

---

***Alma Mater Studiorum***  
**Università di Bologna**

---

**Dottorato di Ricerca in Patologia Vegetale - AGR12**

**XX Ciclo**

**Facoltà di Agraria**

**Dipartimento di Protezione e Valorizzazione  
Agroalimentare**

**Tesi per il conseguimento del titolo**

**MEZZI INNOVATIVI NELLA DIFESA DELLE  
CUCURBITACEE DA *FUSARIUM SOLANI*  
F.SP. *CUCURBITAE***

**PRESENTATA DA:**

**Dott. Cristian Sigala  
Roberti**

**RELATORE:**

**Dott.ssa Roberta**

**COORDINATORE:**

**Prof. Paolo Bertolini**

**Parole chiave: *Fusarium solani* – zucchini – lotta biologica –  
funghi e batteri antagonisti**

---

**ESAME FINALE ANNO 2008**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>4</b>
<b>Capitolo 1- INTRODUZIONE</b>	
<b>1.1 LE CUCURBITACEE</b>	<b>8</b>
<b>1.2 LO ZUCCHINO</b>	<b>9</b>
1.2.1 Caratteristiche botaniche	9
1.2.2 Caratteristiche colturali	9
1.2.3 Investimenti e produzione	11
<b>1.3 LE MALATTIE FUNGINE DELLO ZUCCHINO</b>	<b>14</b>
<b>1.4 <i>FUSARIUM SOLANI</i></b>	<b>16</b>
1.4.1 Descrizione del fungo	16
1.4.2 Sintomi e ciclo della malattia	17
<b>1.5 LOTTA ALLE MALATTIE DELLE PIANTE</b>	<b>20</b>
<b>1.6 LOTTA BIOLOGICA ALLE MALATTIE DELLE PIANTE</b>	<b>23</b>
1.6.1 Meccanismi d'azione degli antagonisti	25
1.6.2 <i>Trichoderma</i>	35
1.6.3 <i>Pseudomonas</i>	36
1.6.4 <i>Streptomyces</i>	38
<b>1.7 FORMULATI BIOLOGICI</b>	<b>40</b>
<b>1.8 SCOPO DELLA TESI</b>	<b>46</b>
<b>Capitolo 2-MATERIALI E METODI</b>	
<b>2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEL PATOGENO</b>	<b>47</b>
<b>2.2 CARATTERIZZAZIONE MORFO-FISIOLOGICA DEGLI ISOLATI DEL PATOGENO</b>	<b>51</b>

2.2.1 Ottenimento colture monosporiche del patogeno	51
2.2.2 Crescita su PDA	52
2.2.3 Crescita su CLPDA	52
2.2.4 Patogenicità dei venti ceppi su zuccino	53
2.2.5 Enzimi di patogenesi	55
2.3 ATTIVITÀ DI PRODOTTI BIOLOGICI SULLA MALATTIA	60
2.3.1 Esperimento 1 e 2	62
2.3.2 Esperimento 3 e 4	63
2.4 MODALITÀ D'AZIONE DI MICRORGANISMI CONTENUTI NEI FORMULATI BIOLOGICI	66
2.4.1 Inibizione della crescita del patogeno e colonizzazione del substrato da parte dell'antagonista	66
2.4.2. Antibiosi	67
2.4.3 Competenza rizosferica ed endofitismo	69
2.4.4 Elaborazione dei dati	70
<b>Capitolo 3-RISULTATI</b>	
3.1 ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DEL PATOGENO	72
3.2 CARATTERIZZAZIONE MORFO-FISIOLOGICA DEGLI ISOLATI DEL PATOGENO	78
3.2.1 Crescita di venti ceppi del patogeno su PDA	79
3.2.2 Crescita di venti ceppi del patogeno su CLPDA	82
3.2.3 Patogenicità dei venti ceppi su zuccino	89
3.2.4 Enzimi di patogenesi	91

<b>3.3 ATTIVITÀ DI PRODOTTI BIOLOGICI SULLA MALATTIA</b>	<b>94</b>
<b>3.3.1 Esperimento 1</b>	<b>95</b>
<b>3.3.2 Esperimento 2</b>	<b>97</b>
<b>3.3.3 Esperimento 3</b>	<b>98</b>
<b>3.3.4 Esperimento 4</b>	<b>100</b>
<b>3.4 MODALITÀ D'AZIONE DI MICRORGANISMI CONTENUTI NEI FORMULATI BIOLOGICI</b>	<b>103</b>
<b>3.4.1 Inibizione della crescita del patogeno</b>	<b>103</b>
<b>3.4.2 Colonizzazione del substrato da parte dell'antagonista</b>	<b>106</b>
<b>3.4.3 Antibiosi</b>	<b>107</b>
<b>3.4.4 Competenza rizosferica ed endofitismo</b>	<b>108</b>
 <b>Capitolo 4-DISCUSSIONE</b>	 <b>110</b>
 <b>BIBLIOGRAFIA</b>	 <b>115</b>

## RIASSUNTO

Lo studio “Lotta biologica a *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* su zucchini” si colloca nell’ambito della difesa integrata delle colture orticole dalle fitopatie fungine, in particolare quelle causate da patogeni ad *habitat* terricolo nei confronti dei quali è sempre più frequente il ricorso a mezzi di lotta diversi dai prodotti chimici.

Interessante e innovativa appare la prospettiva di utilizzare microrganismi adatti a svilupparsi nel suolo, competenti per la rizosfera delle piante e con spiccate caratteristiche d’antagonismo verso i patogeni tellurici e di stimolazione delle difese sistemiche della pianta.

Il marciume del colletto delle cucurbitacee, causato da diversi patogeni tra cui *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae*, rappresenta la principale malattia fungina di tipo tellurica che colpisce lo zucchini ed il melone nella Pianura Padana e che può portare a consistenti perdite produttive. Indagini condotte dal 2004 da parte del Diproval nell’areale bolognese, hanno evidenziato un’elevata frequenza del patogeno su zucchini coltivato soprattutto in tunnel.

Considerata la carenza di conoscenze locali di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* e di mezzi chimici di lotta efficaci, la ricerca svolta ha inteso approfondire la diagnosi della malattia e le caratteristiche biologiche degli isolati locali, e valutare la possibilità di utilizzare metodi biologici di lotta contro questo patogeno, nonché di studiare alcune delle possibili modalità d’azione di microrganismi antagonisti.

Sono state pertanto prelevate, da zone diverse del Bolognese, campioni di piante di zucchini che presentavano sintomi di marciume del colletto ed è stato isolato il patogeno, che in base alle caratteristiche morfologiche macro e microscopiche, alle prove di patogenicità su diversi ospiti e a saggi biomolecolari, è stato identificato come *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* W.C. Snyder & H.N. Hansen razza 1.

Dagli isolati di campo sono state realizzate un centinaio di colture monosporiche venti delle quali sono state utilizzate per la prosecuzione delle prove.

I venti ceppi sono stati saggiati per la loro patogenicità inoculandoli in terriccio sterile e con trapianto di giovani piante di zuccino. E' risultata un'elevata variabilità del livello di virulenza tra i ceppi, stimata da 39% a 83% riguardo la gravità della malattia e da 61 a 96% per la frequenza di malattia. Sono state condotte prove di accrescimento miceliare che hanno evidenziato differenze tra i ceppi e tra gli esperimenti condotti a tre diverse temperature (17, 23 e 28°C) alla luce ed al buio. La crescita maggiore complessivamente è stata ottenuta a 23°C. I venti ceppi hanno anche mostrato di produrre, *in vitro*, vari livelli di enzimi di patogenesi quali cellulasi, poligalatturonasi, pectin liasi e proteasi. E' stata evidenziata un'an correlazione significativa tra attività cellulasica e pectin liasica con frequenza e gravità della malattia dei venti ceppi del patogeno.

Le prove relative al contenimento della malattia sono state condotte in cella climatica. Sono stati considerati prodotti commerciali (Remedier, Rootshield, Cedomon, Mycostop, Proradix, Clonotry) a base rispettivamente dei seguenti microrganismi: *Trichoderma harzianum* ICC012 + *T. viride* ICC080, *T. harzianum* T22, *Pseudomonas chlororaphis* MA342, *Streptomyces griseoviridis* K61, *P. fluorescens proradix* DSM13134 e *T. harzianum* + *Clonostachys rosea*). I prodotti sono stati somministrati sul seme, al terreno e su seme+terreno (esperimenti 1 e 2) e in vivaio, al trapianto e vivaio+trapianto (esperimenti 3 e 4), riproducendo situazioni di pratico impiego. L'inoculazione del patogeno (un ceppo ad elevata patogenicità, Fs7 ed uno a bassa patogenicità, Fs37) è stata effettuata nel terreno distribuendo uno sfarinato secco di semi di miglio e cereali colonizzati dal patogeno. La malattia è stata valutata come intensità e gravità. I prodotti sono stati impiegati in situazioni di particolare stress, avendo favorito particolarmente la crescita del patogeno. Complessivamente i risultati hanno evidenziato effetti di

contenimento maggiore della malattia nel caso del ceppo Fs37, meno virulento. La malattia è stata ridotta quasi sempre da tutti i formulati e quello che l'ha ridotta maggiormente è stato Cedomon. Il contenimento della malattia somministrando i prodotti solo nel terreno di semina o di trapianto è stato in generale quello più basso. Il contenimento più elevato è stato ottenuto con la combinazione di due tipologie di trattamento, seme+terreno e vivaio+trapianto. Le differenze tra i prodotti sono risultate più evidenti nel caso del ceppo Fs7.

Per quanto riguarda lo studio di alcune delle modalità d'azione dei microrganismi contenuti nei formulati più efficaci, è stato verificato che tutti sono stati in grado di inibire, se pur in vario modo, la crescita del patogeno *in vitro*. Gli antagonisti più efficaci sono stati *S. griseoviridis* K61 (Mycostop) e *P. fluorescens proradix* DSM13134). I ceppi di *Trichoderma*, ed in particolare *T.harzianum* T22 (Rootshield), sono risultati i più attivi colonizzatori del substrato. Riguardo il fenomeno dell'antibiosi, il batterio *P. fluorescens proradix* DSM13134 ha mostrato di produrre i metaboliti non volatili più efficaci nel ridurre lo sviluppo del patogeno. Nelle condizioni sperimentali adottate anche i due ceppi di *T. viride* ICC080 e *T. harzianum* ICC012 hanno dimostrato di produrre metaboliti efficaci. Tali risultati, anche se relativi a prove *in vitro*, possono contribuire alla comprensione dei meccanismi dei microrganismi sul contenimento dell'infezione relativamente al rapporto diretto sul patogeno. E' stato inoltre verificato che tutti i microrganismi saggiati sono dotati di competenza rizosferica e solo i batteri di endofitismo.

Si conclude che, nonostante l'elevata pressione infettiva del patogeno che ha certamente influito negativamente sull'efficacia dei microrganismi studiati, i microrganismi antagonisti possono avere un ruolo nel ridurre l'infezione di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* razza 1.

# **Capitolo 1**

## **INTRODUZIONE**

## 1.1 LE CUCURBITACEE

Alla famiglia delle *Cucurbitaceae* appartengono circa 760 specie, diffuse sia nel Vecchio che nel Nuovo Continente. Un'importante caratteristica anatomica è rappresentata dai fasci fibrovascolari del fusto che sono di tipo bicollaterale, provvisti cioè di 2 zone floematiche, l'una interna e l'altra esterna al legno. Le foglie sono prive di stipole e mostrano una disposizione alterna o spiralata; all'ascella delle foglie sono frequenti i cirri, che consentono un saldo ancoraggio ai tutori spesso impiegati ad es. per cetriolo. I fiori, generalmente sono unisessuali e attinomorfi, per lo più tetraciclici e pentameri ed hanno un calice di 5 sepali, saldati alla base, e una corolla normalmente simpetala, di 5 elementi separati da 5 profondi lobi. I fiori maschili possiedono 5 stami che a volte risultano saldati per i filamenti e perfino per le antere. Il fiore maschile può conservare i rudimenti del gineceo. Quest'ultimo, nel fiore femminile, è formato da 3 carpelli saldati in un ovario triloculare incluso nel ricettacolo e pertanto nettamente infero.

Il frutto è una particolare bacca detta peponide. L'impollinazione è entomofila.

Le Cucurbitacee più importanti dal punto di vista economico sono:

- cocomero (*Citrullus lanatus*)
- cetriolo (*Cucumis sativus*)
- melone (*Cucumis melo*)
- zucchini (*Cucurbita pepo*)
- zucca (*Cucurbita maxima*)

## **1.2 LO ZUCCHINO**

### **1.2.1 Caratteristiche botaniche**

Lo zucchini è una pianta erbacea annuale con apparato radicale fittonante che può raggiungere anche un metro e mezzo di profondità. Ha portamento eretto, cespuglioso oppure strisciante, lo stelo è robusto con ramificazioni più o meno numerose ed allungate, i piccioli sono cavi, pungenti e fragili e le foglie hanno lamina ampia con 3-7 lobi arrotondati.

Lo zucchini è una pianta monoica con fiori situati all'ascella delle foglie. I fiori presentano un calice a cupola, gamosepalo, con 5 denti allungati e sottili e una corolla campanulata imbutiforme. Il rapporto tra fiori maschili e femminili è un carattere varietale, pur essendo influenzato dalle condizioni ambientali e di coltivazione: ad esempio temperature elevate e giorno lungo aumentano la produzione dei fiori maschili, al contrario, temperature basse e giorno corto sbilanciano il rapporto a favore dei fiori femminili. Lo zucchini è una specie allogama a impollinazione entomofila. Il frutto è un peponide variabile secondo la cultivar per forma, colore, maculato o striato. L'epicarpo è sottile più o meno liscio; la polpa è bianca senza cavità centrale.

### **1.2.2 Caratteristiche colturali**

Lo zucchini, originario dell'America centro settentrionale, ha elevate esigenze termiche che nei nostri ambienti si verificano nel periodo primaverile-estivo. Anche la disponibilità idrica è un fattore produttivo fondamentale, infatti nei periodi più caldi risultano indispensabili interventi irrigui.

La coltura, pur adattandosi a molti tipi di terreno, predilige quelli a medio impasto, profondi, freschi, fertili, ricchi di sostanza organica, senza ristagni idrici, con pH compreso tra 5,8 e 7 e tollera scarsamente la salinità.

Lo zucchini è una tipica coltura da rinnovo che apre la rotazione, spesso succede a orticole con raccolta autunnale e può essere coltivata anche come coltura intercalare estiva, dopo la raccolta di un cereale.

E' sconsigliabile ripetere la coltura sullo stesso terreno prima di 3-4 anni o coltivarla dopo Solanacee o altre specie appartenenti alla famiglia delle Cucurbitacee, perché sarebbero facilitati gli attacchi di patogeni fungini, nematodi e insetti.

Lo zucchini può essere coltivato sia in pieno campo che in coltura protetta a seconda delle aree climatiche di produzione e di specializzazione colturale. La coltivazione in tunnel o serra è praticata per ottenere il prodotto anche fuori stagione. Sia in pieno campo che in coltura protetta, è diffusa la pratica della pacciamatura, eseguita spesso sulla fila con l'impiego di film pacciamante in polietilene della larghezza di circa centodieci-centoventi centimetri; questi film plastici in genere possono essere di tre tipi: trasparenti, fumè e neri. I film neri non permettono il passaggio della luce impedendo così lo sviluppo delle erbe infestanti.

Lo zucchini può essere seminato direttamente in campo ma è consigliabile il trapianto. I vantaggi della semina diretta consistono in uno sviluppo più profondo dell'apparato radicale ottenendo così piante più resistenti ad esempio, ad interventi meccanici, alla siccità, ecc... Il trapianto, invece, permette di ottenere una buona produzione dello zucchini anche in terreni tendenzialmente sciolti, consente di avere più tempo per preparare il terreno per la messa a dimora delle piante e di evitare il diradamento.

La semina diretta si effettua quando le temperature si stabilizzano sui 15°C (all'incirca alla fine di aprile per quanto concerne la regione Emilia-Romagna). Si dispongono circa 2-3 semi a circa 3-5 cm di profondità. Dopo l'emergenza, quando la pianta ha 2-3 foglie vere si procede al dirado in modo tale da lasciare una pianta per buca.

Per il trapianto si utilizzano piantine con 2-3 foglie vere cresciute in alveolari normalmente da 40-60 fori.

Per quanto riguarda i sestri d'impianto, in pieno campo si adotta generalmente la semina a file singole distanti tra loro circa 1 metro, con densità di circa una pianta per metro quadrato e si semina circa 2-3 kg seme/ha (le densità e i sestri d'impianto variano in base alle cultivar).

In coltura protetta lo zucchini viene spesso impiantato a fila binata che ha il vantaggio di agevolare le operazioni colturali della raccolta e di permettere una maggiore densità d'impianto per un migliore sfruttamento dell'appezzamento. Adottando file binate con distanze di 0,6-0,7 metri tra le file della bina e 1,0-1,3 metri tra le bine, si realizzano investimenti che possono arrivare fino a 2 piante a metro quadrato. L'aumento della densità favorisce lo sviluppo in altezza della pianta e rende spesso indispensabile l'adozione di tutori.

Nelle colture in serra o tunnel è importante arieggiare l'ambiente nei periodi più caldi per evitare un'eccessiva umidità che potrebbe ostacolare l'impollinazione e favorire l'insorgenza di malattie; in coltura protetta talvolta sono necessari trattamenti brachizzanti da eseguire nelle prime fasi di sviluppo per ridurre la crescita vegetativa della pianta.

### **1.2.3 Investimenti e produzione**

Le tabelle successive riportano dati ISTAT, aggiornati al 2007, relativi alla superficie investita a zucchini e produzioni nelle varie regioni italiane complessivamente in pieno campo e serra (Tab. 1.1) e solo in serra (Tab. 1.2).

Per quanto riguarda poi la provincia di Bologna, in particolare, la superficie investita è di 4.500 are, la produzione per ara di 4,4 quintali e quella totale di 19.800 quintali.

Tab. 1.1 - Coltivazione e produzione totali di zuccina in Italia.

--- IN PIENO CAMPO E SERRA ---			
Province e regioni	Superficie totale (are)	Produzione in quintali per ara	Produzione totale in quintali
PIEMONTE	1.504,52	206,8	311.104
LOMBARDIA	458,98	289,9	133.081
Trento	17,5	254,3	4.450
TRENTINO ALTO ADIGE	17,5	254,3	4.450
VENETO	1.239,90	306,9	380.584
FRIULI-VENEZIA GIULIA	71,5	204,5	14.620
LIGURIA	141,5	357,5	50.582
EMILIA-ROMAGNA	1.294,30	231,9	300.170
TOSCANA	558,42	224,5	125.355
UMBRIA	4,9	320,4	1.570
MARCHE	368,55	272,7	100.518
LAZIO	2.781,50	536,7	1.492.898
ABRUZZO	310,8	303,2	94.246
CAMPANIA	1.068,50	272,8	291.449
PUGLIA	1.702,00	207,6	353.400
BASILICATA	150	115,4	17.316
CALABRIA	1.429,60	275,3	393.561
SICILIA	3.096,48	399,6	1.237.474
SARDEGNA	335,46	203,2	68.161
ITALIA	16.534,41	324,8	5.370.539
Nord	4.728,20	252,7	1.194.591
Centro	3.713,37	463,3	1.720.341
Meridione	8.092,84	303,4	2.455.607

Tab. 1.2 – Coltivazione e produzione di zuccina in Italia, in serra.

--- IN SERRA---			
Province e regioni	Superficie totale (are)	Produzione in quintali per ara	Produzione totale in quintali
PIEMONTE	9.452	4,8	45.811
LOMBARDIA	2.798	7,6	21.273
Trento	150	3	450
TRENTINO ALTO ADIGE	150	3	450
VENETO	25.090	4	100.074
FRIULI-VENEZIA GIULIA	1.350	2,5	3.330
LIGURIA	1.750	7,4	13.000
EMILIA-ROMAGNA	7.330	4,3	31.770
TOSCANA	5.842	2,9	17.167
UMBRIA	90	5	450
MARCHE	555	3,2	1.766
LAZIO	144.350	7	1.009.673
ABRUZZO	980	4,1	4.046
CAMPANIA	27.750	3	83.780
PUGLIA	5.200	3,3	17.400
CALABRIA	6.860	2,5	17.465
SICILIA	32.348	16,5	534.240
SARDEGNA	2.246	9,8	21.972
ITALIA	274.141	7	1.923.667
Nord	47.920	4,5	215.708
Centro	150.837	6,8	1.029.056
Meridione	75.384	9	678.903

### 1.3 LE MALATTIE FUNGINE DELLO ZUCCHINO

Le principali malattie fungine che colpiscono lo zucchini, come tra l'altro tutte le cucurbitacee, sono peronospora, oidio, botrite, sclerotinia e marciumi basali a varia eziologia.

#### Peronospora (*Pseudoperonospora cubensis*)

Si presenta con sintomi sulle foglie ove compaiono inizialmente delle aree traslucide e oleose ampie circa uno o due centimetri, a contorni angolosi, che vanno rapidamente incontro a ingiallimento e a disseccamento, assumendo un colore brunastro. La compromissione dell'apparato fogliare comporta conseguenze dello sviluppo dei frutti. L'attacco di peronospora può provocare aborto florale e arresto dello sviluppo vegetativo.

Questa malattia compare solitamente durante il periodo estivo caratterizzato da periodi molto umidi con temperature comprese tra i 10° e i 30° C. In queste condizioni, ottimali per lo sviluppo della malattia, gli sporangi del patogeno producono le zoospore che, in presenza di un sottile velo di acqua, sono in grado di muoversi, germinare e penetrare rapidamente nelle foglie attraverso le aperture stomatiche. Il periodo di incubazione dura 4-5 giorni, al termine dei quali fanno la loro comparsa nella pagina inferiore della foglia i nuovi sporangi. La conservazione nei periodi sfavorevoli è assicurata dalle oospore.

#### Oidio o mal bianco (*Erysiphe cichoracearum* e *Sphaerotheca fuliginea*)

Può interessare tutte le parti verdi della pianta frutti compresi. I primi sintomi compaiono di norma sulla pagina inferiore delle foglie sottoforma di chiazze biancastre, polverulente, che in seguito tendono ad allargarsi e ad interessare gran parte della superficie fogliare. In caso di forte attacco le foglie colpite ingialliscono e disseccano.

Sverna nei residui di vegetali infetti o sulla vegetazione spontanea come foma miceliale o sessuata. Le condizioni ottimali di crescita sono il 70% di umidità e 26°C. In pieno campo le infezioni si sviluppano per lo più da giugno a ottobre.

### Botrite o muffa grigia (*Botrytis cinerea*)

L'infezione riguarda i frutti che vengono ricoperti da un soffice feltro miceliale grigiastro, mentre i sottostanti tessuti assumono un colore brunastro e vanno incontro a marciume molle. Le infezioni si verificano soprattutto in serra dove sono favorite da un'eccessiva umidità dell'ambiente (90%), e da temperature comprese tra i 20°-25°C. La diffusione sui frutti è favorita dalla presenza di residui fiorali infetti. La conservazione durante il periodo invernale può avvenire come micelio o sclerozi.

### Sclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*)

La malattia interessa soprattutto fusti e frutti e può comparire anche dopo la raccolta su frutti conservati in ambienti umidi e poco areati. Si manifesta con una certa frequenza nelle serre non adeguatamente arieggiate allorché la temperatura rimane inferiore ai 20°C per alcuni giorni consecutivi.

Il patogeno responsabile della malattia vive nel terreno dove può conservarsi allo stato latente anche per diversi anni sotto forma di sclerozi.

### Collasso delle cucurbitacee

Si tratta di una sindrome causata da un complesso di microrganismi presenti singolarmente e talvolta simultaneamente. Tra questi quelli che ultimamente sono stati ritrovati più frequentemente sono *Monosporascus cannonballus*, *Rhizopycnis vagum* e *Acremonium cucurbitacearum*. La sintomatologia non è specifica, infatti i sintomi possono essere confusi con quelli causati da altri patogeni, ed è pertanto necessario avvalersi di strumenti di laboratorio per una diagnosi corretta. I sintomi si manifestano circa 2-3 settimane prima della raccolta, in corrispondenza di temperature elevate. Le piante mostrano un anticipato ingiallimento delle foglie, seguito da un rapido collasso. Tali sintomi sono la conseguenza di alterazioni dell'apparato radicale che appare di dimensioni ridotte, con capillizio marcescente, mentre le radici più grandi mostrano zone necrotiche bruno-nerastre intervallate a zone di tessuto sano.

Il precoce collasso delle piante impedisce una corretta maturazione dei frutti.

Marciume pedale o del colletto (*Fusarium solani*)

Essendo argomento di tesi il patogeno e la malattia da esso causata verranno di seguito illustrati più dettagliatamente.

## 1.4 *FUSARIUM SOLANI*

### 1.4.1 Descrizione del fungo

*Fusarium solani* Snyder & Hans. è la forma anamorfa del fungo ascomicete *Nectria haematococca* Berk. & Br. Appartiene alla sezione 12. Martiella-Ventricosum delle specie di *Fusarium* secondo la chiave di Nelson *et al.* (1983). Sono state descritte una ventina di diverse forme speciali tra cui quella oggetto della presente tesi: *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* W.C. Snyder & H.N. Hansen (Booth, 1971).

#### Aspetti microscopici

*F. solani* produce macro- e microconidi. I microconidi, presenti più o meno abbondantemente, sono in genere unicellulari di forma da ovale a reniforme, molto simili morfologicamente a quelli di *F. oxysporum*, ma più larghi e con parete cellulare più spessa. I macroconidi sono abbondanti, con parete spessa e generalmente cilindrici con le superfici dorsali e ventrali parallele per la maggior parte della loro lunghezza. La cellula apicale è smussata e la cellula basale arrotondata e a volte a forma di piede o incavata.

I conidiofori sono formati da monofialidi ramificate o non ramificate. Le monofialidi che sorreggono i microconidi sono lunghe se paragonate a quelle di *F. oxysporum*. Le clamidospore sono presenti singolarmente o in coppia.

La forma ascofora di questo fungo, rappresentata dall'Ascomicete *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*, è assai rara in natura.

#### Morfologia colonia

su PDA la crescita è rapida, spesso con abbondante micelio aereo. La superficie si copre velocemente di sporodochi confluenti che conferiscono alla colonia vari colori, crema, beige, grigio verde o blu. Alcuni ceppi presentano la superficie color porpora scuro. Sotto la superficie il substrato è generalmente incolore, ma alcuni ceppi producono pigmenti color viola scuro.

*F. solani* è stabile in coltura su PDA, anche se talvolta il micelio può mutare presentandosi incolore, con abbondante micelio aereo e assenza di sporodochi.

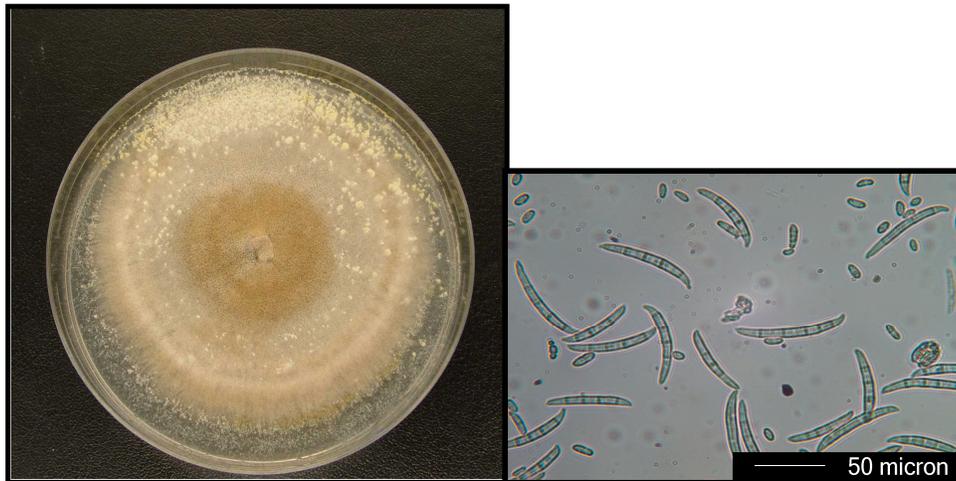


Foto 1.1 - Colonia di un isolato di *Fusarium solani* su PDA, macro e micro conidi al microscopio ottico 300x. (Foto R. Roberti e C. Sigala)

#### Distribuzione e diffusione

*F. solani* è diffuso in tutto il mondo ed è stato isolato da una grande varietà di piante ed anche da tessuti animali e umani. La principale diffusione del patogeno avviene attraverso il terreno infetto, anche se può essere trasmesso attraverso il seme.

