



PSR
2014 2020

LOMBARDIA
L'INNOVAZIONE
METTE RADICI



**Regione
Lombardia**

Programma di Sviluppo Rurale 2014 - 2020

Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

Intervento cofinanziato dal FEASR con l'operazione 16.2.01 "Progetti pilota e sviluppo di innovazione"

per un contributo totale pari a € 167.443,86

Iniziativa realizzata nell'ambito del progetto integrato di filiera «Progetto integrato della filiera di produzione, lavorazione e vendita dei prodotti orticoli ad alto contenuto di servizio» capofila AOPUNOLOMBARDIA Cofinanziato dal FEASR (Op.ne 16.10.1 -Misura 16 - Sottomisura 16.2.01 PSR REGIONE LOMBARDIA 2014-2020 – Autorità di Gestione: Regione Lombardia)

TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV)

SPERIMENTAZIONE DI PRATICHE PER IL CONTENIMENTO E RICERCA DI NUOVI PROTOCOLLI OPERATIVI A BASSO IMPATTO AMBIENTALE

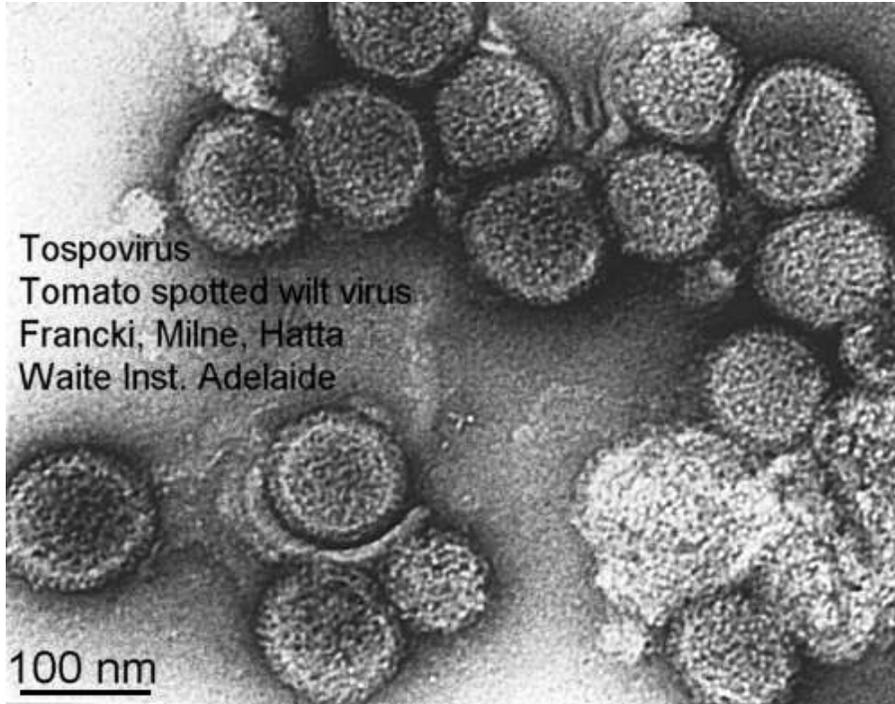
**MISURA 16 «COOPERAZIONE»
SOTTOMISURA 16.2.01 PROGETTI PILOTA E SVILUPPO DI INNOVAZIONE**

PROGETTO: PRO.VIR.VE

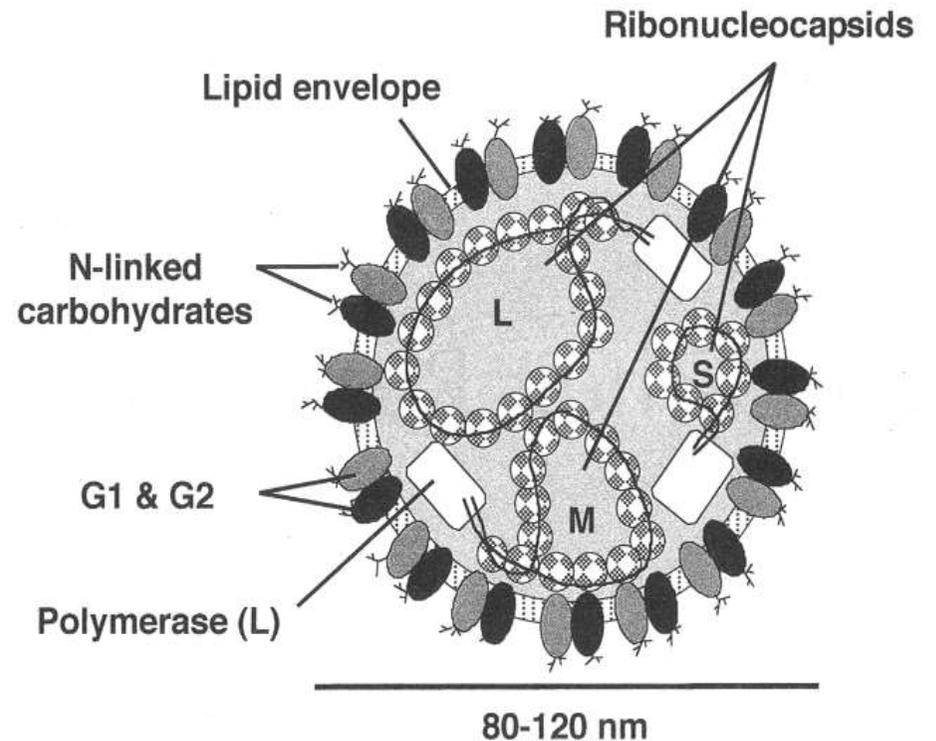
**PROTOCOLLI OPERATIVI DI LOTTA INTEGRATA E BIOLOGICA PER IL
CONTENIMENTO DI TOMATO SPOTTED WILT VIRUS (TSWV) E TRIPIDI
VETTORI SU INSALATE DELLA FILIERA DI IV GAMMA**

PARTERNARIATO del progetto
AOP Unolombardia Sacpa – Capofila
O.P. SOLE E RUGIADA
Università degli Studi di Milano (UNIMI)
Azienda Agricola Agripoli
Azienda Agricola Punto Verde
O.P. OASI
O.P. ISOLA VERDE
O.P. ORTONATURA

STRUTTURA DELLE PARTICELLE VIRALI DI TSWV



Particelle sferiche Ø 80-90 nm
Rivestite membrana lipoproteica



PIANTE OSPITI

Table 1. Some common plant species (not including weeds) that are infected by TSWV.

Common name	Scientific Name	Common name	Scientific Name
Agronomic and Vegetable Crops		Ornamentals (continued)	
Tobacco	<i>Nicotiana tobacum</i>	Nasturtium	<i>Tropaeolum majus</i> and others
Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Impatiens	<i>Impatiens</i> spp
Pepper	<i>Capsicum annum</i>	Petunia	<i>Petunia</i> spp.
Potato	<i>Solanum tuberosum</i>	Zebra plant	<i>Aphelandra squarrosa</i>
Eggplant	<i>Solanum melongena</i> var <i>esculentum</i>	Gloxinia	<i>Sinningia speciosa</i>
Lettuce	<i>Lactuca sativa</i> (many varieties)	Statice	<i>Limonium latifolium</i>
Endive	<i>Cichorium endivia</i>	Verbena	<i>Verbena litoralis</i>
Celery	<i>Apium graveolens</i>	Strawflower	<i>Gomphrena globosa</i>
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	African violet	<i>Saintpaulia ionantha</i>
Spinach	<i>Spinacia oleracea</i>	Ageratum	<i>Ageratum</i> spp.
Bean	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amaranthus	<i>Amaranthus</i> spp.
English pea	<i>Pisum sativum</i>	Anemone	<i>Anemone</i> spp.
Southern pea	<i>Vigna sinensis</i>	Begonia	<i>Begonia</i> spp.
Soybean	<i>Glycine max</i>	Calceolaria	<i>Calceolaria</i> spp.
Watermelon	<i>Citrullus vulgaris</i>	Calenclula	<i>Calendula officinalis</i>
Cucumber	<i>Cucumis sativus</i>	Exacum	<i>Exacum</i> spp.
Cauliflower	<i>Brassica oleracea</i> var <i>botrytis</i>	Geranium	<i>Geranium</i> spp.
Broccoli	<i>Brassica oleracea</i> var <i>botrytis</i>	Snapdragon	<i>Antirrhinum</i> spp.
Fruit crops		Dusty miller	<i>Senecio cineraria</i>
Papaya	<i>Carica papaya</i>	Madagascar-jasmine	<i>Stephanotis floribunda</i>
Pineapple	<i>Ananas sativus</i>	Ranunculus	<i>Ranunculus</i> spp.
Ornamentals		Cyclamen	<i>Cyclamen</i> spp.
Amaryllis	<i>Amaryllis</i> spp.	Cineraria	<i>Hydrangea</i> spp.
Gladiolus	<i>Gladiolus</i> spp.	Gypsophila	<i>Gypsophila</i>
Calla lilly	<i>Zantedeschia</i> spp.	Gerbera daisy	<i>Gerbera jamesonii</i>
Lillies (various)		Peony	<i>Peony</i> spp.
Dahlia	<i>Dahlia</i> spp.	Sage	<i>Salvia</i> spp.
Marigold	<i>Tagetes</i> spp.	Forget-me-not	<i>Myosotis scorpiodes</i>
Chrysanthemum	<i>Chrysanthemum</i> spp.	Morning glory	<i>Ipomea</i> spp.
Aster	<i>Aster</i> spp.	Coleus	<i>Coleus</i> spp.
Zinnia	<i>Zinnia</i> spp.	Larkspur	<i>Delphinium</i>
Coreopsis	<i>Coreopsis</i> spp	Lupine	<i>Lupinus</i> spp.
		Evening Primrose	<i>Oenothera</i> spp.

molto ampia circa 1000 specie appartenenti a 80 famiglie

SINTOMI SU PIANTE OSPITI



bronzatura

avvizzimento

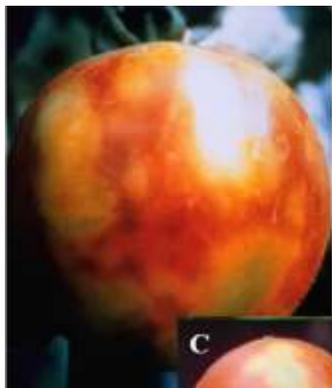


Figure 5. Early leaf wilting in tomato.



Figure 6. Severe leaf wilting in tomato.

Anelli clorotici



C

VETTORI DI TSWV



Frankliniella schultzei

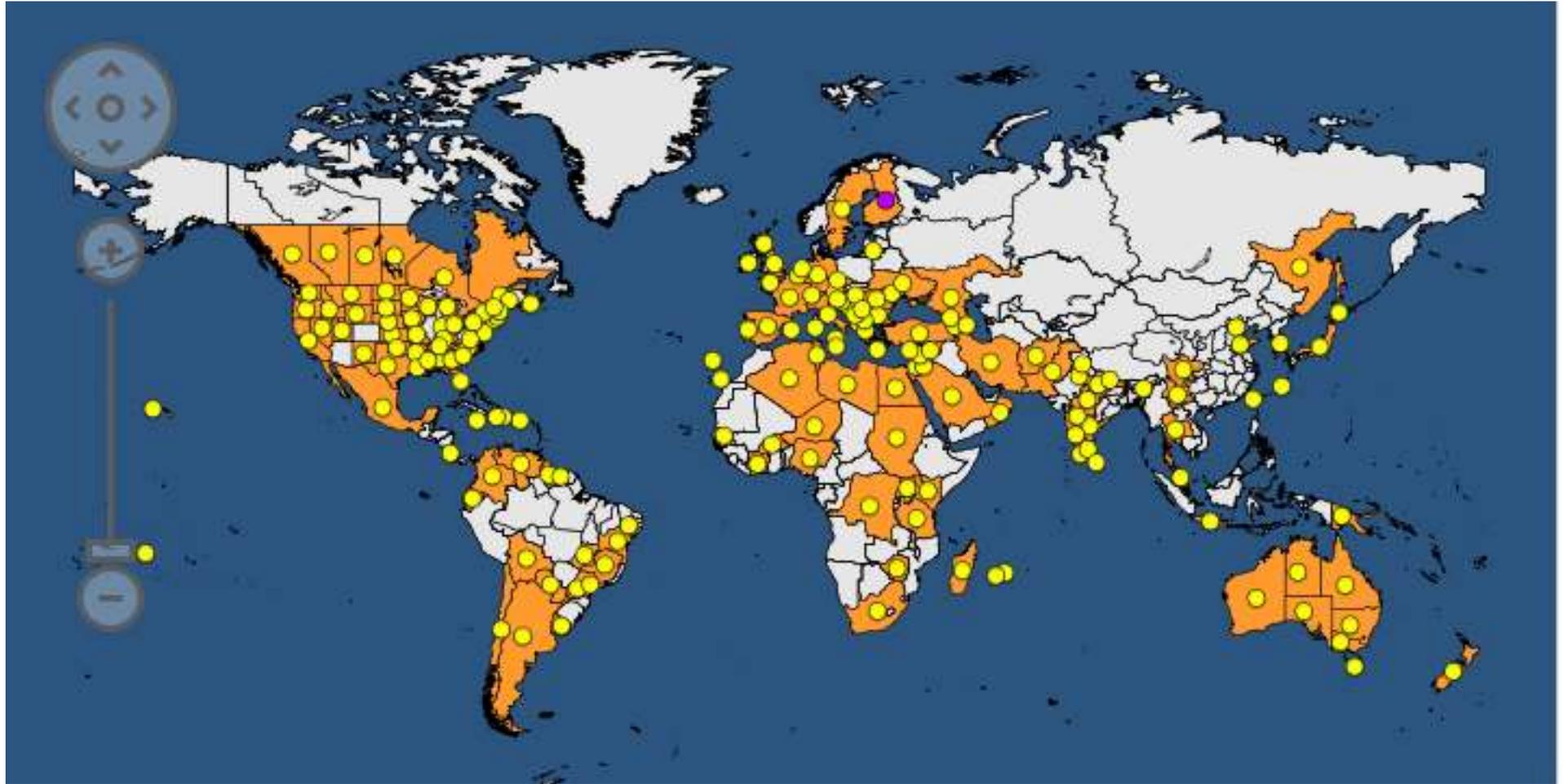


Thrips palmi

Tripidi
Adulti 0,5-5 mm
4 ali filiformi

*Vettori sono 0,2% delle
specie di tripidi (circa
7700 le specie descritte)*

DIFFUSIONE DEL VIRUS NEL MONDO



IN LOMBARDIA



Prime segnalazioni di TSWV
in provincia di Brescia a
partire da ottobre 2015 su
cicoria Pan di Zucchero e
Radicchio



(Foto Bonomelli 2015)



Campo di Pan di zucchero con piante sintomatiche (Bonomelli 2015)

INDAGINI SULLA DIFFUSIONE DEL PATOGENO E INDIVIDUZIONE DI NUOVI PROTOCOLLI

STRATEGIE PREVENTIVE PER DIFFUSIONE

1) Piantine certificate / virus free

STRATEGIE IN AZIONE

2) Controllo delle Piante spontanee ospiti del virus e del vettore
(Fonti di inoculo primaria e Fonte di inoculo secondaria)

3) Eliminazione delle piante sintomatiche – pratica non testata in
quanto il virus non si è mai presentato

4) Monitoraggio e Controllo dei vettori

1) Piantine certificate/ virus free

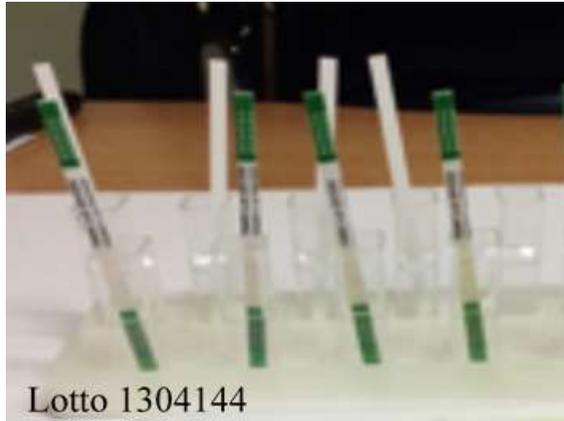
Due le metodologie utilizzate nel controllo:

- Protocollo testato nel PRIMO ANNO DI RICERCA

Prelievo di circa 10 piantine per ciascun lotto, conservate a basse temperature e trasportate in laboratorio fino al momento dell'analisi. La presenza di TSWV è stata ricercata seguendo il protocollo «**Norme OEPP/ EPPO Standards PM 7/34**».

