

## RELAZIONE PROGETTO ALTERNARIA DI F.IN.A.F.

Relazione conclusiva anno 2024

Ricerche coordinate da Tera Seeds

Attività di divulgazione finanziata ai sensi del Reg. (Ue) n. 2021/2115

Nel corso dell'estate 2024 il personale di Tera Seeds ha visionato ripetutamente più di 20 campi di pomodoro da industria, distribuiti tra le province di Parma, Ferrara, Reggio Emilia, Ravenna e Forlì-Cesena, con l'obiettivo di selezionare aziende che possano rappresentare i principali areali di coltivazione del pomodoro in Emilia-Romagna. Per ciascun appezzamento, è stato valutato il grado di sensibilità all'alternariosi attraverso una descrizione dei sintomi osservati, mettendo in relazione differenti varietà di Tera Seeds e di altre aziende sementiere. A tal proposito, sono stati raccolti campioni di foglie e di frutti da 8 di questi campi, e sono stati inviati sia al CREA di Pontecagnano per il riconoscimento del patogeno, sia al laboratorio di Conserve Italia per la verifica della presenza delle tossine.

L'analisi di fitopatologia del CREA di Pontecagnano condotta sui 25 differenti campioni raccolti dal campo ha rilevato la presenza di molti isolati batterici e fungini, rappresentati soprattutto da *Xanthomonas* e *Fusarium oxysporum*. La presenza di *Alternaria sp.* è stata ufficialmente diagnosticata in 12 campioni, sui quali isolati è avvenuta l'identificazione dello specifico ceppo. Il riconoscimento abbina microscopia al sequenziamento molecolare di diverse sequenze geniche interspecifiche, per garantire la realizzazione di un'accurata diagnosi. Ancora una volta, i risultati dell'identificazione del ceppo hanno evidenziato che *Alternaria solani* è presente in uno solo dei campioni infetti, mentre *Alternaria alternata* risulta maggiormente diffusa. Inoltre, è stata confermata la presenza di *A. tenuissima* e di *A. arborescens*, entrambe in uno specifico campione. È importante ancora una volta sottolineare come non sia stata rintracciata *Alternaria tomatofila*.

Azienda	Organo analizzato	Sintomi osservati	Isolato
Az1	foglia	necrosi fogliari + necrosi circolari su foglia	<b>Alternaria alternata + Alternaria solani + Didymella spp.</b>
Az1	foglia	necrosi fogliari	<b>Didymella spp</b>
Az1	frutto	necrosi circolari su frutto	<b>Alternaria alternata</b>
Az1	foglia	necrosi fogliari	<b>Alternaria tenuissima</b>
Az2	frutto	tacche circolari su frutti	<b>Alternaria arborescens</b>
Az2	frutto	tacche circolari su frutti	<b>Xanthomonas sp.</b>
Az2	frutto	tacche circolari su frutti	<b>Xanthomonas sp.</b>
Az4	frutto	tacche necrotiche su frutto	<b>Xanthomonas sp.</b>
Az4	frutto	tacche necrotiche su frutto	<b>Xanthomonas sp.</b>
Az4	frutto	tacche necrotiche su frutto	<b>Alternaria alternata</b>
Az4	frutto	tacche necrotiche su frutto	<b>Xanthomonas sp.</b>
Az5	frutto	tacche necrotiche su frutto	<b>Alternaria alternata</b>
Az5	foglia	necrosi fogliari	<b>Alternaria alternata</b>
Az5	frutto	marcescenza frutto	<b>Alternaria arborescens</b>
Az6	frutto	tacche necrotiche su frutto	<b>Alternaria alternata</b>
Az6	foglia	necrosi fogliari	<b>Alternaria alternata</b>
Az6	frutto	tacche necrotiche su frutto	<b>Alternaria alternata</b>
Az7	frutto	marcescenza frutto	<b>Alternaria alternata</b>
Az7	frutto	marcescenza frutto	<b>Alternaria alternata</b>

I dati di questi rilievi confermano che il quadro varietale del patogeno è variegato e maggiormente complesso di quanto si riteneva in passato, inoltre spiega come varietà dichiarate come tolleranti ad *A. solani* o *A. alternata* mostrino in certe occasioni sintomi di alternariosi. Infatti, per avere una piena resistenza sarà necessario evitare l'infezione verso tutti i ceppi principali di alternaria.

L'analisi chimica per la rilevazione delle tossine è stata eseguita dal personale di Conserve Italia presso il laboratorio centrale, mediante la tecnologia UHPLC-ORBITRAP. Si tratta di un'analisi ad ampio spettro, con la quale possono essere valutati migliaia di composti, oltre alle principali tossine associate all'alternariosi. Le tossine oggetto delle analisi chimiche sono l'alternariol monomethyl ether (AME), l'acido tenuazonico (TeA), l'Alternariolo (AOH) e la tentossina (TEN), i cui relativi limiti di legge sono riportati in tabella.