#### **1.4.2 Sintomi e ciclo della malattia**

Il marciume pedale delle cucurbitacee è causato dal *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* (W.C. Snyder & H. N. Hansen) che, in natura, è presente con due differenti razze patogeniche che aggrediscono in vario modo le diverse parti delle cucurbitacee sensibili (zucchino, zucca, melone e cocomero). Nel caso di infezioni prodotte dalla razza 1 i danni si evidenziano prevalentemente nella zona del colletto e sulle radici ed in rari casi il frutto, mentre la razza 2 colpisce solo i frutti. Le piante attaccate da *F. solani* f.sp. *cucurbitae* razza 1 mostrano progressivi fenomeni di

marcescenza delle radici e della base del fusto che portano ad una completa degradazione dell'apparato radicale ed all'ingiallimento e avvizzimento dell'apparato aereo.

La malattia è stata descritta per la prima volta in Sud Africa nel 1932 ed ora è diffusa in vari Paesi (Zitter *et al.* 1996) ed anche in Italia (Vannacci e Gambogi, 1980; Fantino *et al.*, 1989; Stravato e Cappelli, 1996; Vitale *et al.*, 2007). I primi sintomi della malattia in campo consistono in un avvizzimento delle foglie ed un collasso veloce, in pochi giorni, dell'intera pianta, che poi muore. Rimuovendo il terreno dalla parte basale della pianta appare evidente un'area necrotica e marcescente. Il marciume si presenta inizialmente come un'area decolorata e vitrea che progressivamente si imbrunisce. Con il procedere della malattia i tessuti del colletto tendono a lacerarsi e a distaccarsi anche in profondità senza però interessare le fibre vascolari.



Foto 1.2 – Sintomi di marciume pedale dello zucchini causato da *Fusarium solani* in una serra oggetto dello studio, in provincia di Bologna. Sono ben evidenti gli avvizzimenti delle piante. (Foto R. Roberti)

Le piante infette si rompono facilmente a 2-4 cm sotto la superficie del terreno. Il fungo è generalmente limitato all'area del colletto della pianta e alla parte superiore della radice, mentre la parte inferiore del fittone va soggetta all'infezione solo nei casi di elevata umidità. Sulle piante infette si sviluppano numerosi macroconidi ammassati in sporodochi che danno

colorazioni tendenti dal bianco e al rosa al micelio presente sul fusto, vicino alla superficie del suolo. I frutti subiscono attacchi a livello della superficie di contatto col suolo e la gravità di tali infezioni dipende dal tipo di terreno (Zitter, 1996).

La conservazione di *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* avviene sia nel suolo che nei semi; su questi ultimi può svilupparsi superficialmente oppure all'interno e conservarsi vitale per oltre due anni. L'infezione del seme può avvenire per penetrazione diretta del patogeno attraverso il frutto malato o per contaminazione del frutto stesso durante le fasi di raccolta e lavorazione. Una volta posto a germinare il seme darà origine ad una plantula che può venire aggredita dal patogeno e morire ancor prima dell'emergenza, soprattutto se le temperature sono basse (Sherf e Macnab, 1986).

#### Misure di prevenzione e di difesa

Per evitare l'insorgenza di questa grave malattia si raccomanda di non reimpiantare cucurbitacee per almeno 2-3 anni in un terreno contaminato e di scegliere varietà poco suscettibili. Per quanto concerne la difesa da questa malattia è fondamentale l'impiego di seme sano o accuratamente conciato con fungicidi efficaci, quali prochloraz e dicarbosimidici (Ponti e Laffi, 2001).

In ambiente protetto in particolare, dove la coltivazione è ripetuta a brevi intervalli di tempo sullo stesso terreno, è indispensabile adottare misure di disinfezione del terreno con mezzi chimici, biologici, o fisici come la solarizzazione (Sherf e Macnab, 1986).

I trattamenti con fumiganti chimici al terreno sarebbero da evitare in quanto, essendo dotati di scarsa selettività, possono causare un vero e proprio vuoto biologico nel terreno che in un secondo tempo potrebbe essere nuovamente e più diffusamente colonizzato da un nuovo patogeno al cui sviluppo non si opporrebbero i naturali competitori biologici.

## **1.5 LOTTA ALLE MALATTIE DELLE PIANTE**

La lotta contro le malattie delle piante, in particolare quelle causate da microrganismi fungini, è basata soprattutto su mezzi di natura chimica in quanto dotati di elevata efficacia, facilità di applicazione e costi in genere contenuti. E' noto tuttavia che un uso eccessivo e non regolamentato di tali prodotti ha avuto ripercussioni negative sull'ambiente e sull'uomo. Alcuni fungicidi, inoltre, comprese nuove molecole sintetizzate dall'industria, sono dotati di meccanismi d'azione specifici e quindi suscettibili di causare l'insorgenza di fenomeni di resistenza nella popolazione del patogeno, che così può diventare in poco tempo insensibile all'azione di un determinato fungicida prima efficace.

Motivazioni di ordine igienico-ambientale hanno quindi portato ad una revisione europea di tutte le molecole chimiche per l'agricoltura e le crescenti restrizioni al loro impiego hanno giustificato in questi ultimi anni la ricerca di mezzi di lotta innovativi e alternativi a quelli chimici tradizionali. Un settore che attualmente risulta carente di prodotti efficaci è quello della difesa dalle malattie causate da patogeni del terreno. Ad esempio un prodotto estremamente efficace contro tali patogeni, nonché su fitofagi ed erbe infestanti, ma non più autorizzato all'impiego in quanto implicato nella distruzione dell'ozono della stratosfera, è il bromuro di metile.

Oggigiorno si aspira ad un'agricoltura sostenibile, ossia alla salvaguardia della salute e dell'economia di una nazione nel presente e nel futuro. Con tale concetto si intende la capacità del sistema agricolo di fornire prodotti alimentari di elevata qualità, sicuri, diversificati, a prezzo moderato e socialmente accettabili, adatti sia alla popolazione di una nazione che all'esportazione, quali fonti di crescita economica. Tale capacità, inoltre deve persistere negli anni a vantaggio delle generazioni successive (Cook, 2000b). La lotta biologica è estremamente coerente con il concetto di

agricoltura sostenibile, in quanto sfrutta al massimo il verificarsi di eventi naturali ad impatto ambientale nullo o comunque ridotto (Cook, 2000b).

La lotta biologica contro le malattie delle piante costituisce pertanto uno strumento alternativo che in Italia, pur con grandi difficoltà, sta cominciando ad avere un certo ruolo sia in piani di difesa integrata che in agricoltura biologica.

## **1.6 LOTTA BIOLOGICA ALLE MALATTIE DELLE PIANTE**

In Patologia vegetale, per lotta biologica si intende “la riduzione della densità di inoculo o delle attività patogeniche del patogeno o del parassita nel suo stato attivo o dormiente, ottenuta attraverso l’impiego di uno o più organismi, sia naturalmente che attraverso manipolazione dell’ambiente, dell’ospite o dell’antagonista od attraverso l’introduzione massale di uno o più organismi” (Baker e Cook, 1974). Nel 1983 gli stessi autori ridefinirono la lotta biologica come “la riduzione dell’inoculo del patogeno o della sua attività per mezzo di uno o più organismi diversi dall’uomo”. In questa definizione vengono inclusi ceppi avirulenti o ipovirulenti dello stesso patogeno, l’ospite reso meno suscettibile attraverso il miglioramento genetico, le tecniche agronomiche e l’attività di microrganismi associati.

Le tecniche di lotta biologica vengono elaborate a partire dall’osservazione degli ambienti naturali, attraverso un accurato studio e l’analisi delle interazioni tra i vari componenti e parametri di un ecosistema e l’individuazione di quei fattori che regolano il naturale contenimento dei patogeni e quindi della malattia da essi provocata. Il contenimento dei patogeni, infatti, è di per sé un evento naturale che sfrutta l’azione degli “antagonisti”, ossia di microrganismi in grado di instaurare rapporti biunivoci con i tre elementi fondamentali dell’evento malattia, patogeno, pianta ospite e ambiente (Matta, 1988).

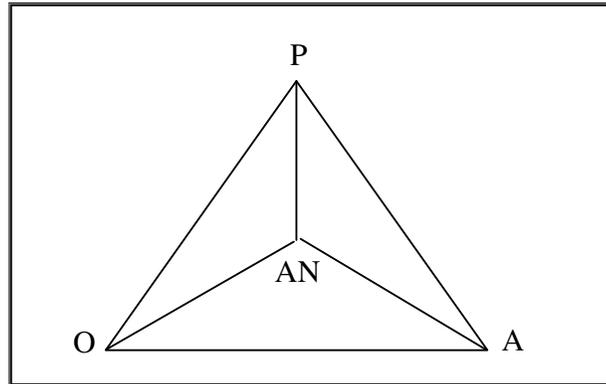


Figura 1.1 - Collocazione degli antagonisti (AN) nell'ambito della rappresentazione schematica del concetto di malattia in cui interagiscono patogeno (P), pianta ospite (O) e ambiente (A).

Nella figura 1.1 è schematizzato il concetto di malattia con il classico triangolo equilatero ai cui vertici sono posizionati la pianta ospite, il patogeno e l'ambiente. Secondo alcuni autori, un quarto componente sarebbe rappresentato dagli antagonisti naturali, mentre per altri, consisterebbe nel fattore tempo in quanto gli antagonisti farebbero parte integrante dell'ambiente (Matta, 1996). Modificando l'uno o l'altro di tali elementi è possibile modificare l'esito della malattia.

Tra le varie strategie indicate da diversi autori per ridurre una malattia in maniera naturale, la diffusione di microrganismi nel terreno, sul seme, sulla fillossera, sulla radice, nonché sul prodotto, rappresenta sicuramente quella più interessante e di facile applicazione. Le ricerche condotte nei decenni passati hanno infatti ripetutamente dimostrato che microrganismi diversi tra loro filogeneticamente possono agire come antagonisti naturali di vari patogeni delle piante (Cook, 2000 a).

Tra i microrganismi antagonisti più noti in letteratura si ricordano ad esempio *Trichoderma*, *Gliocladium* (syn. *Clonostachys*), *Pythium oligandrum*, *Coniothyrium minitans*, tra i funghi, e *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., tra i batteri (Butt *et al.*, 2001; Chet, 1987).

### **1.6.1 Meccanismi d'azione degli antagonisti**

In lotta biologica il contenimento delle malattie delle piante può essere spiegato con le complesse interazioni tra il microrganismo antagonista, il patogeno e la pianta. Si parla di effetti di tipo diretto, quando è il patogeno a subire l'azione diretta dell'antagonista, e di effetti indiretti, quando l'antagonista induce una risposta fisiologica della pianta che si difende dall'attacco del patogeno.

#### Meccanismi diretti

I principali meccanismi di tipo diretto, che sono alla base delle interazioni antagonistiche, comprendono fenomeni di antibiosi, competizione e parassitismo.

#### ***Antibiosi***

L'antibiosi consiste nella produzione di metaboliti secondari, volatili e non, che inibiscono lo sviluppo del patogeno, causandone una ridotta o assente germinazione dei propaguli e ritardo o arresto della crescita dei miceli. Ciò si verifica anche in assenza di un contatto fisico tra i due microrganismi. Dennis e Webster (1971a) furono tra i primi studiosi ad interessarsi del ruolo dei metaboliti nel processo del controllo biologico dei patogeni fungini ed individuaroni composti non volatili nell'estratto di colture cellulari di *Trichoderma* spp.; in particolare identificarono un metabolita denominato "tricodermina". Gli stessi autori, in seguito, rilevarono che alcuni isolati di *Trichoderma* erano in grado di produrre anche sostanze volatili caratterizzate da proprietà antibiotiche e con un caratteristico odore di cocco (Dennis e Webster, 1971b).

Le sostanze ad effetto antibiotico prodotte dagli antagonisti sono di varia natura chimica e sono suddivise in diversi gruppi, di cui i principali per *Trichoderma* e *Gliocladium* sono: Alchilpironi, Isonitrili, Polichetidi, Peptaiboli, Dichetopiperazine, Sesquiterpeni e Steroidi. Molti autori hanno dimostrato che i metaboliti purificati hanno esercitato l'effetto tossico sul patogeno (Howell, 1998).

In alcuni casi è accertato che la produzione di particolari metaboliti è determinante per l'azione biologica: ad esempio mutanti di *T. viride*, che sovraesprimono gliovirina, somministrati al seme di cotone, proteggono le piantine dagli attacchi di *Pythium ultimum* al pari del ceppo selvaggio, mentre quelli che non producono il metabolita non sono in grado di esercitare alcun effetto di biocontrollo (Howell *et al.*, 1993).

I batteri del genere *Streptomyces* sono noti fin dal 1956 (Anderson *et al.*) come forti produttori di metaboliti quali etamicina, viridogriseina e griseoviridina. *S. lydicus* WYEC108 produce metaboliti in grado di inibire la crescita di *Rhizoctonia solani* e *Pythium ultimum* sia *in vitro* che *in vivo* (Yuan e Crawford, 1995). Analisi chimiche dettagliate basate sul fingerprinting metabolico di *S. griseoviridis* ceppo FH-S 1832, hanno evidenziato nuovi metaboliti di cineromicina del tipo B,  $\gamma$ -lattoni e i loro derivati ad anello aperto denominati musacina A-F (Schneider *et al.*, 1996). Sostanze ad azione antibiotica sono prodotte anche dai batteri del genere *Pseudomonas* che hanno interesse nella lotta ai fitopatogeni. *P. chlororaphis* produce 2,3-deepoxy-2,3-didehydro-rhizoxin (DDR) un antibiotico che agisce contro i patogeni impedendo la divisione cellulare (Linser *et al.*, 2006). Haas *et al.* (1990) hanno evidenziato che *P. fluorescens* CHA0 produce importanti metaboliti secondari coinvolti nella riduzione di marciumi radicali del tabacco causati da *Tielaviopsis basicola*. Infatti, mutanti incapaci di produrre acido cianidrico non avevano effetto sulla malattia. L'efficacia di isolati di *P. fluorescens* contro *R. solani* e *Pythium* sp. su riso e peperone rispettivamente è stata messa in relazione con la produzione di siderofori, acido salicilico e acido cianidrico (Muthukumar e Bhaskaran, 2007).

### **Competizione**

Per competizione si intende la capacità di una specie di escludere un'altra attraverso la sua maggior rapidità e/o efficienza nello sfruttamento di una risorsa come ad esempio i nutrienti, l'ossigeno e lo spazio. Si tratta di un

fenomeno considerato molto importante negli equilibri microbiologici, fondamentale nel determinare la densità di popolazione di un organismo.

*Trichoderma*, ad esempio, essendo un efficiente saprofita a crescita molto rapida, è in grado di colonizzare velocemente diversi tipi di substrati e di competere fortemente con diversi patogeni. I fenomeni di competizione fra antagonista e patogeno si realizzano soprattutto a livello della fillosfera dove le quantità di nutrienti e di spazio sono molto più limitate che nel terreno. Ad esempio, nel caso di applicazioni di ceppi selezionati di *Trichoderma* sui grappoli d'uva durante la fioritura, è stato osservato che l'antagonista, colonizzando i tessuti fiorali che diventano man mano senescenti, impedisce al patogeno, *Botrytis cinerea*, di insediarsi successivamente sui frutti e di causare la malattia (Dubos, 1987; Harman *et al.*, 1996).

La competizione si può realizzare anche sul seme relativamente agli essudati prodotti abbondantemente da semi di cotone, mais, lattuga, cipolla, pisello e carota Nelson (1981). L'autore sostiene che la riduzione della germinazione degli sporangi di *P. ultimum* è da attribuire alla competizione per gli essudati seminali da parte di isolati di *Gliocladium* spp. somministrati sui semi.

Diverse forme di competizione sono state osservate nelle piante in corrispondenza delle ferite, che sono facilmente attaccate dai patogeni. Trattamenti a livello dei tagli di potatura con antagonisti fungini hanno permesso di controllare efficacemente alcuni patogeni come *Armillaria luteobubalina* (Nelson *et al.*, 1995) e *Botrytis* (Koning e Köhl, 1995; O'Neill *et al.*, 1996).

Anche la competizione per spazio a livello del rizopiano svolge un ruolo determinante quando *Fusarium* spp. saprofiti occupano i siti d'infezione utilizzati dalle forme patogene vascolari di *Fusarium*, quali le forme speciali di *F. oxysporum* su melone, pomodoro e garofano come è stato verificato in terreni repressivi in Italia e in Francia (Alabouvette, 1986; Garibaldi *et al.*, 1989).

Alla competizione per il ferro viene poi attribuito l'effetto di batteri *Pseudomonas* PGP a livello radicale; tali batteri, infatti, producono i siderofori, dei metaboliti secondari con un'elevata affinità per il  $Fe^{3+}$  (Kloepper *et al.*, 1980).

### ***Micoparassitismo***

Con il termine parassitismo si intende un rapporto di danneggiamento esercitato da un organismo su un altro ed il micoparassitismo è quel fenomeno che si instaura quando un fungo arreca danno ad un altro fungo. Se l'ospite è un parassita il fenomeno si definisce più propriamente iperparassitismo. Gli antagonisti fungini micoparassiti si distinguono in necrotrofi e biotrofi: si parla di parassiti biotrofi quando questi si nutrono di cellule vive dell'ospite, penetrandole tramite gli austori. Si parla invece di parassiti necrotrofi quando essi si nutrono delle cellule dell'ospite solo dopo averle uccise come ad es. *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*. Questi antagonisti avvolgono con le loro ife quelle del patogeno, determinano la lisi delle pareti cellulari dell'ospite e poi penetrano all'interno (Baker, 1987; Chet, 1987). I micoparassiti possono attaccare sia le ife sia gli organi di resistenza quali rizomorfe, clamidospore e sclerozi e, in taluni casi anche i conidi degli oidi, come avviene per *Ampelomyces quisqualis*.

Chet (1990) ha distinto nel processo di iperparassitismo, quattro fasi principali:

1. chemiotropismo, ossia la crescita orientata dell'antagonista in direzione del patogeno in risposta a messaggi chimici emessi da quest'ultimo;
2. riconoscimento, che avviene su base molecolare mediante sostanze presenti sulla parete cellulare dei due microrganismi;
3. attacco e avvolgimento delle ife dell'antagonista intorno a quelle del patogeno;

4. secrezione di enzimi litici, che intervengono nella degradazione della parete cellulare.

Secondo Chet *et al.* (1981), il chemiotropismo è parzialmente dovuto alla conseguente espressione di enzimi degradanti la parete cellulare. La diffusione di un'endochitinasi extracellulare catalizza il rilascio di oligomeri provenienti dalla parete cellulare dei funghi bersaglio, e questo fenomeno subito dopo induce l'espressione di endochitinasi fungitossiche (Brunner *et al.*, 2003) che vengono diffuse e inizia così l'attacco al fungo bersaglio, prima che si sia verificato un vero e proprio contatto fisico (Zeilinger *et al.*, 1999; Viterbo *et al.*, 2002).

I meccanismi di riconoscimento specifico sono necessari nel processo di micoparassitismo per tradurre il potenziale enzimatico dell'antagonista in un efficace contenimento del patogeno parassitizzato. *T. virens*, applicato in trattamenti di semi di cotone, è in grado di contenere gli attacchi di *R. solani* e di *P. ultimum*, ma si comporta da micoparassita solo nei confronti di *R. solani*.

Molti autori hanno riportato che gli antagonisti sono in grado di riconoscere in modo specifico diversi patogeni. Il riconoscimento può avvenire in relazione a stimoli di tipo fisico o chimico. A livello chimico, sono coinvolte le lectine, glicoproteine presenti nella parete cellulare dei microrganismi patogeni, implicate nelle interazioni tra i componenti della superficie cellulare e l'ambiente extracellulare (Barondes, 1981). Elad *et al.* (1983), ha studiato il ruolo delle lectine nell'interazione tra *T. harzianum* e *Rhizoctonia solani* ed ha osservato, in particolare, che sulla parete cellulare di *Trichoderma*, sono presenti dei siti di legame per le lectine prodotte dalla *Rhizoctonia*.

Avvenuto il riconoscimento antagonista-patogeno, segue il contatto tra i due funghi: le specie di *Trichoderma* attaccano il fungo ospite e può seguire la produzione, da parte dell'antagonista, di strutture simili ad uncini, pinze, appressori ed avvolgimenti sulle ife del patogeno (Elad *et al.* 1983; Harman *et al.*, 1981). L'iperparassitismo è stato riscontrato anche

direttamente nel terreno, anche se in misura meno intensa rispetto al vitro (Inbar *et al.*, 1996). Ciò è stato spiegato dagli autori con la diversa concentrazione di nutrienti che supportano la crescita dell'antagonista, che sarebbero minori nel terreno rispetto al *vitro*.

La formazione degli avvolgimenti e degli appressori può anche rappresentare la fase che precede l'inizio dell'attività degli enzimi litici. Diverse specie di *Trichoderma* sono note per la loro abilità a degradare la parete cellulare dei funghi (Baker, 1987; Chet, 1987). Nel processo di degradazione, sono principalmente coinvolti enzimi quali chitinasi, glucanasi e proteasi (Elad *et al.* 1982). Nei siti dove si sono formati gli appressori, possono formarsi dei buchi sulla superficie delle ife del fungo bersaglio, e può avvenire la penetrazione diretta delle ife di *Trichoderma* nel lume della cellula del fungo bersaglio.

Le chitinasi sono gli enzimi deputati alla degradazione della 1,4- $\beta$ -N-acetyl-D-glucosammina, ossia della chitina che è una delle principali componenti della parete cellulare dei funghi. Si distinguono endochitinasi ed esochitinasi in relazione alle loro modalità di attacco della molecola della chitina e ai prodotti liberati (Kubicek e Harman, 1998). Recentemente il sistema chitinolitico di *Trichoderma* è stato studiato in maniera approfondita e alcuni enzimi sono stati caratterizzati a livello biomolecolare (Haran *et al.*, 1996; Harman *et al.*, 1993b; Lorito *et al.*, 1993a, 1994a, e 1996). E' stato osservato che il sistema chitinolitico di *Trichoderma* e *Clonostachys* agisce spesso in associazione con la produzione di altri enzimi litici e di diversi metaboliti tra cui antibiotici e sostanze di autoprotezione. Queste ultime, in particolare, sono state identificate in *Trichoderma*, e si tratta di proteine della parete cellulare, chiamate Quid3, che vengono indotte contemporaneamente con gli enzimi chitinolitici allo scopo di proteggere la parete dall'azione di degradazione degli enzimi stessi (Lora *et al.*, 1994).

Tra gli enzimi implicati nella degradazione della parete cellulare di molti funghi patogeni sono importanti anche le glucanasi, che idrolizzano i

glucani, ossia polimeri del D-glucosio con legami in configurazione  $\alpha$  e/o  $\beta$ . Il sistema glucanolitico di *Trichoderma* e *Clonostachys*, in particolare, è piuttosto complesso, e consiste di eso e endoglucanasi di tipo  $\alpha$  o  $\beta$ , 1,2-, 1,3-, 1,4- o 1,6- a seconda del legame specifico idrolizzato.

Altri enzimi idrolitici coinvolti nel processo del micoparassitismo, anche se in minor misura dei precedenti, sono ad esempio proteasi, amilasi, pectinasi, mannanasi, lipasi e fosfatasi (Benítez *et al.*, 1998).

Tutti i sopra citati meccanismi d'azione diretti degli antagonisti non si escludono a vicenda, ma spesso agiscono insieme per potenziarne l'azione nociva nei confronti dei patogeni. E' infatti stato osservato nel processo di antagonismo che sia l'antibiosi che l'iperparassitismo possono intervenire congiuntamente attraverso la contemporanea produzione di metaboliti tossici e di enzimi idrolitici che agiscono in modo sinergico (Di Pietro *et al.*, 1993; Schirmböck *et al.*, 1994). In ogni caso il tipo di meccanismo impiegato dagli antagonisti può risultare estremamente variabile in relazione alla specie, al tipo di patogeno con il quale interagiscono e alle condizioni ambientali.

#### Meccanismi indiretti

I microrganismi antagonisti sono in grado di interagire con la pianta a livello fisiologico-biochimico in quanto possono incrementare la crescita della pianta, migliorando il suo stato generale di salute e la produttività (promozione della crescita) e attivare la produzione di molecole che sono coinvolte nella reazione di difesa della pianta dalle malattie (induzione di resistenza).

#### ***Promozione della crescita delle piante***

Molti funghi saprofiti, quali *Trichoderma* e batteri, hanno la capacità di incrementare la crescita della pianta e la sua produttività (Whipps, 2001). I rizobatteri induttori di resistenza sono noti come promotori della crescita della pianta e per questo chiamati PGPR ossia "Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Kloepper *et al.*, 1993). Da qualche anno, ormai, è stata

avanzata l'ipotesi che alcuni funghi antagonisti possano comportarsi come i rizobatteri (Benhamou *et al.*, 1997; Yedidia *et al.*, 1999). Anche molti ceppi di *Trichoderma* hanno dimostrato di avere questa capacità (Lindsey e Baker, 1967; Chang *et al.*, 1986) e gli effetti di efficacia più prolungati nel tempo, riguardano probabilmente i ceppi definiti appunto "rhizosphere-competent". Il ceppo T-22 di *T. harzianum* 22 ampiamente studiato negli Stati Uniti è utilizzato per il controllo delle malattie fungine del terreno in sostituzione dei fungicidi chimici. Oltre al contenimento delle malattie, esso stimola la crescita della radice, fatto che non si verifica se si utilizzano i fungicidi chimici (Harman, 2000). Generalmente l'aumento di resa della coltura è particolarmente evidente in condizioni di stress; nel caso in cui la coltura si sviluppi in condizioni che si avvicinano a quelle ottimali c'è una possibilità marginale di aumentare la resa. Questo ceppo, come probabilmente altre specie e ceppi di *Trichoderma*, può solubilizzare diversi nutrienti delle piante, come fosfati minerale di  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ , e  $\text{Zn}^0$ , che possono essere non disponibili in alcuni suoli (Altomare *et al.*, 1999). *T. harzianum* 22 ha anche la capacità di ridurre ioni metallici ossidati per aumentare la loro solubilità e anche per produrre composti siderofori che chelano il ferro (Altomare *et al.*, 1999).

### ***Induzione di resistenza***

Van Loon *et al.* 1998 definiscono l'induzione di resistenza come uno stato fisiologico della pianta di "aumentata capacità difensiva" elicitato da specifici stimoli ambientali che potenziano le difese innate della pianta contro successivi attacchi biotici.

Durante tutta la loro coevoluzione, le piante e gli organismi patogeni hanno sviluppato relazioni complesse risultanti da uno scambio costante d'informazioni molecolari. Gli organismi patogeni hanno sviluppato tutta una serie di strategie offensive per parassitizzare le piante e, viceversa, i vegetali hanno sviluppato un arsenale difensivo che include sia barriere fisiche e biochimiche preformate (resistenza pre-infezionali o passiva), sia meccanismi di difesa indotti (resistenza post-infezionali o attiva), come il

rafforzamento delle pareti cellulari e la produzione di molecole relative alla difesa che può ricordare i meccanismi immunitari degli animali (Benhamou e Picard, 2000).

#### *Meccanismi di difesa indotta*

La difesa indotta è il meccanismo più coinvolto nell'applicazione di microrganismi antagonisti quali *Trichoderma* e batteri colonizzatori della rizosfera. Tali microrganismi, infatti, instaurano un rapporto con la pianta che è molto simile, dal punto di vista biochimico, a ciò che si verifica in seguito all'aggressione da parte di un patogeno. Molti eventi metabolici sono gli stessi.

Le difese post-infezionali di tipo biochimico comprendono l'attivazione da parte della pianta di meccanismi quali la risposta ipersensibile, la resistenza locale o sistemica e la secrezione di sostanze assenti o presenti in quantità ridotte prima dell'infezione, con attività antimicrobica come le proteine correlate alla patogenesi PR (pathogenesis related proteins), le fitoalessine, i composti fenolici (attivi nella forma ossidata dalle fenolasi, fenolossidasi, perossidasi e polifenolossidasi) e i composti ROS (specie reattive dell'ossigeno). Questi ultimi si accumulano durante le reazioni incompatibili, possono distruggere le membrane cellulari, producendo perossidi lipidici e, nello stesso tempo, favorire reazioni che rafforzano le pareti cellulari. Hanno un ruolo diretto come molecole antimicrobiche e come molecole segnale per attivare la resistenza sistemica indotta e la reazione di ipersensibilità.

#### *Resistenza locale e sistemica*

La resistenza della pianta ai patogeni può essere sia di tipo locale se espressa nel sito d'infezione o nelle sue immediate vicinanze ed è definita con l'acronimo LAR ("Local Acquired Resistance"), che di tipo sistemico, quando è espressa anche in parti della pianta lontane da quelle che hanno subito l'attacco del patogeno (Kessmann *et al.*, 1994).

