6 o 10 mm di diametro praticati nel substrato precedentemente inoculato.

In riferimento a *B. subtilis*, non è stata osservata alcuna inibizione da parte dei fungicidi Cantus (boscalid), Geoxe (fludioxonil), Scala (pyrimethanil) e Rovral WG (iprodione). Un lieve effetto di inibizione è stato osservato per Teldor Plus (fenhexamid; parziale inibizione di 1,3 mm di diametro), Switch (cyprodinil+fludioxonil; con alone fino a 5,3 mm), Chorus (cyprodinil; 2,7-4,7 mm), solamente in presenza di 200 µl di fungicida (fori da 10 mm di diametro). Più marcato è stato, invece, l'effetto di inibizione osservato per Banjo (fluazinam; 4-11,7 mm) e i due composti rameici, Coprontal WG (ossicloruro di rame; fino a 18,7 mm di diametro) e Funguran (idrossido di rame; fino a 15,3 mm). Nella Tabella 8 sono riportati i valori di inibizione su *B. subtilis* dopo 48 ore di incubazione, relativi ai diversi saggi.

Relativamente a *B. amyloliquefaciens*, non è stata osservata alcuna inibizione ai fungicidi Teldor Plus, Cantus, Geoxe, Scala e Rovral WG. Per i fungicidi Switch e Chorus è stata riscontrata una lieve inibizione (aloni di 1,3-3 mm di diametro) nel solo saggio che ha previsto l'applicazione di 200 µl di ciascun fungicida in fori da 10 mm di diametro. Molto marcato è stato l'effetto di inibizione osservato per Banjo (9,3-14,7 mm) e i due composti rameici, Coprontal WG (1,3-19 mm) e Funguran (1-20,7 mm) (Tabella 9).



Tabella 8. Inibizione della crescita di *B. subtilis* causata da fungicidi.

Prova condotta	Dose fungicida	Alone di inibizione (mm di diametro) <sup>(a)</sup>									
		Teldor Plus	Switch	Cantus	Chorus	Geoxe	Scala	Coprontal WG	Funguran	Banjo	Rovral WG
Dischetti (15µl di sospensione fungicida)	Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	4,8±0,6	0,0±0,0	5,0±0,0	0,0±0,0
	50% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	2,7±1,2	0,0±0,0	4,3±0,3	0,0±0,0
	25% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,3±0,3	0,0±0,0	4,0±0,0	0,0±0,0
Pozzetti (70µl di sospensione fungicida)	Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	11,7±0,3*	12,0±0,0*	9,0±1,0	0,0±0,0
	50% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	7,5±0,4	0,0±0,0
	25% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	7,7±0,3	0,0±0,0
Pozzetti (200 µl di sospensione fungicida)	Concentrazione di etichetta	1,3±0,3*	5,3±0,7	0,0±0,0	4,7±0,9	0,0±0,0	0,0±0,0	18,7±0,7	15,3±0,3	11,7±0,9	0,0±0,0
	50% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	2,7±0,9*	0,0±0,0	2,7±0,9*	0,0±0,0	0,0±0,0	12,7±0,7	12,0±0,0	11,3±0,7	0,0±0,0
	25% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,0±0,0	13,3±0,3*	11,0±1,0	0,0±0,0

<sup>(a)</sup>I dati riportati in tabella rappresentano il valore medio di tre repliche ± l'errore standard, dopo 48 ore di incubazione al buio a 28±1°C.

\*Inibizione parziale.

Tabella 9. Inibizione della crescita di *B. amyloliquefaciens* causata da fungicidi.

Prova condotta	Dose fungicida	Alone di inibizione (mm di diametro) <sup>(a)</sup>									
		Teldor Plus	Switch	Cantus	Chorus	Geoxe	Scala	Coprontal WG	Funguran	Banjo	Rovral WG
Dischetti (15 µl di sospensione fungicida)	Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	11,0±0,6	0,0±0,0
	50% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	11,5±0,5	0,0±0,0
	25% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	9,7±0,3	0,0±0,0
Pozzetti (70 µl di sospensione fungicida)	Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	6,3±0,9*	7,3±1,2*	9,3±0,3	0,0±0,0
	50% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	1,3±1,3*	1,0±1,0*	9,5±0,5	0,0±0,0
	25% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	9,3±0,3	0,0±0,0
Pozzetti (200 µl di sospensione fungicida)	Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	2,7±0,3	0,0±0,0	3,0±0,6	0,0±0,0	0,0±0,0	19,0±1,5	20,7±0,7	14,7±0,3	0,0±0,0
	50% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	3,0±0,6	0,0±0,0	1,3±0,9	0,0±0,0	0,0±0,0	16,0±0,0	17,7±1,4	13,0±1,0	0,0±0,0
	25% Concentrazione di etichetta	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	15,0±0,3	2,0±1,1*	14,0±1,1	0,0±0,0

<sup>(a)</sup>I dati riportati in tabella rappresentano il valore medio di tre repliche ± l'errore standard, dopo 48 ore di incubazione al buio a 28±1°C.

\*Inibizione parziale.

#### 4.3. VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA ERADICANTE DI TRATTAMENTI IN PRE-CHIUSURA GRAPPOLO

L'efficacia eradicante di trattamenti con formulati a base di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, utilizzati da soli o in miscela con fungicidi, in fase di pre-chiusura del grappolo, è stata verificata nei vigneti di Castellaneta Marina (campo n. 1) e Casamassima (campo n. 2). In particolare è stata valutata la presenza di *B. cinerea*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., e *Rhizopus* spp. su residui fiorali raccolti, 5-7 giorni dopo il trattamento, dalle diverse tesi dei due campi sperimentali. I dati sono riportati nelle Tabelle 10 e 11.

In generale, in entrambe le prove, le percentuali di residui fiorali infetti da *B. cinerea* sono risultate assolutamente trascurabili su tutte le tesi, incluso il testimone non trattato, sia nel campo sperimentale n. 1 (0-3,8%) sia nel campo n. 2 (0-3,3%).

La presenza di residui fiorali infetti da *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., funghi associati ai marciumi secondari del grappolo, è stata rinvenuta con percentuali elevatissime, anche prossime al 99%, con l'unica eccezione per *Aspergillus* spp. nel campo n. 1 (0,6-7%).

Le presenza di specie fungine quali *Alternaria* spp. e *Rhizopus* spp. è stata riscontrata con percentuali variabili, con intervalli di 10,6-88,7% e 0-30,7% rispettivamente.

In nessun caso, il trattamento effettuato con BCA nella fase fenologica di pre-chiusura del grappolo ha dato luogo a differenze statisticamente apprezzabili delle percentuali di residui fiorali contaminati, rispetto al testimone non trattato.

Tabella 10. Analisi della presenza di diversi generi fungini su residui fiorali del campo di Castellaneta Marina (campo n. 1), effettuata mediante isolamenti su agar-acqua.

Trattamento di pre-chiusura	Percentuale di residui fiorali infetti				
	<i>B. cinerea</i>	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp.
Testimone non trattato	0,0	0,6	99,1	78,1	0,0
<i>B. subtilis</i>	0,9	5,7	96,2	88,7	0,9
<i>B. subtilis</i> + Pyrimethanil	0,0	7,0	93,9	53,0	0,0
<i>B. subtilis</i> + Boscalid	0,0	1,8	85,6	64,0	0,0
<i>B. amyloliquefanciens</i>	3,8	4,7	92,5	62,3	0,0
<i>B. amyloliquefanciens</i> + Boscalid	0,8	0,8	98,4	48,0	0,0
Pyrimethanil	2,8	2,8	97,2	75,9	0,0
Boscalid	0,9	3,6	96,4	79,3	0,0

Valutazioni effettuate su campioni costituiti da 100 residui fiorali per tesi.

Tabella 11. Analisi della presenza di diversi generi fungini su residui fiorali del campo di Casamassima (campo n. 2), effettuata mediante isolamenti su agar-acqua o preparazione di camere umide.

Trattamento di pre-chiusura	Percentuale di residui fiorali infetti									
	<i>B. cinerea</i>		<i>Aspergillus</i> spp.		<i>Penicillium</i> spp.		<i>Alternaria</i> spp.		<i>Rhizopus</i> spp.	
	Isolamenti su AA*	Camere umide**	Isolamenti su AA*	Camere umide**	Isolamenti su AA*	Camere umide**	Isolamenti su AA*	Camere umide**	Isolamenti su AA*	Camere umide**
Testimone non trattato	1,0	3,3	83,7	95,0	34,7	23,4	35,6	13,2	8,4	0,3
<i>Bacillus subtilis</i>	1,5	1,4	98,0	92,3	60,0	33,3	43,2	15,4	21,2	0,4
<i>B. amyloliquefanciens</i>	2,0	1,3	96,3	94,8	53,7	37,9	35,6	16,4	30,7	1,4
Boscalid	0,0	1,5	97,5	95,7	83,3	45,1	14,8	10,6	8,4	0,5

\*Valutazioni effettuate su campioni costituiti da 200 residui fiorali per tesi; \*\*Valutazioni effettuate su campioni costituiti da 400 residui fiorali per tesi.

