



*Impiego di *Bombus terrestris* (L.) per la diffusione di antagonisti naturali di *Botrytis cinerea* (Pers.) in ambienti protetti coltivati a fragola* ⁽¹⁾

Massimo Pinna^(*) – Ursula Gamba^(*) – Sandra Spagnolo^(*)

RIASSUNTO

I tre anni di sperimentazione hanno permesso di accertare l'efficacia dell'utilizzo dell'insetto impollinatore *Bombus terrestris* per distribuire antagonisti naturali di *Botrytis cinerea*. Le prove sono state condotte su fragola in coltura protetta ed hanno fornito risultati positivi sulla possibilità di attuare una difesa dal marciume dei frutti distribuendo il fungo antagonista *Trichoderma harzianum* mediante bombi ottenendo efficacia di copertura paragonabile a quella di un prodotto sistemico.

PAROLE CHIAVE

Bombus terrestris, *Trichoderma harzianum*, *Botrytis cinerea*, insetti impollinatori, fragola

Introduzione

Gli insetti pronubi contribuiscono in misura importante al conseguimento delle produzioni agricole; la loro azione impollinatrice è fondamentale per alcune coltivazioni come quelle da seme, o per fruttiferi come melo, ciliegio e mandorlo (Servadei *et al.* 1972), ma può portare notevoli benefici anche a specie con fecondazione principalmente anemofila.

L'azione può essere svolta da un gran numero di specie animali tra cui api, vespe, mosche, farfalle, coleotteri, ma anche uccelli ed altri animali superiori (Proctor *et al.* 1996).

Tuttavia, l'attività impollinatrice s'identifica per lo più con l'attività svolta dall'ape domestica e da alcuni imenotteri apoidei selvatici; tra questi, *Bombus terrestris* occupa una posizione

⁽¹⁾ Lavoro eseguito con il contributo della Regione Piemonte in collaborazione con la Cooperativa E.R.I.C.A. e presentato al convegno AIPP «La difesa delle colture in agricoltura biologica» svoltosi a Cesena il 23-24 novembre 2004

^(*) CRAB Centro di Riferimento per l'Agricoltura Biologica della Provincia di Torino – Via S. Vincenzo, 48 – 10060 Bibiana (TO)

di particolare rilievo in Europa per la possibilità che offre di allevamento in biofabbriche e di successiva diffusione commerciale.

L'impiego di bombi per l'impollinazione delle colture protette, iniziato nei primi anni ottanta nel nord Europa, ha conosciuto un interesse crescente anche nel bacino del Mediterraneo, dove rappresenta uno strumento prezioso direttamente collegato alla diffusione della lotta integrata e biologica.

A distanza di più di venti anni dalle prime esperienze d'impiego si è ormai giunti a superare le 100.000 arnie vendute ogni anno in tutto il continente (Maccagnani 2000).

Il trasporto accidentale di patogeni fungini è un fenomeno possibile durante la normale attività bottinatrice svolta dagli insetti impollinatori (Shaw 1999) e segnalato in ripetute occasioni da autori di diverse parti del mondo (cfr. **Tab. 1**).

Tab. 1 - Esempi di trasporto accidentale di patogeni ad opera di apoidei (di vari generi e specie) (ed altri insetti) durante la normale attività bottinatrice (da Shaw 1999 modificata)

Patogeno	Ospite	Località	Riferimento
<i>Botrytis cinerea</i> (Pers.)	Fiori di fragola	Danimarca	Kovács 1968
<i>Claviceps purpurea</i> (Fr.) Tul	Melata da segale	Austria	Anon. 1953
<i>Monilinia vaccinii corymbosi</i> (Honey)	Mirtillo ed altri piccoli frutti	USA	Batra, L.R. 1983
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.)	Ravizzone	Canada	Stelfox et al.1978
<i>Ustilago violacea</i> (non identificata)	Melanzana	Regno Unito	Griffiths & Roberts 1966
<i>Verticillium alboatrum</i> (Reinke et Berth)	Erba medica	Canada	Huang & Richards 1983 Huang & Kokko 1985 Huang <i>et al.</i> 1985;1986