La resistenza sistemica è definita principalmente come SAR e ISR. La SAR (“Systemic Acquired Resistance”) o resistenza sistemica acquisita, si verifica quando è scatenata da patogeni necrotizzanti, la molecola segnale è rappresentata principalmente dall’acido salicilico e dai suoi analoghi (benzo1,2,3 tiadiazole-7-carbotioico acido S-metil estere BTH o e acido 2,6 dicloro isonicotinico INA) e vi è un accumulo di proteine relative alla patogenesi (PR proteine) nei tessuti lontano dal punto d’infezione del patogeno. La ISR (“Induced Systemic Resistance”) o induzione sistemica di resistenza si verifica quando è attivata da batteri colonizzatori delle radici, le molecole segnale sono l’etilene e l’acido jasmonico e non vi è accumulo di proteine PR.

Per molto tempo i termini SAR e ISR sono stati utilizzati come sinonimi a seconda della tradizione del ricercatore e del suo gruppo di ricerca. Successivamente, a seguito di studi condotti da Pieterse e van Loon nel 1999, che misero in luce la capacità di alcuni batteri colonizzatori delle radici (PGPR: plant growth-promoting rhizobacteria) di indurre resistenza nella pianta, è stato utilizzato il termine ISR per descrivere questo fenomeno e per differenziarlo dalla resistenza sistemica acquisita indotta dall’inoculazione con un patogeno (SAR). Il termine ISR è stato poi ridefinito (Harman *et. al.*, 2004) come RISR per indicare l’induzione di resistenza da rizobatteri, (rizobatteri induttori di resistenza sistemica) lasciando invece inalterato quello di SAR. Va comunque precisato che i batteri possono anche attivare entrambe le vie metaboliche come è stato dimostrato per *P. fluorescens proradix* (Von Rad, 2005).

Nell’ambito dei microrganismi più studiati per il loro impiego in lotta biologica sono comprese varie specie di funghi e batteri appartenenti ai generi *Trichoderma* e *Pseudomonas*. Un interesse crescente riguarda anche il gruppo batterico degli Attinomiceti (Yan e Crawford, 1995).

Di seguito vengono descritti i generi di microrganismi più rappresentati contenuti nei formulati biologici utilizzati nella presente tesi.

### **1.6.2 *Trichoderma***

La letteratura internazionale concernente gli agenti di lotta biologica contro i patogeni fungini comprende in gran parte ricerche che descrivono l'attività antagonistica di specie di *Trichoderma* nei confronti di diversi patogeni che attaccano i vari organi della pianta, seme, radici, fusto, foglie, fiori, stelo e frutto. Isolati di *Trichoderma* spp., sono risultati infatti, efficaci, contro un ampio spettro di patogeni, per esempio *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium* spp. *Botrytis*, *Verticillium*, *Armilalria mellea* e *Fusarium* su differenti colture quali, cotone, vite, mais, lattuga, cipolla, aglio, pisello, carota, pomodoro, patata, fruttiferi, barbabietola, leguminose (Dennis e Webster, 1971a, b; Innocenti, 1989; Nelson, 1991, Howell *et al.*, 1993; Harman e Kubicek, 1998). Da studi condotti in serra ed in campo sono emersi anche effetti positivi di *Trichoderma* spp. nei confronti di varie specie patogene del genere *Fusarium* responsabili del mal del piede del frumento. Tali antagonisti, infatti, applicati sui semi di frumento hanno mostrato una significativa riduzione della malattia sia del germinello che del piede ( Roberti, 1998; Roberti *et al.*, 1996; Roberti *et al.*,1997).

La capacità di utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio e di azoto, insieme alla crescita rapida, all'abbondante produzione di conidi e all'adattabilità a diverse condizioni ambientali, conferiscono a *Trichoderma* un'alta competitività rispetto alla restante microflora specie nel terreno. Una volta che il substrato colturale sia stato interamente colonizzato da esso, la diffusione di altri microrganismi fungini patogeni risulta difficile (Papavizas, 1985).

*Trichoderma*, non solo è in grado di competere a lungo colonizzando anche i possibili siti d'infezione dei patogeni a livello radicale, ma può parassitizzare sia i patogeni già presenti, sia quelli che possono infettare la

pianta successivamente alla loro applicazione. Come già è stato trattato nel capitolo dei meccanismi, sono noti anche un'azione di stimolazione della crescita della pianta e un effetto induttore di resistenza sistemica, nonché di produzione di metaboliti antifungini. Si tratta pertanto di un antagonista con un potenziale “completo” di biocontrollo.

*Trichoderma* è un microrganismo principalmente ad *habitat* terricolo ed infatti il suo impiego più noto è riferito al suolo, alle radici oppure al seme, anche se sono note applicazioni contro malattie fogliari, come *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum acutatum* (Elad, 1994; Freeman *et al.*, 2004). In Italia esistono già alcuni formulati a base di ceppi diversi di *Trichoderma* come riportato nella tabella 1.3.

Si segnala che da circa tre anni non è più in catalogo un prodotto a base di *Trichoderma harzianum* T-39, il Trichodex, da somministrare come trattamento fogliare su vite e fragola contro la muffa grigia (*B. cinerea*), in quanto non è stato ritenuto opportuno difenderlo a livello europeo e quindi non è stato incluso nell'allegato 1 della Direttiva CEE 91/414.

### **1.6.3 *Pseudomonas***

Molte specie di *Pseudomonas* fluorescenti presenti nel suolo sono coinvolte nel fenomeno della soppressione di malattie causate da vari patogeni (Weller *et al.*, 2002; Haas e Defago, 2005). L'esempio più noto da tempo in lotta biologica, riguarda la repressività al mal del piede del frumento attribuito a *Pseudomonas* spp. fluorescenti (Cook e Rovira, 1976; Weller e Cook, 1983). Per tali batteri è stata dimostrata anche la loro capacità di colonizzare la rizosfera e di stimolare la crescita delle piante e per questo chiamati batteri rizogeni PGP (Plant Growth Promoting) (Kloepper *et al.*, 1980) e di esercitare un'azione diretta contro *G. graminis* var. *tritici* attraverso la produzione di antibiotici (Thomashow e Weller, 1988). Questi autori, studiando il metabolita acido fenazina-1-carbossilico (PCA), ne dimostrarono per la prima volta la sintesi nel terreno da parte di *P. fluorescens* ceppo 2-79. Successivamente furono identificati altri

metaboliti prodotti da diversi ceppi del batterio, quali acido 2-idrossifenazina-carbossilico e 2-idrossi-fenazina (Pierson e Thomashow, 1992) e 2,4-diacetilfluoroglucinosio (PHL) (Bangera *et al.*, 1996) che hanno fornito la spiegazione, sotto il profilo microbiologico, dell'accresciuta produttività di un suolo come conseguenza di cambiamenti delle tecniche colturali adottate. Le sperimentazioni di campo che prevedevano l'applicazione del ceppo 2-79 di *P. fluorescens*, produttore di PCA, come conciante del seme, hanno dimostrato la sua potenziale capacità nel migliorare la crescita e la produzione di grano nei terreni dove il mal del piede risultava il principale fattore limitante, ad esclusione di terreni ricchi di argilla montmorillonitica (Ownley *et al.*, 1992). Si ritiene, comunque che i metaboliti prodotti abbiano una certa specificità nei confronti dei patogeni, in quanto ad esempio, il ceppo Q8R1 di *P. fluorescens*, produttore di PHL, pur essendo altamente competente per la rizosfera di frumento (Raijmakers *et al.*, 1997 b), non riesce a contrastare efficacemente gli attacchi di *Rhizoctonia* e di *Pythium* spp. (Cook, 2000b). Un batterio che ha già un impiego pratico per la lotta a diversi patogeni fungini dei cereali è *P. chlororaphis* ceppo MA342 da utilizzare come conciante del seme. E' il primo biofungicida autorizzato in Europa per lo specifico impiego sul seme ed anche in Italia ne è autorizzata la vendita con il nome di Cedomon<sup>®</sup>, (Linser *et al.*, 2006).

I ceppi di *Pseudomonas* PGP, come già specificato sono degli induttori di resistenza sistemica, attivando talvolta la SAR, talvolta la ISR o entrambe, come succede per *P. fluorescens* *proradix* per il quale è stato dimostrato il suo ruolo nell'attivazione di entrambe le vie metaboliche (von Rad *et al.*, 2005). Più recentemente, per *P. aureofaciens* attivo nel contenere attacchi di *R. solani* su soia, è stata dimostrata la induzione di proteine PR, noti marcatori molecolari della SAR (Jung *et al.*, 2007).

#### 1.6.4 *Streptomyces*

I batteri *Streptomyces* appartengono al gruppo *Actinomycetes*, ben noto per gli effetti fungi tossici che si esplicano attraverso diversi meccanismi quali la produzione di metaboliti, ed enzimi litici che degradano la parete cellulare dei patogeni fungini (Goodfellow e Williams, 1983). Diversi studi sugli effetti biologici di *Streptomyces* spp. sono stati condotti per anni in Finlandia, dove il microrganismo è stato isolato da torbe. Diverse specie di *Streptomyces* hanno contenuto diverse malattie causate da patogeni seminali e del terreno su piante orticole e cereali (Tahvonen, 1982; Tahvonen e Avikainen, 1987). Lo stesso ceppo K61 di *S. griseoviridis*, contenuto nel biofungicida Mycostop® registrato in molti Paesi europei, è stato isolato da torba di *Sphagnum* (White *et al.*, 1991). Il formulato è registrato anche in Italia (registrazione n.10506 del 31 maggio 2000, del Ministero della Sanità) per l'impiego su orticole, ornamentali e fiori contro diversi patogeni fungini del terreno. Recentemente è stata dimostrata l'efficacia di un ceppo di *Streptomyces* sp., isolato dalla rizosfera di pomodoro cresciuto in pieno campo, nel contenere il marciume causato da *R. solani* in giovani piantine di pomodoro trapiantate in serra (Sabaratnam e Traquair, 2002). Sempre su pomodoro coltivato in serra, è stata dimostrata, pur con una certa variabilità negli anni e nelle diverse prove, l'efficacia di *S. griseoviridis* K61 nei confronti di patogeni, inoculati artificialmente nel terreno, quali *Pyrenochaeta lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* e *Verticillium dahliae*. Al contrario, il biofungicida somministrato da solo non ha contenuto l'attacco di *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. La combinazione con la tecnica della solarizzazione del terreno non ha migliorato il contenimento delle malattie (Minuto *et al.*, 2006). In substrati utilizzati per le colture di serra trattati con *S. griseoviridis* è stata evidenziata, in assenza di coltura, un'azione diretta nei confronti di patogeni terricoli naturalmente presenti come *F. solani* (Surviliene, 2002).

Tab. 1.3 - Prodotti biofungicidi commercializzati in Italia.

<b>Formulati (ditta distributrice)</b>	<b>Specie antagonista</b>	<b>Patogeni controllati</b>	<b>Colture</b>
<b>AQ10 (Intrchem)</b>	<i>Ampeloyces quisqualis</i>	Oidi appartenenti alla famiglia <i>Erysiphaceae</i>	Vite, orticole e fragola, ornamentali
<b>Cedomon (Kwizda Italia)</b>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA 342	Elmintosporiosi, Carie, Carboni, mal del piede, Septoriosi e Bipolaris	Cereali
<b>Contans (Intrachem)</b>	<i>Coniothyrium minitans</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Sclerotinia minor</i>	Applicabile su tutte le colture suscettibili alla <i>Sclerotinia</i>
<b>Mycostop (Bioplanet)</b>	<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Pyrenocheta lycopersici</i> e <i>Verticillium dahliae</i>	Pomodoro, melanzana, peperone, cucurbitacee, basilico, ciclamino, gerbera e garofano
<b>Remedier (Isagro)</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> ICC012 <i>Trichoderma viride</i> ICC012	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Thirlaviopsis basicola</i> , <i>Phytium</i> spp., <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Armillaria mellea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Frutticole, orticole, floricole in vaso e ornamentali, floricole in pieno campo, tappeti erbosi
<b>Rootshield granules (Intrachem)</b>	<i>Trichoderma harzianum</i> T22	<i>Phythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Cylindrocladium</i> spp., <i>Thielaviopsis</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp. e <i>Armillaria mellea</i>	Piantine e semenzai di orticole e ornamentali, colture orticole, tappeti erbosi, basilico e altre officinali, piante arboree
<b>Serenade (Intrachem)</b>	<i>Bacillus subtilis</i> QST13	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Venturia inequalis</i> , <i>erwinia amylovora</i> , <i>Xantomonas</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp.	Melo, pero e vite

## 1.7 FORMULATI BIOLOGICI

Per quanto riguarda i formulati impiegati nella tesi, si ritiene utile riportarne le caratteristiche, in quanto si tratta di prodotti non ancora molto conosciuti

### **Cedomon**

Cedomon è un formulato a base del batterio *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 un microrganismo naturale, isolato dalla rizosfera di frumento e orzo, dotato di una spiccata attività fungicida. E' il primo biofungicida autorizzato in Europa specifico per la concia del frumento e dell'orzo e la sua attività è rivolta nei confronti di elmintosporiosi, carie e altre malattie dei cereali che si trasmettono attraverso il terreno (Tab. 1.3) Una volta applicato al seme il batterio si moltiplica assicurando una protezione prolungata dovuta a meccanismi che agiscono in sinergia, quali antibiosi, competizione, biostimolazione e induzione di resistenza della pianta.

*P. chlororaphis* appartiene alla classe dei batteri PGPR ed è quindi, dotato di una funzione biostimolante sulla germinazione e sullo sviluppo della pianta. Oltre a tale capacità, il batterio è in grado di produrre sostanze siderofore che competono per il ferro a livello della rizosfera. Il meccanismo principale attraverso il questo batterio agisce nei confronti dei patogeni è l'antibiosi, dovuta ad una sostanza fungitossica detta DDR, che lega la proteina tubulina, impedendo così la formazione del tubo mitotico e quindi la divisione cellulare. La produzione di DDR comincia durante la fase di crescita esponenziale della colonia batterica, quando questo si trova nel suolo. La molecola ha una emivita di sole 25 ore. Nel tempo la colonia di *P. chlororaphis* MA342 presente sulla radice viene incorporata nella microflora del suolo. Il formulato commerciale Cedomon non contiene DDR ma solo batteri in fase di stasi, una volta presente sul seme il batterio sopravvive grazie agli essudati prodotti dall'embrione.

## **Mycostop**

Mycostop è un bioungicida che contiene un ceppo selezionato di *Streptomyces griseoviridis* (ceppo K61), un batterio attinomicete capace di colonizzare rapidamente le radici della pianta ospite e di esercitare un'azione di antagonismo contro funghi patogeni come *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum* e *Verticillium dahliae*.

L'attività di Mycostop è legata a diverse modalità di azione. *Streptomyces griseoviridis*, colonizza rapidamente l'apparato radicale, sottraendo spazio vitale e nutrienti ai funghi patogeni. In alcuni casi aggredisce anche il micelio dei funghi patogeni, grazie alla produzione di enzimi come le chitinasi. Lo sviluppo dei patogeni è anche direttamente inibito dalla produzione di composti ad alta attività antifungina. Mycostop promuove anche la crescita delle piante ospiti, essendo in grado di controllare patogeni minori, e per la produzione di auxine che determinano un maggiore sviluppo dell'apparato radicale.

E' utilizzato su pomodoro, melanzana, peperone, cocomero, zucca, basilico e alcune piante ornamentali.

L'effetto del prodotto è preventivo, pertanto il primo trattamento deve essere effettuato nel vivaio oppure subito al trapianto. Il trattamento deve essere ripetuto ogni 3-6 settimane a seconda della pressione infettiva del patogeno.

## **Proradix**

Proradix è un formulato a base di *Pseudomonas fluorescens proradix*, un batterio appartenente al gruppo dei PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Tale batterio è stato isolato dalla naturale microflora della rizosfera della patata.

Oltre alla produzione di sostanze ad effetto biostimolante su radici e parte aerea, il batterio è dotato di un notevole effetto di induzione di resistenza sistemica. Esso agisce principalmente sulla SAR (induzione di resistenza

sistemica acquisita) mediata dall'acido salicilico. *P. fluorescens proradix* ha un notevole effetto anche sull'acido jasmonico mediatore dell'altra via di induzione di resistenza sistemica: ISR (induzione di resistenza sistemica indotta).

La presenza di questo batterio nella rizosfera delle colture ha garantito buoni risultati in termini di aumenti produttivi, miglioramento delle caratteristiche qualitative e riduzione dei danni derivati da fitopatie e fisiopatie.

Proradix è utilizzato principalmente su patata dove viene applicato durante la semina per rinvigorire la pianta e stimolarne le difese, inoltre è usato su insalata e altre orticole.

### **Remedier**

Remedier è un fungicida biologico a base di una miscela di *Trichoderma viride* ICC080 e *Trichoderma harzianum* ICC012, dotati della caratteristica di svilupparsi a 30°C e a 25°C rispettivamente. Agiscono contro attacchi di *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp. ed di alcuni ceppi virulenti di *Fusarium oxysporum* attraverso diversi meccanismi d'azione quali competizione per i nutrienti e lo spazio necessari ai patogeni per il loro sviluppo e parassitismo. Quest'ultimo è un meccanismo altamente specifico, fondato su un'attrazione chimica e un sistema di riconoscimento, che portano l'antagonista a sviluppare il proprio micelio su quello del patogeno che danneggia attraverso la produzione di enzimi litici della parete cellulare.

Questo prodotto, oltre a garantire una protezione dai patogeni svolge anche un'azione fitostimolante, migliorando la disponibilità e l'assorbimento degli elementi nutritivi e stimolando l'emissione del capillizio radicale.

L'azione di Remedier è essenzialmente preventiva, pertanto è opportuno effettuare i trattamenti alla preparazione del terreno o subito dopo la semina/trapianto e comunque prima del manifestarsi della malattia. I

risultati migliori si ottengono comunque su terreni preventivamente sterilizzati o disinfettati, dove l'introduzione dell'antagonista impedisce o ostacola la ricolonizzazione del terreno da parte del patogeno.

L'applicazione non va eseguita a temperature inferiori a 10°C , fattore limite per lo sviluppo dei microrganismi antagonisti. In terreni con basso tenore di sostanza organica è consigliato integrare il trattamento con un fertilizzante organico.

### **Rootshield**

Rootshield è un biofungicida, a base del ceppo T22 di *Trichodema harzianum*, ottenuto dai laboratori della Cornell university di New York tramite un processo di ricombinazione naturale più comunemente conosciuto come fusione ifale. Agisce preventivamente ed è indicato per il contenimento dei patogeni tellurici e delle malattie dell'apparato radicale. Va applicato come inoculo nel terreno o nel substrato e si moltiplica velocemente seguendo l'accrescimento radicale, colonizzandolo. Contiene diversi patogeni tellurici come *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Cylindrocladium* spp. e *Armillaria mellea*.

Oltre a colonizzare le radici *T. harzianum* è in grado di attaccare, parassitizzare e sfruttare come fonte di cibo gli altri funghi tellurici. Dal momento che il ceppo T22 si sviluppa meglio in presenza di un abbondante apparato radicale, ha sviluppato molti meccanismi per attaccare i funghi e stimolare la crescita della pianta e delle sue radici come micoparassitismo con produzione di enzimi extracellulari litici della parete cellulare del patogeno, competizione per i nutrienti e lo spazio, induzione tolleranza agli stress come conseguenza della stimolazione dello sviluppo radicale e vegetativo, solubilizzazione di alcuni nutrienti organici, induzione di resistenza della pianta agli attacchi di patogeni e inattivazione di enzimi del patogeno. *T. harzianum* non penetra nei tessuti vegetali e agisce solo dall'esterno della pianta.

Rootshield deve essere applicato come preventivo solo su piante sane, incorporandolo nel terreno o nel substrato di crescita della pianta. E' inoltre preferibile applicarlo prima della comparsa della radichetta e della completa formazione dell'apparato radicale; entro 24 ore *T. harzianum* si accresce e forma una specie di scudo intorno alla radice. La rapida copertura della superficie radicale sta alla base degli effetti di questo biofungicida, perché in questo modo si impedisce l'attacco dei patogeni del terreno. In presenza di infezioni in atto si consiglia di trattare con prodotti chimici e solo in seguito somministrare Rootshield .

Rootshield è utilizzato su: pomodoro, peperone, melanzana, patata, cetriolo, zuccina, melone, cavolo, lattuga, e altre orticole in generale, cerealicole e alcune colture arboree.

## 1.8 SCOPO DELLA TESI

Il marciume pedale delle cucurbitacee è una malattia nota da tempo come sporadica, ma che in tempi recenti si è diffusa nelle zone di coltivazioni orticole in Emilia-Romagna. Lo zucchini, coltivato sia in serra che in pieno campo nel comprensorio bolognese, risulta molto sensibile a questa malattia causata da *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae*.

Considerato che poche sono le indicazioni sulla caratterizzazione del patogeno in Italia e nella regione Emilia-Romagna e che la malattia risulta di difficile contenimento per gli scarsi mezzi di difesa attualmente disponibili, gli obiettivi di ricerca di questa tesi sono stati di a) identificare il patogeno, b) caratterizzare morfologicamente e fisiologicamente i ceppi isolati, c) individuare prodotti biologici a base di microrganismi fungini e batterici per contenere la malattia e d) studiare alcune delle possibili modalità d'azione dei microrganismi antagonisti contenuti nei formulati biologici utilizzati nelle prove su piante di zucchini, quali inibizione crescita, competizione, antibiosi, competenza rizosferica ed endofitismo.

## **Capitolo 2**

# **MATERIALI E METODI**

## **2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEL PATOGENO**

Sono state visitate cinque aziende dislocate nel comprensorio bolognese, specializzate nella coltivazione di zucchini in pieno campo e sotto tunnel, che presentavano problematiche fitopatologiche ascrivibili al collasso delle cucurbitacee. Le piante mostravano sintomi di malattia prevalentemente nei mesi di maggio e giugno e quindi in stato di piena produzione.

Porzioni rappresentativi della radice e del colletto di quattro piante con sintomi di avvizzimento sono stati prelevati in tempi diversi da ciascuna delle cinque aziende e portati in laboratorio per le opportune analisi. Ogni azienda è stata etichettata diversamente per il riconoscimento degli eventuali isolati di patogeno. In laboratorio, le parti di pianta sono state accuratamente pulite sotto acqua corrente, per rimuovere i residui di terra, e poi sono state sezionate per prelevate porzioni di tessuto di circa 1 cm, in parte necrotizzato e in parte sano. I frammenti ottenuti sono stati disinfettati in ipoclorito di sodio (2% di cloro attivo) per 2 minuti in agitazione, poi risciacquati tre volte in acqua distillata sterile ed infine lasciati asciugare su carta da filtro sterile sotto cappa biologica. Parte dei tessuti sezionati, ma non sterilizzati, sono stati posti in camera umida su carta da filtro spruzzata con acqua, in una vaschetta di plastica, all'interno di un sacchetto di nylon, per alcuni giorni.

I frammenti disinfettati, invece, sono stati posti in piastre di Petri di polistirolo da 90 mm di diametro contenenti un substrato di crescita composto da agar patata destrosio (PDA, 3,9%) addizionato con l'antibiotico streptomina solfato (3µg/ml). Le piastre sono state incubate a temperatura ambientale in condizioni di luminosità naturale.

Giornalmente sono state effettuate osservazioni ad occhio nudo ed al microscopio, per individuare i microrganismi sviluppatasi dal tessuto vegetale. Le colonie fungine appena formate sono state prelevate, trasferite

su PDA in piastre Petri e incubate a temperatura ambientale per 3 giorni al buio e per successivi 7 giorni in condizioni di luminosità naturale.

Le colonie ottenute in purezza sono state quindi osservate per le caratteristiche morfologiche ad occhio nudo ed al microscopio ottico per quanto riguarda colore e aspetto del micelio, formazioni riproduttive quali conidi, ramificazioni conidiofore e presenza di clamidospore, allo scopo di individuare sommariamente la specie di appartenenza. Le colonie che presumibilmente potevano essere classificate come *Fusarium solani* sono state trasferite in coltura pura in nuove scatole Petri contenenti agar con estratto di foglie di garofano (CLA: carnation leaf agar; 2% agar, 2% estratto foglie di garofano), essendo questo un substrato adatto a stimolare la produzione di macroconidi, importanti per il riconoscimento del patogeno. Le colonie identificate quindi come *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* W.C. Snyder & H.N. Hansen.

sono infine state trasferite in tubi contenenti CLA, parte dei quali, dopo la sommersione della superficie con olio di paraffina sterile, è stata riposta in micoteca a 4°C.

Ciascuno dei cinque isolati di presunto patogeno, intendendo per isolato un rappresentante proveniente da ogni azienda di prelievo, è stato quindi utilizzato per dimostrare contemporaneamente:

- a) la patogenicità del fungo,
- b) l'appartenenza alla forma speciale *cucurbitae*, specifica per la famiglia delle Cucurbitacee.

Per tali dimostrazioni, ciascun isolato è stato inoculato artificialmente su piante di diverse specie vegetali quali cetriolo, melone, zucca e zucchini, della famiglia delle Cucurbitacee, e fagiolo e melanzana appartenenti alle famiglie botaniche delle Leguminose e Solanacee rispettivamente.

Per ciascuna specie vegetale è stato allestito un vassoio alveolare di polistirolo da 104 fori del diametro di 35 mm, riempito con terriccio universale per piante verdi miscelato con sabbia (40% in peso), precedentemente sterilizzato in autoclave a 121°C per 25 minuti, due

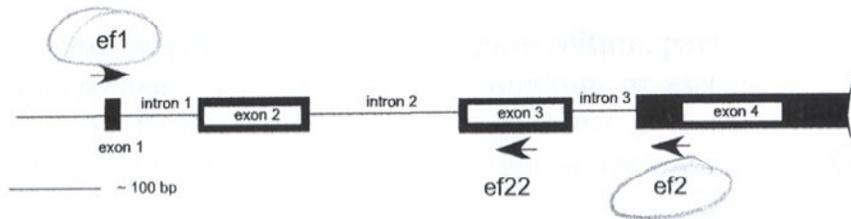
volte a distanza di 24 ore. I semi, non concitati con prodotti chimici, sono stati disinfettati in ipoclorito di sodio al 2% per 5 minuti, risciacquati in acqua distillata sterile, asciugati, posti a dimora, uno per foro, nei vassoi alveolari, annaffiati e posizionati in cella climatica a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidità relativa del 84-88 %, con cicli giornalieri di 12 ore di luce. Le semine sono state effettuate scalarmente, data la diversa velocità di germinazione e di crescita delle diverse specie vegetali, in modo da ottenere in circa un mese tutte le piante omogenee con 3-4 foglie vere, pronte per essere inoculate artificialmente. Novanta piantine di ciascuna specie sono state quindi trapiantate in vaschette di plastica contenenti 300 mg di terriccio sterile (sabbia, terriccio universale, perlite, 1:5:1 in volume); per ogni isolato di patogeno sono state trapiantate, 15 piantine suddivise in tre vaschette (ripetizioni) con dimensioni di 20x7x5 cm; 75 piantine sono servite per l'inoculazione e 15 per il testimone non inoculato. Le piantine sono state lasciate nella stessa cella climatica servita per il vivaio, a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidità relativa del 84-88 %, con cicli giornalieri di 12 ore di luce. Dopo una settimana si è proceduto all'inoculazione, deponendo un cilindretto di colonia (4 mm di diametro e spessore 2 mm) sul colletto di ogni piantina a 1 cm dal terreno, avendo cura di far aderire perfettamente la superficie della colonia con quella del vegetale. I cilindretti sono stati prelevati con un foratappi dai margini in attiva crescita delle colonie di ciascun isolato cresciute per 10 giorni su CLA a  $25^{\circ}\text{C}$ . Sul colletto delle piante testimone (15 per ciascuna specie vegetale) è stato deposto un cilindretto di agar di uguali dimensioni dei precedenti. Giornalmente si è provveduto a mantenere una buona situazione di umidità del terriccio nella zona del colletto delle piante, attraverso nebulizzazione di acqua, in modo da favorire l'evolversi dell'infezione.

Trascorsi 14 giorni dall'inoculazione, è stato rilevato il numero di piante che presentavano sintomi di marcescenza dei tessuti del colletto, attorno alla zona di inoculazione.

Campioni dei tessuti necrotizzati sono stati prelevati, disinfettati con ipoclorito di sodio (2% cloro attivo), risciacquati con acqua, asciugati su carta sterile e depositi su PDA e CLA, per verificare lo sviluppo dello stesso microrganismo inoculato (postulati di Kock) e quindi dimostrare la patogenicità degli isolati.

L'ulteriore conferma della identificazione del patogeno è stata condotta con metodo biomolecolare su tre ceppi Fs7, Fs17 ed Fs37 che presentavano i fenotipi più diversi. A tale scopo è stata prelevata per ciascun ceppo una piccola porzione di micelio, cresciuto per circa 4 giorni a 25°C su cellophane appoggiato su agar acqua (1,6%). La porzione di micelio è stata subito posta in tubo da PCR assieme ai seguenti componenti: H<sub>2</sub>O 20 µl, Taq 0,3 µl, Buffer (10x) 5 µl, DNTPS 4 µl, primer ef1 2µl, primer ef2 2 µl, BSA 2 µl, H<sub>2</sub>O 13,7 µl.