#### 4.4. QUANTIFICAZIONE DELLA RESISTENZA A FUNGICIDI

Le frequenze di conidi resistenti a anilinopirimidine e fungicidi SDHI riscontrate nei campi sperimentali n. 1 e 2 sono riportate nelle tabelle 12 e 13.

È stata valutata la capacità di *B. cinerea* di acquisire resistenza a fluopyram, un fungicida SDHI di nuovissima introduzione, ancora poco impiegato nei programmi di protezione. Essendo un fungicida SDHI, presenta il medesimo meccanismo d'azione del boscalid e, pertanto, si è inteso valutare l'eventuale resistenza incrociata positiva tra i due composti.

In tutte le tesi del vigneto n. 1 è stata riscontrata un'elevata frequenza di conidi resistenti a pyrimethanil, con valori medi delle ripetizioni di ciascuna tesi compresi tra 65,0% (tesi 4) e 93,6% (tesi 2), probabilmente a causa del ripetuto impiego di tale fungicida in annate precedenti. Decisamente più contenute sono state le percentuali di resistenza a boscalid, fungicida di recente introduzione, comprese tra 0,3% (tesi 4) e 23,3% (tesi 11, sottoposta a 6 trattamenti con boscalid). In particolare, tutte le tesi in cui è stato impiegato il boscalid (2-6 applicazioni) non sono risultate statisticamente differenti tra loro, mostrando frequenze medie di resistenza al fungicida comprese tra 5,0 e 23,3%; differenze statistiche sono state invece riscontrate con le tesi trattate con il solo fungicida pyrimethanil e/o con gli agenti di bio-controllo *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (0,3-4,2% di conidi resistenti a boscalid). Non è stata riscontrata resistenza a fluopyram.

Analogamente, nel campo n. 2 la resistenza alle anilinopirimidine è stata rinvenuta con frequenze elevatissime, comprese tra 64,8% (tesi 1, testimone non trattato) e 100% (tesi 2, sottoposta a 12 applicazioni con *B. subtilis*). Le frequenze di conidi resistenti a boscalid sono state generalmente elevate (comprese tra 47,3% per la tesi non trattata e 79,7% per la tesi sottoposta a 12 applicazioni con *B. subtilis*), anche in assenza di trattamenti con il fungicida. Seppur con valori modesti e variabili, tra 0,7% (tesi 1) e 11,5% (tesi 6, unica in cui è stato applicato il principio attivo), sono stati rinvenuti anche conidi di *B. cinerea* resistenti a fluopyram.

Nelle condizioni sperimentali adottate, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente apprezzabile fra i programmi saggiati, in merito all'influenza dei mezzi tecnici impiegati sullo sviluppo in campo di popolazioni resistenti alle

anilinopirimidine. Relativamente al boscalid, nelle tesi in cui è stato impiegato in miscela o in alternanza con *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens*, le percentuali di conidi resistenti al fungicida sono risultate più limitate, pur se non statisticamente differenziabili da quelle osservate sulla tesi trattata esclusivamente con boscalid.

Tabella 12. Frequenza percentuale di conidi di *B. cinerea* resistenti a anilinopirimidine e fungicidi SDHI nel campo sperimentale n. 1.

Tesi	Programma di protezione	Percentuale di conidi resistenti ( $\pm$ E.S.)		
		MM	AcMM	
		Pyr (1 mg l <sup>-1</sup> )	Bos (10 mg l <sup>-1</sup> )	Flp (10 ml l <sup>-1</sup> )
1	Testimone non trattato	89,4 $\pm$ 0,8 ab	2,2 $\pm$ 0,8 bc B	0,0 $\pm$ 0,0
2	<i>Bacillus subtilis</i> (10)	93,6 $\pm$ 3,5 a	4,2 $\pm$ 2,2 bc B	0,0 $\pm$ 0,0
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (10)	93,4 $\pm$ 0,4 a	1,0 $\pm$ 0,5 bc B	0,0 $\pm$ 0,0
4	<i>Bacillus subtilis</i> (3); Pyrimethanil (3)	65,0 $\pm$ 19,4 b	0,3 $\pm$ 0,3 c B	0,0 $\pm$ 0,0
5	<i>Bacillus subtilis</i> (3); Boscalid (3)	92,1 $\pm$ 2,0 a	6,0 $\pm$ 3,4 bc AB	0,0 $\pm$ 0,0
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (3); Boscalid (3)	81,7 $\pm$ 4,1 ab	5,5 $\pm$ 5,5 bc AB	0,0 $\pm$ 0,0
7	<i>Bacillus subtilis</i> + Pyrimethanil (6)	72,6 $\pm$ 10,1 ab	2,8 $\pm$ 0,8 bc B	0,0 $\pm$ 0,0
8	<i>Bacillus subtilis</i> + Boscalid (6)	81,2 $\pm$ 9,5 ab	6,8 $\pm$ 5,1 bc AB	0,0 $\pm$ 0,0
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> + Boscalid (6)	88,9 $\pm$ 0,2 ab	14,8 $\pm$ 2,1 abAB	0,0 $\pm$ 0,0
10	Pyrimethanil (6)	69,2 $\pm$ 3,4 ab	1,3 $\pm$ 1,3 bc B	0,0 $\pm$ 0,0
11	Boscalid (6)	88,1 $\pm$ 8,0 ab	23,3 $\pm$ 12,1 a A	0,0 $\pm$ 0,0
12	Boscalid (2); <i>Bacillus subtilis</i> (2); Pyrimethanil (2)	84,9 $\pm$ 8,1 ab	6,9 $\pm$ 3,7 bc AB	0,0 $\pm$ 0,0
13	Boscalid (2); <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (2); Pyrimethanil (2)	92,2 $\pm$ 1,7 a	5,0 $\pm$ 2,8 bc AB	0,0 $\pm$ 0,0

I dati seguiti da lettere uguali, in ciascuna colonna, non sono differenziabili statisticamente ai livelli di probabilità P=0,05 (lettere minuscole) e P=0,01 (lettere maiuscole).

Tabella 13. Frequenza percentuale di conidi di *B. cinerea* resistenti a anilinopirimidine e fungicidi SDHI nel campo sperimentale n. 2.

Tesi	Programma di protezione	Percentuale di conidi resistenti ( $\pm$ E.S.)		
		MM	AcMM	
		Pyr (1 mg l <sup>-1</sup> )	Bos (10 mg l <sup>-1</sup> )	Flp (10 ml l <sup>-1</sup> )
1	Testimone non trattato	64,8 $\pm$ 9,5	47,3 $\pm$ 10,4	0,7 $\pm$ 0,7
2	<i>Bacillus subtilis</i> (12)	100,0 $\pm$ 0,0	79,7 $\pm$ 10,7	5,9 $\pm$ 1,1
3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (12)	71,5 $\pm$ 7,8	54,4 $\pm$ 2,4	0,9 $\pm$ 0,5
4	<i>Bacillus subtilis</i> (3); Pyrimethanil (4)	69,1 $\pm$ 12,8	49,9 $\pm$ 16,1	6,0 $\pm$ 3,5
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (3); Pyrimethanil (4)	88,3 $\pm$ 6,0	54,6 $\pm$ 15,8	7,2 $\pm$ 4,7
6	Boscalid (1); Pyrimethanil (1); Fenhexamid (1); Pyrimethanil (1); Fenhexamid (1); Fluopyram (1); <i>B. subtilis</i> (2)	80,7 $\pm$ 13,4	73,1 $\pm$ 13,8	11,5 $\pm$ 5,8

#### 4.5. QUANTIFICAZIONE DI *B. SUBTILIS* E *B. AMYLOLIQUEFACIENS* IN CAMPO

Il protocollo messo a punto per l'identificazione e la quantificazione di *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens* da sospensioni di lavaggio di bacche di uva artificialmente inoculate, è stato applicato per il monitoraggio dell'evoluzione delle popolazioni dei due agenti di bio-controllo in campi sperimentali.