- Protocollo testato nel SECONDO ANNO DI RICERCA

Effettuare i controlli direttamente in azienda sulle piantine provenienti da vivaio e mediante un test «*lateral flow*» kit di semplice utilizzo e che da **risultati in 10 minuti senza richiedere materiali aggiuntivi o macchinari particolari**



test lateral flow eseguito presso le Aziende



a sinistra il controllo negativo in cui è evidente un'unica banda che indica l'esatta esecuzione del test a destra il controllo positivo dove sono evidenti due bande sono evidenti le due strisce.

L'interpretazione del risultato è di facile intuizione anche per chi non ha esperienza nel campo della diagnosi. Infatti la comparsa di una sola "riga" comporta l'esecuzione esatta del test con risultato negativo.

Nessuna delle piantine analizzate nei due anni è risultata infetta da TSWV.

PROTOCOLLO PROPOSTO

Effettuare il semplice controllo con kit «lateral flow» all'arrivo delle piantine da vivaio su un campione significativo ripetendolo più volte e **solamente** in caso di incertezza rivolgersi ai laboratori per l'esecuzione di test secondo protocolli standardizzati PM 7/34.

Il test può essere utilizzato anche per il controllo sulla flora spontanea in campo.

Il controllo preventivo ha un costo minimo (€ 5,00) che paragonato con l'effettivo beneficio di evitare il trapianto di piantine malate rende efficace la pratica.



2) Controllo delle Piante spontanee ospiti del virus e del vettore (Fonti di inoculo primaria e Fonte di inoculo secondaria)

Piano sperimentale attuato in affiancamento ai cicli colturali aziendali

- Semina delle flower strip:
 - a) Tetragonia espansa per contenere la pressione di tripidi lungo i bordi dei campi
 - b) Essenze che fioriscono in modo scalare in modo da attrarre i tripidi vettori e utili all'alimentazione di specie predatorie dei tripidi
 - c) Miscugli di monocotiledoni che non ospitano TSWV

- Monitoraggio con lateral flow e rilievo delle piante spontanee ospiti del virus con campionamenti per il controllo della presenza di TSWV con saggi sierologici (E.L.I.S.A.) e molecolari (RT-PCR)

SEMINA DELLE FLOWER STRIPS



Schema di semina delle fasce nei due campi di prova Agripoli azienda biologica Punto verde azienda produzione integrata.



Tetragonia expansa pianta non ospite di TSWV

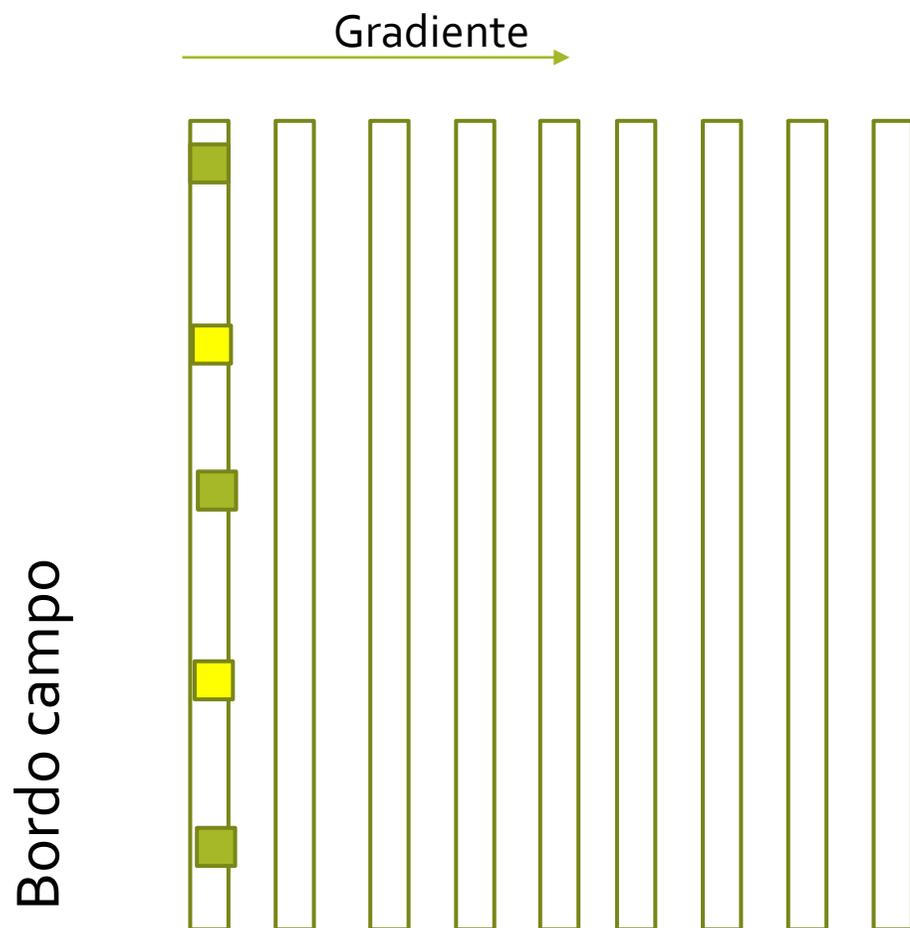
Attività: Monitoraggio della presenza di TSWV

- 1) in piante spontanee durante il ciclo vegetativo della coltura ed eliminazione di quelle infette
- 2) utilizzo di piante non host di (monocotiledoni, *Tetragonia expansa*)
- 3) eliminazione delle piante infette costituenti la coltura che possono costituire fonti secondarie per la diffusione di TSWV

OBIETTIVO

Seguire i dettami di un'agricoltura moderna ovvero la conservazione della flora spontanea per lo sviluppo dei parassiti e parassitoidi naturali.

Monitoraggio presenza di TSWV - campionamento



Dal trapianto una volta alla settimana

Campionamento delle insalate e piante spontanee

Ogni settimana:
3-5 piante per blocco 20 blocchi /103
per Appezamento BIO

3-5 piante per blocco 16/52 per
Appezamento Integrato

RISULTATI

INSALATE ANNI 2018-2019

Nei due anni della ricerca sono state campionate sia insalate (piante di radicchio/cicoria) che specie spontanee presenti all'interno del blocco (in particolare *Galinsoga parviflora*). I campioni sono stati poi portati in laboratorio messi all'interno di buste utili all'estrazione e conservate a -80°C. Sono stati quindi analizzati mediante RT-PCR e test E.L.I.S.A. circa 900 campioni, di cui 300 provenienti dal campo dell'azienda Punto Verde e 600 provenienti da campo dell'azienda Agripoli SS.

I monitoraggi per il rilievo delle piante sintomatiche sono stati effettuati con la collaborazione del personale delle Aziende e sono stati svolti fino alla raccolta (vedi FOTO pagine seguenti).

La metà dei campioni raccolti è stata analizzata utilizzando saggi sierologici (test E.L.I.S.A.) e l'altra metà mediante saggi molecolari. I saggi molecolari sono stati effettuati su pool costituiti da 2/3 campioni (riducendo a 2 i campioni per ciascun blocco) analizzando così circa 200 campioni. Nessuno dei campioni analizzati ha reagito con gli anticorpi utilizzati e nessuno campione è stato amplificato con la coppia di primer specifica utilizzata.

Nel 2019 non sono state osservate piante sintomatiche riferibili alla presenza di TSWV.

In tali monitoraggi sono stati raccolti all'interno dei blocchi creati (vedi schemi successivi) 3 campioni per un totale di 588 campioni per il campo dell'azienda Agripoli SS e 432 per il campo dell'azienda Punto Verde.

Le analisi sono state effettuate attraverso saggi molecolari, costituendo pool di 3 campioni e analizzando quindi circa 200 campioni per la prima azienda e 140 per la seconda.

Nell'anno 2019 nessuno dei campioni analizzati è risultato infetto da TSWV.



RISULTATI

PIANTE SPONTANEE – ANNO 2018

specie	Numero di piante analizzate	Azienda Agripoli SS	Azienda Punto verde	Numero di piante infette
Capsella bursa pastoris	10	5	5	0
Galinsoga parviflora	156	86	70	0
Papaver rhoeas	39	26	13	0
Ranunculus repens	14	11	3	0
Chenopodium quinoa	9	7	2	0
Carduus spp.	15	1	13	0

RISULTATI

PIANTE SPONTANEE – ANNO 2019

specie	campo	N. campioni	esito
ranuncolo	biologico	16	negativo
trifoglio	biologico	6	negativo
tarassaco	biologico	6	negativo
camomilla	biologico	15	negativo
erba medica	biologico	3	negativo
papavero	biologico	13	negativo
geranio selvatico	biologico	1	negativo
cicoria	biologico	3	negativo
papavero	integrato	14	negativo
ranuncolo	integrato	3	negativo
trifoglio	integrato	4	negativo
tarassaco	integrato	14	negativo
camomilla	integrato	5	negativo
erba medica	integrato	13	negativo
geranio selvatico	integrato	1	negativo
galinsoga	integrato	13	negativo
galinsoga	integrato	4	negativo
zucca	integrato	12	negativo
tarassaco	integrato	1	negativo

Sono stati utilizzati in questo caso i test *lateral flow* in modo da avere nell'immediato il dato e poter eliminare le potenziali fonti di inoculo.

Tale analisi può essere un metodo per valutare anche gli interventi da farsi per effettuare diserbi selettivi eliminando gli ospiti di TSWV.

3) Eradicazione delle piante sintomatiche con distruzione per evitare diffusione del virus

Tale attività non ha riscontri sperimentali perché nei due anni della ricerca la presenza del virus non si è presentata

PROTOCOLLO PROPOSTO

Effettuare un controllo con kit «lateral flow» settimanalmente sia all'interno del campo che nelle fasce è una pratica che se mantenuta permette di rilevare in tempi rapidi le piante sintomatiche e di sottoporle a test rapidi

Il controllo preventivo oltre al costo dei kit di prova prevede l'utilizzo di personale addetto e dunque la pratica necessita l'impiego di risorse aziendali, soprattutto personale impiegato nelle azioni



4) Monitoraggio e controllo dei tripidi vettori: utilizzo di strategie a basso impatto

➤ MONITORAGGIO DEI TRIPIDI

- Rilevamento dei tripidi mediante scuotimento
- Impiego di trappole cromotropiche ai bordi del campo dove sono presenti le piante spontanee
- A partire dal trapianto delle insalate il rilevamento avviene con impiego di trappole all'interno del campo

➤ CONTROLLO DEI TRIPIDI

- Strategia PUSH AND PULL ovvero utilizzo di sostanze repellenti derivate da prodotti naturali in grado di allontanare i tripidi dalle coltivazioni o di essenze attrattive in grado di concentrare la presenza dei tripidi vettori al di fuori delle coltivazioni
- Rilascio di PREDATORI

MONITORAGGIO DEI TRIPIDI

ANNO 2018

Per l'azienda Agricola Punto Verde (produzione integrata) la sperimentazione ha riguardato una superficie di circa 2, 2 ha coltivata a Radicchio durante il I° ciclo e Pan di Zucchero il II° Ciclo.

Per quanto riguarda invece l'azienda Agripoli S.S società Agricola (produzione biologica) la superficie interessata alla sperimentazione era di circa 5ha di cui 2,5 a radicchio e 2,5 a Pan di Zucchero sia per quanto riguarda il I° e il II° ciclo.

I campi sottoposti a sperimentazione sono stati suddivisi in blocchi come descritto successivamente. In particolare il campo a conduzione integrata è stato suddiviso in 52 blocchi mentre il campo a conduzione biologica in 103 blocchi (Figure nelle pagine seguenti)

Anno 2019

I campi dedicati alla sperimentazione sono i medesimi dell'anno 2018.

I due campi sono stati suddivisi in blocchi delle medesime dimensioni monitorandone un numero inferiore.

In particolare il campo dell'azienda Agripoli S.S. è stato suddiviso in 18 file di cui la sperimentazione ne ha interessate 5, per un totale di 37 blocchi. In tale campo ulteriori blocchi sono stati individuati nelle fasce fiorite istituite ai lati del campo (5+4) e nella fascia destinata alla presenza di monocotiledoni (5).

Presso il campo dell'azienda Punto Verde sono state individuate 8 file di cui monitorate 3 per un totale di 27 blocchi. Anche in questo caso sono presenti blocchi nelle fasce fiorite (6+6) e nell'area con le monocotiledoni (3).