E' stata utilizzata una reazione di polimerasi per amplificare la regione TEF (translation elongation factor) del gene 1- $\alpha$  (ef1 forward primer; 5'-ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC-3') e ( ef2 reverse primer; 5'-GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT-3').



La reazione PCR è stata eseguita utilizzando una temperatura di annealing di 53°C., ottenendo un prodotto di circa 700 pb.

Il programma usato per amplificare la regione TEF è stato il seguente:

95°	6'	}	34 cicli
94°	45''		
53°	30''		
72°	1'20''		
72°	10'		
4°	raffreddamento		

## **2.2 CARATTERIZZAZIONE MORFO-FISIOLOGICA DEGLI ISOLATI DEL PATOGENO**

### **2.2.1 Ottenimento colture monosporiche (ceppi) del patogeno**

Allo scopo di studiare gli isolati di *F. solani* sono state allestite, in totale, un centinaio di colture monosporiche (ceppi) su CLA a 25°C in condizioni di illuminazione naturale. Da prove precedenti con diversi substrati, è risultato che CLA accelera la sporificazione, soprattutto dei macroconidi, rispetto al PDA (in media 4 giorni contro 7) e consente una maggiore differenziazione morfologica delle colonie del patogeno. Le colture monosporiche sono state ottenute attraverso diluizioni delle sospensioni conidiche del fungo. Tali sospensioni composte da macro e micro conidi, sono state preparate lavando la superficie di una colonia di ciascun isolato con 10 ml di acqua distillata sterilizzata e filtrando con garza sterile. La presenza e la concentrazione dei conidi nel filtrato è stata determinata al microscopio su cella Thoma. Con opportune diluizioni la concentrazione del filtrato è stata portata a circa 10 conidi/ml e aliquote di 0,5 ml sono state disperse uniformemente sulla superficie di agar acqua (WA, water agar 2%) in scatole Petri da 90 mm e incubate a 25°C al buio.

La germinazione di singoli conidi è stata controllata giornalmente con un microscopio stereoscopico (40×) sotto cappa biologica sterile e all'occorrenza ciascun conidio germinato è stato prelevato con un ago, trasferito su CLA in una piastra Petri da 90 mm e incubato a 25°C al buio.

Le 100 colonie monosporiche ottenute sono state poi esaminate in base all'aspetto morfologico e riunite in classi. Tra queste ne sono state selezionate 20 (Fs1, Fs3, Fs4, Fs5, Fs6, Fs7, Fs8, Fs9, Fs10, Fs11, Fs17, Fs18, Fs19, Fs26, Fs27, Fs28, Fs37, Fs40, Fs41) giudicate rappresentative delle suddette classi, allo scopo di proseguire gli studi sulla caratterizzazione fisiologica riguardo 1) la crescita su PDA e CLPDA a

diverse temperature, in condizioni di luce e buio e 2) il grado di patogenicità su zucchini.

### **2.2.2 Crescita su PDA**

Ciascuno dei venti ceppi selezionati di *F. solani*, è stato inoculato, in tre ripetizioni, su PDA (20 ml/piastra) al centro di piastre Petri di 90 mm di diametro, deponendo un cilindretto (4 mm diametro) di colonia in attiva crescita su PDA, prelevato dalla periferia. Sono state allestite tre gruppi di 60 piastre l'uno da ripartire in funzione della temperatura, a 17, 23 e 28°C in condizioni di alternanza di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Con regolarità nel tempo è stato misurato l'accrescimento di ciascuna colonia, attraverso la media di due diametri perpendicolari passanti per il centro dell'inoculo. Le misurazioni sono state interrotte al raggiungimento di circa 80 mm di diametro, in quanto non risultano più attendibili nel momento in cui il margine della colonia tocca il bordo della piastra (90 mm).

### **2.2.3 Crescita su CLPDA**

Ciascuno dei venti ceppi selezionati di *F. solani*, è stato inoculato, in tre ripetizioni, su 20 ml di CL-PDA (CL: carnation leaf, ossia foglie di garofano) al centro di piastre Petri di 90 mm di diametro, deponendo un cilindretto (4 mm diametro) di colonia in attiva crescita prelevato dalla periferia. Per la preparazione del substrato CL-PDA, è stato utilizzato il filtrato di bollitura delle foglie in acqua distillata (1% foglie essiccate), pH 7,0 al quale è stato addizionato il PDA (3,9%). Sono state allestite sei gruppi di 60 piastre l'uno da ripartire in funzione della temperatura, a 17, 23 e 28°C sia in condizioni di luce che di buio. Con regolarità nel tempo è stato misurato l'accrescimento di ciascuna colonia, attraverso la media di due diametri perpendicolari passanti per il centro dell'inoculo. Le misurazioni sono state interrotte al raggiungimento di circa 80 mm di diametro, come sopra specificato.

## **2.2.4 Patogenicità dei venti ceppi su zucchini**

Poiché le venti colonie monosporiche mostravano una discreta variabilità morfologica e di velocità di crescita, si è deciso di valutarne anche la patogenicità su zucchini utilizzando una delle varietà più diffuse nel comprensorio bolognese, lo “zucchini chiaro di Bologna”. La prova è stata allestita in cella climatica a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , umidità relativa 84-88 %.

### Preparazione dell'inoculo

Per l'inoculazione del patogeno si è cercato di riprodurre le condizioni di un'infezione naturale, proveniente dal terreno. È stato pertanto preparato uno sfarinato organico inoculato con ciascun ceppo, da distribuire nel terreno in prossimità del colletto delle piantine. A tale scopo, semi di miglio e di frumento (1:2 in volume) sono stati lasciati immersi in acqua distillata per 20 ore, quindi filtrati, lavati sotto acqua corrente e ripartiti in aliquote da 100 g in beute da 300 ml. Le beute così preparate sono state chiuse con cotone idrofobo e sterilizzate in autoclave per 20 minuti a  $121^\circ\text{C}$ . Una volta raffreddate, si è proceduto ad inoculare ciascun patogeno versando 5 ml di sospensione conidica  $2,5 \times 10^6$  conidi/ml di ciascun patogeno proveniente da una colonia di 14 giorni cresciuta su CLA. Le beute sono state agitate energicamente per distribuire in modo uniforme la sospensione conidica all'interno del substrato e poi sono state poste ad incubare per 14 giorni al buio a  $24^\circ\text{C}$ . Trascorso tale periodo il contenuto delle beute è stato fatto essiccare per 14 giorni in ambiente scuro e asciutto, al riparo dalla polvere, ed è stato triturato con un mulino manuale fino ad ottenere uno sfarinato fine e asciutto. Lo sfarinato è stato conservato in barattoli sterili a temperatura ambiente fino al momento dell'utilizzo. Le unità formanti colonia (UFC) per mg di sfarinato sono state determinate, prima dell'impiego, attraverso sospensione in acqua distillata sterile e 8 diluizioni seriali (da 1mg/ml a 0,1ng/ml); aliquote da 0,5 ml di tali diluizioni sono state distribuite, in 5 repliche, su piastre di Petri da 90 mm contenenti PDA addizionato di 1  $\mu\text{g/ml}$  di streptomina e 1  $\mu\text{g/ml}$  di ampicillina. Le piastre così preparate sono state riposte in incubazione al

buio a 24°C e giornalmente sono state contate le singole colonie di neo formazione alle varie diluizioni.

#### Preparazione delle piante

Le piante sono state ottenute deponendo semi non trattati chimicamente, disinfettati con ipoclorito di sodio (2% cloro attivo) e risciacquati, in vassoi alveolati riempiti con terriccio universale miscelato a sabbia, come precedentemente descritto per la verifica di patogenicità dei cinque isolati.

Dopo circa 15 giorni le piantine sono state trapiantate in vaschette di plastica dal volume di circa 280 cm<sup>3</sup> (20x7x5 cm) contenenti uno strato di argilla espansa coperta di terriccio sterile misto a sabbia. Parte delle radici ed il colletto sono state ricoperte di terriccio inoculato con lo sfarinato del patogeno (100 cfu/g terriccio). Per ogni colonia monosporica, e per il testimone non inoculato (“sano”), sono state trapiantate 28 piante suddivise in 4 vaschette (ripetizioni) da 7 piante ciascuna.

Giornalmente si è provveduto a mantenere una buona situazione di umidità del terriccio soprattutto nella zona del colletto delle piante, attraverso nebulizzazione di acqua, in modo da favorire l’evolversi dell’infezione. È stato effettuato un rilievo visivo 25 giorni dopo l’inoculazione.

#### Valutazione della malattia

Per quanto riguarda la valutazione dei sintomi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae*, sono state determinate le percentuali della frequenza e della gravità della malattia: la frequenza è stata calcolata in base al rapporto percentualizzato tra il numero delle piante ammalate rispetto al totale delle piante inoculate, mentre la gravità della malattia è stata stimata attraverso l’applicazione di un indice % di danno. Questo è stato ottenuto suddividendo le piante in classi numeriche d’infezione in base alla percentuale di superficie del colletto e parte superiore delle radici con lesioni necrotiche dovute al patogeno inoculato. Nel dettaglio sono state considerate 4 classi di infezione, 0 equivalente allo 0% di tessuto colpito, 0,25 = 5% di tessuto necrotizzato, 0,5 = 50%, 1 = 100% (pianta morta).

La gravità dell'infezione è stata calcolata con l'indice di Townsend Heuberger (1943) modificato, con la seguente formula:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^n (n_i \cdot v_i) \cdot 100}{N \cdot V}$$

$n_i$  = numero piante in ogni classe  
 $v_i$  = ogni classe d'infezione  
 $N$  = totale delle piante esaminate  
 $V$  = classe d'infezione più alta  
 $n$  = numero delle classi



Foto 2.2 – Pianta adulta di zucchini gravemente danneggiata a livello del colletto da *F. solani* f.sp. *cucurbitae*. (Foto C. Sigala)

### 2.2.5 Enzimi di patogenesi

Allo scopo di valutare alcuni degli eventuali enzimi di patogenesi (poligalatturonasi, pectin liasi, cellulasi e proteasi), i 20 ceppi di *F. solani* f. sp. *cucurbitae* sono stati coltivati in terreno liquido povero di elementi nutritivi (Pratt's Medium modificato), addizionato di pareti cellulari vegetali estratte dal colletto di piante di melone.

#### Estrazione della pareti cellulari

L'estrazione delle pareti cellulare è stata ottenuta seguendo un metodo già noto (Rose *et al.*, 1998; Huysamer *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1997),

modificato. Porzioni di colletto di piante di melone precedentemente sminuzzate sono stata bollite in 100 ml di etanolo (95%) per 30-45 minuti, applicando sul bollitore una colonna di raffreddamento per la condensazione e il recupero dei vapori di etanolo. Il tessuto vegetale è stato poi raffreddato, omogeneizzato e filtrato con pompa a vuoto e filtro poroso in vetro (Nuclepore) ricoperto in superficie con una membrana di carta (Whatman 1001 055). E' stato così recuperato il materiale vegetale insolubile che è stato poi sottoposto a tre cicli di lavaggio e di filtrazione. Il primo lavaggio è stato eseguito usando 100 ml di etanolo (95%), il secondo con 100 ml di cloroformio: metanolo (1:1 v/v), il terzo con 100 ml di acetone. Dopo ogni lavaggio il campione è stato posto in agitazione per 5 minuti e filtrato. Il materiale è stato poi asciugato in stufa a 30°C per una notte, posto in un contenitore ermetico e congelato. Sono state ottenuti 3,5 g di parete cellulare da 128 g di materiale vegetale fresco.

#### Estrazione degli enzimi del patogeno

Per ognuna delle 20 colonie monosporiche è stato preparata una beuta contenente 20 ml di un substrato liquido di crescita Pratt's, in accordo con Quadir *et al.* (1997) così composto:  $K_2PO_4$ , 13,6 g/L;  $NH_4NO_3$ , 4,0 g/L;  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 1,25 g/L;  $CuSO_4 \times 5H_2O$ , 0,001 g/L;  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ , 0,002 g/L;  $(NH_4)_2MoO_4$ , 0,0013 g/L;  $MmSO_4 \times H_2O$ , 0,016 g/L;  $H_3BO_3$ , 0,028 g/L;  $FeSO_4 \times 7H_2O$ , 0,02 g/L; estratto di lievito, 1,0 g/L; pareti cellulari vegetale, 3,0 g/L;  $H_2O$ , 1,0 L; pH 4,5. Il substrato è stato quindi inoculato con un plug di 4 mm di diametro di micelio di ciascun ceppo del patogeno e posto ad agitare alla temperatura di 26°C, per 14 giorni.

Dopo l'incubazione di 14 giorni ogni beuta è stata filtrata con triplo strato di garza sterile, centrifugata per 10 minuti a 4000 rpm a 15°C e filtrata nuovamente con filtri sterili di 0,45 µm. I filtrati ottenuti sono stati dializzati immergendo una membrana selettiva Spectra/Por Membrane MWCO: 6-8,000 (Spectrum; Reorder n° 132 650), contenente ciascun filtrato in un tampone composto da 3,6 L di acqua distillata sterile a pH 7 e 0,4 L di sodio acetato 1M a pH 5 e posto in agitazione a 4°C per 16 ore. I

filtrati colturali dializzati sono stati trasferiti in Falcon sterili e conservati a -20°C fino al loro utilizzo per i test di attività enzimatica su substrato solido (Cup Plate).

#### Determinazione dell'attività enzimatica

E' stato utilizzato il metodo del Cup Plate che permette di evidenziare l'attività di un enzima con la formazione di un alone trasparente su gel colorato. Le caratteristiche dei gel e dei coloranti variano in funzione dell'enzima ricercato. I substrati solidi sono stati preparati seguendo il protocollo modificato di Hankin e Anagnostakis (1975). Per stabilire lo standard di riferimento quantitativo sono stati eseguiti i test utilizzando enzimi noti di provenienza commerciale, da questi sono state ottenute le curve di taratura.

#### *Attività poligalatturonasica (PG)*

Le poligalatturonasi è stata determinate in accordo con Tamura *et al.* (2004), Stotz *et al.* (1993), Hankin *et al.* (1975) e Chattrjee (1995) e opportune modifiche.

Una soluzione contenente 2 g agarosio, 20 mg acido poligalatturonico e 200 ml acetato di sodio 0,1 M pH 5 e 0,744 g di EDTA è stata portata ad ebollizione e versata ancora calda in una piastra trasparente in grado di contenere, una volta raffreddato, un gel alto circa 2 mm. Una volta solidificato il gel è stato forato con foratappi del diametro di 6 mm creando così dei pozzetti equidistanti che sono stati riempiti con 40 µl del campione da analizzare. La piastra è stata incubata a 37°C per 16 ore e il gel è stato poi colorato con Ruthenium Red (0,05 w/v; 0,2g/400ml acqua distillata) per 30 minuti in agitazione avendo cura che la superficie del gel fosse bagnata omogeneamente dalla soluzione colorante. Al termine della colorazione il gel è stato lavato per circa 20 minuti con acqua distillata. Un gel analogo è stato fatto per determinare l'attività dello standard di riferimento utilizzando la Pectinasi da *Aspergillus niger* (Sigma P2736, Ferment Depectinization Unit – FDU – 3,093 FDU/ml). Differenti

concentrazioni dell'enzima, da 0 a 10 %, sono stati caricati in triplice coppia, ponendo sempre 40 µL per foro.

La presenza di enzimi pectolitici nei campioni è stata evidenziata da un alone trasparente su sfondo rossastro.

#### *Attività pectin liasica (PL)*

Le pectin liasi sono state determinate in accordo con Hankin *et al.* (1975) e Chattrjee (1995), con modifiche. Il procedimento adottato nella preparazione del gel è lo stesso di quello usato per gli enzimi pectolitici, con l'unica differenza nel pH dell'acetato che in questo caso è stato portato a 7. La composizione del gel pertanto è stata la seguente: 2 g di agarosio, 20 mg di acido poligalatturonico e 200 ml di acetato di sodio 0,1 M pH 7. Un gel analogo è stato preparato per determinare lo standard di riferimento utilizzando la pectato liasi da *Cellvibrio japonicus* (Megazyme E-PLYCJ). Differenti concentrazioni dello standard ( da 0,68 a 18,04 U/ml) sono stati caricati in triplice coppia, ponendo 40 µL per foro.

La quantità di campione caricato, il tempo di incubazione e il tipo di colorazione è stato lo stesso di quello usato per rilevare la pectinasi.

#### *Attività cellulasica (CMC)*

La cellulasi è stata determinate in accordo con Burianova *et al.*(1991), con modifiche. La composizione del gel utilizzato per saggiare l'attività delle cellulasi è stato il seguente: 2 g di agarosio, 0,2 g di carboxymethylcellulase (CMC) e 200 ml di fosfato di sodio 0,1 M pH 5,5.

Una volta caricati i campioni, il gel è stato incubato per 16 ore a 37°C. Successivamente è stato colorato con una soluzione di Congo Red (0.1 % w/v) per 30 minuti. La superficie del gel è stata poi lavata per due volte con una soluzione di cloruro di sodio 1 M. Per incrementare il contrasto il gel è stato lavato con acido acetico (5%) per 3 minuti. La presenza di enzimi cellulolitici, nei campioni è stata evidenziata dalla presenza di un

alone trasparente su sfondo scuro. Un gel analogo è stato allestito per determinare lo standard di riferimento utilizzando la cellulasi da *Aspergillus* sp. (Sigma C2605).

Differenti concentrazioni dell'enzima, da 0 a 10 %, sono stati caricati in triplice coppia, ponendo sempre 40 µl per foro. Il caricamento dei campioni e l'incubazione sono stati i medesimi della Pectinasi.

#### *Attività proteasica (PR)*

La cellulasi è stata determinata seguendo il metodo di Gregori *et al.* (2003) modificato. I campioni di estratto enzimatico provenienti dai 20 ceppi sono stati caricati come nei precedenti saggi su gel composto da: 2 g di agarosio, 2 g di gelatina o caseina, 200 ml di acetato di sodio 0,1 M pH 5, incubato per 16 ore a 37°C. Il gel è stato poi colorato con una soluzione di Comassie Brilliant Blue per 3 ore. Tale soluzione era composta da: Comassie Brilliant Blue, 0,5 g; acqua distillata pH 7, 90 ml; metanolo, 90 ml; acido acetico glaciale, 20 ml. La superficie del gel è stata decolorata con acqua per circa un'ora, per tre volte. La presenza di enzimi proteolitici nei campioni, è stata evidenziata dalla presenza di un alone trasparente nel gel su sfondo scuro. Un gel analogo è stato fatto per determinare lo standard di riferimento utilizzando la pepsina (Pepsin A Sigma P7000).

## 2.3 ATTIVITÀ DI PRODOTTI BIOLOGICI SULLA MALATTIA

Lo scopo principale della tesi è quello di valutare la possibilità di contenimento della malattia causata da *F. solani* f. sp. *cucurbitae* con formulati biologici commerciali, a base di funghi e batteri. La tabella 2.1 riporta l'elenco dei formulati impiegati, le loro caratteristiche e le dosi impiegate nelle prove. Si sottolinea che tra i cinque formulati, quattro (Cedomon, Mycostop, Remedier e Rootshield) sono registrati in Italia come biofungicidi, mentre due sono ammendanti. In particolare Clonotry è una formulazione dei funghi *T. harzianum* e *Clonostachys rosea*, mentre Proradix è a base di un microrganismo batterico, *Pseudomonas* sp. *proradix* ceppo DSM13134, definito PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) ossia dotato della capacità di promuovere la crescita delle piante e nel contempo di stimolarne le difese sistemiche. Tra i biofungicidi ne sono stati scelti due a base di batteri e due a base di funghi antagonisti: tra i primi, Cedomon e Mycostop contenenti rispettivamente *P. chlororaphis* ceppo MA342 e *Streptomyces griseoviridis* ceppo K61; tra i secondi, Remedier contenente *Trichoderma harzianum* ceppo ICC012 + *T. viride* ceppo ICC080 e Rootshield composto da *T. harzianum* ceppo T-22. Ciascun prodotto è stato utilizzato per verificarne l'attività nei confronti di *F. solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1. Per queste prove sono stati considerati due ceppi di patogeno Fs7 ed Fs37, selezionati dalle prove precedenti in quanto dotati di elevata e bassa patogenicità rispettivamente.

Sono stati allestiti quattro esperimenti.

Gli esperimenti 1 e 2 sono relativi ai trattamenti eseguiti sul seme, nel terreno e su seme + terreno nei confronti dei ceppi Fs7 (più patogeno) ed Fs37 (meno patogeno), rispettivamente. Gli esperimenti 3 e 4 sono relativi ai trattamenti eseguiti nel terreno nella fase di vivaio, di trapianto e in vivaio + trapianto nei confronti dei ceppi Fs7 (più patogeno) ed Fs37

(meno patogeno), rispettivamente. L'inoculazione artificiale del patogeno è stata effettuata nel terreno.

Tab. 2.1 – Prodotti saggiati negli esperimenti *in vivo* ed *in vitro*, loro composizione, campo e dosi d'impiego suggerite dalla ditta distributrice e dosi impiegate nelle prove *in vivo*.

Prodotto commerciale (formulazione)	Composizione	Campo e dosi di impiego	Dosi impiegate
Remedier (Polvere bagnabile)	Tricoderma harzianum ICC012 Tricoderma viride ICC080 (2% + 2% in peso, corrispondenti a $5 \times 10^7$ UFC/g + $5 \times 10^7$ UFC/g)	0,25 kg/m <sup>3</sup> colture in vaso o vivaio  2,5 kg/ha serra o pieno campo frutticole: 3/10 kg/ha	Trattamento a terreno 0,25 mg/cm <sup>3</sup> 1,25 gr in 200 ml d'acqua
Rootshield (Polvere bagnabile)	Tricoderma harzianum T22 (1,15 g; $1 \times 10^7$ UFC/g peso secco)	750 g/m <sup>3</sup> in semenzaio pieno campo 6/12 kg/ha arboree 4/6 kg/ha	0,75 mg/cm <sup>3</sup> 3,75 g in 5000 cm <sup>3</sup> di terreno
Mycostop (Polvere bagnabile)	Streptomyces griseoviridis K 61 (33%) $10^8$ UFC/g	Semenzali 2-10 g/100m <sup>2</sup> Concia sementi 8 g/kg Su terreno 5-10g/100m <sup>2</sup> Su lana di roccia 5/10g/100m <sup>2</sup> In vaso 0,5/1g/100 vasi	0,1 g/m <sup>2</sup>  24 mg cassa
Cedomon (Liquido)	Pseudomonas chlororaphis (ceppo MA 342) $10^9$ - $10^{10}$ UFC/ml (8,7 g/l)	500-750 ml/100g di semente	Diluizione 1/10 somministrati 5-10 ml/pianta
Proradix (Polvere)	Pseudomonas fluorescens $5 \times 10^5$ UFC/g	Pretrapianto 0,4 g/l Post-trapianto 0,2 g/l	0,4g/l 5ml di soluzione per pianta  trattamento terreno 20g in 100 litri
Clonotry (Liquido)	Trichoderma harzianum Clonostachys rosea Totale $10^9$ UFC/g	Concia semi 10 ml/kg seme Radici per immersione o irrorazione vassoi in vivaio Trapianto 200 ml/1000 m <sup>2</sup> in serra o 1L/ha in pieno campo	0,1 ml/10 g seme 0,2 ml/m <sup>2</sup>

### 2.3.1 Esperimenti 1 e 2

Gli esperimenti 1 e 2 hanno riguardato i trattamenti eseguiti sul seme, nel terreno e su seme + terreno nei confronti dei ceppi Fs7 (più patogeno) ed Fs37 (meno patogeno), rispettivamente. I prodotti sono stati somministrati secondo tre modalità: sul seme, nel terreno e con la loro combinazione (seme + terreno). Prima dei trattamenti tutti i semi destinati alle prove sono stati disinfettati per immersione in una soluzione di sodio ipoclorito (1% di cloro attivo) per 10 minuti, risciacquati in acqua sterile e asciugati su carta da filtro sterile. I semi sono stati quindi suddivisi in 3 gruppi, ciascuno corrispondente ad una tipologia di trattamento: su seme, nel terreno e su seme + terreno.

I semi trattati e non sono stati seminati in terreno costituito da torba, sabbia e vermiculite (1:2:1 in volume), che è stato ripartito in vaschette di alluminio (8 x 22cm) contenenti 260 g. Il terreno, prima dell'utilizzo, è stato sterilizzato in autoclave, ad una pressione di  $0,7\text{kg/cm}^2$  e ad una temperatura di  $106^\circ\text{C}$ , mentre le vaschette sono state sterilizzate in stufa a secco per 2 giorni a  $100^\circ\text{C}$ . Per ogni tesi sono stati seminati 40 semi suddivisi in quattro vaschette da 35 semi ciascuna. Per ogni esperimento sono stati utilizzati 280 semi.

Per il trattamento del seme, i semi sono stati immersi per 30 min in una soluzione di 20ml di acqua sterile e prodotto diluito alla dose indicata dalla ditta produttrice (Tab. 2.1) e con gli opportuni accorgimenti, consigliati dalla ditta distributrice, quando il prodotto non era specificatamente indicato per il seme. In ogni caso le somministrazioni sul seme sono state tali da garantire una concentrazione di UFC di circa  $1 \times 10^6$  conidi/ml nella soluzione di immersione.

Per il trattamento del terreno sono stati somministrati 100ml di soluzione di ciascun prodotto in ogni vaschetta, alle dosi indicate nella tabella 2.1; 100ml di sola acqua sterile sono stati distribuiti nelle vaschette dove non era previsto il trattamento, ma solo l'inoculazione con il patogeno.

Per il trattamento combinato seme + terreno si è proceduto alla combinazione dei trattamenti sopra esposti.

L'inoculazione con il patogeno è stata effettuata in tutto il terreno destinato alla semina. Sono stati inoculati il ceppo Fs7 (esperimento 1) ed il ceppo Fs37 (esperimento 2) sotto forma di sfarinati ottenuti come specificato precedentemente (§ 2.2.4). Lo sfarinato di ciascun ceppo è stato miscelato al terreno già suddiviso in 7 porzioni, una per ciascuna tesi e già trattata con ciascun prodotto biologico come descritto precedentemente (§2.3). La quantità di sfarinato distribuita è stata di 20 g per tesi tale da consentire una concentrazione finale di circa 60 UFC/g di terreno.

Le vaschette sono state incubate in cella climatica a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidità relativa 84-88 %, con cicli giornalieri di 12 ore di luce.

### **2.3.2 Esperimenti 3 e 4**

#### Preparazione delle piante

Per entrambi gli esperimenti è stato allestito un vivaio in 6 vassoi alveolari (uno per trattamento + uno per i testimoni) riempiti con terriccio universale per piante verdi miscelato con sabbia (30% in peso), sterilizzato in autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  per 60 minuti; sono stati seminati, in eccedenza per ogni esperimento, 400 semi (non trattati con prodotti chimici), uno per alveolo, previamente disinfettati con ipoclorito di sodio (2% di cloro attivo) per 5 minuti, risciacquati accuratamente con acqua distillata sterile e asciugati. I vassoi sono stati incubati in cella climatica a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , umidità relativa 84-88 %, con cicli giornalieri di 12 ore di luce. Regolarmente si è provveduto a bagnare il terreno con acqua per circa 10 giorni, fino al momento del primo trattamento.

#### Trattamenti con i formulati

I formulati biologici sono stati somministrati al terreno in vivaio, al terreno destinato al trapianto e con entrambe le modalità. Le dosi utilizzate per ciascun trattamento sono state quelle riportate nella tabella 2.2.

Per il primo trattamento ciascun prodotto è stato diluito in 200 ml di acqua distillata sterilizzata e sono stati distribuiti 5 ml di sospensione ad ogni piantina, facendo percolare il liquido nel terreno vicino al colletto, in modo che il prodotto rimanesse localizzato il più possibile a livello delle radici. Le piantine testimone sono state bagnate con 5 ml di acqua distillata sterile.

Tab. 2.2 – Protocollo sperimentale delle prove di attività *in vivo* dei formulati biologici nei confronti dei ceppi Fs7 ed Fs37.

Trattamenti <sup>(1)</sup>	Dose	trattamento in vivaio (dose/pianta) <sup>(2)</sup>	trattamento nel terreno da trapianto (dose in 5 litri terreno) <sup>(2)</sup>	Inoculazione (dose in 5 litri terreno)
Rootshield	750 g/m <sup>3</sup>	90 mg	3,75g	30 g
Mycostop	0,1 g/m <sup>2</sup>	0,6 mg	24 mg	30 g
Cedomon	5 ml/g seme	0,5 ml	20 ml	30 g
Proradix	0,4 g/l	2 mg	80 mg	30 g
Remedier	0,25 kg/m <sup>3</sup>	30 mg	1,25 g	30 g
H <sub>2</sub> O (test non inoculato)		5 ml	200 ml	-
H <sub>2</sub> O (test inoculato)		5 ml	200 ml	30 g

<sup>(1)</sup> Per ogni trattamento sono state utilizzate 40 piante suddivise in 4 ripetizioni.