In dettaglio, il protocollo è stato applicato a campioni di bacche raccolte da piante trattate con i formulati commerciali Serenade Max e Amylo-X, prelevate 3 ore, 3, 6 e 9 giorni dopo uno o due trattamenti successivi, e da piante trattate con i due biofungicidi, da soli o in combinazione con fungicidi chimici di sintesi, dopo 30 giorni dall'ultimo trattamento. Il DNA ottenuto è stato amplificato in nested-real-time PCR con sonde TaqMan, specifiche per ciascun ceppo batterico.

Nel campo sperimentale di Adelfia (campo n. 3), la popolazione di *B. subtilis* (QST713) risultata pari a  $3 \times 10^3$  UFC/g di uva dopo 3 ore dal primo trattamento con Serenade Max, ha subito un lieve decremento, raggiungendo valori di  $2 \times 10^3$  UFC/g nove giorni dopo l'applicazione. Con il secondo trattamento, la popolazione di *B. subtilis* ha subito un incremento fino a  $5 \times 10^3$  UFC/g, riducendosi drasticamente fino al nono giorno, in cui è stata registrata una densità di popolazione di  $4 \times 10^2$  UFC/g (Figura 5).

La popolazione di *B. amyloliquefaciens* (D747), pari a  $4 \times 10^2$  UFC/g uva dopo 3 ore dal primo trattamento con Amylo-X, ha subito un incremento nei primi sei giorni raggiungendo valori di  $2 \times 10^3$  UFC/g di uva, per poi decrescere fino a  $2 \times 10^2$  UFC/g uva al nono giorno; dopo 3 ore dal secondo trattamento la popolazione del batterio ha raggiunto densità di  $4 \times 10^3$  UFC/g di uva, riducendosi a  $2 \times 10^2$  UFC/g nei successivi tre giorni e rimanendo generalmente stabile fino al nono giorno (Figura 6).

Popolazioni di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* sono state quantificate anche su campioni di bacche raccolte nelle tesi del campo sperimentale di Casamassima (campo n. 2), sottoposte a differenti programmi di protezione con Serenade Max o Amylo-X. Ad un mese dalla sospensione dei trattamenti, dopo 12 applicazioni con i due biofungicidi, la frequenza di rinvenimento di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* è stata rispettivamente pari a  $5 \times 10^3$  e 60 UFC/g di uva (Figura 7).



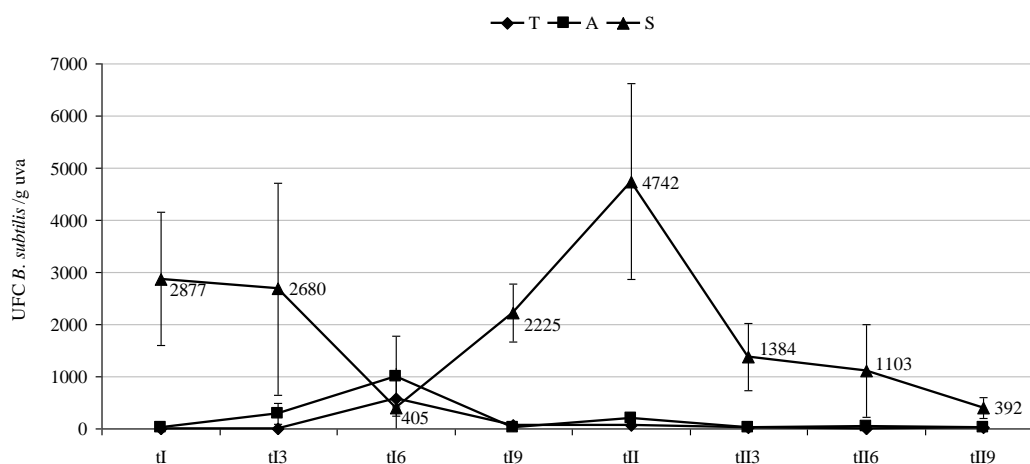


Figura 5. Quantificazione delle popolazioni di *B. subtilis* (S) impiegando sonda TaqMan specifica per la specie batterica. Le valutazioni sono state eseguite su campioni costituiti da 30 bacche di uva da tavola cv. Italia raccolte in 8 differenti tempi: 3 ore dopo il primo trattamento (tI); a 3, 6, 9 giorni dopo il primo trattamento (tI3, tI6 e tI9, rispettivamente); 3 ore dopo la seconda applicazione (tII); a 3, 6, 9 giorni dopo il secondo trattamento (tII3, tII6 e tII9). Campioni di bacche non trattate (T) o trattate con *B. amyloliquefaciens* (A) sono stati impiegati come controlli negativi nelle reazioni di amplificazione. Le barre rappresentano l'errore standard.

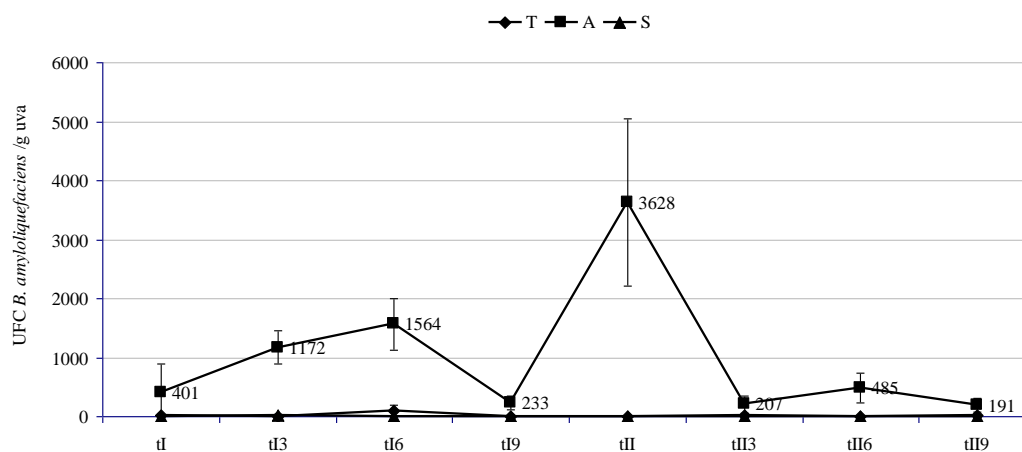


Figura 6. Quantificazione delle popolazioni di *B. amyloliquefaciens* (A) impiegando sonda TaqMan specifica per la specie batterica. Le valutazioni sono state eseguite su campioni costituiti da 30 bacche di uva da tavola cv. Italia raccolte in 8 differenti tempi: 3 ore dopo il primo trattamento (tI); a 3, 6, 9 giorni dopo il primo trattamento (tI3, tI6 e tI9, rispettivamente); 3 ore dopo la seconda applicazione (tII); a 3, 6, 9 giorni dopo il secondo trattamento (tII3, tII6 e tII9). Campioni di bacche non trattate (T) o trattate con *B. subtilis* (S) sono stati impiegati come controlli negativi nelle reazioni di amplificazione. Le barre rappresentano l'errore standard.

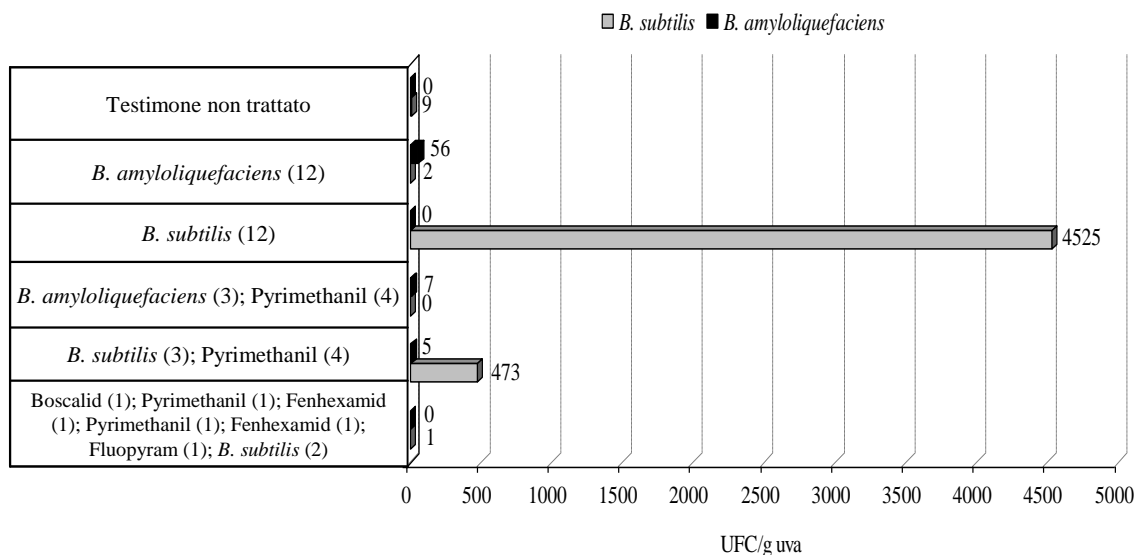


Figura 7. Abbondanza delle popolazioni di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* rinvenute su bacche d'uva raccolte un mese dopo la sospensione dei trattamenti, nel campo sperimentale di Casamassima (campo n. 2), sottoposto a differenti programmi di protezione con Serenade Max o Amylo-X.

## CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI

*B. cinerea*, agente causale della muffa grigia, è un patogeno polifago ed ubiquitario che, soprattutto negli ambienti dell'Italia meridionale, risulta decisamente dannoso per numerose colture di rilevante interesse economico, tra cui uve a maturazione media e tardiva, soprattutto in vigneti coperti per posticipare la raccolta. In essi, infatti, la protezione antibotritica può richiedere un consistente impiego di fungicidi, anche in epoche prossime alla raccolta, con gravi ripercussioni in termini di qualità del prodotto, salubrità per il consumatore e costi di gestione aziendali.

Un impiego razionale dei fungicidi, ovvero l'adozione di programmi di protezione che assicurino la sostenibilità della produzione non solo nell'immediato ma anche nel medio-lungo termine, come previsto dalla direttiva CE 128/2009, che si pone l'obiettivo di far transitare tutta l'agricoltura europea in un regime di protezione integrata entro il 2014, è un punto cruciale della gestione della muffa grigia.

Il problema della diffusione di ceppi resistenti ai fungicidi comunemente impiegati contro *B. cinerea*, associato alle necessità di riduzione dell'impatto ambientale delle produzioni agricole, e di una maggior sicurezza alimentare, sta focalizzando l'attenzione sull'impiego di BCA.

L'esigenza di disporre di informazioni e indicazioni più dettagliate circa la corretta applicazione di antagonisti microbici nelle diverse condizioni climatiche e colturali, ha portato a studiare la dinamica delle popolazioni di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* in vigneti del Sud Italia.

Al fine di monitorarne la sopravvivenza in campo, così da stabilire il momento più idoneo per un eventuale trattamento, è stato messo a punto un protocollo per la rilevazione e quantificazione in real-time PCR delle popolazioni di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, specifico per ciascuna specie batterica. Ulteriori prove, previste per la stagione produttiva in corso, saranno comunque effettuate per confermare la bontà del metodo.

Al fine di mettere a punto strategie di protezione integrata basate sull'impiego combinato di fungicidi e agenti di bio-controllo, sono state anche eseguite valutazioni

sull'inibizione della crescita di *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* da composti ad attività antibotritica; da tali osservazioni è emerso che i due antagonisti microbici non sono inibiti dai fungicidi Cantus (boscalid), Geoxe (fludioxonil), Scala (pyrimethanil) e Rovral WG (iprodione), e pertanto applicazioni in associazioni con tali fungicidi potrebbero essere utili per limitare le problematiche correlate a insorgenza di resistenza e impatto ambientale.

Nei vigneti sperimentali, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente apprezzabile fra i programmi saggiati, indipendentemente dall'applicazione o meno di formulati commerciali a base di BCA, in merito alla diffusione di popolazioni resistenti alle anilinopirimidine (frequenze di rinvenimento di 65-100%). Relativamente al boscalid, fungicida introdotto più recentemente, nelle tesi in cui è stato impiegato in miscela o in alternanza con *B. subtilis* o *B. amyloliquefaciens*, le percentuali di conidi resistenti al fungicida sono risultate più limitate, pur se in modo non statisticamente differenziabile, di quelle riferite alla tesi trattata esclusivamente con boscalid.

La straordinaria capacità di adattamento di *B. cinerea* è stata confermata dalla comparsa, seppur modesta (frequenze di rinvenimento inferiori a 12%) di conidi del fungo resistenti a fluopyram, fungicida SDHI registrato su vite da solamente un anno, ancora poco impiegato nei programmi di protezione. Tale composto è caratterizzato dal medesimo meccanismo d'azione del boscalid e, pertanto, la presenza di forme di resistenza a tale principio attivo potrebbe essere dovuta alla parziale resistenza incrociata positiva esistente tra i due composti.

Concludendo, in un'ottica di protezione integrata sarebbe auspicabile l'impiego di BCA nelle fasi iniziali della malattia, quando le condizioni ambientali sono meno favorevoli al patogeno e la pressione delle popolazioni di *B. cinerea* è ridotta, ricorrendo invece all'uso di fungicidi nei momenti di maggiore rischio, operando scelte razionali, nel rispetto comunque delle strategie anti-resistenza.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

- Anderson L.M., G. Burtin, F. Bartoli, T. Heulin, 2004. An extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* inactivates antibiotics of *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Phytopathology*, 94, 1228-1234.
- Antoniolli L.R., G.A. da Silvia, S.A.M. Alves, L. Moro, 2011. Alternative control of raspberry postharvest decay. *Pesquisa agropecuaria brasileira*, 46 (9), 979-984.
- Aranda F.J., A. Teruel, A. Ortiz, 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1713 (1), 51-56.
- Arrebola E., D. Sivakumar, R. Bacigalupo, L. Korsten, 2010. Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. *Crop Protection*, 29, 369-377.
- Aziz A., B. Poinssot, X. Daire, M. Adrian, A. Bézier, B. Lambert, J.M. Joubert, A. Pugin, 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 16, 1118-1128.
- Banno S., K. Yamashita, F. Fukumori, K. Okada, H. Uekusa, M. Takagaki, M. Kimura, M. Fujimura, 2009. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Plant Pathology*, 58 (1), 120-129.
- Bardas G., T. Veloukas, O. Koutita, G. Karaoglanidis, 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*, 66 (9), 967-973.
- Baroffio C.A., W. Siegfried, V.W. Hilber, 2003. Long-term monitoring for resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine, phenylpyrrole and hydroxyanilide fungicides in Switzerland. *Plant Disease*, 87, 662-666.
- Basha S., K. Ulaganathan, 2002. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata*. *Current Science*, 82, 1457-1463.
- Bélanger R.R., C. Labbé, W.R. Jarvis, 1994. Commercial-scale control of rose powdery mildew with fungal antagonists. *Plant Disease*, 78, 420-424.
- Belli G., P.A. Bianco, P. Casati, P. Cortesi, F. Faoro, G. Farina, M. Iriti, M. Moretti, M. Saracchi, P. Sardi, A. Vercesi, 2006. Elementi di Patologia Vegetale. Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova, pp. 475.
- Bernard M.B., P. Cole, A. Kobelt, P.A. Horne, J. Altmann, S.D. Wratten, A.L. Yen, 2010. Reducing the Impact of Pesticides on Biological Control in Australian Vineyards: Pesticide Mortality and Fecundity Effects on an Indicator Species, the Predatory Mite *Euseius victoriensis* (Acari: Phytoseiidae). *Journal of Economic Entomology*, 103 (6), 2061-2071.
- Bertetti D., A. Garibaldi, M.L. Gullino, 2008. Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides in Italian vineyards. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 73 (2), 273-282.
- Besson F., G. Michel, 1990. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin producing *Bacillus subtilis*. *Microbios*, 62, 93-99.
- Besson F., G. Peypoux, G. Michel, L. Delcambe, 1977. The structure of Bacillomycin L, an antibiotic from *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 77, 61-67.
- Blakeman J.P., 1993. Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology*, 42, 479-493.