La possibilità di impiegare i pronubi per il trasporto di microrganismi (funghi, batteri e virus) utili a combattere alcune tra le avversità delle piante coltivate è un'idea relativamente recente. *Apis mellifera* (L.) è stata utilizzata per il trasporto di: *Gliocladium roseum* per la lotta a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) su colza (Israel e Boland 1992), *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas fluorescens* per la lotta biologica ad *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* su pomacee (Johnson *et al.* 1993), *Trichoderma* spp. per la lotta a *B. cinerea* su fragola e lampone (Peng *et al.* 1991, 1992); *B. impatiens* (Cresson) è stato impiegato analogamente per il trasporto di *G. roseum* per la lotta a *B. cinerea* nella stessa sperimentazione; infine *A. mellifera* è stata impiegata per il trasporto di sei isolati di *Trichoderma* spp. per la lotta a *S. sclerotiorum* su girasole (Escande *et al.* 2002).

In Italia, sono stati condotti studi sull'utilizzo di *A. mellifera* per il trasporto di *T. harzianum* per la lotta alla muffa grigia della fragola (Maccagnani *et al.* 1999) e indagini in merito alla quantità di spore che i bombi sono in grado di trasportare su fiori di pomodoro con l'impiego di un dispenser appositamente studiato (Maccagnani *et al.* 2001).

Nella fragola, l'impollinazione avviene principalmente per via anemofila e per gravità, tuttavia percentuali notevoli dei fiori di tale specie possono essere impollinati da insetti; l'utilizzo d'insetti impollinatori può produrre inoltre

un aumento in peso dei frutti che può variare da un minimo del 18% sino ad un massimo del 26% e, secondo studi recenti, giungere sino al 25-35% in più (Kovach e Finkelstein 2001).

L'impiego d'insetti impollinatori sulle colture protette di fragola è pratica ormai affermata in molte aziende poiché determina un aumento dell'allegagione e del peso dei frutti e riduce le deformazioni a carico dei medesimi. *B. cinerea* è uno degli agenti patogeni più pericolosi per la coltura della fragola: il periodo più critico per le infezioni è la fioritura anche se la manifestazione sintomatologica è successiva. Recentemente è stato registrato dal Ministero della Sanità e messo in commercio sotto forma di polvere bagnabile un fungo antagonista, *T. harzianum*, in grado di contenere le infezioni di *B. cinerea*.

La sua efficacia è inferiore a quella dei fungicidi di sintesi, ma potrebbe essere migliorata utilizzando *B. terrestris* per il trasporto delle spore sui singoli fiori (organo principale d'infezione).

Nel 2002 e nel 2004 è stata condotta una sperimentazione per approfondire le conoscenze riguardanti l'impiego di bombi per il trasporto di funghi antagonisti di *B. cinerea* su fragola.

Materiali e metodi

Negli anni 2002-2004 sono stati allestiti campi sperimentali presso le aziende Boetti Giacomo di Monteu Roero (CN) (in entrambi gli anni) e Garro Andrea di Peveragno (CN) solo nel 2002. Sono state messe a disposizione due serre con coltura di fragola in atto.

Nel 2003 non è stato possibile allestire la prova a causa delle avverse condizioni climatiche. Nella **Tab. 2** sono indicate le tesi messe a confronto e le dosi di prodotto impiegate.

Il disegno sperimentale ha previsto l'impiego di blocchi randomizzati con quattro ripetizioni per tesi, in modo tale da ottenere un totale di 16 parcelle di circa cinque metri lineari cadauna.

Le parcelle delle tesi 1,2,3 sono state isolate con reti anti-insetto per impedire su di esse un'eventuale bottinatura di *B. terrestris* ed il conseguente trasporto del fungo antagonista.