<sup>(2)</sup> I prodotti sono stati sospesi in acqua distillata per un volume finale di 200 ml, distribuendo in vivaio 5 ml per pianta e al trapianto nei 5 litri di terreno.

### Trapianto

Per il trattamento da eseguire al trapianto 5 litri di terreno sterile per tesi, costituito da sabbia a media granulosità e terriccio universale per piante verdi (1:6 in volume), è stato trattato con ciascun prodotto con le dosi e le quantità indicate nella tabella 2.2.

Le piantine cresciute in vivaio sono state trapiantate due giorni dopo il primo trattamento, prelevandole con il panetto di terra aderente alle radici e posizionandole in vasche delle dimensioni 15x40x17 (4 per tesi) nelle quali era stato predisposto un substrato drenante di 1 cm di spessore costituito da argilla espansa sterile, ricoperta con 2 cm di terreno sterile

(1:6 in peso di sabbia a media granulosità e terriccio universale per piante verdi)

Le piantine sono state trapiantate nel terreno dei cassoni con l'accortezza di lasciare emergere la panetta 1 cm al di sopra del filo del terreno, in modo da poter ricoprire con il terreno precedentemente trattato e inoculato anche parte (circa 1 cm) del colletto.

#### Inoculazione con il patogeno

Sono stati inoculati il ceppo Fs7 (esperimento 3) ed il ceppo Fs37 (esperimento 4) sotto forma di sfarinati ottenuti come specificato precedentemente (§ 2.2.4), al momento del trapianto. Lo sfarinato di ciascun ceppo è stato miscelato al terreno già suddiviso in 6 porzioni, una per ciascuna tesi e già trattata con ciascun prodotto biologico come descritto precedentemente (§2.3). La quantità di sfarinato distribuita è stata di 30 g per tesi tale da consentire una concentrazione finale di 100 UFC/g di terreno.

#### Valutazione della malattia

Le valutazioni della malattia hanno riguardato la frequenza (numero di piante ammalate rispetto al totale delle piante inoculate) e la gravità (calcolata con l'indice di Townsend Heuberger modificato, § 2.3), a 14 e a 19 giorni dall'inoculazione con il patogeno.

Tutte le prove sono state ripetute almeno due volte con risultati simili tra di loro. I risultati che verranno in seguito riportati sono relativi ad una delle due prove.

## **2.4 MODALITÀ D'AZIONE DI MICRORGANISMI CONTENUTI IN FORMULATI BIOLOGICI**

Per lo studio delle modalità d'azione dei microrganismi contenuti nei formulati biologici utilizzati per le prove di attività *in vivo*, si è proceduto al loro isolamento in coltura pura. A tale scopo un grammo di ogni formulato è stato sospeso in 20 ml di acqua distillata sterile e tenuto in agitazione per 30 minuti. Ciascuna sospensione è stata poi diluita in maniera seriale (1:10) per otto volte. Aliquote di 0,5 ml dell'ultima diluizione sono state infine spatolate sulla superficie di PDA addizionato di streptomicina solfato (3µg/ml) per quanto riguarda l'isolamento dei microrganismi fungini *Trichoderma* spp. e sulla superficie di KB solido ( peptone 20 g, glicerolo 10 ml, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 g, MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O 1,5 g, Bacto agar 15 g, acqua distillata 1000 ml, pH 7,2) per l'isolamento dei batteri. Le piastre sono state incubate a 10°C per *T. viride* ICC080, a 25-30°C per *T. harzianum* T-22 e ICC012, a 28°C per i batteri. Dopo due passaggi successivi nei medesimi substrati, i ceppi dei microrganismi sono stati utilizzati per lo studio delle loro modalità d'azione *in vitro* nei confronti dei ceppi di Fs7, Fs37 e Fs17. Sono state considerate le modalità relative all'inibizione della crescita micelica del patogeno, alla competizione per il substrato e all'antibiosi.

### **2.4.1 Inibizione della crescita del patogeno e colonizzazione del substrato da parte dell'antagonista**

In piastre Petri di 90 mm di diametro, contenenti 15 ml di PDA sono stati appoggiati due dischetti uno del patogeno ed uno dell'antagonista, di 4 mm di diametro, distanti tra loro 40 mm, prelevati dai margini di colonie giovani di ciascun ceppo di microrganismo e di patogeno. Sono state considerate tutte le combinazioni tra i sei microrganismi ed i tre ceppi di patogeno, ripetute cinque volte. Le piastre sono state inoculate tutte lo

stesso giorno e sono state incubate in cella termostata a 25°C in condizioni di oscurità.

Giornalmente sono stati valutati gli accrescimenti, sia del patogeno che dell'antagonista e sono stati calcolati la inibizione percentuale di crescita radiale del patogeno (IPCR) secondo il metodo di Manandhar et al. (1987) e la colonizzazione del substrato da parte dell'antagonista secondo Camporota (1985).

La IPCR rappresenta l'intensità di antagonismo diretto di un microrganismo nei confronti di un altro ed è stata calcolata con la formula seguente:

$$IPCR = (R_1 - R_2 / R_1) \cdot 100$$

dove  $R_1$  rappresenta il raggio maggiore di crescita del patogeno e  $R_2$  il raggio minore del patogeno, quello verso la direzione dell'antagonista.

La colonizzazione del substrato è considerata da Camporota (1985) come la capacità competitiva di un antagonista, valutata con la formula:

$$C = (DT \cdot 100) / DE$$

dove DT rappresenta la distanza percorsa dall'antagonista sull'asse che unisce i due inoculi e DE la distanza che separa i due inoculi.

#### **2.4.2. Antibiosi**

L'antibiosi è stata studiata relativamente all'effetto di metaboliti non volatili rilasciati nel substrato da parte degli antagonisti, utilizzando la tecnica di Dennis e Webster (1971) per i tre ceppi di *Trichoderma* (T-22, ICC080 e ICC012) ed il ceppo K61 di *S. griseoviridis*, un batterio attinomicete caratterizzato dalla produzione di ife. Tale tecnica prevede la deposizione di un disco di cellophane sulla superficie di PDA in piastre Petri, sul quale viene inoculato, al centro, un dischetto di giovane colonia di antagonista. Il cellophane consente il passaggio dei metaboliti prodotti nell'agar sottostante, ma non di ife e spore del microrganismo. Dopo 48 ore d'incubazione a 25°C, il cellophane è stato rimosso assieme al microrganismo e, sempre al centro della piastra, direttamente sulla

superficie di PDA è stato inoculato un dischetto del patogeno di 4 mm di diametro. Le piastre sono state nuovamente incubate a 25°C al buio e, giornalmente, è stato misurato il diametro di accrescimento del patogeno. Sono state considerate tutte le combinazioni tra i sei microrganismi ed i tre ceppi di patogeno, ripetute cinque volte. Le piastre testimone erano costituite da ciascun ceppo di patogeno inoculato su PDA sul quale non era stato posto l'antagonista.

Relativamente ai batteri *P. fluorescens* sp. proradix e *P. chlororaphis* il meccanismo dell'antibiosi è stato studiato utilizzando il loro filtrato colturale di crescita, aggiunto, in proporzione di 1:1 in volume, a PDA (4% finale) utilizzando il protocollo modificato di Rosale *et al.* (1995). A tale scopo le colture batteriche sono state inizialmente incubate in agitazione a 30° C per 48 ore su brodo KB, quindi centrifugate per 30 minuti a 4200 rpm alla temperatura di 10° C. Il surnatante è stato rimosso ed il pellet è stato sospeso nel substrato liquido di crescita PPM (Pigment Production Media) che, secondo Rosales *et al.* (1995) favorisce la produzione di metaboliti di *Pseudomonas* spp. Tale substrato è così costituito: peptone 20 g, glicerolo 20 g, NaCl 5 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, agar tecnico 15 g, acqua distillata 1 L, pH 7,2.

Le colture liquide allestite su PPM sono state poste a crescere per 4 giorni a 30° C su un agitatore orbitale, quindi centrifugate per 30 minuti a 4200 rpm e 10° C ed il surnatante è stato prelevato in sterilità e filtrato con membrane sterili monouso con porosità di 0,45 µm. Il filtrato colturale così ottenuto è stato aggiunto in proporzione 1:1 a PDA (4% finali) e quindi versato in piastre Petri da 90 mm di diametro. Sono state previste 6 tesi da 5 repliche ciascuna relative a ciascun microrganismo e 3 tesi testimone con i tre ceppi del patogeno.

Al centro di ogni piastra è stato deposto un dischetto di 4 mm di diametro, ottenuto da giovani colonie di ciascun ceppo di patogeno, cresciuto su PDA a temperatura ambiente per 10 giorni. Le piastre testimone erano costituite da ciascun ceppo di patogeno inoculato su PDA addizionato con

il 50% del substrato PPM filtrato, nel quale non erano stati inoculati i batteri antagonisti.

I rilievi di crescita sono stati effettuati misurando il diametro della colonia fungina con cadenza giornaliera.

### **2.4.3 Competenza rizosferica ed endofitismo**

La competenza rizosferica è l'abilità di un microrganismo, di colonizzare e proliferare sopra e nelle vicinanze della superficie delle radici, utilizzando come substrato i nutrienti rilasciati dalle radici. Gli antagonisti competono efficacemente con la microflora del terreno per queste fonti di nutrimento (Harman e Björkman 1998).

L'endofitismo è la capacità di un microrganismo di crescere e svilupparsi all'interno dei tessuti di un vegetale, instaurando così un rapporto più intimo.

La competenza rizosferica e l'endofitismo sono stati verificati per tutti gli antagonisti dei formulati biologici di cui è stata testata l'attività antifungina.

Per ogni antagonista sono stati somministrati 50 ml di sospensione di spore a 10 piantine di zuccino di 9 giorni d'età cresciute su terreno sterilizzato, alle dosi di  $100 \times 10^7$  (*P. chlororaphis* MA342),  $79,5 \times 10^7$  (*P. fluorescens* ssp. *proradix* DSM13134),  $91,5 \times 10^4$  (*S. griseoviridis*),  $10 \times 10^7$  (*T. harzianum* T22),  $15 \times 10^7$  (*T. harzianum* ICC012 + *T. viride* ICC080).

La prova è servita per rilevare sia l'eventuale colonizzazione della rizosfera che la presenza degli isolati all'interno dei tessuti delle piante.

Per avere una buona stima della rizosfera, ovvero prelevare un quantitativo di terreno adeguato ben aderente alle radici, si è interrotto l'irrigazione delle piante 2 giorni prima del termine della prova. Le piantine sono state estratte delicatamente facendo attenzione a non danneggiare l'apparato radicale e che del terreno rimanesse aderente alle radici.

L'apparato radicale con le radici avvolte dallo strato di terreno è stato posto in becker sterili contenenti 10 ml di acqua distillata sterilizzata,

cercando di distaccare il più possibile il terreno dalle radici. Dopo leggera agitazione, aliquote di 100 µl di questa sospensione acquosa che sono stati piastrati su Petri da 90 mm contenenti PDA per i funghi e KB per i batteri. Dopo opportuna incubazione è stata valutata la presenza dei microrganismi. La presenza dei batteri fluorescenti è stata verificata con luce UV, mentre quella dei funghi con osservazioni a occhio nudo e al microscopio ottico. L'endofitismo è stato valutato ponendo sui substrati specifici (vedi competenza rizosferica) porzioni di radici opportunamente lavate dai residui terrosi e sterilizzate superficialmente per due minuti con una soluzione di sodio ipoclorito (1% di cloro attivo) in etanolo (50%) e risciacquate più volte. Le osservazioni sono state eseguite come sopra descritto per la competenza rizosfera.

Tutte le prove sono state ripetute almeno due volte con risultati simili tra di loro. I risultati che verranno in seguito riportati sono relativi ad una delle due prove.

#### **2.4.4 Elaborazioni statistiche dei dati**

I risultati ottenuti da tutte le prove sono stati sottoposti ad elaborazione statistica. In relazione all'impostazione delle prove, è stata effettuata un'analisi della varianza (ANOVA) a 1 o a 2 vie, a seconda della necessità e le medie sono state confrontate con il test DMS di Fisher con livello di significatività dello 0,05, oppure con la SEM (standard error of the mean) nel caso dell'ANOVA a 2 vie dove l'interazione tra fattori era risultata significativa. In alcuni casi si è fatto ricorso alla deviazione standard della media oppure alla correlazione.

I dati percentualizzati, prima dell'elaborazione statistica, sono stati trasformati nel corrispondente valore angolare (arcoseno) utilizzando le tavole di Bliss. Per le elaborazioni statistiche è stato utilizzato il software StatGraphics Plus, 1996.

# **Capitolo 3**

## **RISULTATI**

### 3.1 ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DEL PATOGENO

Le cinque aziende di zucchini visitate presentavano problematiche fitopatologiche ascrivibili al collasso delle cucurbitacee. Le piante, infatti, mostravano avvizzimenti dell'apparato fogliare con diverso grado di intensità ed il colletto evidenziava aree necrotiche talvolta con fuoriuscita di essudato dal colore ambrato. Le piante più colpite dalla malattia erano completamente avvizzite e con i tessuti del colletto marcescenti. Nessun sintomo è stato riscontrato sul frutto.



Foto 3.1 – Immagine di coltivazione di zucchini in una delle serre oggetto di studio. Sono evidenti ingiallimenti e avvizzimenti di alcune piante attaccate da *F. solani* f.sp. *cucurbitae*. (Foto C. Sigala)

Dal materiale ammalato prelevato, è stato osservato lo sviluppo di micelio sui tessuti infetti incubati in camera umida a temperatura ambientale. Da tutte le porzioni di colletto e radice infette incubate su PDA, si sono sviluppate colonie fungine morfologicamente molto simili tra di loro e presumibilmente responsabili della malattia osservata. Tali colonie sono state successivamente isolate in coltura pura per procedere all'identificazione del microrganismo ed alle successive prove di patogenicità e reisolamento per confermare i postulati di Koch.

Allo scopo di identificare il microrganismo responsabile della malattia, sono state condotte inizialmente osservazioni macro e microscopiche. Le osservazioni macroscopiche hanno evidenziato colonie con micelio aereo fitto e di colore bianco panna, tendente al grigio e talvolta al marrone chiaro, a rapido accrescimento. Le osservazioni di porzioni di colonia effettuate al microscopio ottico a luce trasmessa (300-500×) hanno mostrato la presenza di macro- e microconidi. I macroconidi si presentavano affusolati con la parte centrale più larga, plurisetati (3, 5 setti), con dimensioni di  $35-55 \mu\text{m} \times 4,5-6 \mu\text{m}$ , talvolta con cellule apicali e basali evidenti, queste ultime smussate. I microconidi erano di forma ovale, dimensioni  $8-16 \times 2-4 \mu\text{m}$ , talvolta con un setto, prodotti da monofialidi laterali o da conidiofori ramificati, emergenti dal micelio aereo. Sono state osservate anche clamidospore globose, prodotte singolarmente o a coppia  $9-12 \times 8-10 \mu\text{m}$  su corte ramificazioni laterali o intercalari. In base alle caratteristiche osservate ed alle chiavi identificative delle specie di *Fusarium* (Booth, 1977, Nelson et al., 1983) il fungo è stato identificato come *Fusarium solani* Snyd. & Hans.

In relazione alla matrice vegetale di provenienza, inoltre, si è ipotizzato che il microrganismo appartenesse alla forma speciale *cucurbitae*.

Per dimostrare sia la patogenicità del fungo che l'appartenenza alla forma speciale *cucurbitae*, sono state condotte successive prove, inoculando artificialmente con il presunto patogeno piante di diverse specie vegetali, quali cetriolo, melone, zucca e zucchini, appartenenti alla famiglia delle

Cucurbitacee e fagiolo e melanzana appartenenti alle famiglie delle Leguminose e Solanacee rispettivamente.

Nella tabella 3.1 è riportata l'incidenza percentuale di malattia sulle varie specie prese in esame. Si evince che le piante di fagiolo e melanzana sono risultate tutte sane non presentando sintomi di malattia. Al contrario valori di incidenza della malattia significativi sono stati rilevati per le quattro specie di Cucurbitacee considerate e con tutti gli isolati di patogeni testati. In generale zucca e zucchini hanno presentato valori d'incidenza di malattia più elevati. L'inoculazione su zucca e zucchini con gli isolati I-3 ed I-4 ha provocato un'incidenza di malattia significativamente più elevata rispetto a cetriolo e melone. Questi ultimi hanno mostrato una suscettibilità al patogeno significativamente uguale tra di loro nell'ambito di ciascun isolato fungino.

Tab. 3.1 - Patogenicità dei cinque isolati di *F. solani* su diverse specie vegetali, valutata dopo dieci giorni dall'inoculazione artificiale.

Specie vegetale	Frequenza malattia (%) <sup>(1)</sup>				
	I-1 <sup>(2)</sup>	I-2	I-3	I-4	I-5
Cetriolo	76 b <sup>(3)</sup>	79 b	80 b	75 b	72 b
Melone	85 bc	86 bc	78 b	75 b	80 bc
Zucca	92 c	98 c	95 c	97 c	100 c
Zucchini	100 c	98 c	97 c	99 c	98 c
Fagiolo	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Melanzana	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a

<sup>(1)</sup> Percentuale di piante ammalate rispetto a quelle inoculate.

<sup>(2)</sup> Isolati provenienti dal campo.

<sup>(3)</sup> I valore seguiti da lettere diverse, nella stessa colonna, sono significativamente diversi per  $P \leq 0,05$ , secondo il test DMS.

L'inoculazione del patogeno è stata eseguita deponendo un cilindretto di colonia in attiva crescita sul colletto di piantine allo stadio di 2 foglie vere pienamente sviluppate.

Da campioni di tessuti prelevati dalle piante con sintomi di malattia si è sempre sviluppato lo stesso patogeno che era stato inoculato artificialmente.

Da tali risultati si deduce, pertanto, che i cinque isolati esaminati sono i patogeni responsabili della malattia osservata in campo e che si tratta di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*.

In base all'osservazione dei sintomi in campo, localizzati esclusivamente a livello del colletto e della radice, si è anche dedotto che il patogeno potesse essere ascrivibile alla razza 1. Un'ulteriore identificazione per l'accertamento della razza è stata effettuata con metodo biomolecolare su tre colture monosporiche del fungo (Fs7, Fs17 e Fs37), scelte tra i fenotipi più diversi come descritto nei paragrafi successivi. L'amplificazione ed il sequenziamento della regione genica TEF (translation elongation factor) dei tre ceppi e l'utilizzo del database FUSARIUM-ID v.1.0 (David M Geiser, Dept of Plant Pathology, Penn State), ha consentito di riscontrare il 100% di omologia di un frammento di 720 bp di ciascuna delle tre monosporiche con la sequenza di *F. solani* f. sp. *cucurbitae* MPI TEF 1- $\alpha$  (numero d'accesso 22098), facendo concludere che il patogeno isolato è da ritenere *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* W.C. Snyder & H.N. Hansen, razza 1.

Di seguito viene riportato l'allineamento di una porzione nucleotidica della regione genica TEF, dove sono posti a confronto i tre fenotipi Fs7, Fs17 e Fs37. In rosso sono riportate le identità ed in nero le differenze.

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    ACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCCA
ceppo37   ACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCCA
ceppo17   -----ACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCCA
Fsolani_MPI ---TCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCCA
          *****
Prim.cons. ACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACCGTAAGTCAAACCCCA

          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    TCGCGATCTGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTTGGCGGGGGTTTCA
ceppo37   TCGCGATCTGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTTGGCGGGGGTTTCA
ceppo17   TCGCGATCTGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTTGGCGGGGGTTTCA
Fsolani_MPI TCGCGATCTGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTTGGCGGGGGTTTCA
          *****
Prim.cons. TCGCGATCTGCTTATCTCGGGTCGTGGAACCCCGCCTGGCATCTTGGCGGGGGTTTCA

          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    TCAGCCACTTCATGCTAACAAATCATCTACAGACCGGTCACCTGATCTACCAGTGGGTGG
ceppo37   TCAGCCACTTCATGCTAACAAATCATCTACAGACCGGTCACCTGATCTACCAGTGGGTGG
ceppo17   TCAGCCACTTCATGCTAACAAATCATCTACAGACCGGTCACCTGATCTACCAGTGGGTGG
Fsolani_MPI TCAGCCACTTCATGCTAACAAATCATCTACAGACCGGTCACCTGATCTACCAGTGGGTGG
          *****
Prim.cons. TCAGCCACTTCATGCTAACAAATCATCTACAGACCGGTCACCTGATCTACCAGTGGGTGG

          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    TATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGC
ceppo37   TATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGC
ceppo17   TATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGC
Fsolani_MPI TATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGC
          *****
Prim.cons. TATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTTGGTGACATCTCCCCGATCGCGC

          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    CTTGTATCCACATCGAATTCCCCGTCGAACTCCCTCCCTCGCGACACGCTCTGCGCCC
ceppo37   CTTGTATCCACATCGAATTCCCCGTCGAACTCCCTCCCTCGCGACACGCTCTGCGCCC
ceppo17   CTTGTATCCACATCGAATTCCCCGTCGAACTCCCTCCCTCGCGACACGCTCTGCGCCC
Fsolani_MPI CTTGTATCCACATCGAATTCCCCGTCGAACTCCCTCCCTCGCGACACGCTCTGCGCCC
          *****
Prim.cons. CTTGTATCCACATCGAATTCCCCGTCGAACTCCCTCCCTCGCGACACGCTCTGCGCCC

          310     320     330     340     350     360
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    GCGTCTCCCGAGTCACAAAATTTTGGCGTCCGACCGTAATTTTTTGGTGGGGCATT
ceppo37   GCGTCTCCCGAGTCACAAAATTTTGGCGTCCGACCGTAATTTTTTGGTGGGGCATT
ceppo17   GCGTCTCCCGAGTCACAAAATTTTGGCGTCCGACCGTAATTTTTTGGTGGGGCATT
Fsolani_MPI GCGTCTCCCGAGTCACAAAATTTTGGCGTCCGACCGTAATTTTTTGGTGGGGCATT
          *****
Prim.cons. GCGTCTCCCGAGTCACAAAATTTTGGCGTCCGACCGTAATTTTTTGGTGGGGCATT

          370     380     390     400     410     420
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    ACCCCGCCGCTCGGGTGACGTTGGACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAACACGAAAC
ceppo37   ACCCCGCCGCTCGGGTGACGTTGGACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAACACGAAAC
ceppo17   ACCCCGCCGCTCGGGTGACGTTGGACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAACACGAAAC
Fsolani_MPI ACCCCGCCGCTCGGGTGACGTTGGACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAACACGAAAC
          *****
Prim.cons. ACCCCGCCGCTCGGGTGACGTTGGACAAAGCCCTGATCCCTGCACACAAAACACGAAAC

          430     440     450     460     470     480
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    CCTCTTGGCGCGCATCATCACGTGGTTCACATAAGAAGCTAACCGTTCAACAATAGGAA
ceppo37   CCTCTTGGCGCGCATCATCACGTGGTTCACATAAGAAGCTAACCGTTCAACAATAGGAA
ceppo17   CCTCTTGGCGCGCATCATCACGTGGTTCACATAAGAAGCTAACCGTTCAACAATAGGAA
Fsolani_MPI CCTCTTGGCGCGCATCATCACGTGGTTCACATAAGAAGCTAACCGTTCAACAATAGGAA
          *****
Prim.cons. CCTCTTGGCGCGCATCATCACGTGGTTCACATAAGAAGCTAACCGTTCAACAATAGGAA

          490     500     510     520     530     540
          |      |      |      |      |      |
ceppo7    GCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGCAGCTCAAGGCC
ceppo37   GCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGCAGCTCAAGGCC
ceppo17   GCCGCTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCTTGCAGCTCAAGGCC

```

```

Fsolani_MPI  GCGCGTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCCTTGACAAGCTCAAGGCC
*****
Prim.cons.   GCGCGTGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCCTGGGTCCTTGACAAGCTCAAGGCC

                550      560      570      580      590      600
                |        |        |        |        |        |
ceppo7       GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTAC
ceppo37      GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTAC
ceppo17      GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTAC
Fsolani_MPI  GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTAC
*****
Prim.cons.   GAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCCGCTAC

                610      620      630      640      650      660
                |        |        |        |        |        |
ceppo7       TATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTCTCTCATCCGTCCTCAATCAGTCTCACCCTAAC
ceppo37      TATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTCTCTCATCCGTCCTCAATCAGTCTCACCCTAAC
ceppo17      TATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTCTCTCATCCGTCCTCAATCAGTCTCACCCTAAC
Fsolani_MPI  TATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTCTCTCATCCGTCCTCAATCAGTCTCACCCTAAC
*****
Prim.cons.   TATGTCACCGTCATTGGTATGTTGCTCTCTCATCCGTCCTCAATCAGTCTCACCCTAAC

                670      680
                |        |
ceppo7       AATCAACAGACGCTCCCG-----
ceppo37      AATCAACAGACGCTCCCG-----
ceppo17      AATCAACAGACGCTCCCG-----
Fsolani_MPI  AATCAACAGACGCTCCCGGCCACCGTG
*****
Prim.cons.   AATCAACAGACGCTCCCGGCCACCGTG

```

---

**Alignment data :**