Pianificazione posizionamento trappole cromotropiche e disposizione dei blocchi in **campo a conduzione integrata** – anno 2018

POSIZIONAMENTO Anno 2018

lotto AR (produt. INTEGRATA)		BLOCCHI																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
SETTORI	1																										
	2					1		2						5		4						5					
	3																										
	4	6		7						8		9							10								
	5																										
	6					11		12							15						14				15		
	7																										
	8												17														



Schema disposizione blocchi e posizionamento trappole cromotropiche campo a conduzione integrata (Punto Verde)

Risultati ottenuti dall'osservazione delle trappole cromotropiche in campo a conduzione integrata – anno 2018

RISULTATI II CICLO Anno 2018

lotto AR
(prodaz.
INTEGRAT
A)

BLOCCHI

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
SETTORI	1																										
	2	08-14/9	263		124		177		70		192		146		232												
		17-23/9	210		115		222		200		295		201		214												
		2 - 8/10	170		116		142		64		56		81		157		73		62		87		84		45		
	3																										
	4	08-14/9	186		248		174		195		91		315		100		28		41								
		17-23/9	119		116		120		208		194		152		114		209		115								
		2 - 8/10	56		118		84		59		65		143		62		120		62		86		35				
	5																										
6	08-14/9	159		165		95		167		171		88		102		228		155		153		/		/			
	17-23/9	205		195		303		283		190		198		280		283		275		90							
	2 - 8/10	87		114		148		89		56		/		135		73		84		73		101					
7																											
8	08-14/9	90		154		157		111		164		162		81		148		164		86							
	17-23/9	197		166		104		112		187		102		196		66		108		78		/		/		/	
	2 - 8/10	45		98		140		129		56		147		42		48		42		59		36		73		5	

Dati monitoraggi II° ciclo 2018 Punto Verde

Pianificazione posizionamento trappole cromotropiche e disposizione dei blocchi in **campo a conduzione biologica** – anno 2018

POSIZIONAMENTO Anno 2018



lotto VT (prodiz. BIOLOGICA)		BLOCCHI																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1																														
2		1		2		3		4		5		6		7		8														
3																														
4																														
5																														
6																														
7																														
8																														
9																														
10																														
11																														
12																														
13																														
14																														
15																														
16																														
17																														
18																														

Schema dei blocchi e posizionamento delle trappole nel campo biologico (Agripoli SS)

Risultati ottenuti dall'osservazione delle trappole cromotropiche in campo a conduzione biologica – anno 2018

RISULTATI II CICLO Anno 2018

lotto VT specie: BIOLOGICHE		BLOCCHI																												
SETTORI		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1																														
2	17-23/19	171		174		171		/		186		169		126																
	2-8/10	36		45		45		65		28		42		51																
3																														
4	17-23/19	109		181		104		173		160		182		171		102														
	2-8/10	131		40		81		56		87		59		92		31														
5																														
6	17-23/19	177		96		172		171		197		171		129		109		90		92		155		151		88				
	2-8/10	73		36		134		31		112		62		112		56		53		64		39		67		36				
7																														
8	17-23/19	90		171		96		160		184		182		82		157		79		330		101				11				
	2-8/10	14		73		53		90		34		81		48		/		109		78		42		39		37				
9																														
10	17-23/19	140		62		162		73		270		106		196		151		218		140		246		128						
	2-8/10	20		25		9		28		14		25		14		42		28		17		14		29						
11																														
12	17-23/19	178		73		146		67		73		112		129		95		45		45		78		62		56				
	2-8/10	42		77		92		43		59		168		56		263		7		129		20		25		39				
13																														
14	17-23/19	95		101		73		185		73		212		67		117		95		173		118		75		168				
	2-8/10	36		/		49		28		50		59		39		28		39		62		14		25		25				
15																														
16	17-23/19	73		174		129		218		162		127		78		151		72		266		80		140		123		39		77
	2-8/10	11		39		28		39		20		42		39		22		17		56		17		39		42		50		23
17																														
18	17-23/19	39		95		196		118		151		67		134		101		89		112		280		101		/		78		62
	2-8/10	42		6		20		59		11		36		19		34		14		50		20		34		28		17		11

Dati monitoraggio II° ciclo del 2018 Agripoli SS

Pianificazione posizionamento trappole cromotropiche e disposizione dei blocchi in **campo a conduzione integrata** – anno 2019

Nel 2019 i due appezzamenti sono stati suddivisi ancora in blocchi ma si sono considerati anche dei trattamenti effettuati con nematodi e acari predatori. In figura sono indicati i trattamenti effettuati, e le file sulle quali sono stati fatti i trattamenti.

		BLOCCHI								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		fascia fiorita				tetragonia (non cresciuta)				
	fascia fiorita	G	B	G	B	G	B	G	B	G
	non trattato / trichoderma	A	B	G	B	G	B	G	B	G
	non trattato / trichoderma	B								
	non trattato / trichoderma	C								
	trichoderma	D								
SETTORI	trichoderma	E	G	B	G	B	G	B	G	B
	trichoderma	F								
	nematodi	G								
	nematodi	H	B	G	B	G	B	G	B	G
	nematodi	I								
	fascia fiorita	G	B	G	B	G	B	G	B	G
		fascia fiorita				monocotiledoni				

Schema disposizione blocchi e posizionamento trappole cromotropiche e trattamenti effettuati dall'azienda - campo a conduzione integrata (Punto Verde)

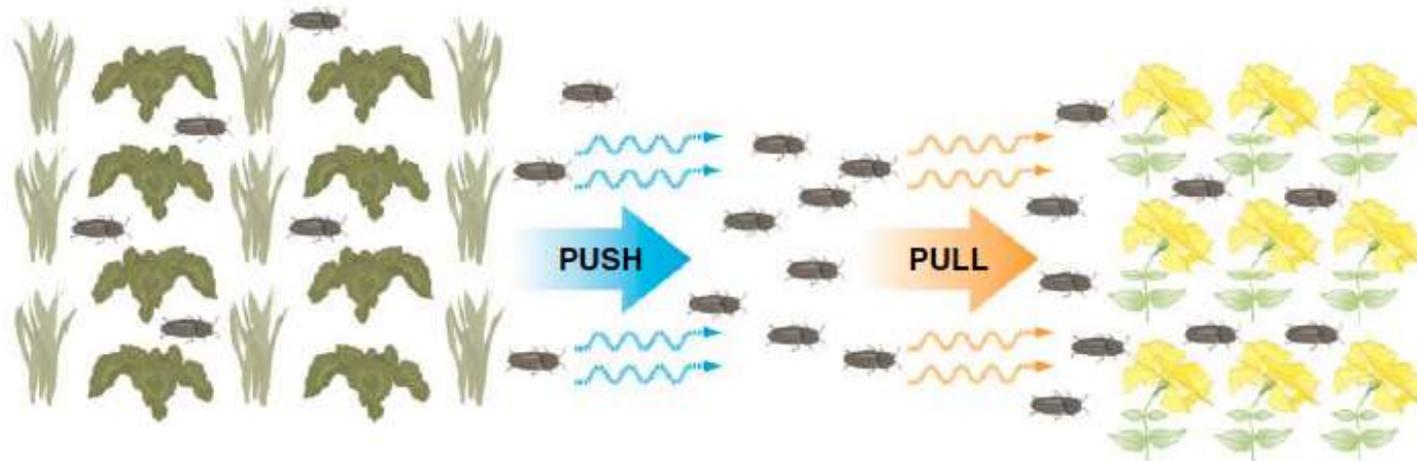
Pianificazione posizionamento trappole cromotropiche e disposizione dei blocchi in **campo a conduzione biologica** – anno 2019

		BLOCCHI																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	fascia fiorita	B G B G B																											
	non trattato	A G B G B																											
	non trattato	B																											
		C																											
		D																											
		E																											
		F																											
		G																											
		H																											
	non trattato	I																											
	non trattato	L G B G B G B G B																											
	non trattato	M																											
	nematodi	N																											
	nematodi	O B G B G B G B G																											
	nematodi	P																											
	trichoderma	Q																											
	trichoderma	R G B G B G B G B																											
	trichoderma	S																											
	non trattato	T B G B G B G B G B G																											
	fascia fiorita	G B G B G B G B G														G B G B G B G													
		fascia fiorita														monocotiledoni													

Schema della divisione in blocchi e trattamenti effettuati –campo a coltivazione biologica (Agripoli SS)

CONTROLLO DEI TRIPIDI

Strategia Push and Pull



Utilizzo di:

Piante attrattive: strisce fiorite
Predatori
Trappole cromotropiche

Trattamenti campo

Riportiamo come esempio alcuni trattamenti

01/04/2019

Sup. 0,75 ha produzione integrata – Capirel (*Steinernema feltiae* – Koppert) – Dosaggio 500 milioni/ha

Sup. 0,75 ha produzione biologica – Capirel (*Steinernema feltiae* – Koppert) – Dosaggio 750 milioni/ha

04/05/2019

Sup. 0,75 ha produzione integrata – Capirel (*Steinernema feltiae* – Koppert) – Dosaggio 500 milioni/ha

Sup. 0,75 ha produzione biologica – Capirel (*Steinernema feltiae* – Koppert) – Dosaggio 750 milioni/ha

31/05/2019

Sup. 0,75 ha produzione integrata – Capirel (*Steinernema feltiae* – Koppert) – Dosaggio 500 milioni/ha

Sup. 0,75 ha produzione biologica – Capirel (*Steinernema feltiae* – Koppert) – Dosaggio 750 milioni/ha

ENTONEM

Steinernema feltiae



Nematodi entomopatogeni

Gestione e trattamento fasce e rilascio predatori

Riportiamo come esempi

Semina fasce fiorite secondo ciclo 2018

Sfalcio zone fiorite ed inerbite: 15/04/2019 e 11/06/2019

Trattamenti:

I trattamenti con *Amblyseius swirskii*, sono stati effettuati a partire dalla settimana 20 (fine giugno) e ripetuti mensilmente (settimane nn. 30, 35 e 39).



Orius laevigatus (Thripor-L) fine di giugno 2 individui/m², Il lancio successivo è stato effettuato a il 25 luglio



Nel 2018 è stato fatto un trattamento a inizio ottobre con il parassita *Neoseiulus cucumeris* (nome commerciale Thripex). L'acaro è stato distribuito all'interno di tre blocchi sia nel campo di appartenenza a Punto Verde sia che in quello di competenza di Agripoli SS (vedi foto successiva). In particolare sono stati utilizzati 250 unità/m².

Il trattamento è stato effettuato in modo tale da contenere la schiusa di eventuali uova e controllare i tripidi al primo stadio larvale ed avere un effetto positivo l'anno successivo.

Una settimana dopo il trattamento la ricerca di *Neoseiulus cucumeri* in campo, nei blocchi trattati sui cespi di insalate sfogliandoti (sono state estirpati 5/6 cespi per blocco trattato), non ha permesso di identificare individui attivi (è stata utilizzata una lente).



THRIPEX

Nicotiana glauca

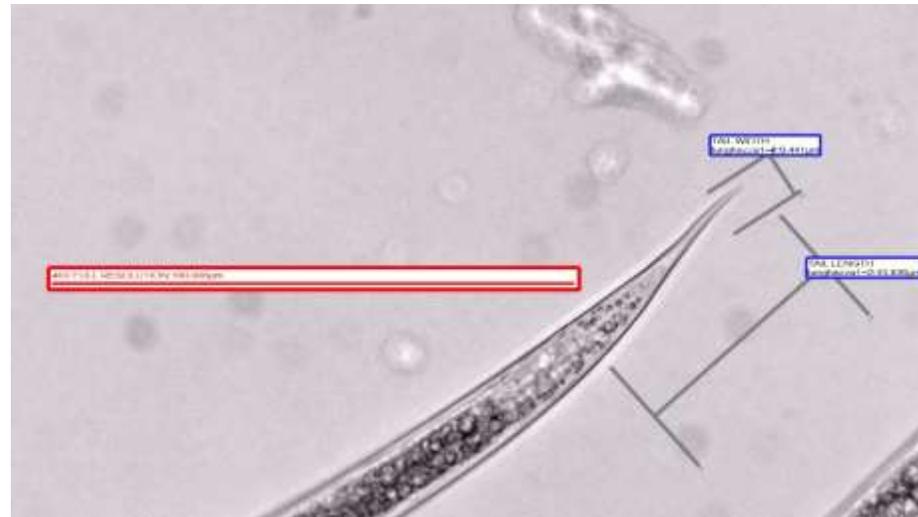
(Formerly known as *Amblyseius cucumeris*)



Le analisi effettuate per identificare i nematodi hanno determinato che, a un mese dal trattamento, in 3 campioni prelevati nel campo biologico, il numero di nematodi presenti era pari rispettivamente a 932, 997 e 2398 ogni 200 cc di terreno analizzato e gli individui di *S. feltiae* erano pari a 145, 150 e 312, rappresentando mediamente il 14,5% degli individui presenti nel suolo. Nel campo in cui viene effettuata la lotta integrata il numero di nematodi individuato era rispettivamente di 931, 412 e 426 ogni 200 cc di terreno analizzato e gli individui di *S. feltiae* erano 83, 31 e 64, rappresentando mediamente il 10,5% degli individui. I risultati ottenuti indicano che *S. feltiae* persiste nel terreno e quindi può essere attiva nei confronti delle pupe di tripidi presenti nel terreno.



S. feltiae
ingrandimento 5X



S. feltiae
ingrandimento
40X

Durante il secondo ciclo nelle stesse fasce sono stati poi effettuati i trattamenti con *Neoseiulus cucumeris* (Thripex) con un solo lancio sulla coltura quando questa aveva sviluppato almeno 5-6 foglie. I trattamenti sono stati effettuati durante l'ultima settimana di agosto con dosaggio di 750.000 acari/ha per appezzamento convenzionale e 1.000.000 acari/ha per appezzamento biologico. La distribuzione è stata effettuata in collaborazione con i tecnici aziendali. Per quanto riguarda l'operazione effettuata si evidenzia la difficoltà di distribuire tale parassita di tripidi in pieno campo registrando difficoltà di distribuzione omogenea. Va sottolineato che l'operazione manuale su una superficie di terreno di 0,75 ha ha richiesto circa un'ora rendendo impossibile l'applicazione in pieno campo su tutto l'appezzamento.

L'utilizzo di droni, in un futuro, potranno rendere tale pratica più efficace.

Le fasce fiorite, una volta presenti i fiori, sono state trattate distribuendo il predatore *Orius laevigatus* (Thripor-L) con lanci, a distanza di una settimana l'uno dall'altro, a partire dalla fine di giugno il dosaggio totale è stato di 2 individui/m² (considerare come superficie le strisce fiorite o poco più). Il lancio successivo è stato effettuato a il 25 luglio utilizzando le medesime dosi. Purtroppo in questo caso i fiori presenti risultavano solo quelli di *Trifolium pratense*, l'eccessivo caldo e la mancanza di pioggia hanno determinato il disseccamento dei fiori presenti a giugno. Inoltre il caldo eccessivo ha diminuito anche la vitalità dei predatori.

Nelle medesime fasce fiorite è stato effettuato un ulteriore trattamento con il prodotto *Amblyseius swirskii*, acaro predatore.



È stata scelta tale forma in quanto i sacchetti sono realizzati in pellicola compostabile possono essere pertanto smaltiti insieme ai residui di coltivazione. Tale formato facilita la distribuzione del prodotto rispetto a *Neoseiulus cucumeris*.

Sacchetto con contiene 250 acari predatori *A. swirski* miscelati con materiale di supporto (crusca).