- Blakeman J.P., I.D.S. Brodie, 1976. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. *In: Microbiology of Aerial Plant Surfaces* (C.H. Dickinson, T.F. Preece, editori), *Academic Press*, Londra, 529-557.
- Boff P., J. Köhl, M. Gerlagh, J. de Kraker, 2002. Biocontrol of grey mould by *Ulocladium atrum* applied at different flower and fruit stages of strawberry. *BioControl*, 47, 193-206.
- Bollen G.J., G. Scholten, 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 77, 83-90.
- Brent K.J., 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be managed? FRAC Monograph No. 1, second revised edition, *Fungicide Resistance Action Committee*, Brussels, Belgio, pp. 56.
- Brooks C., J.S. Cooley, 1917. Temperature relations of apple-rot fungi. *Journal of Agricultural Research*, 8, 139-164.
- Caia G., A. Bertoluzza, F. Foschi, 1988. Fitofarmaci e legislazione. *In: Fitofarmaci, Igiene e Ambiente* (G. Goidànich, G.C. Pratella, editori), *Maggioli*, Rimini, Italia, 236-250.
- Chatterton S., Z.K. Punja, 2012. Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f.sp. *catenulata*, a biological control agent of Botrytis grey mould. *Botany-Botanique*, 90 (1), 1-10.
- Chen H., L. Wang, C.X. Su, G.H. Gong, P. Wang, Z.L. Yu, 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 180-186.
- Choi G.J., K.J. Cheol, J.K. Soo, N.M. Hyeon, S.W. Lee, H.T. Kim, 2009. Biocontrol Activity of *Acremonium strictum* BCP Against Botrytis diseases. *Plant Pathology Journal*, 25 (2), 165-171.
- Compant S., C. Clément, A. Sessitsch, 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.
- Cook R.J., 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 31-53.
- Creelman R.A., J.E. Mullet, 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 355-381.
- Cutting S.M., 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28, 214-220.
- D'Ercole N., Nipoti P., 1980. Biologia della *Botrytis cinerea* sulla vite: 1. Conservazione del parassita. *Rivista di Patologia Vegetale*, S, IV, 17, 35-43.
- Danielsson J., O. Reva, J. Meijer, 2007. Protection of oilseed rape (*Brassica napus*) toward fungal pathogens by strains of plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial Ecology*, 54, 134-140.
- Davis R.P., C. Dennis, 1979. Use of dicarboximide fungicides on strawberries and potential problem of resistance in *Botrytis cinerea*. *In: Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference*, Brighton, Inghilterra, 193-201.
- De Boer M., I. van der Sluis, L.C. van Loon, P.A.H.M. Bakker, 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas spp.* strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 201-210.
- Deleu M., M. Paquot, T. Nylander, 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface e implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283, 358-365.
- Delp C.J., J. Dekker, 1985. Fungicide resistance: definitions and use of terms. *Bulletin OEPP*, 15, 333-335.

- De Miccolis Angelini R.M., W. Habib, C. Rotolo, S. Pollastro, F. Faretra, 2010. Selection, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 185-199.
- De Miccolis Angelini R.M., C. Rotolo, M. Masiello, S. Pollastro, H. Ishii, F. Faretra, 2012. Genetic analysis and molecular characterisation of laboratory and field mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to QoI fungicides. *Pest management Science*, 68, 1231-1240.
- De Miccolis Angelini R.M., C. Rotolo, A.V. Ancona, S. Pollastro, F. Faretra, 2013. Current status of fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on strawberry in South Italy. In: Abstract book XVI<sup>th</sup> International *Botrytis* Symposium, Locorotondo, Italia, 55.
- Demoz B.T., L. Korsten, 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control*, 37, 68-74.
- Derckel J.P., J.C. Audran, B. Haye, B. Lambert, L. Legendre, 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and  $\beta$  1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum*, 104, 56-64.
- Diáñez F., M. Santos, R. Blanco, J.C. Tello, 2002. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry crops in Huelva (Southwestern Spain). *Phytoparasitica*, 30 (5), 1-6.
- Dongiovanni C., M. Di Carolo, C. Rotolo, R.M. De Miccolis Angelini, A. Santomauro, S. Pollastro, F. Faretra, 2013a. Integrate grey mould control using biocontrol agents and fungicides on table grape. In: Abstract Book XVI International *Botrytis* Symposium, Locorotondo (Bari), Italia, 47.
- Dongiovanni C., Di Carolo M., Rotolo C., De Miccolis Angelini R.M., Santomauro A., Pollastro S., Faretra F., 2013b. The new SDHI fungicides boscalid and fluopyram in the control of grey mold: efficacy and resistance. In: Abstract Book XVI International *Botrytis* Symposium, Locorotondo (Bari), Italia, 54.
- Droby S., M. Wisniewski, D. Macarasin, C. Wilson, 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52, 137-145.
- Dubos B., 1992. Biological control of *Botrytis*: State of the art. In: Recent advances in *Botrytis* research (Verhoeff K., N.E. Malatrakis, B. Williamson, coord.), *Centre for Agricultural Publishing and Documentation (PUDOC)*, Wageningen, Olanda, 169-178.
- Duffy B.K., D.M. Weller, 1995. Suppression of take-all of wheat using *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* individually and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. *Plant Disease*, 79, 907-911.
- Ebata M., K. Miyazaki, Y. Takahashi, 1969. Isolation and characterization of Subsporins A, B and C. *Journal of Antibiotics*, 22, 467-472.
- Elad Y., I. Chet, 1995. Practical approaches for biocontrol implementation. In: Novel Approaches to Integrated Pest Management (R. Reuveni, editore), Lewis, Chelsea, Michigan, 323-338.
- Elad Y., E.A. Kapat, 1999. *Trichoderma harzianum* T39 - mechanisms of biocontrol of foliar pathogens. In: Modern fungicides and antifungal compounds II (Lyr H., P.E. Russel, H.W. Dehne, H.D.J. Sisler, coord.). In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Reinhardtsbrunn Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germania, 459-467.

- Elad Y., S. Freeman, 2002. Biological control of fungal plant pathogens. *In: The mycota, a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research* (Kempken F., coord.), *XI Agricultural Applications*, Springer, Heidelberg, Germania, 93-109.
- Elad Y., A. Stewart, 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. *In: Botrytis: biology, pathology and control* (Elad Y., B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen, editori). *Kluwer Academic Press*, Dordrecht, Olanda, 223-241.
- Elad Y., N.E. Malathrakis, A.J. Dik, 1996. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops. *Crop Protection*, 15 (3), 229-240.
- Elad Y., B. Kirshner, N. Yehuda, A. Szejnberg, 1998. Management of powdery mildew and gray mould of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10. *BioControl*, 43, 241-251.
- Elad Y., L. Shpialter, N. Korolev, M. Mamiev, D. Rav David, I. Dori, L. Ganot, D. Shmuel, E. Matan, Y. Messika, 2008. Chemical and cultural means of control integrated for grey mould (*Botrytis cinerea*) management in *Lisianthus*. *In: Modern fungicides and antifungal compounds V. Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Reinhardtsbrunn Symposium Friedrichroda, Germania*, (Dehne H.W., U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell, H. Lyr, coord.), *BCPC, DPG*, Braunschweig, Germania, 211-218.
- Ellis M.B., J.M. Waller, 1974. *Botrytis fabae*. *In: IMI descriptions of fungi and bacteria sheet 432*. Issued by the Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey England. *Eastern Press Ltd., London and Reading*.
- Elmar P.A.G., T. Reglinski, P.N. Wood, R.A. Hill, S.M. Marsden, F. Parry, J.T. Taylor, 2003. Suppression of *Botrytis* in grapes using a combination of elicitors and fungal antagonists. *In: Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology*, Christchurch, Nuova Zelanda, 43.
- Elmer P.A.G., T. Reglinski, 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55, 155-177.
- Faretra F., V. Piglionica, 1982. Relazione fra presenza di *Botrytis cinerea* Pers. e condizioni climatiche occorse dal 1978 al 1981 in un "tendone" ad uva da tavola. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*, 103 (suppl.), 135-140.
- Faretra F., E. Antonacci, 1987. Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. *Phytopathologia Mediteranea*, 26, 29-35.
- Faretra F., S. Pollastro, 1993. Isolation, characterization and genetic analysis of laboratory mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to the phenylpyrrole fungicide CGA 173506. *Mycological Research*, 97, 620-624.
- Faretra F., S. Pollastro, 1998. *Botryotinia fuckeliana*. *In: Electronic crop protection compendium, International Centre for Agriculture and Biosciences (CABI)*, Oxon, Inghilterra, pp. 112.
- Faretra F., E. Antonacci, S. Pollastro, 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana* teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*, 134, 2543-2550.
- Faretra F., S. Pollastro, A.P. Di Tonno, 1989. New natural variants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) coupling resistance to benzimidazoles to insensitivity towards the N-phenylcarbamate diethofencarb. *Phytopathologia mediterranea*, 28, 98-104.
- Faretra F., S. Pollastro, A. Santomauro, M. Miazzi, 1996. Genetics of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*): an overview. *In: Abstract book del XI<sup>th</sup>*