Nella settimana antecedente la fioritura è stata collocata in ogni serra un'arnia di *B. terrestris*.

Tab. 2 - Tesi a confronto, prodotti impiegati e relative dosi

Tesi	Trattamento	Prodotto commerciale impiegato	Dose (g/HA) di p.a.	Modalità di somministrazione
1	<i>T. harzianum</i>	Tricodex	200	diretta, con motopompa elettrica a zaino
2	Ciprodinil + fludioxonil	Switch	80	diretta, con motopompa elettrica a zaino
3	Testimone	–	–	–
4	<i>T. harzianum</i>	Tricodex	50 ^(*)	indiretta, con <i>Bombus terrestris</i> come vettore

^(*) dose complessiva utilizzata nel corso della sperimentazione

All'apertura dei primi fiori di fragola è stato applicato alle arnie un dispenser per il trasporto del fungo antagonista ad opera dei bombi. Questo dispenser è stato semplicemente ricavato da un contenitore per diapositive, utilizzando la parte inferiore come supporto ed il coperchio come recipiente per la somministrazione del fungo antagonista. Il dispenser è stato poi fissato al foro d'uscita dell'arnia per indurre il contatto tra gli insetti ed il prodotto prima dell'azione bottinatrice, lasciando invece libero il foro di rientro.

Nel dispenser si è collocata la quantità di circa 15 grammi di prodotto a base di *T. harzianum*; nelle settimane successive, si è reintegrata periodicamente tale dose per un totale di 50 grammi di prodotto impiegati nel corso dell'intera stagione.

Nelle parcelle isolate con reti anti-insetto della tesi 1 (*T. harzianum* in forma di polvere bagnabile) e tesi 2 (ciprodinil + fludioxonil) è stato eseguito un trattamento in pre e post fioritura.

Durante i trattamenti sono stati chiusi i fori d'uscita delle arnie e rimosse le reti di protezione, immediatamente ricollocate alla fine delle operazioni.

All'inizio del periodo di raccolta sono state rimosse sia le protezioni che le arnie e sono stati eseguiti tre conteggi per verificare il numero di frutti colpiti da *B. cinerea* in ogni parcella.

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica e in seguito confrontati con i test delle differenze minime significative (LSD) e di comparazione multipla di Tukey-Kramer.

Risultati

anno 2002

Nella **Tab. 3** sono indicate le percentuali di frutti colpiti da *B. cinerea* riscontrate nel corso del 2002.

I dati raccolti evidenziano un'efficacia maggiore nella distribuzione di *T. harzianum* da parte di *B. terrestris* rispetto a quella ottenuta dalla distribuzione con pompa a spalla del fungo antagonista.

La percentuale di frutti colpiti da *B. cinerea* nella tesi bombi + *T. harzianum* non si discosta da quella riscontrata nelle parcelle in cui è stato distribuito il fungicida chimico (**Tab. 4**).

Tab. 3 - Percentuali di frutti colpiti da *B. cinerea* in serra nel 2002

Data rilievo		<i>T. harzianum</i> + bombi	<i>T. harzianum</i>	Switch	Testimone
08/05/02	Serra 1	0,025	0,095	0,042	0,069
14/05/02		0,07	0,165	0,095	0,186
08/05/02	Serra 2	0,06	0,137	0,06	0,20
14/05/02		0,125	0,24	0,09	0,272

Tab. 4 - Test di Tukey – Kramer

Data rilievo			P
08/05/02	Serra 1	<i>T. harzianum</i> + bombi vs. <i>T. harzianum</i>	P<0,01(**)
		<i>T. harzianum</i> + bombi vs. Switch	n.s.
		<i>T. harzianum</i> + bombi vs. testimone	P<0,05(*)
	Serra 2	<i>T. harzianum</i> + bombi vs. <i>T. harzianum</i>	n.s.
		<i>T. harzianum</i> + bombi vs. Switch	n.s.
		<i>T. harzianum</i> + bombi vs. testimone	P<0,05(*)
15/05/02	Serra 1 + Serra 2	<i>T. harzianum</i> + bombi vs. <i>T. harzianum</i>	P<0,05(*)
		<i>T. harzianum</i> + bombi vs. Switch	n.s.
		<i>T. harzianum</i> + bombi vs. testimone	P<0,05(*)

anno 2004

Nella **Tab. 5** sono indicate le percentuali di frutti colpiti da *B. cinerea* riscontrate nel corso del 2004.