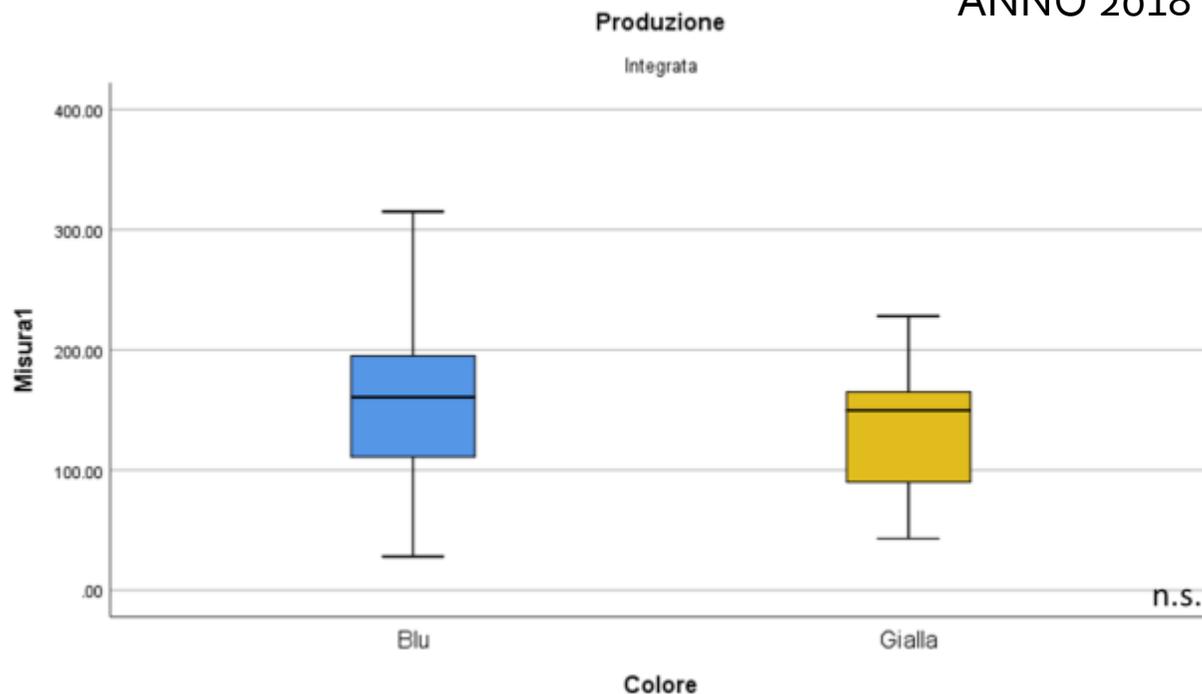
STIMA DELLA INCIDENZA DEI TRIPIDI



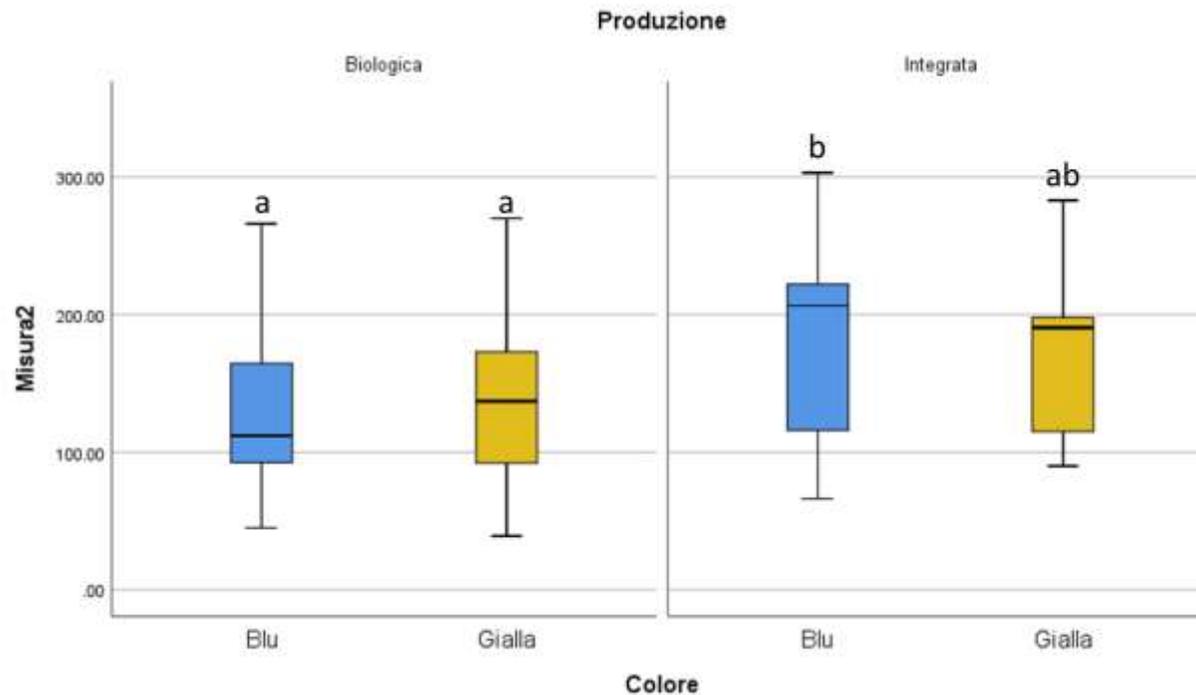
STIMA DELLA INCIDENZA DEI TRIPIDI

Valutazione della presenza di tripidi in CAMPO

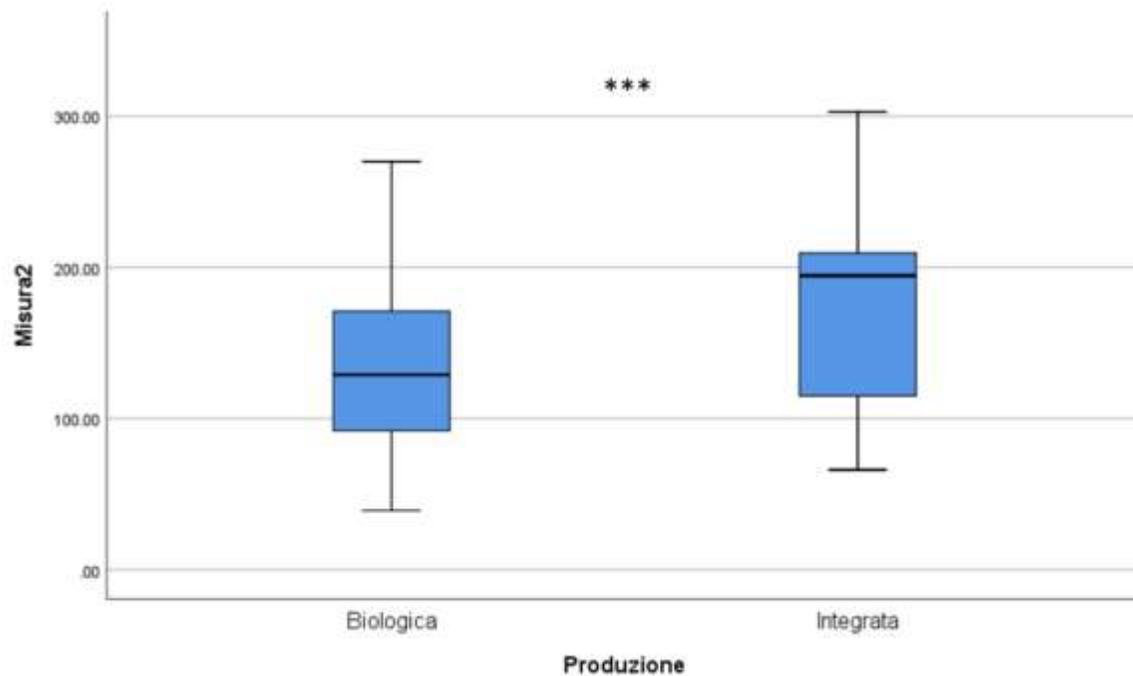
ANNO 2018



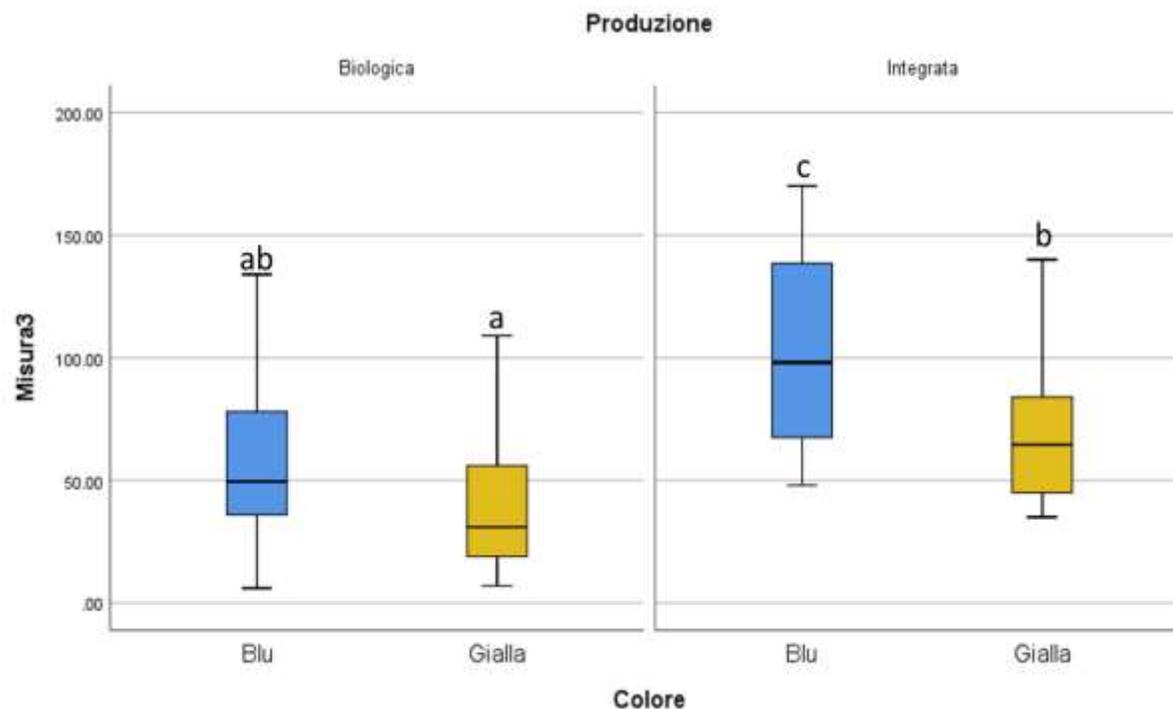
Nella prima valutazione dei tripidi, effettuata nella settimana del 8-14 settembre, non si sono evidenziate differenze fra le trappole gialle e blu nella cattura dei tripidi. Non è stato possibile valutare se fosse diversa la presenza di tripidi fra la conduzione integrata o biologica, in quanto non si è potuta quantificare la presenza di tripidi nella conduzione biologica.



Nella seconda valutazione della presenza dei tripidi, avvenuta nella settimana del 17-23 settembre, non si evidenziano differenze significative fra le trappole gialle e blu, che hanno catturato quantità paragonabili di individui. Già da questa analisi si può stabilire che la presenza di tripidi sia minore nella parcella a conduzione biologica ma, dato che non ci sono differenze fra i due tipi di trappola, si è proceduto a comparare la quantità totale di tripidi catturati fra i due metodi di conduzione.



Il grafico evidenzia il fatto che nella parcella a conduzione biologica la quantità di tripidi catturata è significativamente minore (Student's t-test, $P = 0.000$).

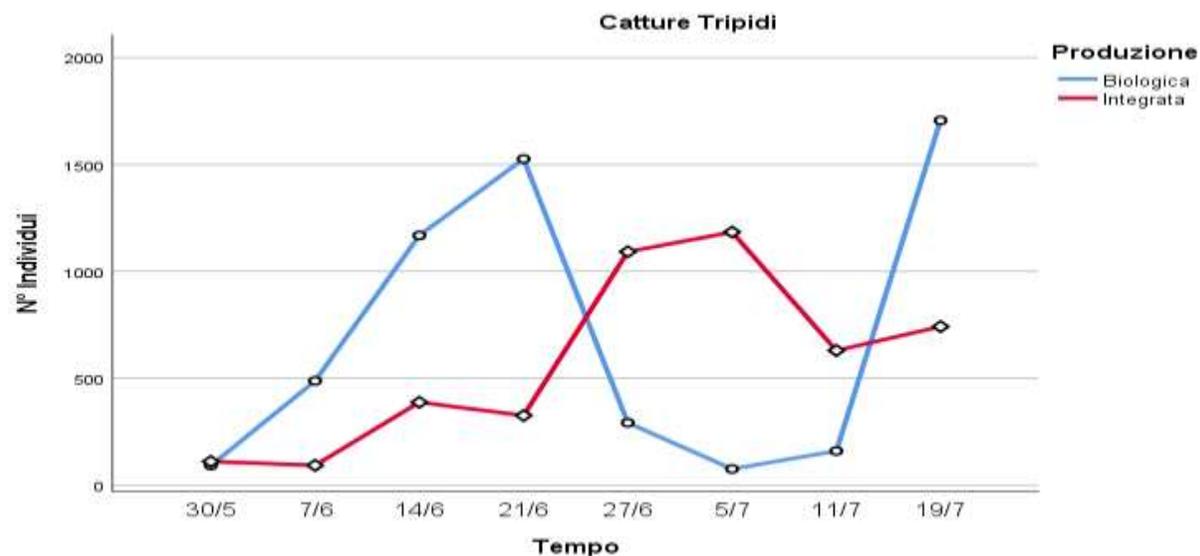


Nella terza valutazione della quantità di tripidi, avvenuta nella settimana del 2-10 ottobre, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa nella quantità di tripidi catturati fra le trappole gialle e blu, in particolare nella parcella a conduzione integrale.