```

Alignment length : 687
Identity (*) : 659 is 95.92 %
Strongly similar (:): 0 is 0.00 %
Weakly similar (.): 0 is 0.00 %
Different : 28 is 4.08 %
Sequence 0001 : ceppo7 ( 678 residues).
Sequence 0002 : ceppo37 ( 678 residues).
Sequence 0003 : ceppo17 ( 660 residues).
Sequence 0004 : Fsolani_MPI ( 684 residues).

```

### 3.2 CARATTERIZZAZIONE MORFO-FISIOLOGICA DEGLI ISOLATI DEL PATOGENO

Allo scopo di studiare gli isolati di *F. solani* f. sp. *cucurbitae* sono state allestite un centinaio di colture monosporiche (ceppi) su CLA a 25°C in condizioni di illuminazione naturale. Da prove precedenti con diversi substrati, è risultato che CLA consente una maggiore facilità di sporificazione dei ceppi in meno giorni rispetto al PDA (4 giorni contro 7) e una maggiore differenziazione morfologica dei medesimi.

Tab 3.2 - Suddivisione dei ceppi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* in base alle loro caratteristiche morfologiche su CLPDA.

Numero ceppi di <i>F. solani</i>	Caratteristiche micelio aereo <sup>(1)</sup>	Colore substrato	Caratteristiche conidi
1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 	aderente al substrato di colore marrone chiaro (Cinnamomo n.10) con zonature concentriche	Fulvo 12	Macroconidi: 3-5 setti, misura media 45 x 5 µm, prodotti in sporodochi. Microconidi: uni- o bicellulari in media 12 x 3 µm, prodotti su monofialidi
17, 18, 19 	fioccoso di colore Bianco panna (n.4D)	assente	Macroconidi: 3-5 setti, misura media 45 x 5 µm, prodotti in sporodochi. Microconidi: uni- o bicellulari, in media 12 x 3 µm, prodotti su monofialidi
26, 27, 28, 30, 37, 40, 41 	aderente al substrato di colore camoscio (n.52)	assente	Macroconidi: 3-5 setti, misura media 45 x 5 µm, portati da monofialidi, sporodochi assenti. Microconidi: uni- o bicellulari, in media 12 x 3 µm, prodotti su monofialidi

<sup>(1)</sup> Colorazione secondo la tabella colorimetrica identificativa “Colour identification chart” Flora of British Fungi, della Royal Botanic Garden Edinburgh, 1969.

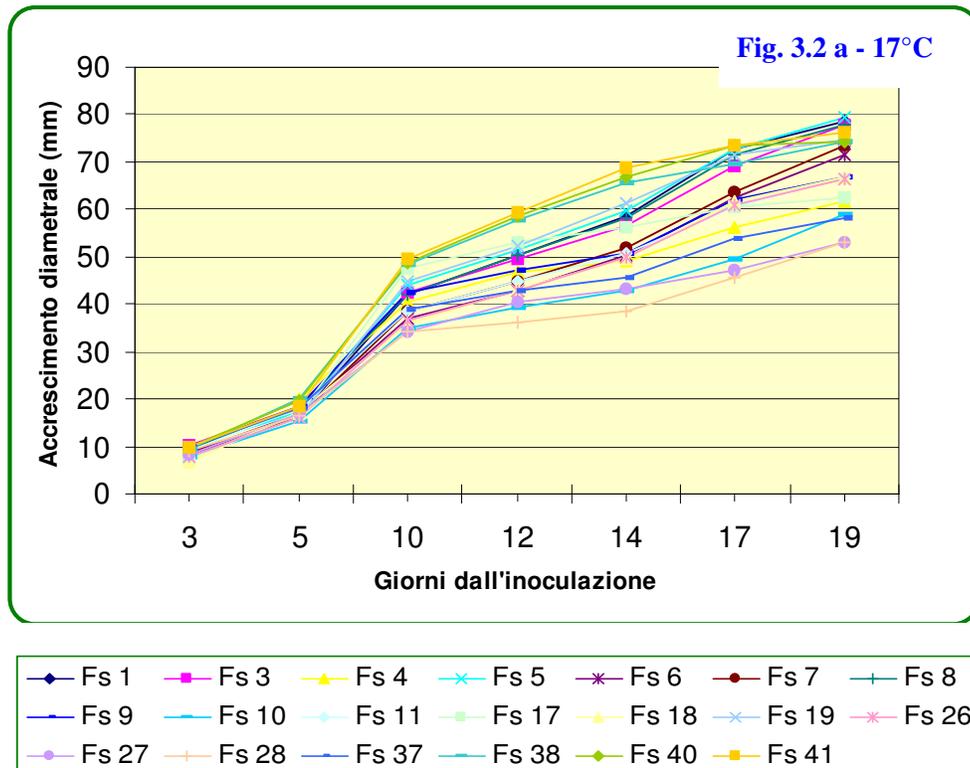
Le colture monosporiche sono state inizialmente suddivise su base morfologica, raggruppandole per omologia di colore, aspetto del micelio e capacità di sporificare e di produrre clamidospore. In particolare si sono notate le tipologie descritte nella tabella 3.2.

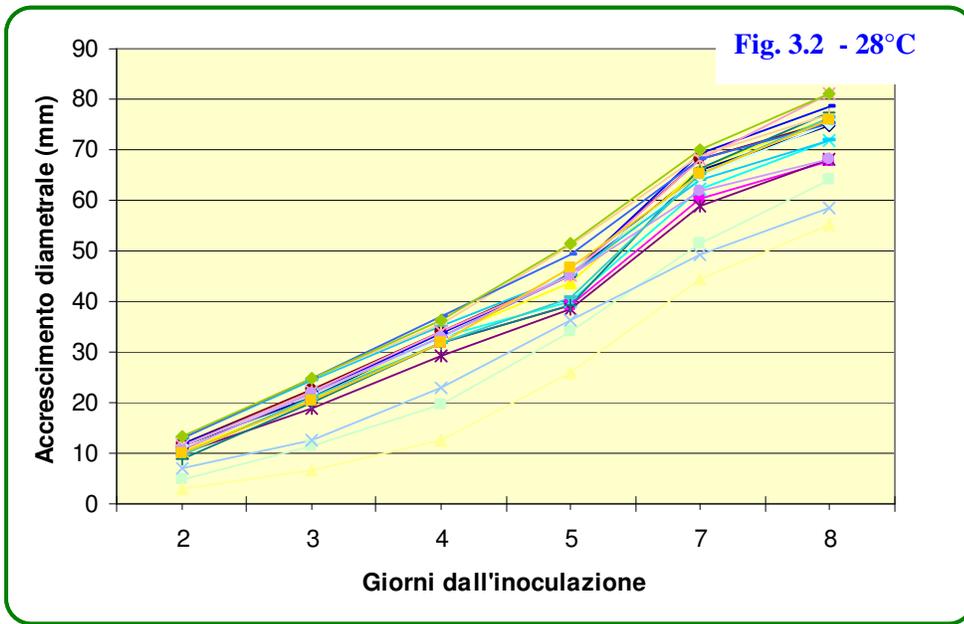
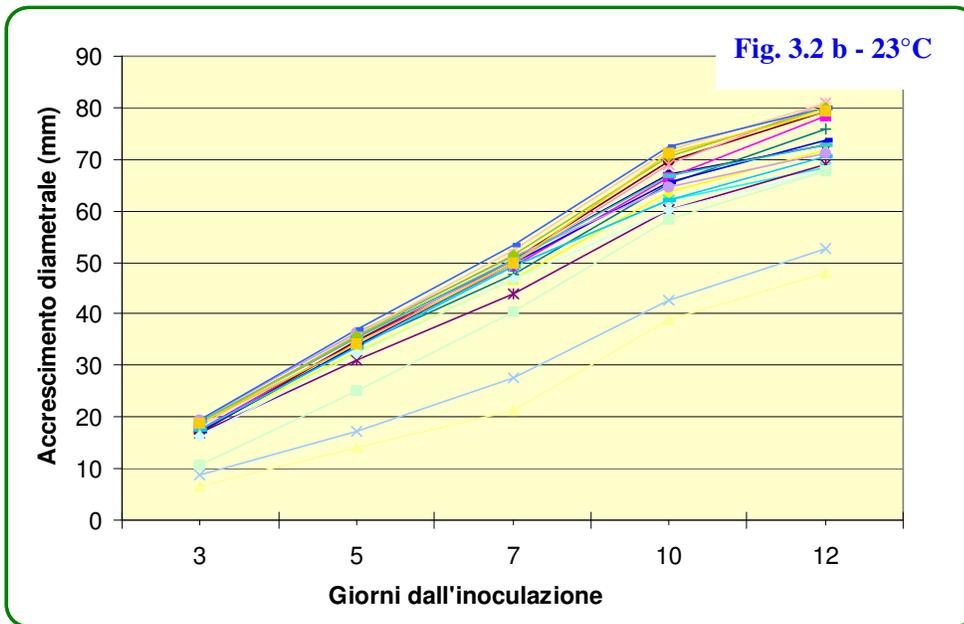
Tra tutti i ceppi ottenuti, ne sono stati scelti venti appartenenti alle tre tipologie, per la prosecuzione della caratterizzazione fisiologica riguardo 1) la crescita su PDA e CLPDA a diverse temperature ed in condizioni di luce e buio e 2) il grado di patogenicità su zuccchino.

### 3.2.1 Crescita di venti ceppi del patogeno su PDA

Inizialmente si è voluto esaminare l'accrescimento dei ceppi su PDA a tre temperature (17, 23 e 28°C) in condizioni di illuminazione alternata 12 ore luce e 12 di buio (Fig.3.2a, b, c e Tab. 3.3).

Le figure 3.2 mostrano l'accrescimento dei ceppi alle diverse temperature e per tutto il periodo dell'esperimento. Si nota che i tempi degli esperimenti non sono uguali tra di loro, in quanto le misurazioni della crescita sono state interrotte quando le colonie fungine più veloci avevano raggiunto gli 80 mm di diametro.





Tab. 3.3 - Accrescimento giornaliero delle colonie dei venti ceppi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* su PDA a 17, 23 e 28°C, in condizione di alternanza luce buio 12/12.

Ceppi	Crescita giornaliera (mm)			
	17°C	23°C	28°C	Medie
Fs 1	3,27	7,07	9,00	6,44
Fs 3	3,67	6,93	7,87	6,16
Fs 4	4,00	6,53	8,73	6,42
Fs 5	3,47	6,87	8,00	6,11
Fs 6	3,40	6,20	7,73	5,78
Fs 7	3,33	6,93	9,13	6,47
Fs 8	3,60	6,80	7,87	6,09
Fs 9	3,73	6,80	9,00	6,51
Fs 10	3,07	6,73	9,00	6,27
Fs 11	3,60	6,47	9,20	6,42
Fs 17	3,40	5,00	6,80	5,07
Fs 18	3,47	2,80	5,20	3,82
Fs 19	3,20	3,47	7,27	4,64
Fs 26	3,20	7,07	9,00	6,42
Fs 27	3,40	7,27	9,07	6,58
Fs 28	3,33	7,20	10,20	6,91
Fs 37	3,60	7,40	9,87	6,96
Fs 38	4,00	7,07	8,13	6,4
Fs 40	3,93	7,13	10,27	7,11
Fs 41	3,67	6,87	9,33	6,62
Medie	3,52	6,43	8,53	

Effetto del ceppo sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della condizione di incubazione alle tre temperature sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione ceppo x condizioni: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 0,323.

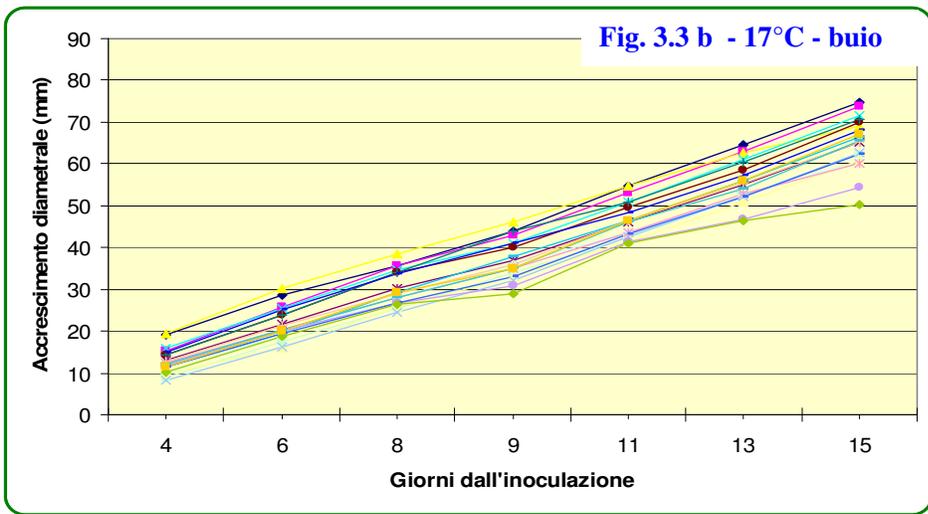
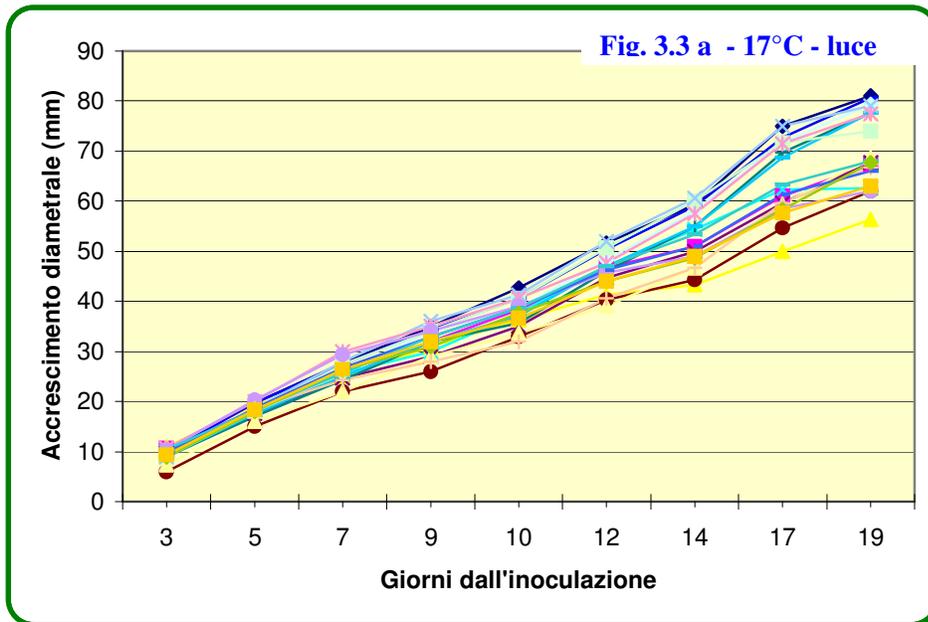
All'esame della tabella 3.3 si nota che la crescita giornaliera di quasi tutti i ceppi aumenta al crescere della temperatura d'incubazione, ad eccezione di Fs18 e Fs19. A 28°C, la temperatura più elevata, sono evidenti le maggiori differenze tra i ceppi che mostrano una crescita variabile da 5,20 a 10,27 mm giornalieri.

### **3.2.2 Crescita di venti ceppi del patogeno su CLPDA**

Successivamente si è pensato di esaminare l'accrescimento dei venti ceppi anche su CLPDA, considerato che questo substrato favorisce la contemporanea produzione di macroconidi e di microconidi; si è inoltre introdotto il fattore di variabilità luce e buio per ciascuna delle diverse temperature, 17, 23 e 28°C.

Nelle figura 3.3, relativa alla crescita dei 20 ceppi a 17°C alla luce ed al buio, si nota un andamento crescente nel tempo molto simile tra di essi.

La tabella 3.4 illustra la velocità di accrescimento dei ceppi a 17°C in condizioni di luce e buio. La crescita giornaliera rilevata si è differenziata in relazione sia al ceppo che alle condizioni di crescita luce-buio e tra questi due fattori è risultata significativa l'interazione. Si osserva che 14 ceppi sono cresciuti più velocemente al buio che alla luce, mentre solo 3 hanno avuto comportamento inverso. Per i rimanenti tre, Fs 17, 26 e 37, le condizioni di luce e buio non hanno influito significativamente sulla velocità di crescita.



Tab. 3.4 - Accrescimento giornaliero delle colonie dei venti ceppi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* su CLPDA a 17°C in condizioni di luce ed al buio.

Ceppi	Crescita giornaliera (mm)		
	17°C - Luce	17°C - Buio	Medie
Fs 1	3,88	4,89	4,36
Fs 3	3,56	4,78	4,18
Fs 4	3,44	5,11	4,32
Fs 5	3,33	4,56	3,93
Fs 6	3,22	4,11	3,66
Fs 7	2,89	4,44	3,64
Fs 8	3,56	4,89	4,23
Fs 9	3,80	4,56	4,18
Fs 10	3,56	4,22	3,89
Fs 11	3,78	4,00	3,91
Fs 17	3,78	3,78	3,80
Fs 18	3,22	3,67	3,47
Fs 19	4,00	3,56	3,78
Fs 26	3,89	3,89	3,84
Fs 27	3,78	3,44	3,61
Fs 28	3,11	4,00	3,53
Fs 37	3,67	3,67	3,69
Fs 38	3,67	3,89	3,81
Fs 40	3,44	3,22	3,33
Fs 41	3,56	3,89	3,72
Medie	3,56	4,13	

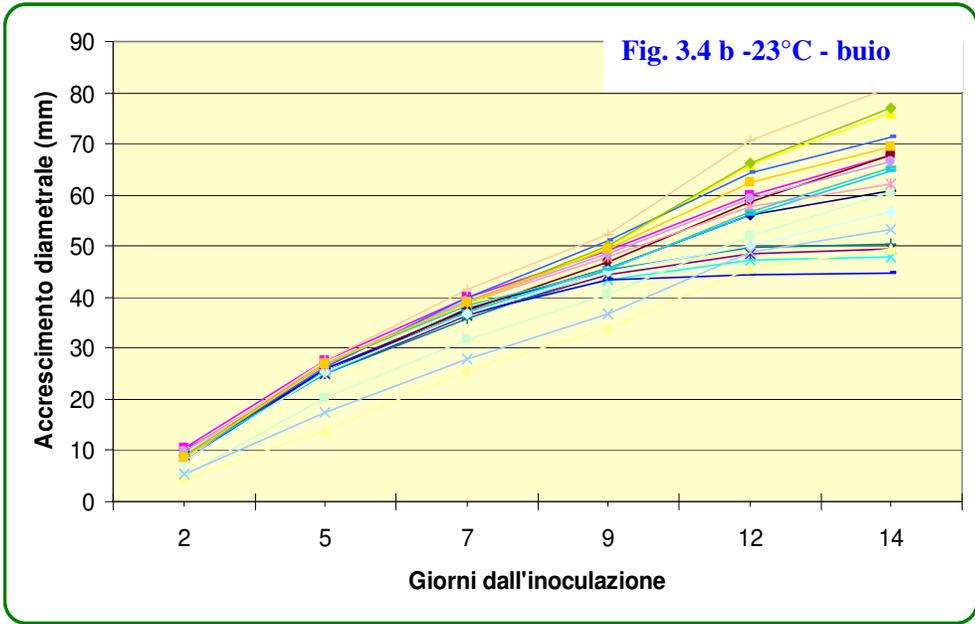
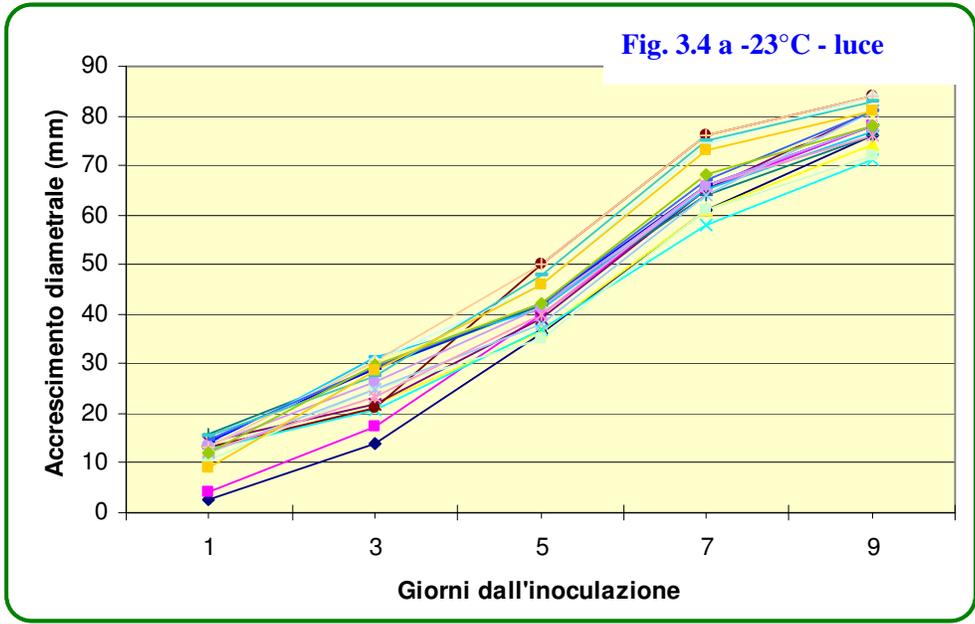
Effetto del ceppo sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della condizione di crescita luce e buio sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione ceppo x condizioni: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 0,108.

L'accrescimento nel tempo di tutto l'esperimento dei venti ceppi a 23°C alla luce ed al buio è illustrato nelle figure 3.4a e b. In generale, risulta evidente che i ceppi hanno raggiunto gli 80 mm di diametro in 9 giorni alla luce ed in 14 giorni al buio, facendo presumere una maggiore velocità di crescita in condizioni di luce.



Riguardo l'accrescimento giornaliero, a 23°C è stata ottenuta un'interazione significativa tra i ceppi e la condizione di crescita, dalla quale risulta che lo sviluppo dei ceppi è stato sempre maggiore in presenza di luce rispetto al buio, confermando quanto era stato osservato nelle figure 3.4 (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 - Accrescimento giornaliero delle colonie dei venti ceppi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* su CLPDA a 23°C in condizioni di luce ed al buio.

Ceppi	Crescita giornaliera (mm)		
	23°C - Luce	23°C - Buio	Medie
Fs 1	8,44	5,07	6,76
Fs 3	8,67	5,44	7,07
Fs 4	8,22	5,52	6,88
Fs 5	7,89	4,81	6,35
Fs 6	9,00	4,93	6,96
Fs 7	9,33	5,22	7,28
Fs 8	8,44	5,04	6,74
Fs 9	8,67	4,81	6,74
Fs 10	8,56	5,07	6,80
Fs 11	9,33	5,00	7,15
Fs 17	8,00	4,52	6,26
Fs 18	8,78	3,78	6,28
Fs 19	9,00	4,07	6,54
Fs 26	8,44	5,33	6,89
Fs 27	8,67	5,37	7,02
Fs 28	9,33	5,81	7,57
Fs 37	9,00	5,67	7,36
Fs 38	9,22	5,04	7,13
Fs 40	8,67	5,56	7,11
Fs 41	9,00	5,48	7,26
Medie	8,74	5,08	

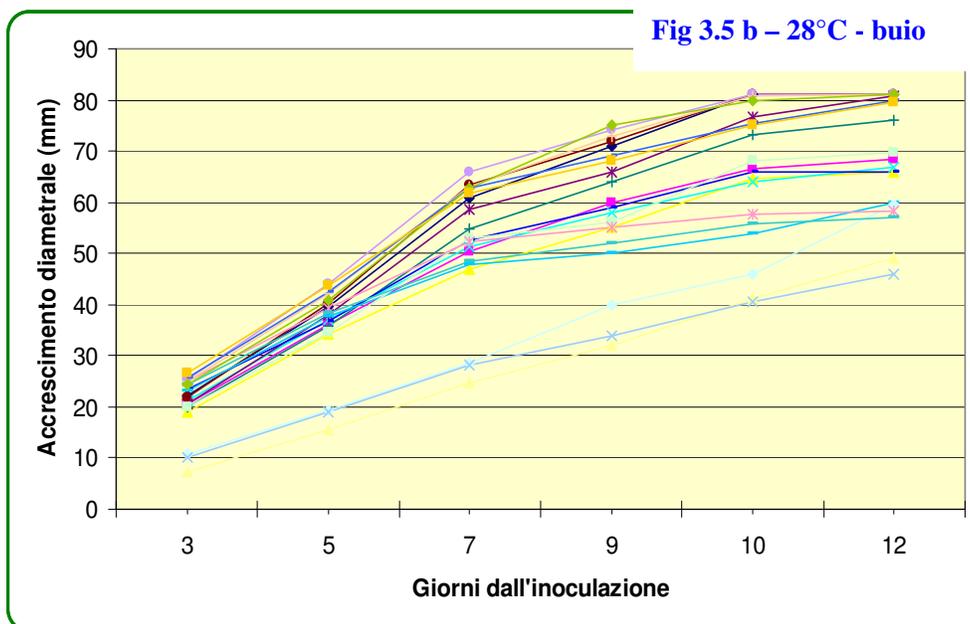
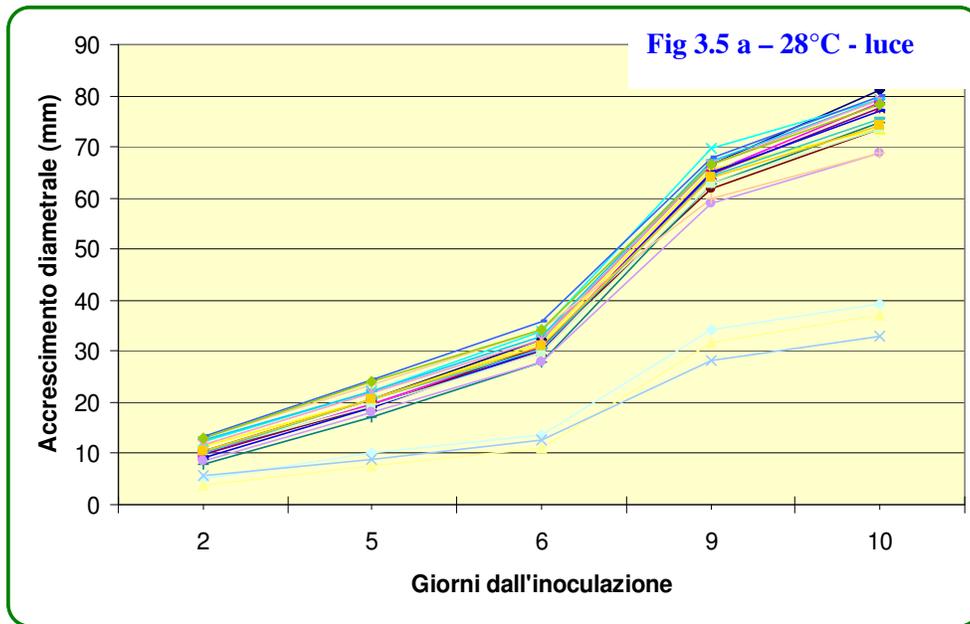
Effetto del ceppo sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della condizione di crescita luce e buio sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione ceppo x condizioni: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 0,452.

L'andamento generale dell'esperimento condotto sullo sviluppo dei venti ceppi a 28°C alla luce ed al buio è presentato nelle figure 3.5a e b dove si nota una maggiore uniformità di crescita alla luce.



condizione di crescita. Infatti si nota molta variabilità tra i ceppi riguardo il comportamento in presenza o assenza di luce: quattro ceppi (Fs 6, 8, 18 e 37) si sono sviluppati allo stesso modo alla luce ed al buio, otto (Fs3, 4, 5, 9, 10, 17, e 38) sono cresciuti di più alla luce e i rimanenti 8 (FS1, 7, 11, 19, 27, 28, 40, e 41) di più al buio.

Tab. 3.6 - Accrescimento giornaliero delle colonie dei venti ceppi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* su CLPDA a 28°C in condizioni di luce ed al buio.

Ceppi	Crescita giornaliera (mm)		
	28°C - Luce	28°C - Buio	Medie
Fs 1	7,41	7,89	7,65 lm
Fs 3	7,22	6,67	6,94 edfg
Fs 4	7,30	6,11	6,66 cde
Fs 5	7,74	6,44	6,87 cdfg
Fs 6	7,19	7,33	7,20 fghi
Fs 7	6,85	8,00	7,43 hil
Fs 8	6,96	7,11	7,04 efgh
Fs 9	7,22	6,56	6,89 cdef
Fs 10	7,48	5,56	6,52 cd
Fs 11	3,81	4,44	4,13 b
Fs 17	6,96	6,22	6,59 cd
Fs 18	3,52	3,56	3,54 a
Fs 19	3,15	3,78	3,46 a
Fs 26	7,41	6,11	6,76 cde
Fs 27	6,56	8,22	7,39 hil
Fs 28	6,67	8,11	7,39 hil
Fs 37	7,52	7,67	7,59 ilm
Fs 38	7,15	5,78	6,46 c
Fs 40	7,41	8,33	7,87 m
Fs 41	7,11	7,56	7,33 ghil
Medie	6,60 ns	6,57 ns	

Effetto del ceppo sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della condizione di crescita luce e buio sulla crescita: non significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione ceppo x condizioni: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 0,4402.

### 3.2.3 Patogenicità dei venti ceppi su zucchini

La tabella 3.7 e la figura 3.6 illustrano la prova di patogenicità dei 20 ceppi di *F. solani* f. sp. *cucurbitae* su zucchini. Sono stati rilevati sia la frequenza percentuale della malattia che la gravità. Si nota che tutti i ceppi hanno causato sintomi di malattia con una frequenza superiore al 60% ed una gravità superiore al 39%.

Tab. 3.7 - Patogenicità su zucchini dei venti ceppi di *F. solani* f. sp. *cucurbitae* inoculate nel suolo (100 UFC/g di suolo) al momento del trapianto. I sintomi di malattia sono stati rilevati 25 giorni dopo il trapianto.

Ceppi	Frequenza malattia (%) <sup>(1)</sup>		Gravità di malattia (%) <sup>(2)</sup>	
Fs 1	71,43	bc <sup>3</sup>	54,76	cd <sup>3</sup>
Fs 3	75,00	bcd	54,76	cd
Fs 4	67,86	ab	52,38	cd
Fs 5	60,71	a	39,29	a
Fs 6	82,14	def	55,95	cd
Fs 7	92,86	gh	83,00	g
Fs 8	85,71	efg	63,10	ef
Fs 9	96,43	h	80,95	g
Fs 10	96,43	h	80,95	g
Fs 11	92,86	gh	77,38	g
Fs 17	89,29	fgh	66,67	f
Fs 18	82,14	def	63,10	ef
Fs 19	78,57	cde	64,29	ef
Fs 26	67,86	ab	50,00	bc
Fs 27	75,00	bcd	58,33	de
Fs 28	78,57	cde	58,33	de
Fs 37	78,57	cde	50,00	bc
Fs 38	67,86	ab	45,25	b
Fs 40	89,29	fgh	69,05	f
Fs 41	85,71	efg	65,48	f

<sup>(1)</sup> Percentuale di piante ammalate rispetto a quelle inoculate con il patogeno.

<sup>(2)</sup> Calcolata con l'indice di Townsend Heuberger (vedi materiali e metodi).

<sup>(3)</sup> A lettere uguali corrispondono, nella stessa colonna, valori significativamente non differenti secondo il metodo di confronto multiplo di Newman Keuls per  $P < 0,05$ .

Correlazione tra frequenza e gravità della malattia:  $y = 1,102x - 28,16$ ;  $r^2 = 0,8796$ ;  $P^{***} = 0,0001$ .

Condizioni di crescita: 23-25°C, 12 ore di luce; 4 ripetizioni di 28 piante ciascuna.

I ceppi che hanno determinato la frequenza di malattia significativamente più elevata sono stati Fs7, 9, 10, 11, 17 e 40, mentre riguardo la gravità della malattia i ceppi più patogeni sono stati Fs7, 9, 10 e 11. E' stato riscontrato inoltre che frequenza e gravità della malattia sono correlate positivamente tra di loro (Tab. 3.7).

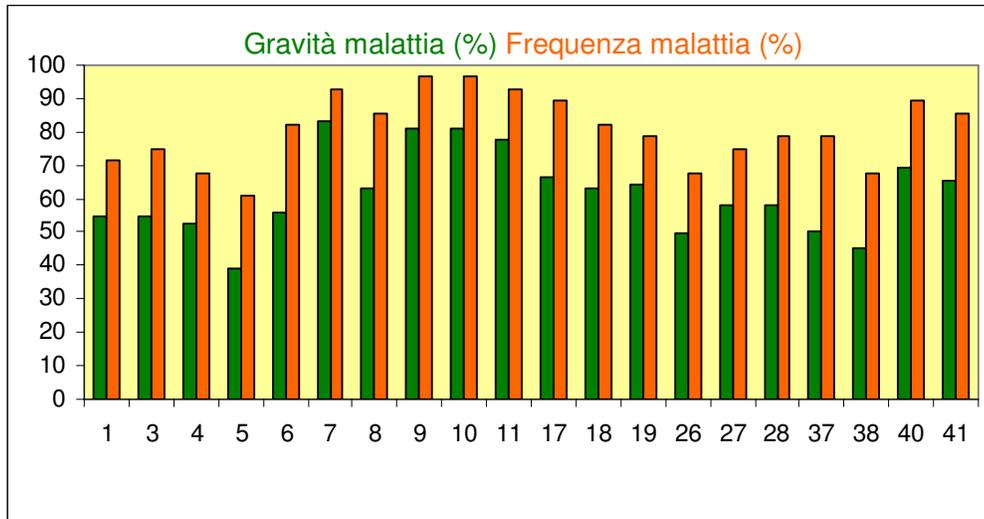


Fig. 3.6 - Rappresentazione grafica della gravità e della frequenza della malattia causata da *F. solani* f.sp. *cucurbitae* nella prova di patogenicità dei venti ceppi.

### 3.2.4 Determinazione attività di enzimi di patogenesi

I venti ceppi del patogeno sono stati studiati anche per quanto riguarda l'attività di alcuni enzimi presumibilmente coinvolti nel processo di patogenesi. Sono state determinate le attività poligalatturonasica (PG), pectin liasica (PL), cellulastica (CMC) e proteasica (PR).

Nella tabella 3.8 sono riportati i risultati relativi alle cinque attività enzimatiche per ciascun ceppo di *F. solani* f.sp. *cucurbitae*. Si nota che i livelli di attività sono molto variabili tra i ceppi, infatti le cellulasi vanno da 0,39 a 3,08 U/μl, le pectin liasi da 1,41 a 7,38 U/μl, le poligalatturonasi da 0,0001 a 0,0063 FDU/μl e le proteasi da 6,44 a 24,28 μg/μl.

Tab. 3.8 - Attività enzimatica di cellulasi (CMC), poligalatturonasi (PG), pectin liasi (PL) e proteasi (PR) rilevata nei filtrati dei venti ceppi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* cresciuti su Pratt's medium in presenza di pareti cellulari di fusto di zuccchino

Ceppo	CMC		PG		PL		PR	
	U/μl	DS <sup>(1)</sup>	FDU/μl	DS	U/μl	DS	μg/μl	DS
Fs 1	2.4038	0,050	0.0062	0,050	2.8902	0,000	9.54	0,000
Fs 3	2.078	0,050	0.0052	0,100	2.5424	0,058	14.09	0,000
Fs 4	2.1245	0,050	0.0056	0,050	1.4076	0,050	7.4879	0,000
Fs 5	0.8336	0,058	0.0037	0,050	2.898	0,050	7.3911	0,000
Fs 6	2.4736	0,050	0.0063	0,100	7.3832	0,685	14.09	0,000
Fs 7	3.0773	0,772	0.0023	0,058	10.504	0,058	10.6922	0,816
Fs 8	2.0649	0,100	0.0035	0,082	8.6362	0,000	6.4448	0,957
Fs 9	2.67	0,289	0.0026	0,050	5.5284	0,115	11.5416	0,500
Fs 10	2.0882	0,346	0.0017	0,058	6.9135	0,189	7.719	0,629
Fs 11	2.1813	0,346	0.0025	0,115	2.5287	0,000	8.9932	0,577
Fs 17	1.5304	0,250	0.0018	0,100	5.5579	0,000	24.2837	0,000
Fs 18	1.0649	0,000	0.0014	0,250	5.9109	0,400	18.1675	0,000
Fs 19	1.1649	0,289	0.002	0,100	5.4205	0,000	16.8084	0,000
Fs 26	0.1573	0,000	0.0002	0,096	4.3422	0,980	12.3911	0,577
Fs 27	0.39	0,000	0.0011	0,100	4.5579	0,000	6.4448	0,500
Fs 28	0.7973	0,250	0.0002	0,100	2.6709	0,500	13.2406	0,500
Fs 37	0.6111	0,350	0.0005	0,100	2.4013	0,000	9.8427	0,957
Fs 38	0.6344	0,320	0.0001	0,100	2.1857	0,000	9.8427	0,500
Fs 40	1.0649	0,300	0.0005	0,100	3.884	0,250	13.2406	0,500
Fs 41	0.4366	0,115	0.0062	0,050	2.8902	0,000	9.54	0,500

<sup>(1)</sup> Deviazione standard della media.

E' stata riscontrata una correlazione significativa tra attività pectin liasica e cellulastica nei confronti della frequenza e della gravità della malattia (Figg. 3.7 e 3.8).

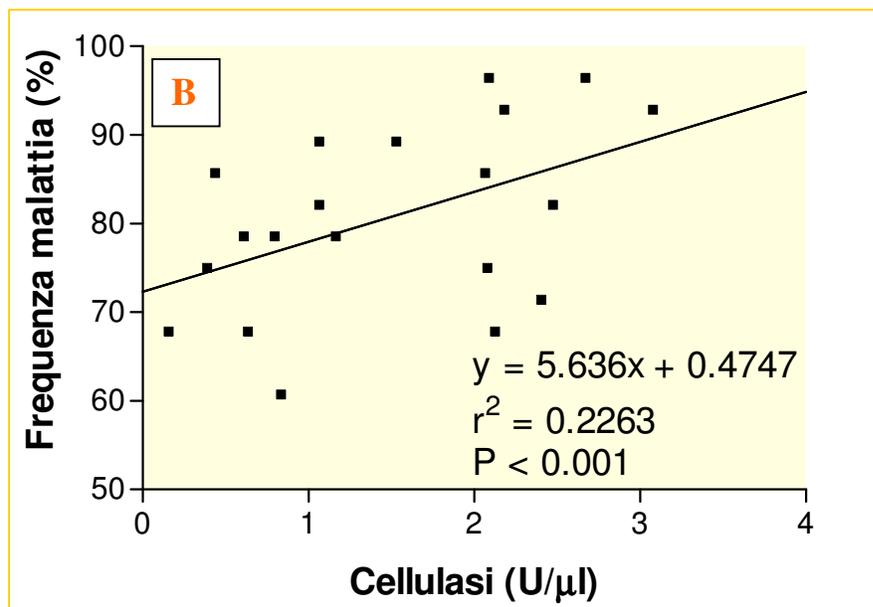
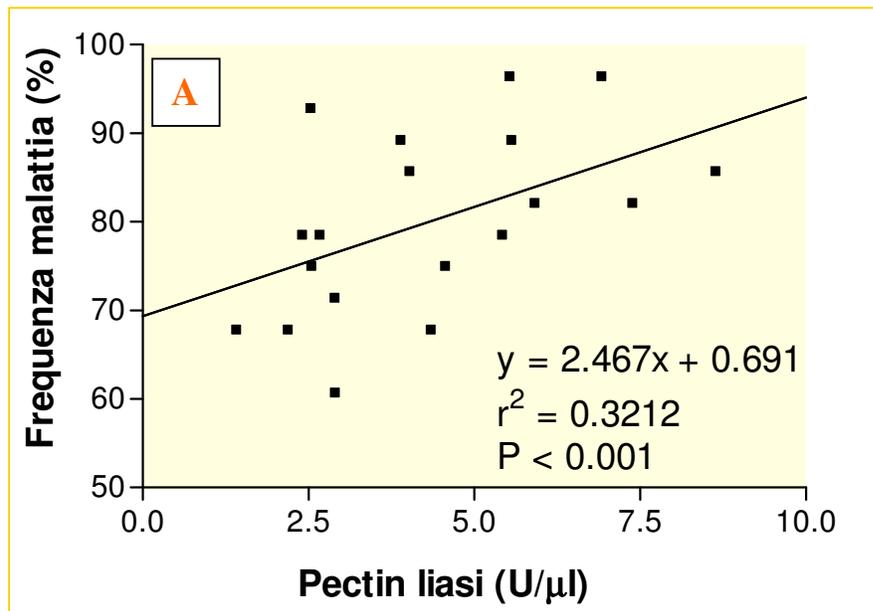


Fig. 3.7 - Relazione tra la frequenza di malattia causata dai venti ceppi di *F. solani* f.sp.*cucurbitae* e l'attività pectin liasica (A) e cellulasica (B) degli stessi.

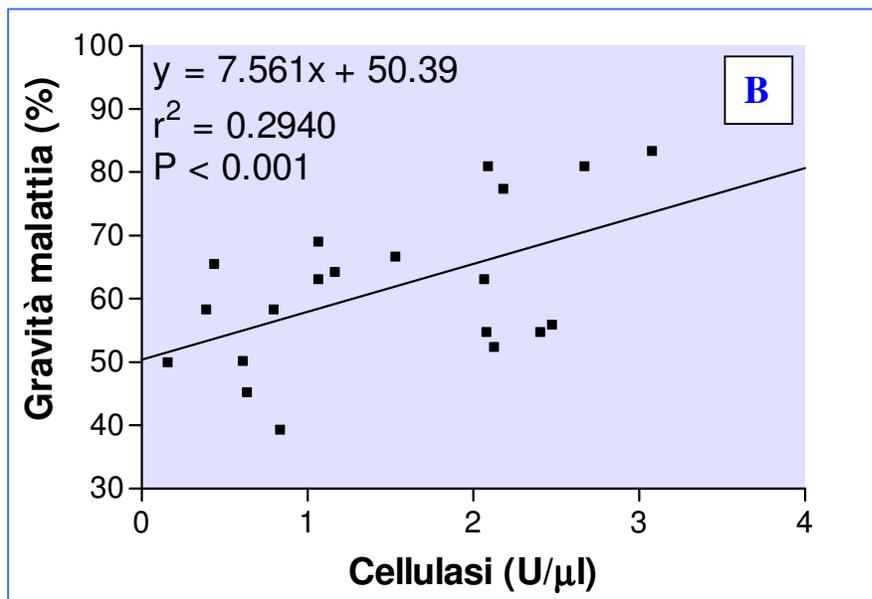
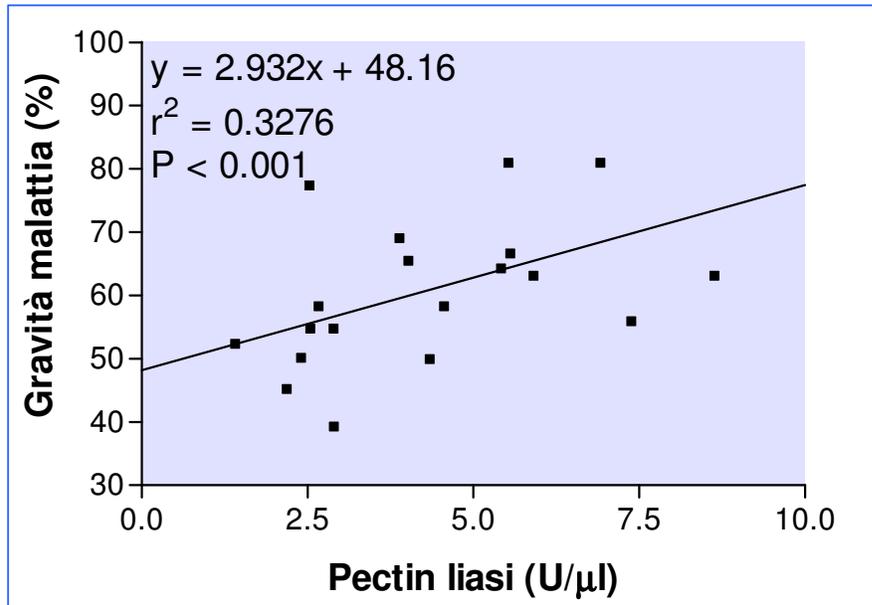


Fig. 3.8 - Relazione tra la gravità di malattia causata dai venti ceppi di *F. solani* f.sp.cucurbitae e l'attività pectin liasica (A) e cellulasica (B) degli stessi.

### 3.3 ATTIVITÀ DI PRODOTTI BIOLOGICI SULLA MALATTIA

L'effetto di formulati biologici a base di funghi e batteri (Tab. 2.1 § Materiali e Metodi) per il contenimento della malattia causata da *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, è stato studiato su due ceppi, Fs7 e Fs37, selezionati dalle prove precedenti in quanto dotati di elevata e bassa patogenicità rispettivamente.

Sono stati allestiti quattro esperimenti.

Gli esperimenti 1 e 2 sono relativi ai trattamenti eseguiti sul seme, nel terreno e su seme + terreno nei confronti dei ceppi Fs7 (più patogeno) ed Fs37 (meno patogeno), rispettivamente.

Gli esperimenti 3 e 4 sono relativi ai trattamenti eseguiti nel terreno nella fase di vivaio, di trapianto e in vivaio + trapianto nei confronti dei ceppi Fs7 (più patogeno) ed Fs37 (meno patogeno), rispettivamente.

Un primo saggio *in vivo* con i prodotti biologici ha inteso verificare se i trattamenti concianti potevano in qualche modo influenzare la geminazione dei semi di zucchini. I formulati non hanno né stimolato, né inibito l'emergenza del seme di zucchini, che notoriamente è già dotato di un'elevata germinazione e di rapida emergenza (dati non mostrati). E' stato solo notato che le piantine nate da semi trattati con Cedomon si mostravano di un verde più brillante rispetto alle altre.

Si precisa che l'inoculazione con il patogeno è stata sempre eseguita nel terreno, i trattamenti come specificato nei quattro esperimenti e le valutazioni della malattia, sia della frequenza che della gravità, sono state effettuate a 14 giorni dall'inoculazione con il patogeno.

In generale si è osservato che l'effetto dei trattamenti sull'esito della malattia, causata da inoculazioni artificiali di zucchini con i due ceppi Fs7 e Fs37 di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* razza 1, è risultato spesso differenziato

in funzione delle modalità di trattamento e della patogenicità dei due ceppi come di seguito illustrato.

### 3.3.1 Esperimento 1

Relativamente agli effetti dei trattamenti su Fs7, va sottolineato che tra i fattori trattamento e tipo di trattamento non è stata ottenuta alcuna interazione nei riguardi della frequenza di malattia (Tab. 3.8). I trattamenti del seme con Cedomon, Mycostop e Proradix hanno ridotto significativamente la frequenza di malattia rispetto al testimone non trattato – inoculato. Non è stata rilevata nessuna differenza tra i trattamenti somministrati al terreno, mentre combinando i due tipi di trattamento, seme + terreno, tutti i formulati, ad eccezione di Clonotry hanno ridotto la malattia.