- International *Botrytis* Symposium, Wageningen, Olanda, 11.
- Fernández-Ortuño D., F. Chen, G. Schnabel, 2012. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. *Plant Disease*, 96, 1198-1203.
- Fernández-Ortuño D., F. Chen, G. Schnabel, 2013. Resistance to cyprodinil and lack of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry in North and South Carolina. *Plant Disease*, 97, 81-85.
- Fokkema N.J., B. Schippers, 1986. Phyllosphere versus rhizosphere as environments for saprophytic colonization. In: Microbiology of the Phyllosphere (N.J. Fokkema, J. Van den Heuvel, editori), *Cambridge University Press*, Cambridge, Inghilterra, 137-159.
- Forster B., T. Staub, 1996. Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides against *Botrytis cinerea*. *Crop Protection*, 15, 529-537.
- Forster H., G.F. Driever, D.C. Thompson, J.E. Adaskaveg, 2007. Postharvest decay management for stone fruit crops in California using the "reduced-risk" fungicides fludioxonil and fenhexamid. *Plant Disease*, 91 (2), 209-215.
- Frändberg E., J. Schnürer, 1994. Chitinolytic properties of *Bacillus pabuli* K1. *Journal of Applied Bacteriology*, 76, 361-367.
- Gärtel W., 1965. Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung der *Botrytis cinerea* Pers. unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei der Pfropfrebenherstellung. *Weinberg keller*, 12, 469-480.
- Giannakis C., C.S. Bucheli, K.G.M. Skene, S.P. Robinson, N.S. Scott, 1998. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defense against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4, 14-22.
- Grossman A.D., 1995. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annual Review Genetics*, 29, 477-508.
- Grover M., L. Nain, S.B. Sing, A.K. Saxena, 2010. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24. *Current Microbiology*, 60, 99-106.
- Groves J.W., L. Draytonf, 1939. The perfect stage of *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 31, 485-489.
- Groves J.W., C.A. Loveland, 1953. Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 45, 415-425.
- Gullino M.L., 1992. Chemical control of *Botrytis* spp.. In: Recent advances in *Botrytis* research (Verhoeff K., N.E. Malathrakakis, B. Williamson, coord.). Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, Olanda, 217-222.
- Gullino M.L., D. Bertetti, M. Mocioni, A. Garibaldi, 1998. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* Pers. to new fungicides. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent*, 63 (3b), 1047-1056.
- Gullino M.L., D. Bertetti, M. Monchiero, A. Garibaldi, 2000. Sensitivity to anilinopyrimidines and phenylpyrroles in *Botrytis cinerea* in north-Italian vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, 433-446.
- Hammerschmidt R., J. Kuc, 1995. Induced Resistance to Diseases in Plants. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Olanda, pp. 196.
- Helbig J., 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *Bio- Control*, 47, 85-99.
- Holz B., 1979. Über eine resistenzerscheinung von *Botrytis cinerea* an Reben gegen die neuen Kontaktbotrytizide im Gebiet der Mittelmosel. *Weinberg und Keller*, 26, 18-25.

- Holz G., S. Coertze, B. Williamson, 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen, coord.). *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, Olanda, 9-27.
- Hsieh F.C., T.C. Lin, M. Meng, S.S. Kao, 2008. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide Iturin A. *Current Microbiology*, 56, 1-5.
- Hu H.Q., X.S. Li, H. He, 2010. Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of *Capsicum* bacterial wilt. *Biological Control*, 54, 359-365.
- Hu L.B., Z.Q. Shi, T. Zhang, Z.M. Yang, 2007. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moliniforme* Shaldon ATCC 38932. *FEMS Microbiology Letters*, 272, 91-98.
- Huang R., G.Q. Li, J. Zhang, L. Yang, H.J. Che, D.H. Jiang, H.C. Huang, 2011. Control of Postharvest Botrytis Fruit Rot of Strawberry by Volatile Organic Compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101 (7), 859-869.
- Ishii H., J. Fountaine, W.H. Chung, M. Kansago, K. Nishimura, K. Takahashi, M. Oshima, 2009. Characterization of QoI resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest Management Science*, 65, 916-922.
- Isogai A.S., S. Takayama, S. Murakoshi, A. Suzuki, 1982. Structure of  $\beta$ -amino acids in antibiotics Iturin A. *Tetrahedron Letters*, 23, 3065-3068.
- Jarvis W.R., 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity. Monograph 15. Research Branch Canada, Department of Agriculture Monographs. Ottawa, Canada, pp. 195.
- Jiang J., L. Ding, T.J. Michailides, H. Li, Z. Ma, 2009. Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 72-76.
- Joshi R., B.B. McSpadden Gardener, 2006. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 96, 145-154.
- Katan T., 1982. Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cycloimide (dicarboximide) fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathology*, 31, 133-141.
- Katz E., A.L. Demain, 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological Review*, 41, 449-474.
- Kavitha S., S. Senthilkumar, S. Gnanamanickam, M. Inayathullah, R. Jayakumar, 2005. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process Biochemistry*, 40, 3236-3243.
- Kim P.I., K.C. Chung, 2004. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234, 177-183.
- Kim J.H., S.H. Lee, C.S. Kim, E.K. Lim, K.H. Hyuck, H.G. Kong, D.W. Kim, S.W. Lee, B.J. Moon, 2007. Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *Journal of microbiology and biotechnology*, 17 (3), 438-444.
- Kinsella K., C.P. Schulthess, T.F. Morris, J.D. Stuart, 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 374-379.
- Kirk P.M., P.F. Cannon, D.W. Minter, J.A. Stalpers, 2008. Dictionary of the fungi. X Edizione, *CAB International*, Wallingford, Inghilterra, pp. 640.

- Kluge B., J. Vater, J. Salnikow, K. Eckart, 1988. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Letters*, 231, 107-110.
- Kluger M., W. Loeffler, C. Rapp, A. Kern, G. Jung, 1990. Rhizoctin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Archives of Microbiology*, 153, 276-281.
- Köhl J., W.M.L. Molhoek, C.H. van Der Plas, N.J. Fokkema, 1995. Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathology*, 85, 393-401.
- Köhl J., M. Gerlagh, G. Grit, 2000. Biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Ulocladium atrum* in different production system of cyclamen. *Plant Disease*, 84, 569-573.
- Korolev N., M. Mamiev, T. Zahavi, Y. Elad, 2011 Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 129 (4), 591-608.
- Korzybski T., Z. Kowszyk-Gifinder, W. Kurytowicz, 1978. Antibiotics: Origin, Nature and Properties. *American Society for Microbiology*, Washington, USA, pp.1651.
- Kretschmer M., M. Hahn, 2008. Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115 (5), 214-219.
- Kunst F., N. Ogasawara, I. Moszer, A.M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, *et al.*, 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- Kwon G.-H., H.-A Lee, J.-Y. Park, J.S. Kim, J. Lim, C.-S. Park, D.Y. Kwon, Y.-S. Kim, J. H. Kim, 2009. Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 282-287.
- Latorre B.A., R. Torres, 2012. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection*, 40, 49-52.
- Latorre B.A., I. Spadaro, M.E. Rioja, 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, 21, 957-961.
- Leclère V., M. Béchet, A. Adam, J.S. Guez, B. Wathelet, M. Ongena, P. Thonart, F. Gancel, M. Chollet-Imbert, P. Jacques, 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied Environmental and Microbiology*, 71, 4577-4584.
- Lee H., J. Leon, I. Raskin, 1995. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Science*, USA, 92, 4076-4079.
- Lee J.P., S.W. Lee, C.S. Kim, J.H. Son, J.H. Song, K.Y. Lee, H.J. Kim, S.J. Jung, B.J. Moon, 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* from the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37, 329-337.
- Leroch M., M. Kretschmer, M. Hahn, 2011. Fungicide Resistance Phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from Commercial Vineyards in South West Germany, *Journal of Phytopathology*, 159 (1), 63-65.
- Leroux P., 1994. Effect of pH, amino acids and various organic compounds on the fungitoxicity of pyrimethanil, glufosinate, captafol, cymoxanil and fenpiclonil in *Botrytis cinerea*. *Agronomie*, 14, 541-554.
- Leroux P., 1995. Progress and problems in the control of *Botrytis cinerea* in grapevine. *Pesticide Outlook*, 10, 13-19.