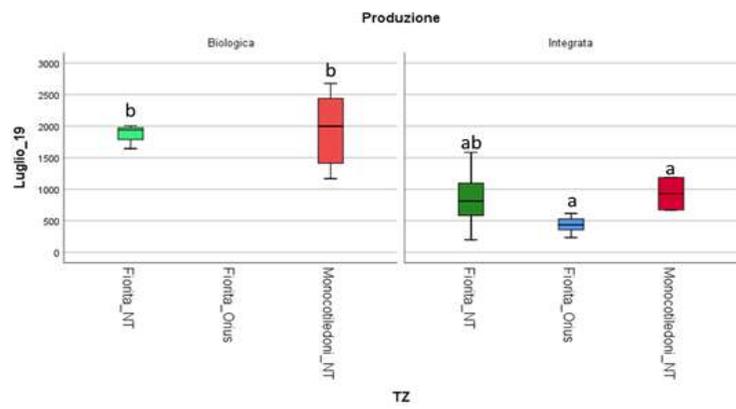
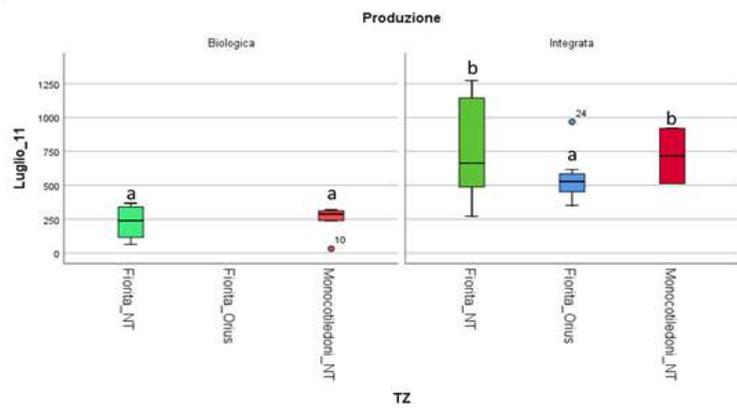
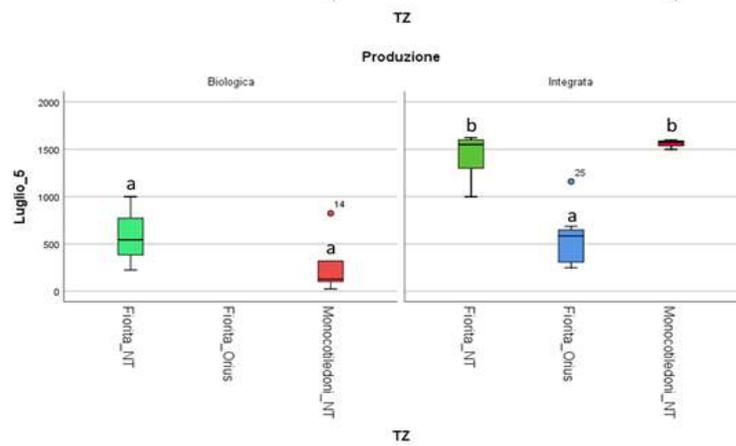
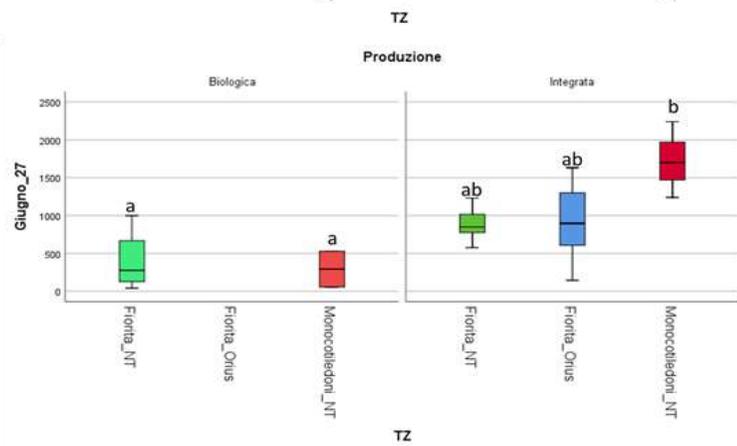
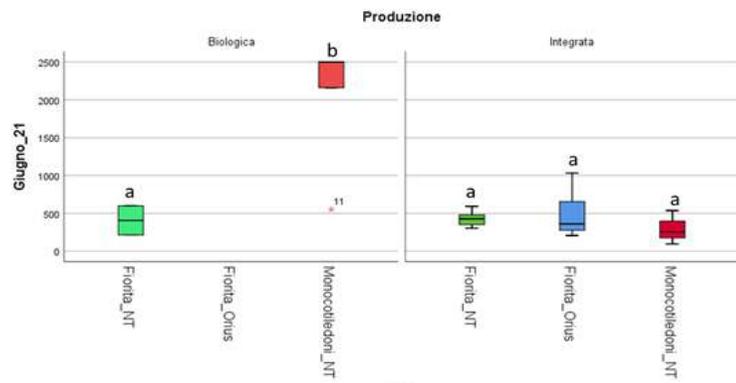
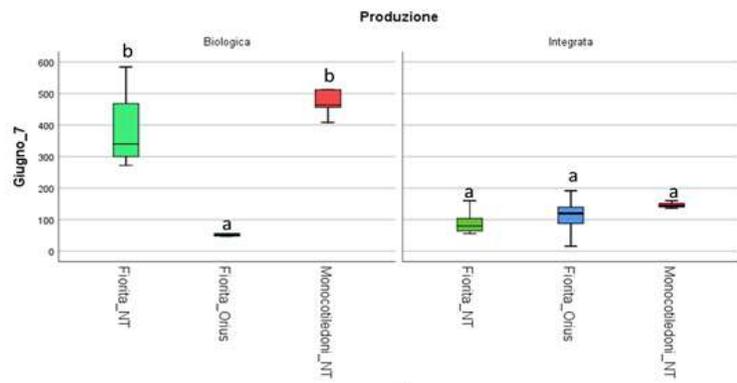
Si rileva inoltre una quantità maggiore di tripidi nella parcella a conduzione integrale che in quella a conduzione biologica, a prescindere dal colore delle trappole (ANOVA a una via, post-hoc di Tukey, $P = 0.000$).

Valutazione della presenza di tripidi nelle FASCE FIORITE

ANNO 2019

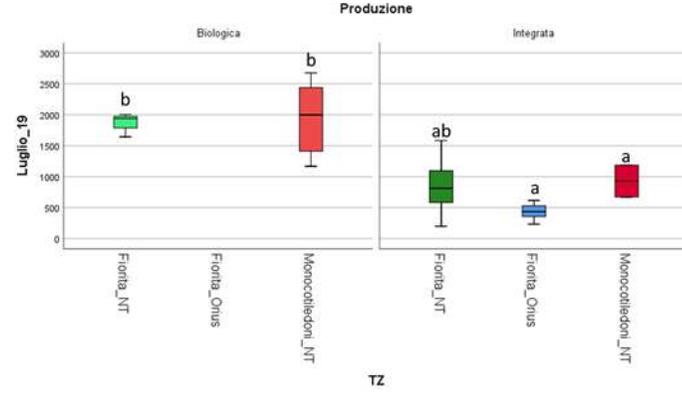
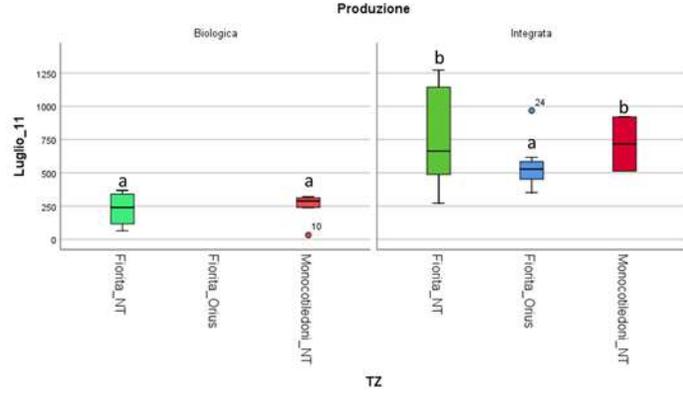
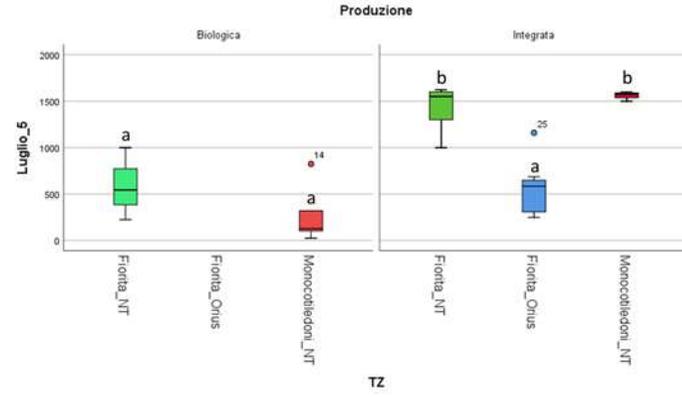
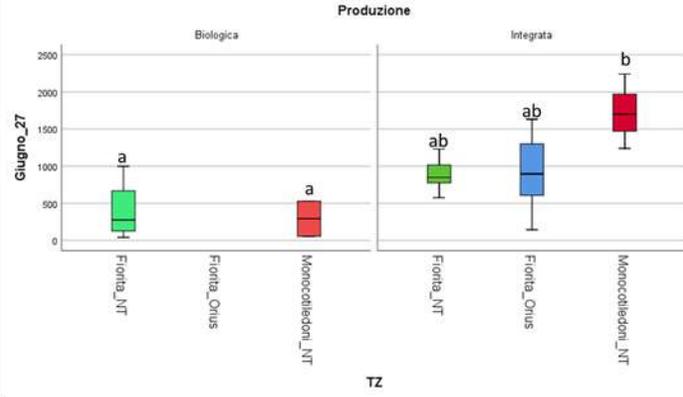
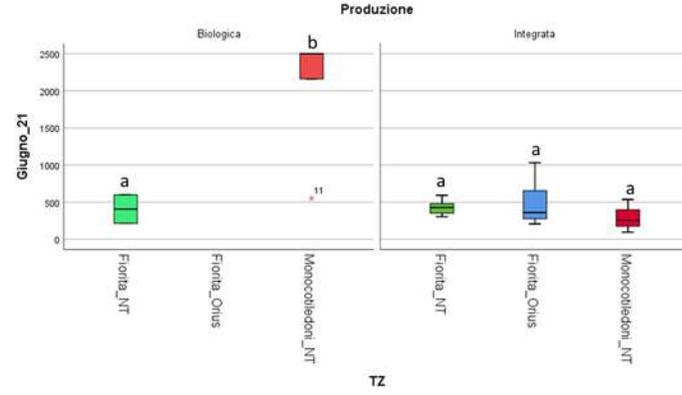
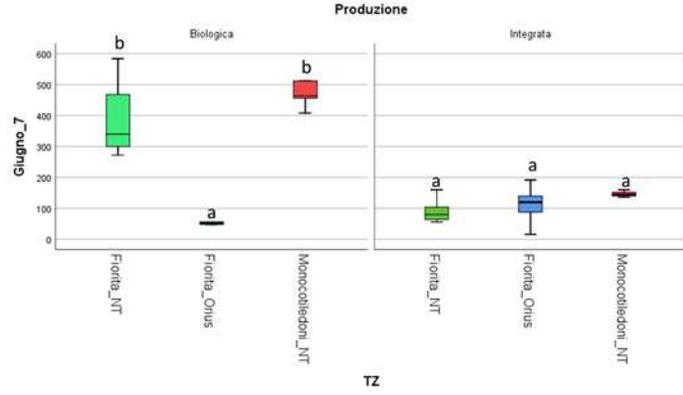


La cattura dei tripidi nelle fasce fiorite ha avuto un andamento altalenante: nella maggior parte delle misure effettuate, la quantità di tripidi è maggiore nelle fasce fiorite nella parcella a conduzione Biologica (linea azzurra), ma nel periodo fra il 27 giugno e l'11 luglio si registra un'inversione di questa tendenza, con una maggiore quantità di individui catturati nella parcella a conduzione Integrata. Ad eccezione delle date del 30 maggio e del 14 giugno, in tutte le date la differenza fra la conduzione biologica e integrata è statisticamente significativa (Student's t-test, $P < 0.05$). (vedi grafici successivi)



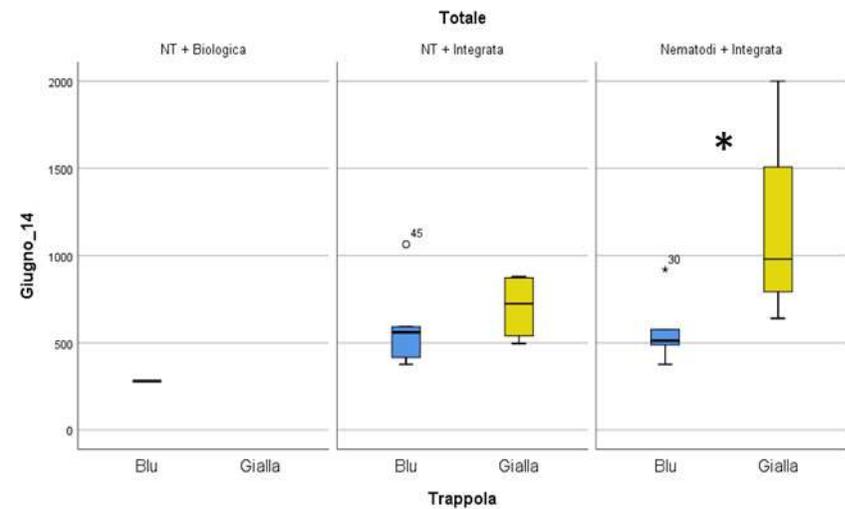
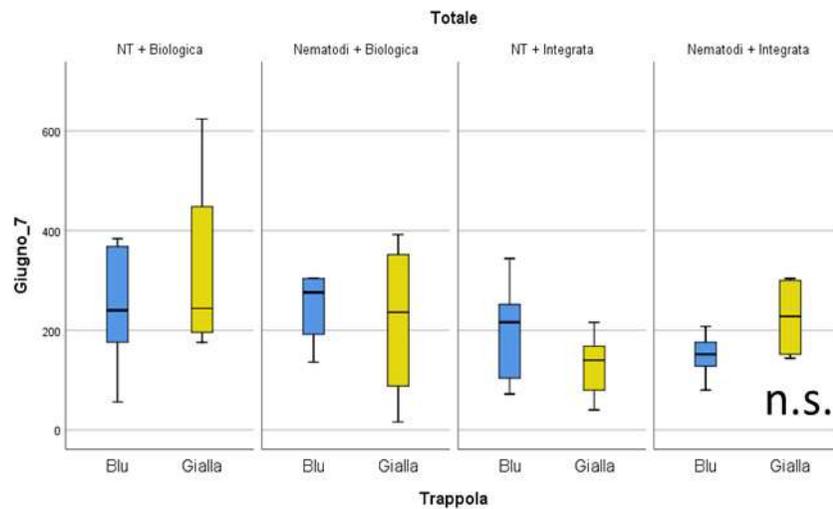
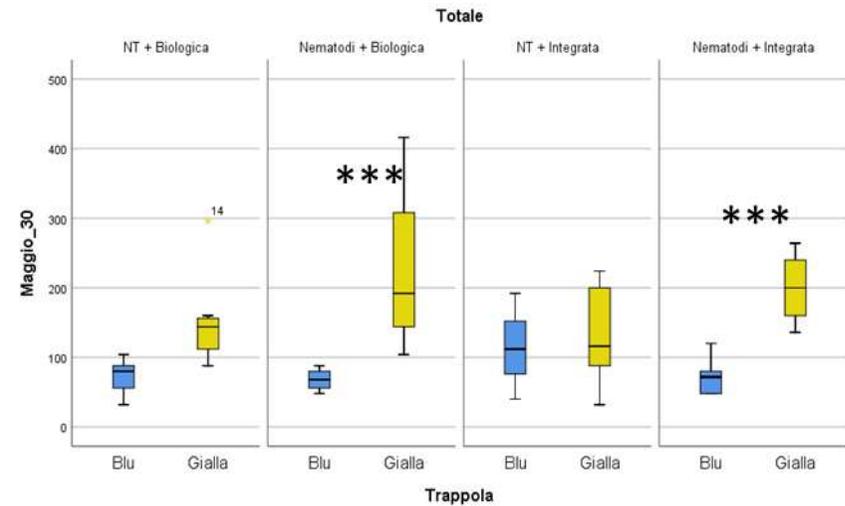
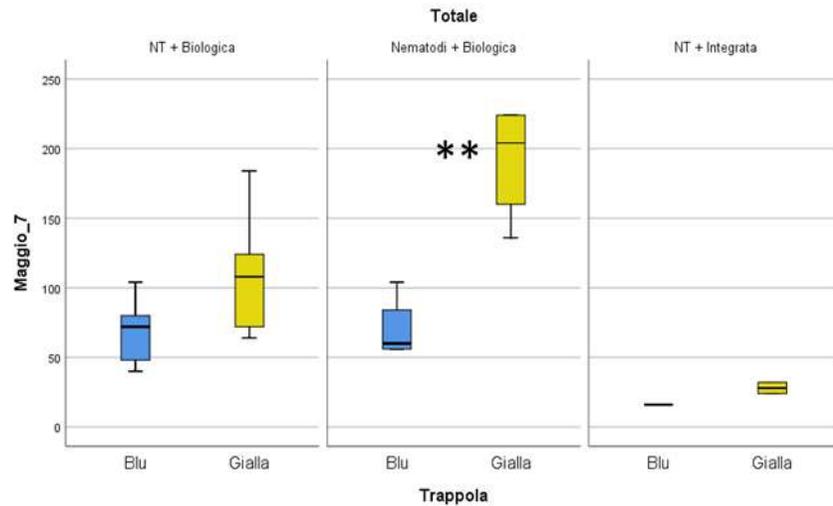
Più nello specifico, le fasce erano di tre tipi: fascia fiorita non trattata, fascia fiorita con applicazione di Orius, e inerbita a monocotiledoni.