Azienda	Organo analizzato	AME (alternariol monomethyl ether)	TeA (Tenuazonic acid)	AOH (Alternariolo)	TEN (Tentoxin)
		limite di legge 5	limite di legge 500	limite di legge 10	
Az1	frutto	/	/	/	3,5
Az3	foglia	/	/	/	27
Az3	foglia	/	/	/	31
Az3	foglia	8,4	/	/	6,5
Az4	frutto	/	163	/	/
Az4	foglia	28	/	/	33
<i>Tabella 1 - Tabella riassuntiva degli isolamenti dei ceppi di alternaria, rinvenuti su campioni di frutti e foglie. Sono riportati solo i campioni che hanno dato un esito positivo.</i>					
Az4	frutto	1	1	1	/
Az4	foglia	8	/	/	51
Az4	frutto	/	2776	/	/
Az4	foglia	8,7	/	/	25
Az4	foglia	/	/	/	16,6
Az5	foglia	/	/	/	14,6
Az5	foglia	/	/	/	8
Az6	frutto	4,5	752	31	/
Az6	foglia	/	/	/	2
Az6	foglia	/	/	/	12,1
Az7	foglia	/	/	/	34
Az7	foglia	/	/	/	39

*Tabella 2 - Tabella riassuntiva delle analisi chimiche sulle tossine da alternariosi condotta dal laboratorio di Conserve Italia. Sono stati riportati solamente gli esiti positivi. In rosso le quantità eccedenti i limiti di legge.*

Il personale di Tera Seeds ha prelevato campioni di foglie e bacche, i quali sono stati scorporati per l'esecuzione di singole analisi specifiche, in maniera tale da evidenziare l'eventuale presenza di differenti tossine sulla stessa pianta. In totale, sono state eseguite 40 analisi chimiche, da 28 differenti coltivazioni varietali, distribuite in 9 appezzamenti. I risultati dei saggi chimici mostrano l'assenza di residui di tossine rilevabili su 20 campioni, mentre evidenziano la presenza di differenti tossine sui restanti 20. Di questi, quasi tutti presentano tossine in quantità che eccede il valore consentito.

Una distinzione emerge tra i campioni fogliari e delle bacche, e conferma che la tossina Tentoxin si rinviene solo nelle foglie. Questo importante indizio può indicare una metodologia per valutare la presenza di un'infezione fogliare da alternaria in corso mediante un saggio chimico.

Come per lo scorso anno, abbiamo osservato che la distribuzione geografica dei ceppi è ubiquitaria. Inoltre, non si notano associazioni tra specie di alternaria e località. Al momento non possiamo stabilire se la presenza di tossine sia legata specificamente ad una sola specie di alternaria. Possiamo infine evidenziare come alcuni campioni, nonostante una diagnosi visiva e biochimica di infezione da alternaria, non abbiano sviluppato tossine al suo interno. Si tratta di un indizio che, se verificato con ulteriori prove nelle annate future, potrebbe indicare come alcune varietà non solo presentino sintomi fogliari attenuati ma anche un minor rischio di avere tossine nei frutti.

Uno dei principali obiettivi di questo progetto sta nell'identificare dei genotipi resistenti ad *A. solani* e/o *A. alternata*, i due ceppi più diffusi, e successivamente individuarne le regioni cromosomiche responsabili. Sono stati realizzati test di infezione artificiale, sfruttando le competenze del personale del CREA di Pontecagnano, che da anni è attivo nella validazione e nel perfezionamento di un efficace e ripetibile saggio in vivo impiegando ceppi vigorizzati di Alternaria.



Figura 1 - Test di inoculazione artificiale in serra e realizzazione della camera umida.

In totale, sono stati valutati cinque diversi genotipi ibridi utilizzando tre differenti protocolli di inoculazione artificiale, in laboratorio su foglie staccate in vitro ed in serra creando un'apposita camera umida.

Le piante di pomodoro da testare sono state seminate in serra non climatizzata; successivamente, sono state raccolte fogliole prelevate dalla terza/quarta foglia vera sulle quali è stata eseguita inoculazione con un tassello di micelio di 5 mm. Le foglie inoculate sono state incubate in piastre Petri sterili in fitotrone a 23°C e alternanza luce/buio. I rilievi sono stati eseguiti a una settimana dall'inoculazione, misurando il diametro maggiore della lesione necrotica. Il risultato del saggio di inoculazione eseguiti con l'isolato di *A. solani* 1365.2 su foglia staccata, espresso come media di 30 fogliole, evidenzia che i campioni Syraz e Milbech presentano una maggiore tolleranza al patogeno. Comportamento intermedio è rilevato in Mascali mentre le varietà Rulander, 20T6309 e Kerner risultano fortemente sensibili. Tuttavia, la presenza di micelio fungino è stata comunque significativa in tutti i campioni valutati.