Nell'anno 2004 i dati raccolti hanno evidenziato differenze minime significative nei confronti del testimone soltanto per le tesi 1 (somministrazione del fungo antagonista mediante

pompa a motore) e 2 (confronto con antibotritico di sintesi) come indicato nel grafico (**Fig. 1**); i bombi non sono stati così efficaci come nella sperimentazione del 2002. L'andamento stagionale caratterizzato da temperature inferiori ai 10°C per periodi prolungati e le piogge persistenti hanno sfavorito la loro attività.

Tab. 5 - Percentuali di frutti colpiti da *B. cinerea* in serra nel 2004

Data rilievo	<i>T. harzianum</i> + bombi	<i>T. harzianum</i>	Switch	Test
23/04/04	0	0	0	0,02
29/04/04	0	0	0	0,19
05/05/04	0,2	0,08	0	0,16
13/05/04	0,11	0	0	0,11
19/05/04	0,03	0	0	0,08
27/05/04	0,03	0,03	0,01	0
09/06/04	0,10	0,07	0,04	0,04

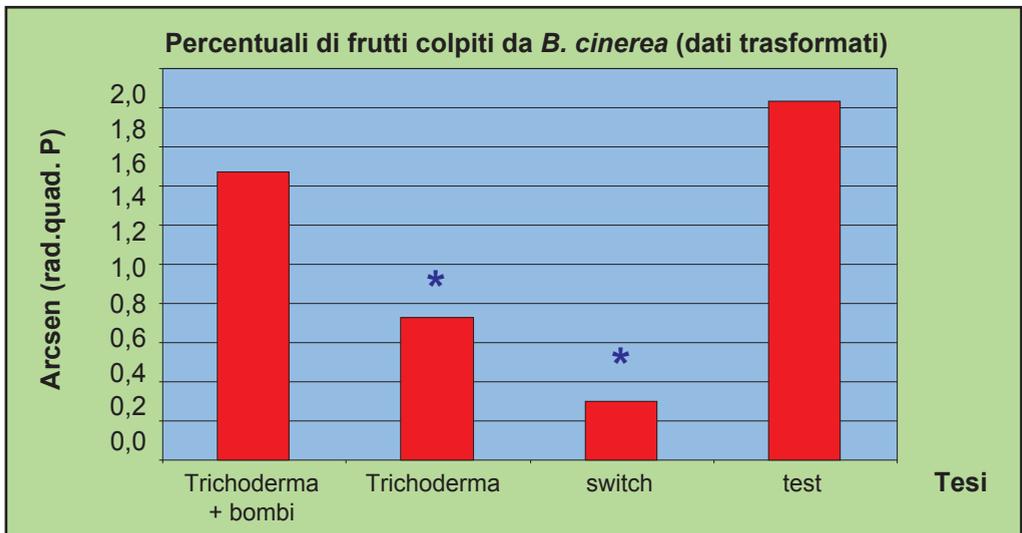


Fig. 1 - Percentuali di frutti colpiti da *B. cinerea* [dati trasformati in arcsen (rad.quad. P)]

Conclusioni

I test statistici hanno evidenziato nel 2002 differenze significative tra l'impiego di *T. harzianum* distribuito da solo o in abbinamento con *B. terrestris* come vettore: quest'ultima soluzione ha dato un contenimento di *B. cinerea* confrontabile con quello ottenuto con l'impiego del fungicida chimico. Nel 2004 questi risultati brillanti non sono stati confermati anche a causa di limitazioni climatiche all'attività dei bombi.