In tutte le date di misurazione risulta che, nella parcella a conduzione integrata, la fascia fiorita trattata con *Orius laevigatus* ha una quantità di tripidi o uguale o significativamente minore rispetto alle altre tipologie di fasce. Per la parcella a conduzione biologica è stato possibile verificare la quantità di tripidi solo il 7 giugno ma, in tale data, la quantità di tripidi catturati è stata molto inferiore rispetto alle altre fasce fiorite. Questi risultati sembrano indicare che il trattamento con *Orius laevigatus* è stato efficace nel contenere la quantità di tripidi presenti (vedi grafici seguenti).

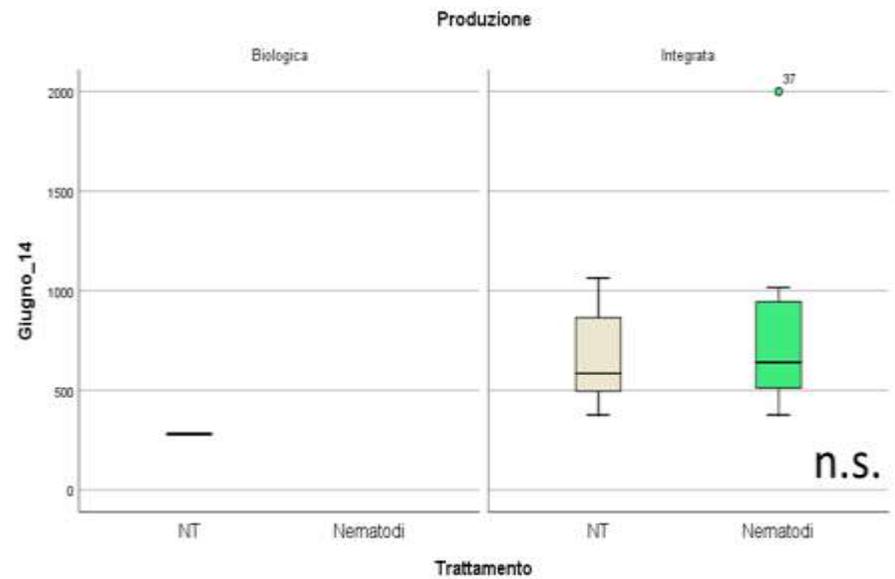
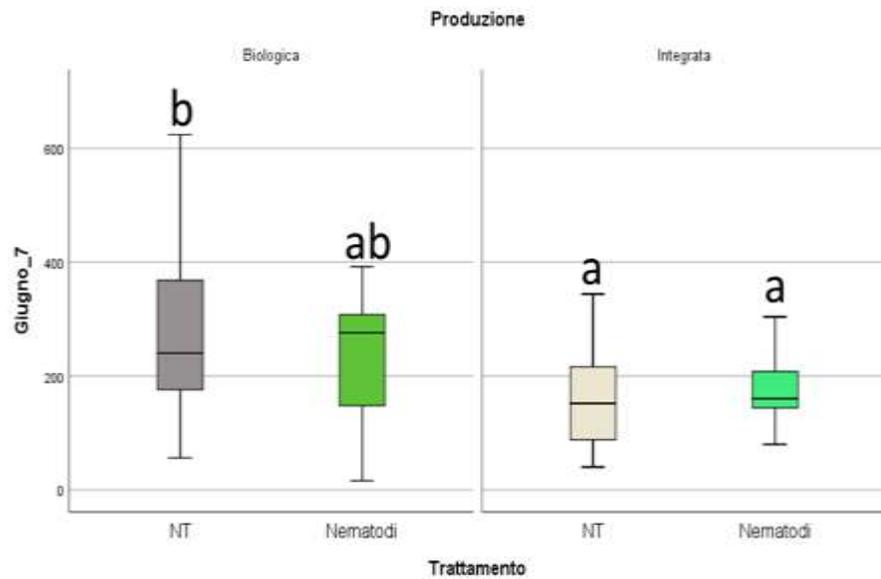
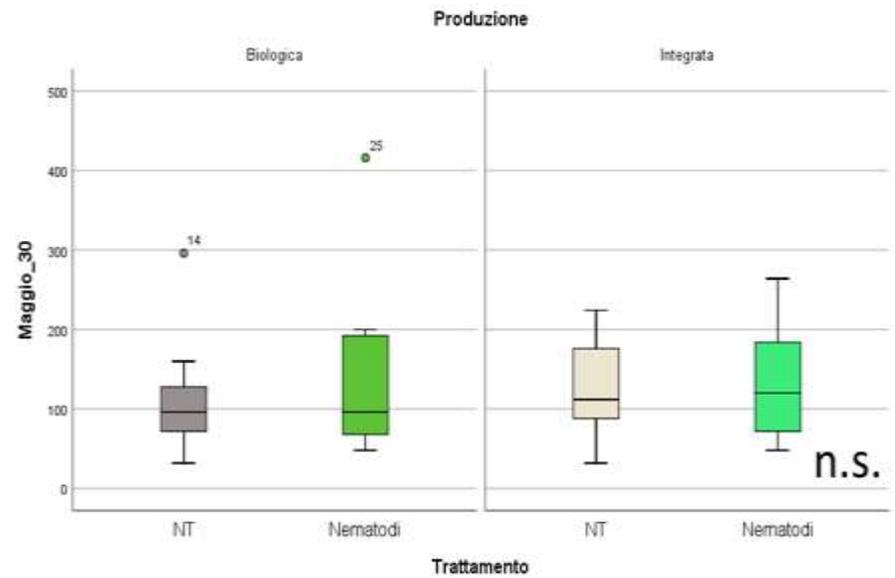
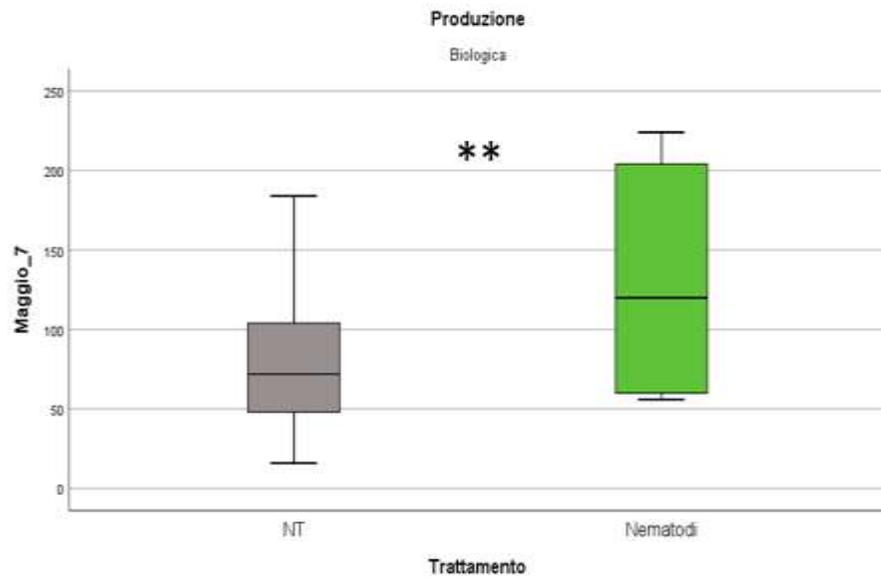


Valutazione della presenza di tripidi in CAMPO

PRIMO CICLO (Aprile-Giugno)



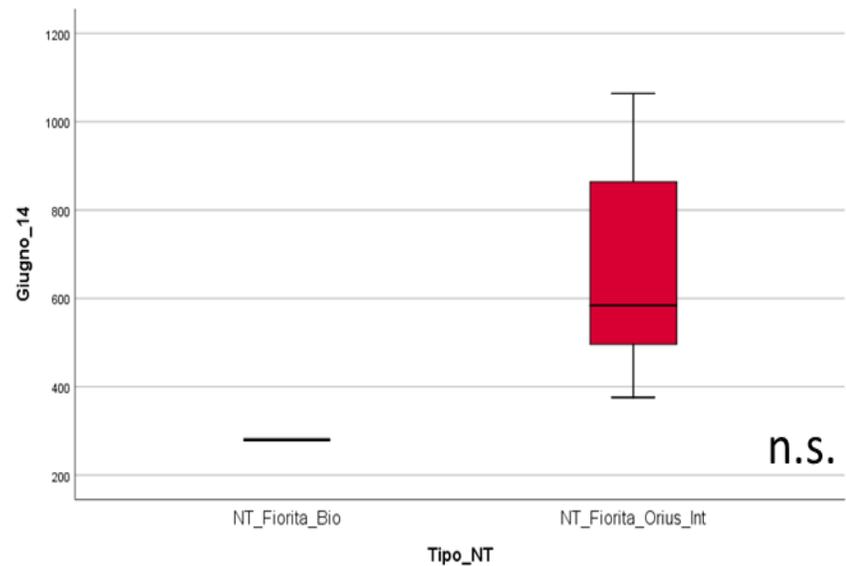
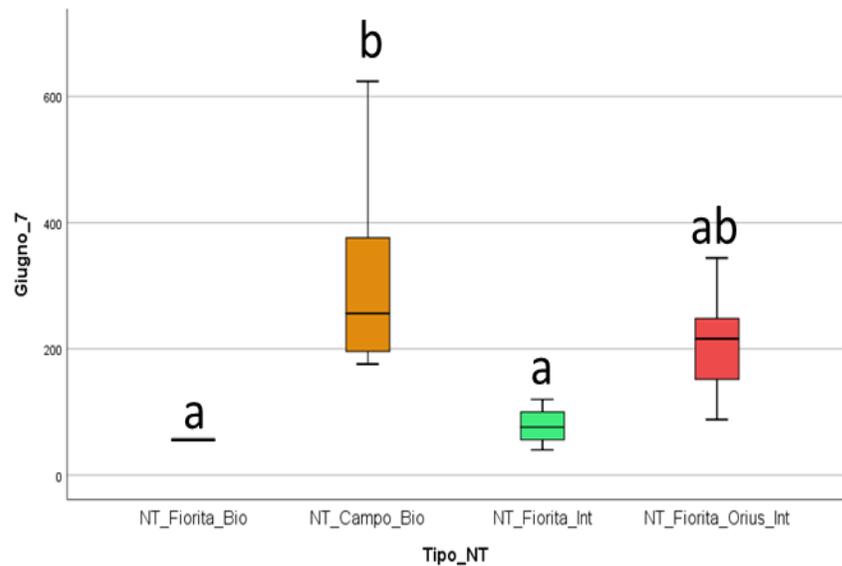
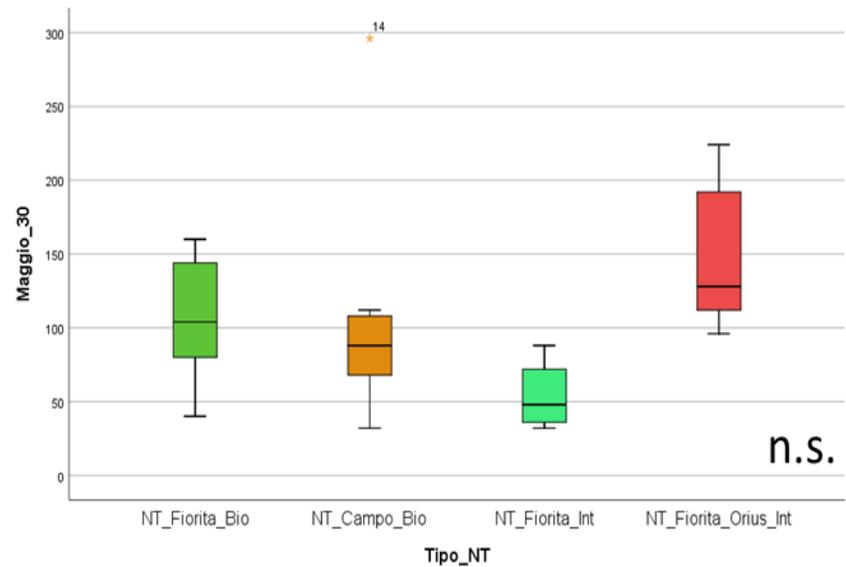
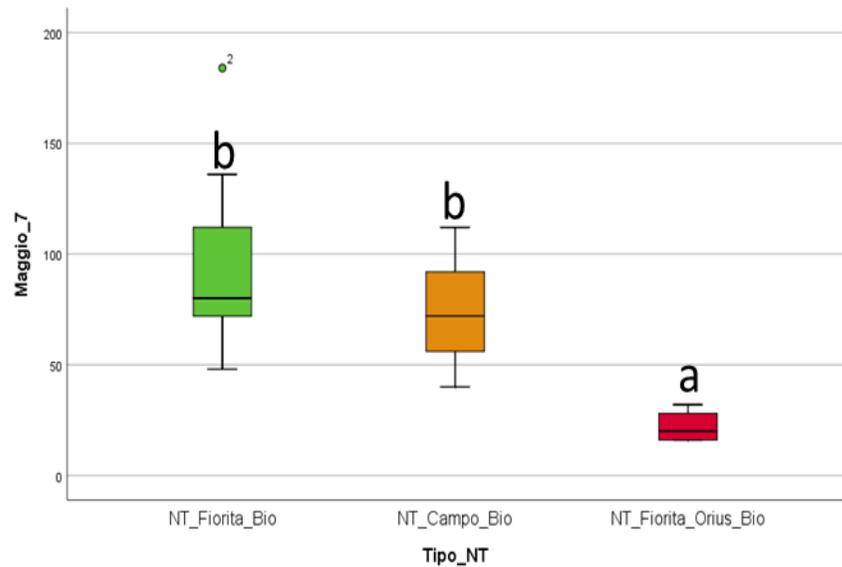
In campo, si sono valutate le differenze fra i diversi trattamenti (NT o nematodi) e le diverse conduzioni (biologica o integrata). Innanzitutto si è proceduto con la valutazione della differenza fra individui catturati su trappole gialle e blu. Una differenza significativa nel numero di individui catturati si è registrato unicamente nei blocchi trattati con i nematodi, mentre nessuna differenza significativa è stata individuata nei blocchi non-trattati, a prescindere dalla conduzione.



La conta dei tripidi catturati in campo ha dato dei risultati altalenanti e non sono emerse differenze significative fra i trattamenti e le conduzioni.

Nella giornata del 30 maggio, per la quale sono disponibili solo dati sulla parcella a conduzione biologica, si è registrato un numero di individui catturati significativamente maggiore nei blocchi trattati con i nematodi, rispetto a quello non trattato. Nella giornata del 7 giugno, il numero di tripidi catturati più alto è stato registrato nella parcella a conduzione biologica NT, mentre nei blocchi trattati con i nematodi il numero è stato più basso, quasi in linea con quello registrato nella parcella a conduzione integrata.

I dati suggeriscono che nella parcella a conduzione integrata, nella quale il numero di individui catturati è sempre stato relativamente basso, non vi è nessun effetto del trattamento con i nematodi, dato che non si sono mai rilevate differenze significative fra NT e nematodi. Si possono invece vedere delle differenze nella parcella biologica, ma gli effetti dei nematodi sono stati opposti in due diverse date, rendendo difficile dare un'interpretazione univoca del loro effetto.