Tab. 3.8 - Effetto di diverse modalità di trattamento su seme, terreno e seme + terreno sulla frequenza della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs7 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Frequenza di malattia (%) <sup>(1)</sup>		
	Seme	Terreno <sup>(3)</sup>	Seme + terreno
Cedomon	30,0 a <sup>(2)</sup>	42,5	25,0 a
Clonotry	50,0 c	55,0	52,5 b
Mycostop	32,5 ab	47,5	30,0 a
Proradix	35,0 ab	45,0	35,0 a
Remedier	45,0 bc	45,0	35,0 a
Rootshield	45,0 bc	42,5	30,0 a
Non trattato inoculato	54,0 c	55,0	52,0 b

<sup>(1)</sup> Calcolata con il rapporto percentualizzato del numero delle piante ammalate rispetto al totale delle piante.

<sup>(2)</sup> A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti nella stessa colonna, secondo il test LSD di Fisher per  $P \leq 0,05$ .

<sup>(3)</sup> Le medie non sono significativamente diverse tra di loro per  $P \leq 0,05$ .

Tab. 3.9 - Effetto di diverse modalità di trattamento su seme, terreno e seme + terreno sulla gravità della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs7 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Gravità malattia (%) <sup>(1)</sup>			Medie
	Seme	Terreno	Seme + terreno	
Cedomon	25,35	38,41	22,87	28,87
Clonotry	40,53	39,00	39,02	39,52
Mycostop	29,75	38,41	27,90	32,02
Proradix	28,15	34,75	25,10	29,3
Remedier	34,48	34,12	29,12	32,57
Rootshield	31,63	29,75	29,75	30,38
Non trattato inoculato	39,73	38,45	40,12	39,43
Medie	32,81	36,13	30,55	

<sup>(1)</sup> Calcolata con l'indice di Townsend Heuberger (vedi materiali e metodi).

Elaborazione statistica: analisi della varianza a 2 vie.

Effetto del trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della modalità trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione trattamento x modalità trattamento: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 4,53.

Passando ad esaminare gli effetti dei trattamenti sulla gravità della malattia, si sottolinea che l'interazione tra trattamenti e tipo di trattamenti è stata significativa (Tab. 3.9). In generale si nota che nei trattamenti sul seme e su seme + terreno, tutti i prodotti, ad eccezione di Clonotry, hanno ridotto la gravità della malattia. Cedomon, Mycostop e Proradix hanno esercitato la stessa efficacia sul seme, mentre su seme + terreno Cedomon è risultato migliore di Mycostop. Rootshield è stato l'unico prodotto che ha ridotto significativamente, e nella stessa misura, la malattia in tutte le tipologie di trattamento. L'efficacia di Remedier è risultata migliore nel trattamento combinato rispetto a quello su seme, mentre quella di

Cedomon, Mycostop e Proradix è risultata simile nei due tipi di trattamento.

### 3.3.2 Esperimento 2

Gli effetti dei trattamenti su seme e/o terreno nei confronti della frequenza della malattia causata dal ceppo Fs37 sono riportati nella tabella 3.10. Come precedentemente osservato per il ceppo Fs7 sulla frequenza di malattia, l'interazione tra i fattori trattamento e tipo di trattamento non è risultata significativa. Si nota che tutti i trattamenti hanno determinato la riduzione significativa della frequenza di malattia in ciascuna tipologia di somministrazione e che Clonotry ha esercitato l'efficacia inferiore.

Tab. 3.10 - Effetto di diverse modalità di trattamento su seme, terreno e seme + terreno sulla frequenza della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs37 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Frequenza malattia (%) <sup>(1)</sup>		
	Seme	Terreno	Seme + terreno
Cedomon	12,5 a <sup>(2)</sup>	20,0 a	10,0 a
Clonotry	30,0 b	30,0 b	30,0 c
Mycostop	15,0 a	20,5 a	15,5 ab
Proradix	17,5 a	25,0 ab	15,0 ab
Remedier	20,0 a	20,5 a	20,0 b
Rootshield	20,0 a	20,0 a	15,0 ab
Non trattato inoculato	40,0 c	39,5 c	42,0 d

<sup>(1)</sup> Calcolata con il rapporto percentualizzato del numero delle piante ammalate rispetto al totale delle piante.

<sup>(2)</sup> A lettere diverse corrispondono valori significativamente differenti nella stessa colonna, secondo il test LSD di Fisher per  $P \leq 0,05$ .

Nei riguardi della gravità della malattia (Tab. 3.11), tutti i trattamenti sono risultati efficaci nelle tre tipologie di trattamento, anche se il contenimento maggiore della malattia è stato ottenuto nel trattamento combinato, ad

eccezione di Clonotry. I formulati che hanno ridotto di più la gravità sono stati Cedomod e Proradix. Il trattamento al terreno ha fornito complessivamente un contenimento minore rispetto a quello sul seme e a quello combinato.

Tab. 3.11 - Effetto di diverse modalità di trattamento su seme, terreno e seme + terreno sulla gravità della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs37 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Gravità malattia (%) <sup>(1)</sup>			Medie
	Seme	Terreno	Seme + terreno	
Cedomon	10,35	16,25	9,18	11,92
Clonotry	20,01	20,80	19,80	20,20
Mycostop	12,70	15,20	11,23	13,04
Proradix	11,23	14,91	9,05	11,73
Remedier	12,35	13,63	11,65	12,54
Rootshield	12,78	11,73	11,88	12,13
Non trattato inoculato	24,55	22,15	23,68	23,46
Medie	14,85	16,38	13,78	

<sup>(1)</sup> Calcolata con l'indice di Townsend Heuberger (vedi materiali e metodi).

Elaborazione statistica: analisi della varianza a 2 vie.

Effetto del trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della modalità trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione trattamento x modalità trattamento: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 0,974.

### 3.3.3 Esperimento 3

Passando ad esaminare gli effetti dei trattamenti eseguiti in vivaio, al trapianto e in vivaio + trapianto sulla frequenza di malattia, si nota un'elevata virulenza del ceppo F7 del patogeno che ha causato l'infezione di tutte le piante nel testimone (Tab.3.12). Tutti i formulati, ad eccezione

di Rootshield hanno ridotto la malattia significativamente rispetto al testimone e quello più efficace è stato Cedomon.

Tab. 3.12 - Effetto di diverse modalità di trattamento in vivaio, al trapianto e vivaio + trapianto sulla frequenza della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs7 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Frequenza malattia (%) <sup>(1)</sup>			Medie
	Vivaio	Trapianto	Vivaio + trapianto	
Cedomon	70,0	95,0	65,0	77,6
Mycostop	85,0	100	85,0	90,0
Proradix	80,0	92,5	85,0	85,8
Remedier	95,0	95,0	90,0	93,3
Rootshield	100	100	100	100
Non trattato inoculato	100	100	100	100
Medie	88,33	97,08	87,5	

<sup>(1)</sup> Calcolata con il rapporto percentualizzato del numero delle piante ammalate rispetto al totale delle piante.

Elaborazione statistica: analisi della varianza a 2 vie.

Effetto del trattamento sulla frequenza della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della modalità trattamento sulla frequenza della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione trattamento x modalità trattamento: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 0,620.

Nei riguardi della gravità della malattia (Tab. 3.13) è stata rilevata una percentuale particolarmente elevata nei testimoni. I trattamenti sono stati variamente efficaci, a parte Rootshield che non si è mai differenziato dai testimoni. In generale si osserva che il trattamento combinato ha consentito il contenimento più elevato della malattia, e quello al solo trapianto quello inferiore. Le percentuali più basse di gravità di malattia sono state ottenute con Cedomon e Proradix.

Tab. 3.13 - Effetto di diverse modalità di trattamento in vivaio, al trapianto e vivaio + trapianto sulla gravità della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs7 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Gravità malattia (%) <sup>(1)</sup>			Medie
	Vivaio	Trapianto	Vivaio + trapianto	
Cedomon	35,75	61,78	25,63	41,05
Mycostop	58,15	58,75	48,50	55,13
Proradix	47,50	62,78	35,50	48,59
Remedier	52,78	60,33	47,25	53,45
Rootshield	62,28	62,53	52,53	59,11
Non trattato inoculato	62,20	64,13	63,50	62,61
Medie	52,77	61,71	45,48	

<sup>(1)</sup> Calcolata con l'indice di Townsend Heuberger (vedi materiali e metodi).

Elaborazione statistica: analisi della varianza a 2 vie.

Effetto del trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della modalità trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione trattamento x modalità trattamento: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 1,249.

### 3.3.4 Esperimento 4

L'esame relativo agli effetti dei trattamenti in vivaio e/o trapianto nei confronti del ceppo Fs37 (Tab. 3.14), dotato di minore patogenicità del precedente ceppo Fs7, evidenzia una frequenza di malattia di circa la metà di quanto osservato in precedenza nella tabella 3.12. Tutti i trattamenti hanno ridotto la frequenza della malattia in tutte le tipologie di applicazione dei formulati. Il doppio trattamento vivaio + trapianto ha ridotto maggiormente la malattia. Cedomon è risultato il formulato più

efficace, seguito per attività da Remedier, soprattutto nel doppio trattamento.

Tab. 3.14 - Effetto di diverse modalità di trattamento in vivaio, al trapianto e vivaio + trapianto sulla frequenza della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs37 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Frequenza malattia (%) <sup>(1)</sup>			Medie
	Vivaio	Trapianto	Vivaio + trapianto	
Cedomon	35,0	55,0	27,5	39,2
Mycostop	42,5	52,5	45,0	46,6
Proradix	45,0	57,5	40,0	47,5
Remedier	47,5	55,0	35,0	45,8
Rootshield	47,5	52,5	42,5	47,5
Non trattato inoculato	55,5	58,0	57,5	57,0
Medie	45,5	55,1	41,2	

<sup>(1)</sup> Calcolata con il rapporto percentualizzato del numero delle piante ammalate rispetto al totale delle piante.

Elaborazione statistica: analisi della varianza a 2 vie.

Effetto del trattamento sulla frequenza della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della modalità trattamento sulla frequenza della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione trattamento x modalità trattamento: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 0,7485.

Tutti i trattamenti effettuati hanno ridotto efficacemente anche la gravità della malattia, in particolar modo nel doppio trattamento (Tab. 3.15). La somministrazione al solo trapianto ha fornito complessivamente i risultati meno soddisfacenti. I prodotti più efficaci sono stati Cedomon, Proradix e Rootshield, gli ultimi due relativamente al trattamento in vivaio + trapianto.

Tab. 3.15 - Effetto di diverse modalità di trattamento in vivaio, al trapianto e vivaio + trapianto sulla gravità della malattia provocata artificialmente con il ceppo Fs37 di *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* razza 1 inoculato artificialmente nel terreno.

Trattamento	Gravità malattia (%) <sup>(1)</sup>			Medie
	Vivaio	Trapianto	Vivaio + trapianto	
Cedomon	20,13	34,40	13,12	22,55
Mycostop	25,60	38,12	15,52	26,41
Proradix	23,25	34,52	12,50	23,42
Remedier	30,43	33,01	21,75	28,39
Rootshield	23,20	33,75	13,50	23,48
Non trattato inoculato	37,20	40,20	38,28	38,56
Medie	26,63	35,67	19,11	

<sup>(1)</sup> Calcolata con l'indice di Townsend Heuberger (vedi materiali e metodi).

Elaborazione statistica: analisi della varianza a 2 vie.

Effetto del trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della modalità trattamento sulla gravità della malattia: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione trattamento x modalità trattamento: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 1,28.

### **3.4 MODALITÀ D'AZIONE DI MICRORGANISMI CONTENUTI NEI FORMULATI BIOLOGICI**

Allo scopo di interpretare i risultati ottenuti negli esperimenti di attività dei prodotti biologici sulla malattia, sono stati condotti saggi *in vitro* per studiare le modalità d'azione dei microrganismi contenuti nei formulati utilizzati *in vivo* contro il patogeno. Sono state studiate le modalità di inibizione della crescita del patogeno, competizione per il substrato (colonizzazione) e la produzione di metaboliti non volatili (antibiosi). I microrganismi antagonisti utilizzati per questi saggi sono stati isolati in purezza dai formulati per evidenziarne le singole azioni specifiche nei confronti del patogeno, in assenza di interferenze da parte dei coformulanti contenuti nei prodotti commerciali di partenza. Per questi esperimenti sono stati presi in esame i due ceppi del patogeno testati *in vivo*, Fs7 e Fs37, e un ulteriore ceppo, Fs17, dotato di caratteristiche fenotipiche e fisiologiche diverse e di patogenicità intermedia.

I saggi condotti in coltura duale, patogeno/antagonista, hanno permesso di evidenziare l'inibizione di crescita del patogeno e la colonizzazione del substrato da parte dell'antagonista.

#### **3.4.1 Inibizione della crescita del patogeno**

Nella tabella 3.12 sono riportati i risultati dell'inibizione percentuale di crescita radiale (IPCR) dei tre ceppi di *F. solani* f.sp. *cucurbitae*, Fs7, Fs17 e Fs37, da parte dei sei microrganismi contenuti nei diversi formulati. L'analisi dei dati ha evidenziato che sia il fattore ceppo che il fattore trattamento hanno avuto un effetto significativo sull'IPCR e che la loro interazione è risultata significativa. Si evidenzia che tutti gli antagonisti hanno inibito, in misura più o meno efficace, la crescita dei tre ceppi del patogeno. Gli antagonisti che hanno maggiormente inibito tutti i tre ceppi sono stati i batteri SG-K61 e PP-DSM13134. Ciascun microrganismo ha mostrato, in generale, livelli di inibizione diversi in relazione al ceppo.

Tab. 3.12 - Inibizione percentuale di crescita radiale di tre ceppi di *F. solani* f. sp. *cucurbitae* per effetto degli antagonisti contenuti nei formulati.

Antagonista	Ceppo <i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i>			Medie
	F7	F17	F37	
PC-MA342	59,52	58,89	55,96	58,12
SG-K61	77,59	79,62	69,72	75,64
PP-DSM13134	66,46	70,44	73,07	69,99
TV-ICC080	46,49	57,07	57,27	49,75
TH-ICC012	53,43	57,99	45,68	56,23
TH-T22	31,63	50,01	54,35	42,10
Medie	55,68	62,33	57,90	

Effetto del ceppo sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della condizione di crescita luce e buio sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione ceppo x condizioni: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 2,810.

PC-MA342: *Pseudomonas choloraphis* MA342 (Cedomon)

SG-K61: *Streptomyces griseoviridis* K61 (Mycostop)

PP-DSM13134: *Pseudomonas fluorescens* sp. *proradix* DSM13134

TV-ICC080: *Trichoderma viride* ICC080 (Remedier)

TH-ICC012: *T. harzianum* ICC012 (Remedier)

TH-T22: *T. harzianum* T22 (Rootshield).

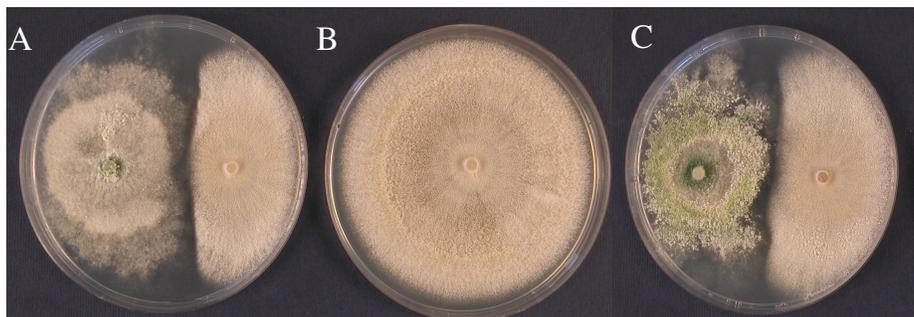


Foto 3.2 - Confronto a coppia tra *T. viride* (A) e *T. harzianum* (C) con *F. solani* su PDA. Al centro il testimone *F. solani* (B). (Foto R. Roberti)

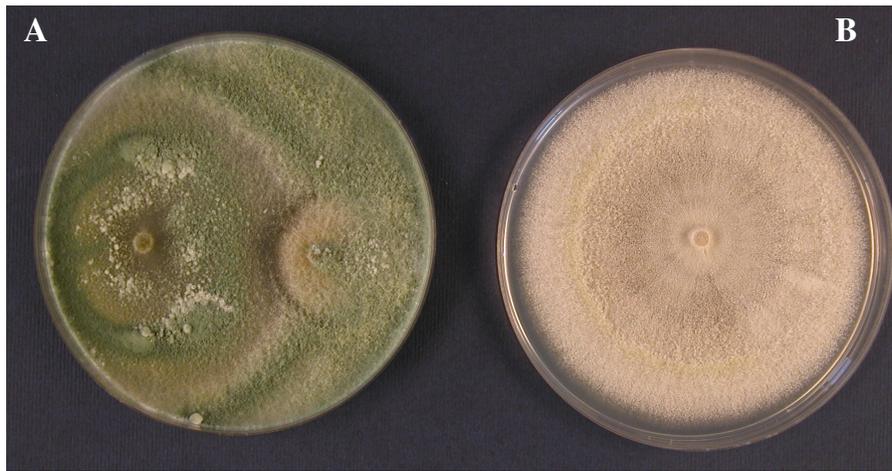


Foto 3.3 - Confronto a coppia tra *T. harzianum* T-22 (Rootshield) (A) con *F. solani* (B) su PDA. (Foto R. Roberti)

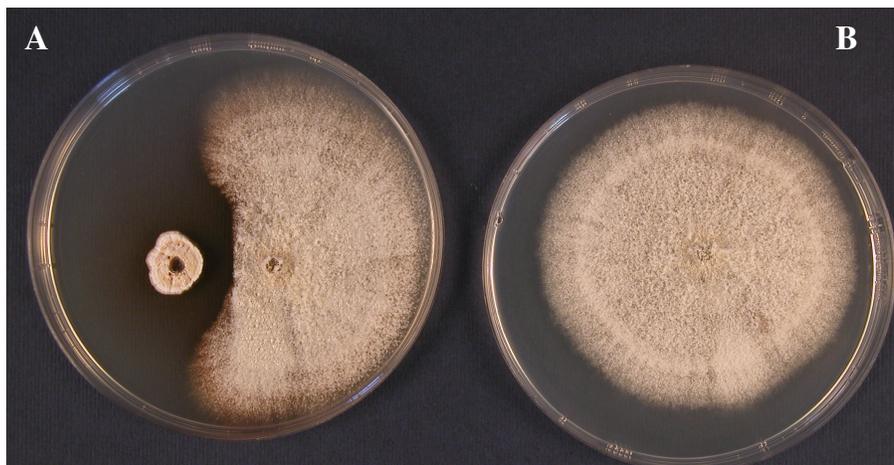


Foto 3.4 - Confronto a coppia tra *S. griseoviridis* K61 (Mycostop) (A) con *F. solani* (B) su PDA. (Foto R. Roberti)

### 3.4.2 Colonizzazione del substrato da parte dell'antagonista

Riguardo la colonizzazione del substrato da parte degli antagonisti (Tab. 3.13) si evidenzia, come sopra, che il fattore ceppo ed il fattore antagonista hanno avuto un effetto significativo e che la loro interazione è risultata significativa. In generale si nota che tutti gli antagonisti sono stati in grado di svilupparsi in varia misura sul substrato, ed in particolare si evidenzia, come prevedibile che le specie di *Trichoderma* (TH-ICC012, TH-T22 e TV-ICC080) hanno colonizzato più dei batteri, essendo dotati di ife ad accrescimento molto rapido. TH-T22 è risultato il fungo più attivo in tutte le tre combinazioni di crescita duale con ciascun ceppo patogeno. Si nota, inoltre, che tra i batteri, SG-K6 colonizza in misura maggiore.

Tab. 3.13 - Colonizzazione percentuale del substrato da parte degli antagonisti cresciuti in coltura duale con gli isolati F7, 17 e 37 di *F. solani* f. sp. *cucurbitae*.

Antagonisti	Ceppo <i>F. solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i>			Medie
	F7	F17	F37	
PC-MA342	10,0	5,0	5,0	6,67
SG-K61	18,0	19,0	18,0	18,33
PP-DSM13134	10,0	8,33	7,4	8,57
TV-ICC080	53,0	55,5	51,9	53,46
TH-ICC012	58,9	64,7	59,5	61,04
TH-T22	70,0	69,5	88,0	75,83
Medie	36,65	37,02	38,30	

Effetto del ceppo sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della condizione di crescita luce e buio sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione ceppo x condizioni: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 2,335.

PC-MA342: *Pseudomonas choloraphis* MA342 (Cedomon)

SG-K61: *Streptomyces griseoviridis* K61 (Mycostop)

PP-DSM13134: *Pseudomonas fluorescens* sp. *proradix* DSM13134

TV-ICC080: *Trichoderma viride* ICC080 (Remedier)

TH-ICC012: *T. harzianum* ICC012 (Remedier)

TH-T22: *T. harzianum* T22 (Rootshield).

### 3.4.3 Antibiosi

Il meccanismo dell'antibiosi è stato studiato con una tecnica che ha previsto l'inoculazione di ciascun ceppo del patogeno Fs7, Fs17 e Fs37 su PDA, contenente i metaboliti non volatili di ogni antagonista. I dati ottenuti sono stati espressi come accrescimento radiale (Tab. 3.14). Sia il fattore ceppo che il fattore trattamento, intendendo per trattamento la presenza di metaboliti non volatili di ciascun antagonista, hanno influenzato significativamente la crescita e anche l'interazione tra i due fattori è stata significativa. Tutti gli antagonisti hanno mostrato di produrre metaboliti efficaci nel ridurre la crescita dei tre ceppi del patogeno. Le crescite minori si sono avute per effetto di PP-DSM13134 su Fs17 (23,8 mm), di TV-ICC080 su tutti i ceppi (da 29,2 a 32,8 mm) e di TH-ICC012 su F7 (32,4 mm).

Tab. 3.14 - Effetto di metaboliti non volatili rilasciati nel mezzo di coltura sull'accrescimento radiale delle colonie di *F. solani* f.sp. *cucurbitae* ceppi F7, F17 ed F37.

Antagonisti	Ceppo <i>F. solani</i> f.sp. <i>cucurbitae</i>			
	F7	F17	F37	Media <sup>1</sup>
-	76,4	76,0	74,4	75,6 f
PC-MA342	53,6	39,1	52,8	48,5 d
PP-DSM13134	43,8	23,8	45,8	37,8 c
SG-K61	53,8	48,6	56,6	53,0 e
TH-ICC012	32,4	35,6	37,2	35,1 b
TH-T22	35,0	34,0	34,6	34,5 b
TV-ICC080	32,8	29,2	32,2	31,4 a