- Leroux P., M. Clerjeau, 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to fungicides in French vineyards. *Crop Protection*, 4, 137-160.
- Li H., C. Leifert, 1994. Development of resistance in *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel against the biological control agent *Bacillus subtilis* CL27. *Z PflKrankh PflSchutz*, 101, 414-418.
- Lima G., A. Ippolito, F. Nigro, M. Salerno, 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Tecnology*, 10, 169-178.
- Liu Y.F., Z.Y. Chen, T.B. Ng, J. Zhang, M.G. Zhou, F.P. Song, F. Lu, Y.Z. Liu, 2007. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916. *Peptides*, 28, 553-559.
- Llop P., P. Caruso, J. Cubero, C. Morente, M.M. Lopez, 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37, 23-31.
- Long C.A., Z. Wu, B.X. Deng, 2005. Biological control of *Penicillium italicum* of citrus and *Botrytis cinerea* of grapes by Strain 34-9 of *Kloeckera apiculata*. *European Food Research and Technology*, 221 (1-2), 197-201.
- Lorenz G., 1988. Dicarboximide fungicides: history of resistance development and monitoring methods. In: Fungicide Resistance in North America (Delp C.J., coord.). *American Phytopathological Society*, St Paul, Minnesota, USA, 45-51.
- Louis D., 1963. Le modalités de la pénétration du *Botrytis cinerea* Pers. dans les plantes. *Annales des épiphyties*, 14, 57-72.
- Ludwig W., K. Schleifer, B.W. Whitman, 2008. Revised Road Map to the Phylum *Firmicutes*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume 3.
- Madigan M.T., J.M. Martinko, 2006. Microbiologia generale. Brock. *Biologia dei microorganismi*. Volume 1.
- Magnin-Robert M., P. Trotel-Aziz, D. Quantinet, S. Biagianti, A. Aziz, 2007. Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and b-1,3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 43-57.
- Majumdar S.K., S.K. Bose, 1958. Mycobacillin, a new antifungal antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 63, 391-398.
- Malandrakis A., A. Markoglou, B. Ziogas, 2011. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99, 118-124.
- Marahiel M.A., M.M. Nakano, P. Zuber, 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology*, 7, 631-636.
- Mari M., M. Guizzardi, G.C. Pratella, 1996. Biological Control of Gray Mold in Pears by Antagonistic Bacteria. *Biological control*, 7, 30-37.
- Martínez M.A., O.D. Delgado, J.D. Breccia, M.D. Baigorí, F. Siñeriz, 2002. Revision of the taxonomic position of the xylanolytic *Bacillus* sp. MIR32 reidentified as *Bacillus halodurans* and plasmid-mediated transformation of *B. halodurans*. *Extremophiles*, 6, 391-395.
- Matta A., E. Luisoni, G. Surico, 1996. Fondamenti di Patologia Vegetale, *Patron Editore*, Quarto inferiore, Bologna, Italia, pp. 496.
- Maurhofer M., C. Hase, P. Meuwly, J.P. Métraux, G. Defago, 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 88, 139-146.

- Mukerji K.J., K.L. Garg, 1988. Biocontrol of Plant Diseases, *CRC Press*, Boca Raton, Florida, pp. 405.
- Myresiotis C.K., G.S. Karaoglanidis, K. Tzavella-Monari, 2007. Resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to anilinopyrimidine, phenylpyrrole, hydroxyanilide, benzimidazole, and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 91 (4), 407-413.
- Myresiotis C.K., G.A. Bardas, G.S. Karaoglanidis, 2008. Baseline sensitivity of *Botrytis cinerea* to pyraclostrobin and boscalid and control of anilinopyrimidine- and benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease*, 92 (10), 1427-1431.
- Nally M.C., V.M. Pesce, Y.P. Maturano, C.J. Munoz, M. Combina, M.E. Toro, L.I.C de Figueroa, F. Vazquez, 2012. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology*, 64 (1), 40-48.
- Nelson K.E., 1951. Factors influencing the infections of table grapes by *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathology*, 41, 319-326.
- Nelson K.E., Amerine M.A., 1957. The use of *Botrytis cinerea* Pers. in the production of sweet table wines. *Hilgardia*, 26, 521-563.
- Ongena M., P. Jacques, 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16, 115-125.
- Osman M.S., D. Sivakumar, L. Korsten, 2011. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. *Crop Protection*, 30, 173-178.
- Pak H.A., R.E. Beever, E.P. Laracy, 1990. Population dynamics of dicarboximide-resistant strains of *Botrytis cinerea* on grapevine in New Zealand. *Plant Pathology*, 39, 501-509.
- Petsikos-Panayotarou N., E. Markellou, A.E. Kalamarakis, D. Kyriakopoulou, N.E. Malathrakis, 2003. *In vitro* and *in vivo* activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* isolates resistant to other botryticides and selection for resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 173-182.
- Peypoux F., G. Michel, L. Delcambe, 1976. The structure of Mycosubtilin, an antibiotic isolated from *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, 63, 391-398.
- Peypoux F., F. Besson, G. Michel, L. Delcambe, 1981. Structure of bacillomycine D, a new antibiotic of the iturin group. *European Journal of Biochemistry*, 118, 323-327.
- Pieterse C.M.J., S.C.M. Van Wees, J.A. Van Pelt, M. Knoester, R. Laan, H. Gerrits, P.J. Weisbeek, L.C. Van Loon, 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1571-1580.
- Piglioni V., 1979. Interventi fitoiatrici contro *Botrytis cinerea* Pers.. *Notiziario sulle Malattie delle Piante*, 101, 53-59.
- Polach F.J., G.S. Abawi, 1975. The occurrence and biology of *Botryotinia fuckeliana* on beans in New York. *Phytopathology*, 65, 657-660.
- Pommer E.H., G. Lorenz, 1995. Dicarboximide fungicides. In: Modern selective fungicides - Seconda edizione (Lyr H., coord.), *Gustav Fisher Verlag*, Jena, Germania, 99-118.
- Raaijmakers J.M., M. Leeman, M.M.P. van Oorschot, I. van der Sluis, B. Schippers, P.A.H.M. Bakker, 1995. Dose-response relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85, 1075-1081.

- Raupach G.S., J.W. Kloepper, 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88, 1158-1164.
- Reglinski T., C. Kingstone, 2001. Biological control – the next generation of pest control agents? *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 454, 106-9.
- Reymond P., E.E. Farmer, 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 404-411.
- Roogsawang N., J. Thaniyavarn, S. Thaniyavarn, T. Kameyama, M. Haruki, T. Imanaka, M. Morikawa, S. Kannaya, 2002. Isolation and characterization of halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. *Extremophiles*, 6, 499-506.
- Rosslensbroich H.J., D. Stuebler, 2000. *Botrytis cinerea*-history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19, 557-561.
- Rotolo C., 2010. Caratterizzazione molecolare della resistenza a fungicidi e della compatibilità sessuale in *Botryotinia fuckeliana*. Tesi di Dottorato, Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari, pp. 198.
- Rotolo C., R.M. De Miccolis Angelini, S. Pollastro, A. Santomauro, F. Faretra, 2009. Resistance of *Botryotinia fuckeliana* to anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicides in Southern Italy. In: Atti del XV Congresso della Società Italiana di Patologia Vegetale, Locorotondo, Bari, Italia, 159.
- Rotolo C., R.M. De Miccolis Angelini, S. Pollastro, F. Faretra, 2010. Monitoring of fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on grapevine and strawberry in South Italy. In: Abstract book of XV International Botrytis symposium, Cádiz, Spagna, 68.
- Roudet J., B. Dubos, 2000. Evaluation of three years study of *Ulocladium atrum* (strain 385) as a biological control agent of vine gray rot in the Bordeaux region. *Proceeding of the XIIth International Botrytis Symposium*, Reims, Francia, 58.
- Rozen S., H.J. Skaletsky, 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology (Krawetz S., S. Misener, coord.), *Humana Press.*, Totowa, New Jersey, USA, 365-386.
- Sadfi-Zouaoui N., I. Hannachi, D. Andurand, B. Essghaier, A. Boudabous, P. Nicot, 2008. Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24 (12), 2871-2877.
- Salzman R.A., I. Tikhonova, P.B. Bordelon, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology*, 117, 465-472.
- Samuel S., L.C. Papayiannis, M. Lerouch, T. Veloukas, M. Hahn, G.S. Karaoglanidis, 2011. Evaluation of the incidence of the G143A mutation and *cytb* intron presence in the *cytochrome bc-1* gene conferring QoI resistance in *Botrytis cinerea* populations from several hosts. *Pest Management Science*, 67, 1029-1036.
- Sanderson K.E., A.M. Srb, 1965. Heterokaryosis and parasexuality in the fungus *Ascochyta imperfecta*. *American Journal of Botany*, 52, 72-81.
- Santomauro A., G. Tauro, M. Sorrenti, M.A. De Guido, F. Faretra, 1997. Miglioramenti nella protezione dell'uva da tavola dalla muffa grigia (*Botryotinia fuckeliana*). *La Difesa delle Piante*, 20, 5-20.