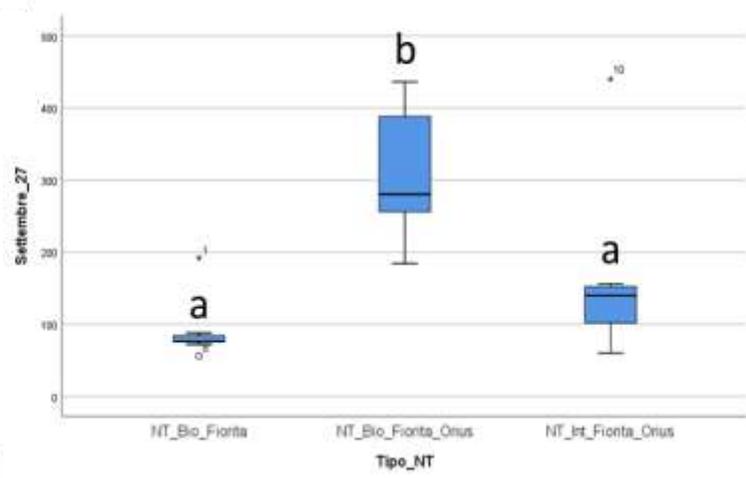
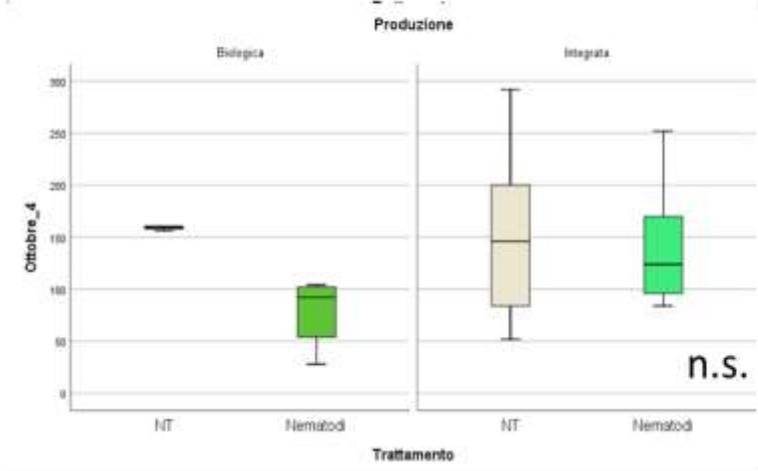
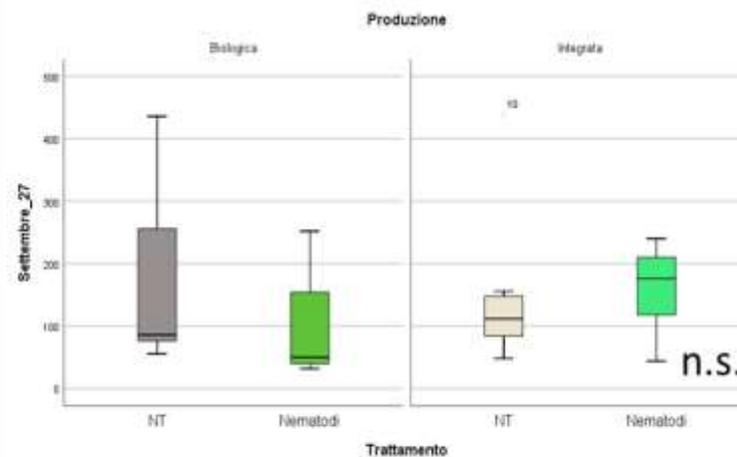
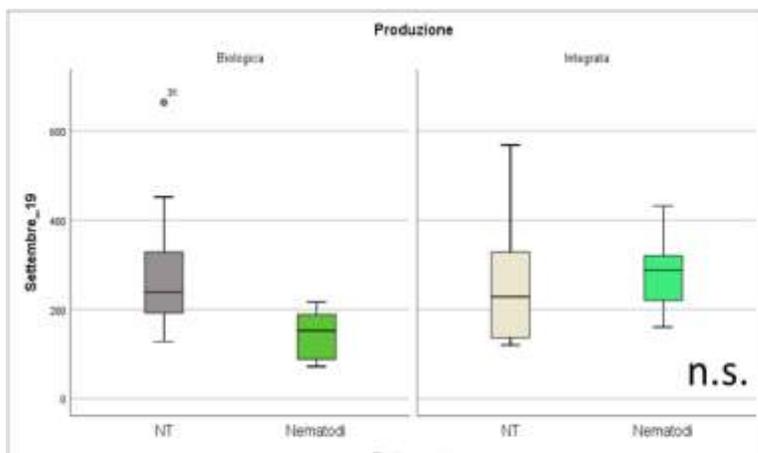
Per quanto riguarda i blocchi NT, si possono dividere in tre diverse condizioni per la parcella a conduzione biologica (vicino alla fascia fiorita, vicino alla fascia fiorita trattata con *Orius laevigatus*, e in mezzo al campo) e in due condizioni per la parcella a conduzione integrata (vicino alla fascia fiorita, vicino alla fascia fiorita trattata con *Orius laevigatus*).

Per la parcella integrata, non è possibile dire nulla in quanto i dati disponibili sono pochi. Per la parcella a conduzione biologica si può notare che, in tutte le date, i non-trattati vicini alla fascia fiorita trattata con *Orius laevigatus* hanno valori molto bassi di tripidi catturati. Anche la fascia fiorita senza trattamento mostra valori uguali o significativamente inferiore rispetto al non-trattato nel mezzo del campo.

Questi risultati suggeriscono che la vicinanza della fascia fiorita è in grado di ridurre la quantità di tripidi presenti nel campo, e ancor di più se *Orius laevigatus* è stato introdotto.

A questi risultati non corrisponde una correlazione, positiva o negativa, con la quantità di individui catturati nelle fasce fiorite nelle date corrispondenti.

SECONDO CICLO (Agosto – Ottobre)



Nel secondo ciclo produttivo dell'anno 2019, non sono mai emerse differenze significative fra i blocchi trattati con i nematodi o NT, o fra le modalità di conduzione delle parcelle: il numero di tripidi catturati non ha avuto differenze in base a queste variabili, ed era in generale più basso di quello rilevato nel primo ciclo produttivo.

L'analisi dei blocchi non trattati, svolto su un numero minore di variabili in base ad i dati ottenibili, ha mostrato un'inversione di tendenza: i blocchi vicini alla fascia fiorita trattata con *Orius laevigatus* nella parcella a conduzione biologica ha dato un numero di individui catturati significativamente più alto rispetto ai blocchi vicini alla fascia fiorita non-trattata e al suo corrispettivo nella parcella a conduzione integrata.

PROTOCOLLO PROPOSTO

Il monitoraggio dei tripidi attraverso l'utilizzo delle trappole cromotropiche ha introdotto nelle aziende una pratica prima non effettuata. Il posizionamento e il cambio delle stesse sono comunque risultate un problema aggiuntivo per l'azienda in quanto può limitare gli interventi da effettuare in campo.

Le dati ottenuti hanno evidenziato che il problema maggiore per le aziende, per quanto riguarda i tripidi, è nel secondo ciclo culturale. Dunque le pratiche descritte in precedenza possono essere applicate soprattutto nel secondo ciclo (ovvero quello più a rischio).



PROTOCOLLO PROPOSTO

Introdurre nelle aziende di prodotti a basso impatto come nematodi, acari e insetti predatori è una pratica attuabile. L'analisi dei dati effettuata ha evidenziato che gli effetti sono soprattutto rilevabili con l'utilizzo di *Orius laevigatus* nelle fasce fiorite. Gli effetti dei trattamenti con nematodi e l'acaro predatore in campo non sono costanti.

i dati ottenuti hanno evidenziato un effetto positivo (diminuzione del numero dei tripidi) nelle fasce trattate con i predatori, nei confronti dei tripidi.

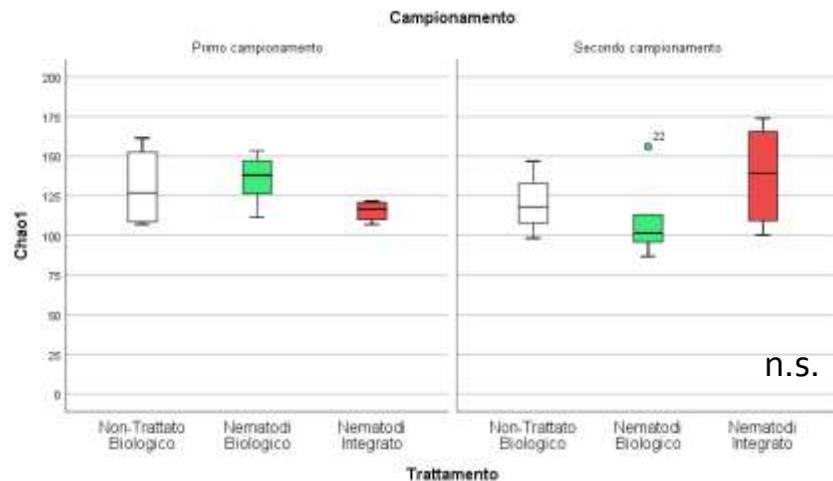
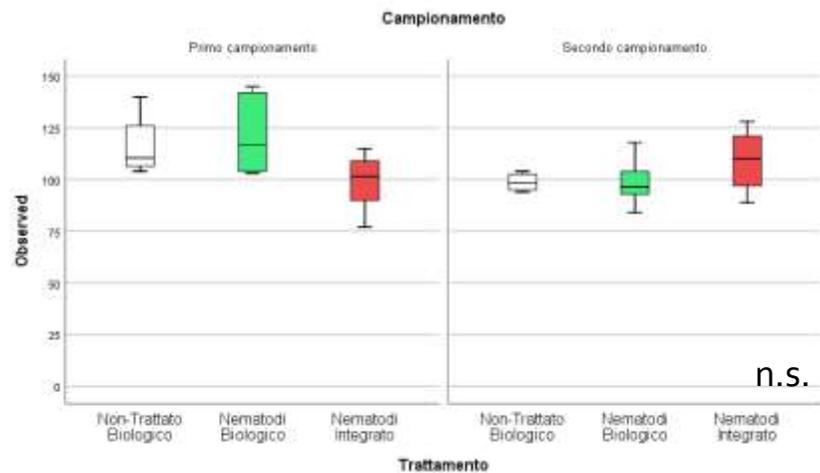


Inoltre nel 2019 sono stati prelevati campioni di terreno per analisi successive. Sono stati fatti due campionamenti in entrambi gli appezzamenti delle due Aziende in data 11/07/2019 e 04/10/2019 con lo scopo di determinare la presenza di artropodi tramite analisi di metagenomica con primer disegnati sul gene COI e descrivere la biodiversità presente. I campioni in laboratorio sono stati trattati al fine di poter estrarre il DNA totale del suolo ed è stata costruita una libreria genica per le successive analisi tramite tecnologia ILLUMINA.

I risultati delle analisi condotte sul terreno in due differenti periodi per valutare la ricchezza in specie presenti nel terreno.

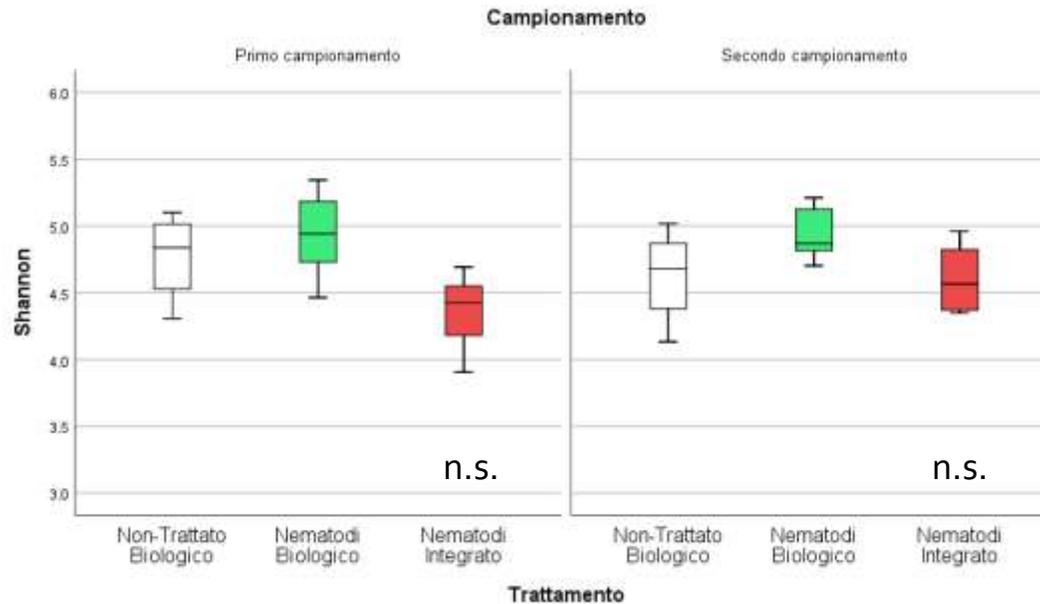
La tabella di seguito riportata indica che le analisi effettuate mediante tecnologia ILLUMINA sono buone per il numero di ampliconi avendo ottenuto più di un milione di *reads*.

Trattamento	N° medio ampliconi	N° Campioni	Totale ampliconi COI
Nematodi Biologico 1° campionamento	50'085	6	300'509
Nematodi Biologico 2° campionamento	44'038	6	264'225
Nematodi Integrato 1° campionamento	64'702	6	388'212
Nematodi Integrato 2° campionamento	27'230	6	163'377
Non-Trattato Biologico 1° campionamento	61'691	4	246'765
Non-Trattato Biologico 2° campionamento	67'471	4	269'885



Nessun parametro di alpha-diversità (COI) è significativamente diverso per ANOVA a una via eseguita con il test di Tukey ($p < 0.05$)

Gli indici "Observed" e "Chao1" non differiscono significativamente, e quindi indicano una buona profondità di analisi.



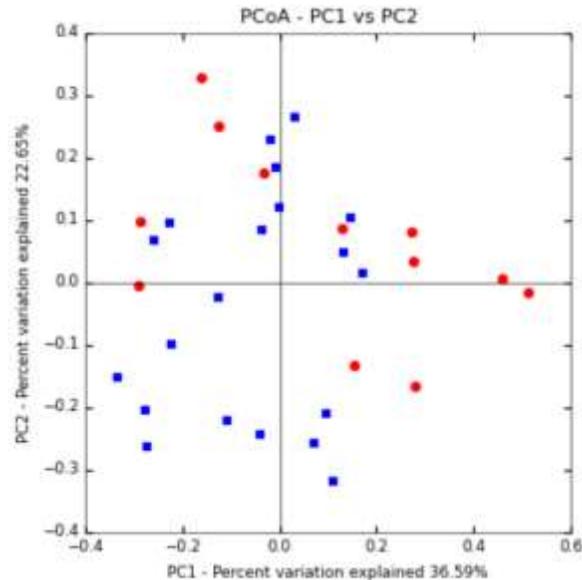
I valori dell'indice di Shannon ottenuti per i differenti trattamenti/appezzamenti sono simili, e quindi la struttura del microbiota è similmente omogenea.