Sulle medesime piante allevate in serra è stato eseguito un saggio mediante inoculazione con un tassello di micelio di 5 mm, realizzando una camera umida con umidità relativa prossima al 90%. Anche

in questo caso, i rilievi sono stati eseguiti dopo sette giorni misurando i millimetri di diametro delle tacche circolari necrotiche. I risultati spiegano come le tacche necrotiche in ciascun campione analizzato siano superiori ai 10mm di diametro. Nessuno dei cinque genotipi saggiati è stato in grado di impedire la proliferazione del micelio fungino. Di fronte all'aggressività di questo test in vivo, eventuali meccanismi di tolleranza è possibile che vengano facilmente abbattuti e superati.

Possiamo quindi confermare l'efficacia e l'attuale affidabilità dei protocolli di infezione, dal momento che l'*Alternaria* ha sviluppato micelio in ciascuna delle tesi analizzate. Questo test verrà ripetuto in serra nel 2025. Non è stato possibile rilevare una significativa variabilità del grado di infezione per nessuno dei 3 protocolli impiegati, eccetto che per il metodo delle foglie staccate. Tuttavia, la presenza di micelio fungino su ogni campione conferma la suscettibilità di tutti i genotipi analizzati.



Figura 2 - Lesione su foglia staccata in vitro causata da *A. solani*.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'anno 2023, il personale di Tera Seeds ha realizzato 14 nuovi ibridi. Sono state selezionate ed impiegate come parentale le migliori linee aventi genetiche di tolleranza all'alternariosi. Nel corso dell'anno 2025, verrà valutato in pieno campo il grado effettivo di resistenza.

## CONCLUSIONI

In seguito alle molteplici analisi di fitopatologia è emerso come nell'areale emiliano-romagnolo nel 2024 siano presenti svariati patogeni del pomodoro da industria e tra questi diversi ceppi di *alternaria*. I risultati dell'identificazione del ceppo hanno evidenziato che *Alternaria solani* è presente in uno solo dei campioni visivamente classificati come infetti, mentre *Alternaria alternata* risulta maggiormente diffusa.

Possiamo evidenziare come alcuni campioni, nonostante una diagnosi visiva e biochimica di infezione da *alternaria*, non abbiano però sviluppato tossine al suo interno. Si tratta di un indizio che, se verificato con ulteriori prove nelle annate future, potrebbe indicare come alcune varietà non solo presentino sintomi fogliari attenuati ma anche un minor rischio di avere tossine nei frutti.

Sono state individuate tossine da *alternariosi* in 7 campi su 8, ma solamente in 3 viene superato il livello consentito per legge.

I risultati dei test di infezione artificiale e la successiva combinazione con i rilievi di campo confermano che al momento non possiamo considerare nessuna delle varietà oggetto delle analisi come efficacemente resistente.

Questi risultati pongono le basi per ampliare il lavoro nelle prossime annate dove cercheremo delle conferme in merito ai ceppi diffusi in Emilia-Romagna, alla loro relazione con le tossine, all'assenza di tali tossine nelle varietà di Tera Seeds e alla relazione tra test artificiale e infezione in campo.

L'*alternaria* rimane una delle principali piaghe per i produttori di pomodoro e per l'industria, dal momento che le tossine prodotte dal fungo rappresentano un concreto pericolo per il consumatore. Questo progetto proseguirà nel 2025 con l'obiettivo primario di sviluppare varietà di pomodoro in grado di garantire un controllo efficace del patogeno, azzerando i quantitativi di tossine prodotte. L'esistenza di una o più fonti di resistenza genetica verso i vari ceppi di *alternaria* permetterebbe il mappaggio

genico, ed il futuro sviluppo di marcatori molecolari in grado di fornire un fondamentale supporto al breeding per lo sviluppo di varietà resistenti.

Inoltre, in collaborazione con il dipartimento di chimica dell'Università di Parma e con Conserve Italia, verrà realizzato lo studio di un modello previsionale basato sull'impiego di naso elettronico. Si tratta di uno strumento analitico avanzato in grado di rilevare e qualificare una molecola volatile presente anche a bassissime concentrazioni. Lo sviluppo di un modello analitico efficace in grado di correlare con la presenza di tossine da alternariosi potrebbe rappresentare per l'industria un potente e rapido strumento di discriminazione dei lotti di pomodoro in ingresso.