- Santomauro A., G. Tauro, M. Sorrenti, M.A. De Guido, S. Pollastro, F. Faretra, 1998. Protezione antibotritica dell'uva da tavola. *L'Informatore Agrario*, 50, 41-44.
- Santomauro A., S. Pollastro, M.A. De Guido, R.M. De Miccolis Angelini, P. Natale, F. Faretra, 2000. A Long-term trial on the effectiveness of new fungicides against grey mould on grapevine and on their influence on the pathogen's population. *In: Abstract book of the XII International Botrytis Symposium*, Reims, Francia, P75.
- Santomauro A., C. Dongiovanni, M. Di Carolo, C. Rotolo, R.M. De Miccolis Angelini, M. Masiello, S. Pollastro, F. Faretra, 2013. Efficacy of IPM strategies against grey mould on table grape and their influence on fungicide resistance in *Botryotinia fuckeliana*. *In: Abstract book of Future IPM in Europe*, Riva del Garda, Italia, 298.
- Schena L., A. Ippolito, 2003. Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* in roots and soils by real time Scorpion-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 85 (1), 15-25.
- Seddon B., 2000. *Bacillus brevis* (*Brevibacillus brevis*) and biological control of *Botrytis cinerea*. *In: Abstract book of the XII International Botrytis Symposium*, Reims, Francia, L25.
- Seiichi F., M. Mai, A. Yoshinao, K. Hironori, T. Tsutomu, S. Masafumi, S. Shungji, 2011. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 21 (6), 705-720.
- Sengupta S., A.B. Banerjee, S.K. Bose, 1971.  $\gamma$ -Glutamyl and D- or L-peptide linkages in mycobacillin, a cyclic peptide antibiotic. *Biochemistry Journal*, 121, 839-846.
- Sergeeva V., N.G. Nair, J.R. Verdane, C. Shen, I. Barchia, R. Spooner-Hart, 2002. First report of anilinopyrimidine-resistant phenotypes in *Botrytis cinerea* on grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31 (3), 299-300.
- Shadle G.L., S.V. Wesley, K.L. Korth, F. Chen, C. Lamb, R.A. Dixon, 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of l-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry*, 64, 153-161.
- Sharma R.R., D. Singh, R. Singh, 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50, 205-221.
- Shu-Bin L., F. Mao, Z. Ren-Chao, H. Juan, L. Xiao, 2012. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* - induced blight of *Anthurium*. *Biological Control*. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.06.002.
- Slimene I.B., O. Tabbene, N. Djebali, P. Cosette, J.M. Schmitter, T. Jouenne, M.C. Urdaci, F. Limam, 2012. Putative use of a *Bacillus subtilis* L194 strain for biocontrol of *Phoma medicaginis* in *Medicago truncatula* seedlings. *Institut Pasteur Research in Microbiology*, 163, 388-397.
- Smilanick J.L., 1994. Strategies for the isolation and testing of biocontrol agents. *In: Biological Control of Postharvest Diseases. Theory and practice.* (C.L. Wilson, M.E. Wisniewski, editori), *CRC Press*, Boca Raton, Florida, USA, 25-41.
- Smith C.M., 1988. History of benzimidazole use and resistance, in *Fungicide Resistance in North America*, (Delp CJ, editore), *American Phytopathological Society*, St Paul, Minnesota, USA, 23-24.
- Stammler G., H.D.B. Brix, B. Nave, R. Gold, U. Schoefl, 2008. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. *In: Modern fungicides and antifungal compounds* (Dehne V.H.W., H.B. Deising, U. Gisi, K.H. Kuck, P.E. Russell, H. Lyr, editori), *Friedrichroda: DPG Spectrum Phytomedizin*, 45-51.

- Strobel G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5, 535-544.
- Suty A., R. Pontzen, K. Stenzel, 1999. Fenhexamid - Sensitivity of *Botrytis cinerea*: determination of baseline sensitivity and assessment of the risk of resistance. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 52 (2), 145-157.
- Tervet I.W., A.I. Rawson, E. Cherry, R.B. Saxson, 1951. A method for the collection of microscopic particles. *Phytopathology*, 41, 282-285.
- Tombolini R., D.J. Van der Gaag, B. Gerhardson, J.K. Jansson, 1999. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3674-3680.
- Topolovec-Pintaric S., 2009. Resistance risk to new botryticides in *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in winegrowing areas in Croatia. *Journal of Plant Disease and Protection*, 116 (2), 73-77.
- Touré Y., M. Ongena, P. Jacques, A. Gurio, P. Thonart, 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1151-1160.
- Trotel-Aziz P., M. Couderchet, S. Biagianti, A. Aziz, 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany*, 64, 21-32.
- Tsuge K., T. Akiyama, M. Shoda, 2001. Cloning sequencing, and characterization of the iturin A operon. *Journal of Bacteriology*, 183, 6265-6273.
- Urbasch I., 1983. Über entstehung und keimung der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers.. *Phytopathologische Zeitschrift*, 108, 54-60.
- Urbasch I., 1986. *In vivo*-untersuchungen zur entstehung und funktion der chlamydosporen von *Botrytis cinerea* Pers. am wirt-parasit-system *Fuchsia hybrida*-*B. cinerea*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 117, 276-282.
- Utkhede R.S., S. Mathur, 2006. Preventive and curative biological treatments for control of *Botrytis cinerea* stem canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, 51, 363-373.
- Van Loon L.C., P.A.H.M. Bakker, C.M.J. Pieterse, 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- Van Loon L.C., E.A. Van Strien, 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85-97.
- Van Wees S.C.M., C.M.J. Pieterse, A. Trijssenaar, Y.A.M. Van't Westende, F. Hartog, L.C. van Loon, 1997. Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 10, 716-724.
- Veloukas T., M. Leroch, M. Hahn, G.S. Karaoglanidis, 2011. Detection and Molecular Characterization of Boscalid-Resistant *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry. *Plant disease*, 95, (10), 1302-1307.
- Vercesi A., Bisiach M., 1982. Il marciume acido del grappolo. *Terra e Vita*, 23 (3), 47-49.
- Verhagen B.W.M., P. Trotel-Aziz, P. Jeandet, F. Baillieul, A. Aziz, 2011. Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production. *Phytopathology*, 101, 768-777.
- Wang Q.J., S.W. Chen, J.B. Zhang, M. Sun, Z.I. Liu, Z.I. Yu, 2007. Coproducing lipopeptides and poly-gamma-glutamic acid by solid-state fermentation of



- Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresource Technology*, 99, 3318-3323.
- Wattiau P., M.-E. Renard, P. Ledent, V. Debois, G. Blackman, S.N. Agathos, 2001. A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 816-819.
- Weber R.W.S., 2011. Resistance of *Botrytis cinerea* to Multiple Fungicides in Northern German Small-Fruit Production. *Plant disease*, 95 (10), 1263-1269.
- Weller D.M., 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 379.
- Yang D., B. Wang, J. Wang, Y. Chen, M. Zhou, 2009. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape. *Biological Control*, 51, 61-65.
- Yunis H., Y. Elad, 1993. Effect of microclimate and nutrients on development of cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). *Phytoparasitica*, 21, 257-268.
- Zaldua S., E. Sanfuentes, 2010. Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* Mini-Cuttings using *Clonostachys* and *Trichoderma* strains. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70 (4), 576-582.
- Zhang C.Q., S.K. Yuan, H.Y. Sun, Z.Q. Qi, M.G. Zhou, N. Zhu, 2007. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. *Plant Pathology*, 56, 646-653.

## RINGRAZIAMENTI

*Alla fine del mio percorso di studi voglio Ringraziare tutti coloro che hanno consentito il raggiungimento di questo traguardo.*

*Un Ringraziamento particolare va ai miei genitori e a tutti i parenti, per avermi dato la possibilità di iniziare questo percorso di studio e per la fiducia dimostratami.*

*Ringrazio il prof. Faretra e tutto il Suo gruppo di ricerca.*

*Ringrazio la Dott.ssa Stefania Pollastro per la sua disponibilità con tutti gli studenti.*

*Ringrazio la mia correlatrice, la Dott.ssa Rita Milvia De Miccolis Angelini, per i suggerimenti dati durante il lavoro di tesi e per la revisione di tutto l'elaborato.*

*Un Ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Caterina Rotolo, per la passione che ha saputo trasmettermi in tutto il lavoro di tesi attraverso i suoi insegnamenti e consigli, e per il prezioso aiuto fornitomi nella stesura di questo elaborato.*

*Ringrazio tutti gli amici che mi sono stati vicini nel corso di studi, per i momenti meravigliosi passati insieme; un grazie particolare alla Dott.ssa e Amica Maria Rita Sellitri, con cui ho condiviso diversi esami, per la sua piacevole compagnia.*