L'impiego congiunto di microrganismi utili e d'insetti pronubi come loro vettori richiede quindi ulteriori approfondimenti ma offre interessanti prospettive, considerando i risultati ottenuti nel 2002 e soprattutto le dosi ridotte d'impiego, inferiori anche di 4 volte rispetto alla somministrazione diretta.



Fig. 2 - Coperture con reti anti-insetto nel tunnel oggetto della sperimentazione



Fig. 3 - Dispenser di *T. harzianum* ottenuto con un semplice contenitore per diapositive



Fig. 4 - Bombo su fiore di fragola



Fig. 5 - Infezione di *B. cinerea* su fragola immatura



Fig. 6 - Nella sequenza un bombo si imbratta di *T. harzianum* prima di spiccare il volo

BIBLIOGRAFIA

- **ESCANDE A.R., LAICH F.S., PEDRAZA M.V., 2002.** Field testing of honey-bee-dispersed *Trichoderma* spp. to manage sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Plant Pathology* 51 (3), 346-351.
- **ISRAEL M.S., BOLAND G.J., 1992.** Influence of formulation on efficacy on honey bees to transmit biological controls for management of sclerotinia stem rot of canola. *Can. J. Pl. Pathol*, 14: 244.
- **JOHNSON K.B., STOCKWELL V.O., MCLAUGHLIN RANDY J., SUGAR D., LOPER JOYCE E., ROBERTS R., 1993.** Epiphytic bacteria reduce establishment and population size of honey-bee dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms, *Acta Hort. (ISHS)* 338: 231-232.
- **KOVACH J., FINKELSTEIN J., 2001.** Using Honey Bees to Disseminate *Trichoderma harzianum* to Strawberries for Botrytis Control. www.nysipm.cornell.edu/publications/botrytis.html. Ultima visita 10/09/2004.
- **MACCAGNANI B., MOCIONI M., GULLINO M.L., LADURNER E., 1999.** Application of *Trichoderma harzianum* by using *Apis mellifera* as a vector for the control of grey mould of strawberry: first results. *Bullettin OILB/SROP* 22(1): 161-164.
- **MACCAGNANI B. (2000).** *Bombus terrestris*. In: Gli ausiliari nell'agricoltura sostenibile, a cura di G. Nicoli, P. Radeghieri, Calderini Edagricole, 343- 377.
- **MACCAGNANI B., LADURNER E., CESARI M., MOCIONI M., 2001.** Sperimentazione di distributori per l'impiego di *Bombus terrestris* come veicolo di formulati microbiologici. *Informatore Fitopatologico – La Difesa delle piante*, 51 (4), 2001.
- **PENG G., SUTTON J.C. , KEVAN P.G., 1991.** Evaluation of honey bees for applying *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to control grey mould caused by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Pl. Pathol.* 12: 283.
- **PENG G., SUTTON J.C. , KEVAN P.G., 1992.** Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Can. J. Pl. Pathol.* 14: 117-129.
- **PROCTOR M., YEOP AND LACK A., 1996.** *The Natural History of Pollination*. Harper Collins Publishers, London, UK.
- **SERVADEI A., ZANGHERI S., MASUTTI L., 1972.** *Entomologia generale ed applicata* CEDAM.
- **SHAW D.E., 1999.** Bees and fungi, with special reference to certain plant pathogens. In: Daniel McAlpine Memorial Lecture 1999. www.australasianplantpathologysociety.org.au/McAlpine/DM12.htm. Ultima visita 10/09/04.
- Per i lavori citati nella tabella 1, cfr: Shaw D.E. (1999) – Bees and fungi, with special reference to certain plant pathogens Table 1. In: Daniel McAlpine Memorial Lecture 1999. www.australasianplantpathologysociety.org.au/McAlpine/DM12.htm. Ultima visita 10/09/04.