.integrato
.biologico

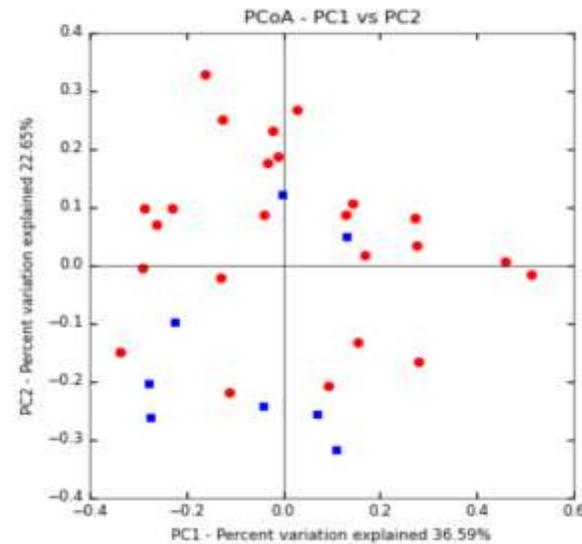
.trattati
.NT

.I° camp.
.II° camp.

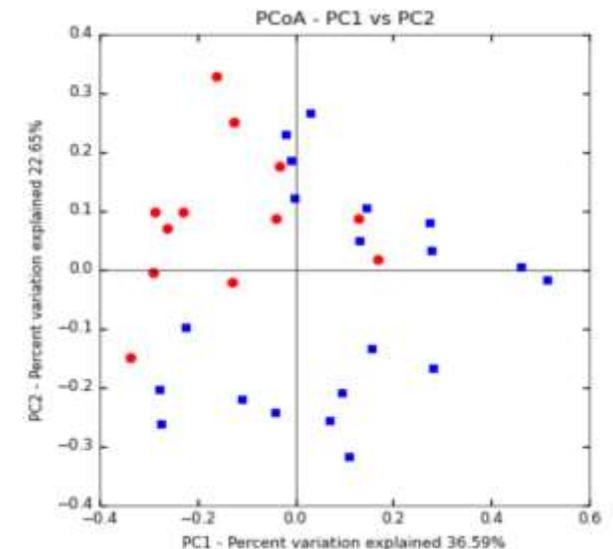
Conduzione del Campo



Trattamento



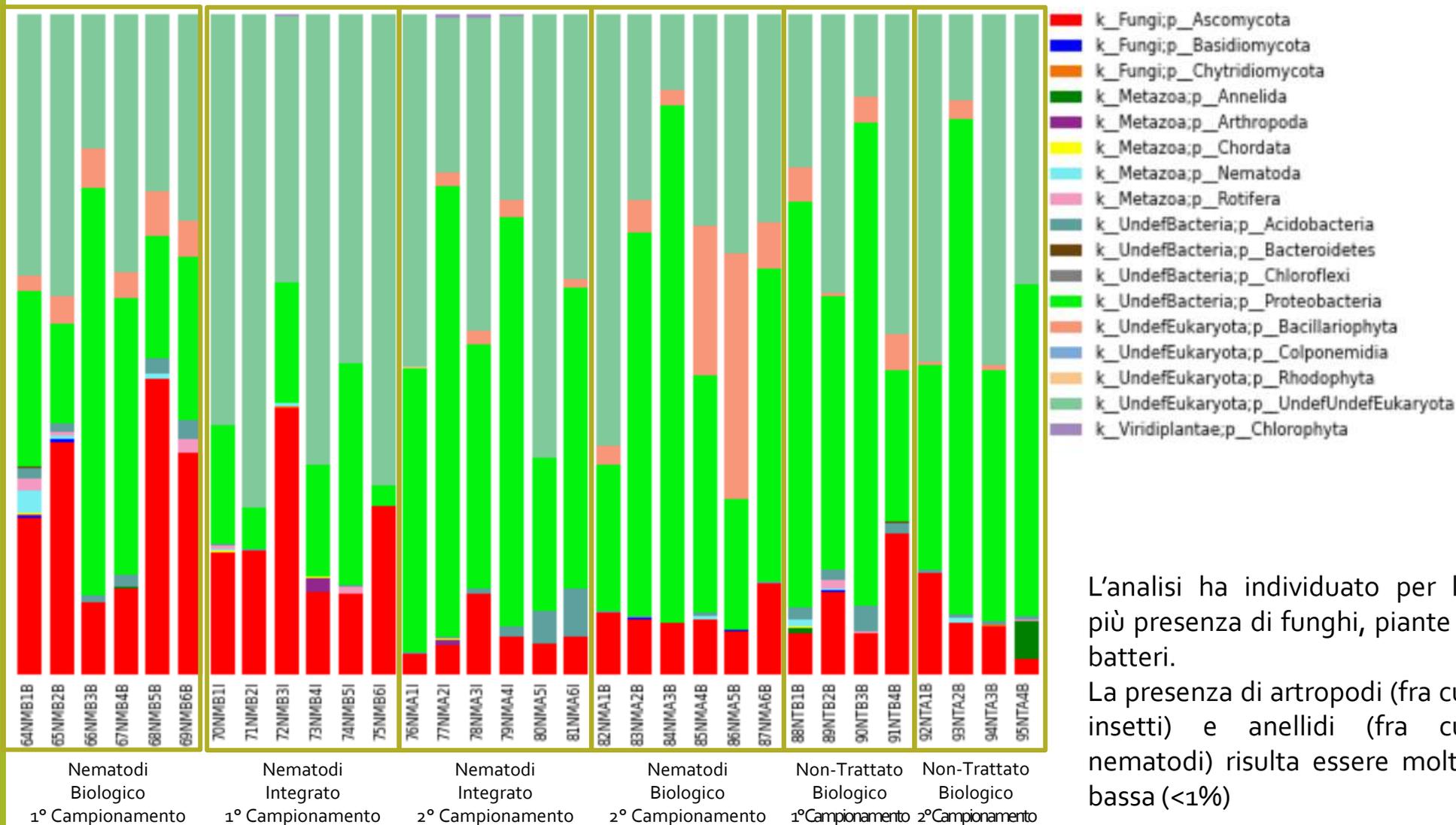
Campionamento



Le analisi di PCA effettuate tenendo conto della conduzione (biologico/integrato), trattamento e data di campionamento evidenzia che solo quest'ultima variabile individua "cluster" di campioni riconoscibili.

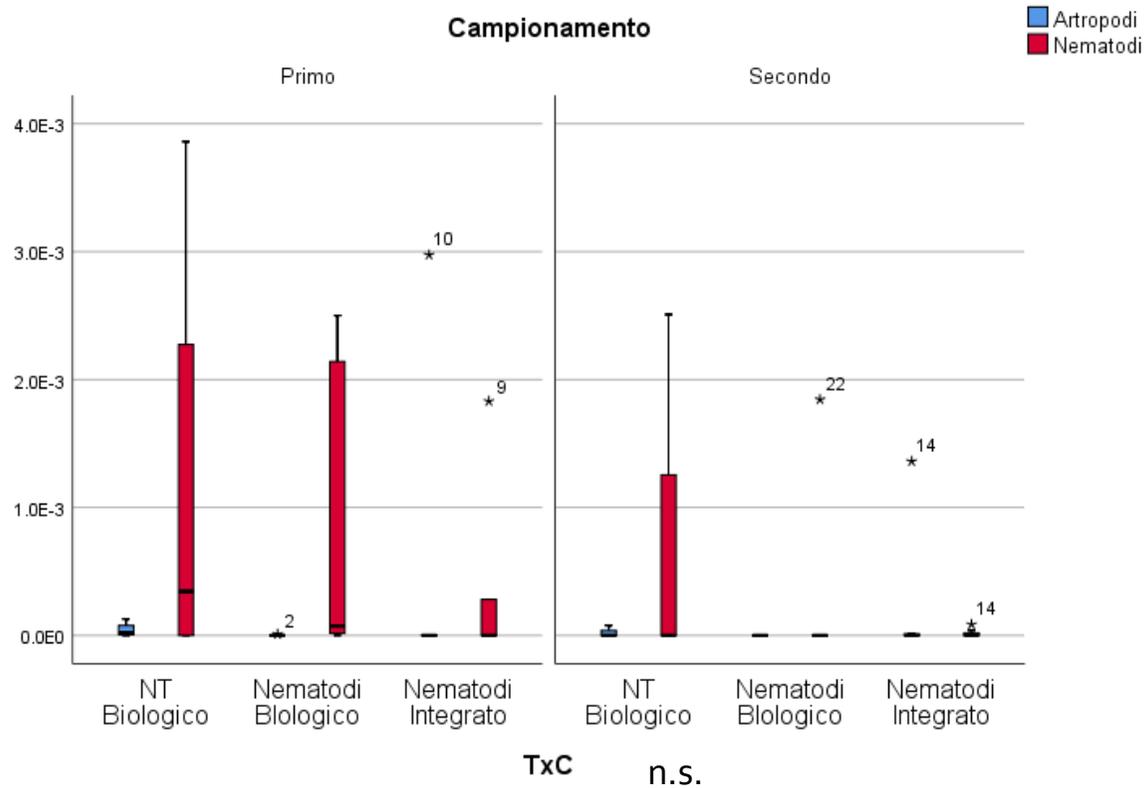
Il trattamento (trattato con nematodi e non trattato) sembrerebbe avere una influenza, individuando i due cluster ma alcuni campioni risultano mescolati.

La conduzione non ha un effetto molto forte.

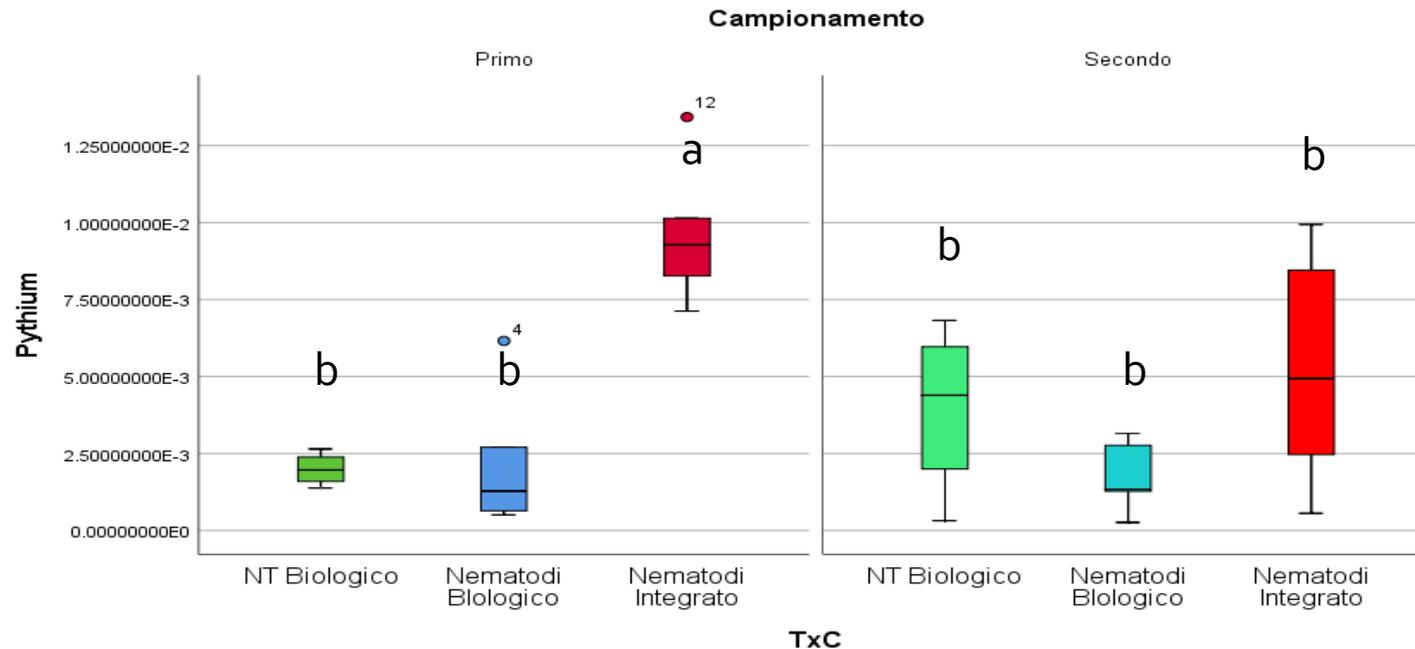


L'analisi ha individuato per lo più presenza di funghi, piante e batteri.

La presenza di artropodi (fra cui insetti) e anellidi (fra cui nematodi) risulta essere molto bassa (<1%)



Non si registrano differenze significative a livello dell'abbondanza di artropodi e/o nematodi fra i diversi campioni e tempi di analisi.



Si registrano invece differenze significative nella presenza di oomiceti appartenenti al genere *Pythium* fra i diversi appezzamenti al primo campionamento. Al secondo campionamento si registra una sensibile diminuzione (seppur non statisticamente significativa) dell'abbondanza di questo genere nei campioni trattati con nematodi nel campo a conduzione biologica. Sintomi riconducibili alla presenza di questo patogeno sono stati osservati in campo.

I dati sulla descrizione della biodiversità del suolo evidenziano che i nematodi alla fine dei due cicli produttivi rappresentano una percentuale molto bassa così come gli artropodi.

I dati inoltre indicano che la biodiversità riscontrata nell'integrato non è molto differente da quella osservata nel biologico indicando quindi che vi è anche una conduzione ottimale per il mantenimento della biodiversità anche nell'integrato.

L'analisi effettuata ha anche indicato una stanchezza del terreno dovuta soprattutto alla presenza di oomiceti appartenenti al genere *Pythium*.

CONCLUSIONI

1. LATERAL FLOW SU PIANTINE IN CONSEGNA e sulle infestanti – è consigliabile l'utilizzo strategico dei test lateral flow come monitoraggio preventivo. Lo strumento è semplice da attuare e da interpretare. Nel corso della ricerca sono stati osservati esiti negativi sia sulle piantine conferite, che su tutte le piante infestanti monitorate, a conferma della non presenza del virus.
2. FLOWER STRIP e MONITORAGGIO PIANTE SPONTANEE OSPITI DEL VETTORE - La semina di Flower Strip non ha permesso di diminuire in modo significativo le popolazioni di tripidi in campo. La gestione delle fasce è risultata costosa sia per la manutenzione delle stesse, sia per la necessità di realizzarle su tutti gli appezzamenti aziendali al fine di consentire la pratica dell'Avvicendamento culturale. Viceversa il monitoraggio eseguito sulle piante spontanee ha dato risultati positivi: su nessun campione prelevato si è osservata la positività a TSWV
3. MONITORAGGIO VETTORI - il monitoraggio dei vettori tramite impiego di trappole cromotropiche ha permesso di monitorare efficacemente la popolazione dell'insetto vettore. Ha presentato tuttavia diverse criticità operative relative alla gestione delle trappole in campo (loro posizionamento e raccolta) e difficoltà di conteggio delle stesse. L'utilizzo di trappole a rotolo, potrebbe rappresentare un ulteriore strumento per limitare gli spostamenti del tripide verso la coltura.
4. Non è stata osservata una differenza significativa tra il livello di biodiversità tra l'agroecosistema Biologico e quello integrato.