Media <sup>1</sup>	46,8 b	40,9 a	47,7 b	

Effetto del ceppo sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Effetto della condizione di crescita luce e buio sulla crescita: significativo per  $P < 0,05$ .

Interazione ceppo x condizioni: significativa per  $P < 0,05$ .

SEM (standard error of the interaction means): 3,090.

PC-MA342: *Pseudomonas choloraphis* MA342 (Cedomon)

SG-K61: *Streptomyces griseoviridis* K61 (Mycostop)

PP-DSM13134: *Pseudomonas fluorescens* sp. *proradix* DSM13134

TV-ICC080: *Trichoderma viride* ICC080 (Remedier)

TH-ICC012: *T. harzianum* ICC012 (Remedier)

TH-T22: *T. harzianum* T22 (Rootshield).

### 3.4.4 Competenza rizosferica ed endofitismo

Le osservazioni relative alla competenza rizosferica, ossia alla capacità dei microrganismi di colonizzare la rizosfera delle piante di zuccino, hanno evidenziato che tutti i microrganismi in prova hanno dato esito positivo, come evidenziato dalle foto 3.5 e 3.6

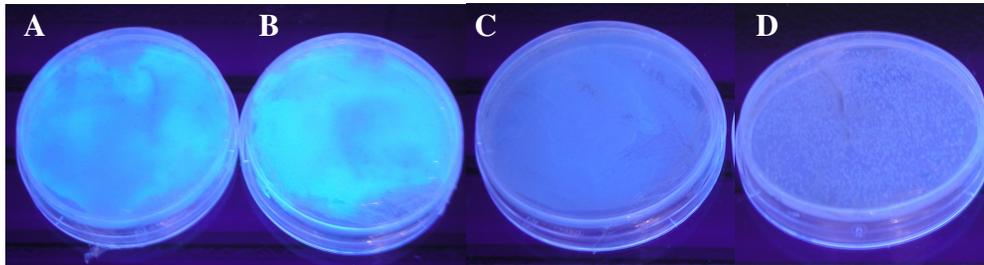


Fig. 3.5 - Colonizzazione della rizosfera di zuccino da parte di *P. fluorescens* ssp. *proradix* DSM13134 (Proradix) (A), *P. chlororaphis* MA342 (Cedomon) (B) e *S. griseoviridis* K61 (C) (Mycostop). A sinistra il testimone (D). (Foto R. Roberti)

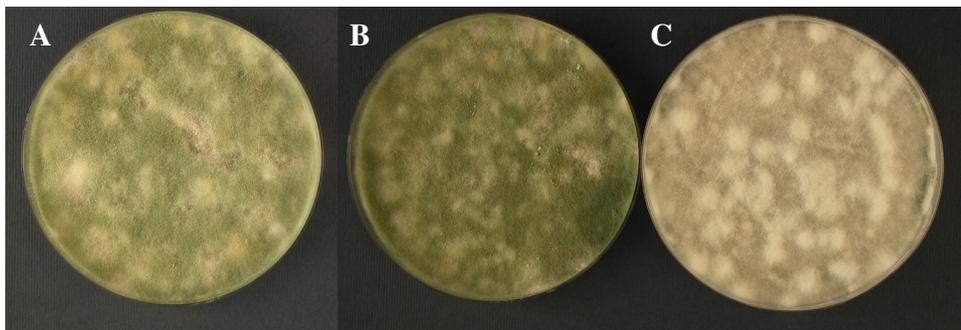


Fig. 3.6 – Colonizzazione della rizosfera di zuccino da parte dei due ceppi *T. viride* ICC080 e *T. harzianum* ICC012 (Remedier) (A) e di *Trichoderma harzianum* T22 (Rootshield) (B). A destra il testimone dove si è sviluppato del micelio inquinante del terreno (C). (Foto R. Roberti)

All'interno dei tessuti radicali esaminati è stata rilevata la presenza solo dei batteri, *P. fluorescens* ssp. *proradix* DSM13134 (Proradix), *P. chlororaphis* MA342 (Cedomon) e *S. griseoviridis* K61 (Mycostop), come mostra la foto 3.7.

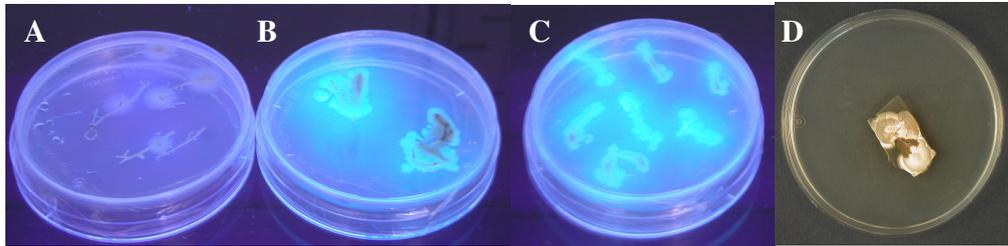


Fig. 3.7 – Endofitismo radicale di zuccchino da parte di *P. fluorescens* ssp. *proradix* DSM13134 (Proradix) (B), *P. chlororaphis* MA342 (Cedomon) (C) e *S. griseoviridis* K61 (D) (Mycostop). A sinistra il testimone dal quale si è sviluppato del micelio inquinante (A). (Foto R. Roberti)

# **Capitolo 4**

## **DISCUSSIONE**

Le ricerche intraprese per lo svolgimento di questa tesi hanno avuto l'obiettivo di caratterizzare un patogeno responsabile del collasso dello zucchini osservato in aziende del comprensorio bolognese e di esaminare una forma alternativa di lotta alla malattia.

Gli studi hanno consentito di affermare che il patogeno che causava tali sintomi era *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* razza 1. Si tratta di un microrganismo fungino che fino a pochi anni fa non era considerato una problematica importante per le Cucurbitacee in generale, ed era stato segnalato sporadicamente. Attualmente, l'impossibilità di utilizzare il bromuro di metile, responsabile di danni ambientali a livello mondiale, ha determinato la diffusione di malattie provenienti dal terreno, tra cui quelle causate da *F. solani* f.sp. *cucurbitae* razza 1. E' risultato pertanto interessante valutare un diverso metodo per il contenimento della malattia, utilizzando prodotti biologici a base di batteri e funghi antagonisti che, com'è noto, vengono considerati a basso impatto ambientale; l'utilizzo di alcuni, infatti, è anche consentito in agricoltura biologica. Sono stati considerati formulati già presenti in commercio, i biofungicidi Cedomon, Mycostop, Remedier e Rootschild non specificatamente indicati contro il patogeno e gli ammendanti biologici Proradix e Clonotry. Si è inoltre ritenuto importante discriminare l'attività di tali prodotti in funzione del grado di patogenicità di *F. solani*. I saggi *in vitro* hanno evidenziato che gli isolati provenienti dalla campagna, erano costituiti da diversi ceppi, morfologicamente e fisiologicamente diversi tra di loro. Questi hanno dimostrato varie velocità di sviluppo in funzione delle condizioni di crescita, quali substrato, temperatura e illuminazione. In generale si è osservato che i diversi ceppi prediligono temperature dai 23 ai 28°C in presenza di luce su CLPDA e di 28°C su PDA, confermando che si tratta di ceppi di un patogeno che causa malattia nel periodo primaverile estivo. Tali ceppi si sono differenziati anche per la patogenicità su zucchini e questo ci ha consentito di scegliere due ceppi Fs7 e Fs37 con elevata e ridotta patogenicità, allo scopo di valutare l'attività dei sopraccitati

formulati. I ceppi hanno anche mostrato di produrre diversi enzimi di patogenesi, poligalatturonasi, cellulasi, pectin liasi e proteasi. L'attività cellulasica e pectin liasica è anche risultata correlata alla malattia causata dai venti ceppi del patogeno, anche se non è stato possibile relazionare la patogenicità dei due ceppi scelti per le prove *in vivo* con una differente produzione enzimatica, tale da giustificarne la virulenza.

Per quanto riguarda l'impiego dei formulati biologici, si può affermare che l'attività si è differenziata in relazione al diverso grado di patogenicità del ceppo e del microrganismo contenuto nei formulati. Tutti i prodotti hanno contenuto la malattia in varia misura, ma nessuno l'ha impedita completamente, neppure il prodotto più efficace, Cedomon. Ciò è giustificabile dal fatto che si è operato in condizioni estremamente favorevoli all'infezione e allo sviluppo del patogeno e che i due ceppi esaminati, avevano comunque un buon grado di patogenicità.

In generale, il contenimento della malattia da parte dei formulati è stato più elevato sul ceppo meno patogeno, ed è stato maggiore nei primi due esperimenti, giustificato però dalla minore concentrazione di patogeni presenti nel terreno. Tra i prodotti, si distingue Cedomon per l'effetto sulla riduzione della malattia causata sia da Fs7 che Fs37; gli altri formulati, Mycostop, Proradix, Remedier e Rootschild hanno mostrato un effetto di contenimento della malattia in particolare sul ceppo meno patogeno, Fs37. Il formulato Clonotry ha mostrato un basso grado di efficacia e per questo motivo non è stato preso in considerazione negli esperimenti che prevedevano il trapianto, cercando di simulare condizioni di pratico impiego.

L'esame delle modalità d'azione dei microrganismi contenuti nei formulati, ha evidenziato diversi aspetti correlati sia al microrganismo che al ceppo del patogeno. In primo luogo tutti i microrganismi sono stati in grado di inibire lo sviluppo del patogeno per effetto di metaboliti prodotti durante la crescita. I produttori di metaboliti più efficaci sono stati i tre ceppi di *Trichoderma* e le due specie di *Pseudomonas* sul ceppo Fs17. I

due ceppi Fs7 e Fs37, che avevano mostrato un diverso grado di patogenicità, non si sono differenziati, invece, riguardo la loro sensibilità ai metaboliti di tutti i microrganismi antagonisti. Ciò fa pensare che la diversa efficacia osservata *in vivo* possa essere dovuta ad altri meccanismi d'azione, anche se le condizioni sperimentali non sono state le medesime. Sorprende però che *P. chlororaphis* (Cedomon), noto per agire per effetto di un metabolita, nelle nostre condizioni sperimentali *in vitro* ha manifestato l'effetto atteso solo nella prova del confronto diretto a coppia, ma non nella prova specifica dell'antibiosi. Si ipotizza che nel confronto diretto i metaboliti prodotti, anche se su un substrato non ottimale per i batteri, fossero presenti e molto più concentrati che nella prova specifica dell'antibiosi nella quale i metaboliti sono stati diluiti nel substrato PDA usato per inoculare i patogeni. Anche gli altri due batteri (*P. fluorescens* sp. *proradix* e *S. griseoviridis*) hanno mostrato un comportamento simile a *P. chlororaphis*, ossia quello di inibire efficacemente lo sviluppo dei tre ceppi di patogeno soprattutto nel confronto diretto.

Riguardo all'aspetto competitivo per la colonizzazione del substrato, le specie di *Trichoderma* hanno evidenziato un'efficace azione, in quanto notoriamente dotate di rapido accrescimento e diffusione nello spazio del substrato a disposizione.

Un particolare aspetto che vale la pena di precisare riguarda l'azione del Proradix, l'ammendante che ha dimostrato buone caratteristiche di efficacia. Le indicazioni di etichetta di questo prodotto riportano che il batterio contenuto nel formulato è un PGPR, ossia promotore di crescita e stimolatore delle difese sistemiche della pianta. I nostri studi hanno dimostrato che il batterio possiede anche un'intensa attività diretta nei confronti di tutti i ceppi del patogeno e tale attività sembra essere attribuibile alla produzione di metaboliti. L'insieme dei vari meccanismi ha reso possibile un buon contenimento della malattia.

Si sottolinea inoltre che tutti i microrganismi isolati dai formulati e somministrati al terreno in prossimità della radice, hanno mostrato

l'attitudine a colonizzare la rizosfera e, limitatamente ai batteri, ad instaurare un rapporto di endofitismo con le radici delle piantine, contribuendo a chiarire meglio le motivazioni che giustificano il contenimento della malattia.

Si conclude che i prodotti biologici testati per contenere la malattia causata da *F. solani* f.sp. *cucurbitae* razza 1, hanno dimostrato un certo grado di efficacia, anche se non accettabile a livello pratico. Si evidenzia, però, che negli esperimenti condotti per questa tesi sono state create situazioni di infezione particolarmente elevate rispetto a quelle che si riscontrano nella pratica agricola e pertanto i prodotti impiegati sono stati sottoposti a dura prova. Va inoltre considerato che i prodotti biologici, raramente possono avere un'efficacia simile a quella dei prodotti di sintesi e quindi il loro impiego va valutato in relazione alla possibilità di integrare diversi sistemi di gestione agronomica e di lotta, per ottenere un contenimento soddisfacente della malattia.

## BIBLIOGRAFIA

- Agrios G.N., 1997. Plant Pathology, Fourth Edition. Academic Press, London UK, 635 pp.
- Alabouvette C., 1986. Fusarium-wilt suppressive soils from the Chateaufort region: review of a 10 years study. *Agronomie* 6, 273-284.
- Altomare C., Norvell W.A., Björkman T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2926-2933.
- Anderson L.E., Ehrlich J., Sun S.H., Burkholder P.R., 1956. Strains of *Streptomyces* the sources of azaserine, elaiomyacin, griseoviridin and viridigrisein. *Antibiot. Chemother.* 6, 100-115.
- Baker K.F. and Cook R.J., 1974. Biological control of Plant Pathogens. W.H. Freeman and company, San Francisco. complete
- Baker K.F., 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 25, 67-85.
- Bangera M.G., Weller D.M., Thomashow L.S., 1996. Genetic analysis of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic locus from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. In: M.J. Daniels, J.A. Downie e A.E. Osbourne eds. *Advances in molecular genetics of plant-microbe interaction*. Vol.3. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 383-386.
- Barondes S.H., 1981. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 207-231.
- Benhamou N., Picard K., 2000. La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*, 80, 137-168.
- Benhamou N., Rey P., Chèrif M., Hockenhull J. and Tirilly Y. 1997. Treatment with the mycoparasite, *Pythium oligandrum*, triggers the induction of defense-related reactions in tomato roots upon challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 87, 108-122.
- Benítez T., Limón C., Delgado-Jarana J., Rey M., 1998. Glucanolytic and other enzymes and their genes. pp 101-127. IN *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol. 2, Kubicek C.P. and Harman G.E. (eds.) Taylor & Francis Ltd.
- Booth C., 1977. *Fusarium*, Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Brown J.M., McNeil M.M., 2003. Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomyces, Streptomyces, and Other Aerobic Actinomycetes. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> Edition (Murray P.R., Baron E.J., Tenover J.C., Tenover F.C. eds). Vol. 1, ASM Press, Washington, D.C., 502-531.
- Brummell D.A., Labavitch J.M., 1997. Effect of Antisense Suppression of Endopolygalacturonase Activity on Polyuronide Molecular Weight in Ripening Tomato Fruit and in Fruit Homogenates. *Plant Physiol.* 115, 717-725.
- Brunner K. *et al.*, 2003. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genet.*, 43, 289-295.

- Burianova T., Kopečný J., Sajdok J., Kas J., 1991. Assay of very low cellulolytic activity in fodder supplemented with enzyme preparation. *Animal Feed Science and Technology* 33, 41-48.
- Butt T.M., Jackson C., Magan N., 2001. Introduction – Fungal Biological Control Agents: Progress, Problems and Potential. In: *Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential* (Butt T.M., Jackson C., Magan N. eds). CABI Publishing, Oxon, UK, 1-8.
- Chang Y.C., Baker R., Kleifeld O., Chet I., 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* 70, 145-148.
- Chatterjee A., Cui Y., Liu Y., Dumeyo C.K., Chatterjee A.K., 1995. Inactivation of rsmA Leads to Overproduction of Extracellular Pectinases, Cellulases, and Proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the Absence of the Starvation/Cell Density-Sensing Signal, N-(3-Oxohexanoyl)-L-Homoserine Lactone. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5)1959-1967.
- Chet I., 1987. *Trichoderma* Applications: mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi pp. 137-160. In: *Innovative Approaches to Plant disease Control*, Chet I. (ed.), John Wiley and Sons, New York.
- Chet I., 1990. Mycoparasitism-recognition, physiology and ecology pp.725-733. In: *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*, Barker R.R. and Dunn P.E. (eds.), Alan Liss, New York.
- Chet I., Harman G. E., Baker R., 1981. *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microb. Ecol.* 7, 29-38.
- Cook R.J., 2000a. Advances in plant health management in the 20th century. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38, 95-116
- Cook R.J., 2000b. Biological control in sustainable agriculture. *Informatore Fitopatologico* 50(3), 45-48.
- Cook R.J., Rovira A.D., 1976. The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. *Soil Biol. and Biochem* 8, 269-273.
- Dennis C., Webster J., 1971a. Antagonist properties of species-groups of *Trichoderma*. I: Production of non volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57(1), 25-39.
- Dennis C., Webster J., 1971b. Antagonist properties of species-groups of *Trichoderma*. II: Productions of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57(1), 41-48.
- Di Pietro A., Lorito M., Hagers C.K., Broadway R.M., Harman G.E., 1993. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology*, 83, 308-313.
- Dubos B., 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. IN *Innovative Approaches to Plant Disease Control* pp 107-135. In: Chet I. (ed.), Wiley, New York.
- Elad Y., Barak R., Chet I., 1983. Possible role of lectins in mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 154, 1431-1435.

- Elad Y., Zimand G., Zaqs Y., Zuriel S., Chet I., 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathol.* 42, 324-332.
- Garibaldi A., Guglielmone L., Gullino M.L., 1989. Rhizosphere competence of antagonistic *Fusaria* isolated from suppressive soils. *Symbiosis*.
- Garibaldi A., Gullino M.L., 1989. La lotta biologica contro i funghi fitopatogeni – Terreni repressivi. *Informatore Fitopatologico* 39 (10), 9-17.
- Goodfellow M., Williams S.T., 1983. Ecology of *Actinomycetes*. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 187–216.
- Haas D., Defago G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 307-319.
- Haas *et al.*, 1990. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 involved in the suppression of root diseases. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium “Advances in molecular genetics of plant microbe interactions”*, vol. 1, Interlaken, Switzerland, Sept. 9-14, 1990, 450-456.
- Hankin L., Anagnostakis S.L., 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67(3) 597-607.
- Haran S., Schickler H., Oppenheim A., Chet I., 1996. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86, 980-985.
- Harman G.E. *et al.*, 1996. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biol. Control.*, 7, 259-266.
- Harman G.E., Björkman T., 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: Eds by G.E. Harman and C. P. Kubicek) “*Trichoderma and Gliocladium* Vol 2. Enzymes, biological control and commercial application” Taylor and Francis, London, 229-261.
- Harman G.E., Charles R.H., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56.
- Harman G.E., Chet I., Baker R., 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. *Phytopathology*, 71, 569-572.
- Harman G.E., Hayes, C.K., Lorito M., Broadway R.M., Di Pietro A., Peterbauer C., Tronsmo A., 1993b. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83, 313-318.
- Howell C.R., 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: *Trichoderma and Gliocladium*. G.E. Harman and C.P. Kubicek eds., Taylor & Francis Ltd, London, 1998, vol. 2, 173-184.
- Howell C.R., Stipanovic R.D., Lumsden R.D., 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. *Biocontrol Sci. Tech.* 3, 435-441.
- Huysamer M., Greve C., Labavitch J.M., 1997. Cell Wall Metabolism in Ripening Fruit. VIII. Cell wall composition and synthetic capacity of two regions of the outer pericarp of mature green and red ripe cv. Jackpot tomatoes. *Physiologia Plantarum* 101, 314-322.

- Inbar J., Menendez A., Chet I., 1996. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 757-763.
- Jung W.J., Mabood F., Kim T.H., Smith D.L., 2007. Induction of pathogenesis-related proteins during biocontrol of *Rhizoctonia solani* with *Pseudomonas aureofaciens* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) plants. *BioControl* 52, 895-904.
- Kessmann H., Staub T., Ligon J., Oostendorp M., Ryals J., 1994. Activation of systemic acquired resistance in plants. *Eur. Journal Plant Pathol.*, 100, 359-369.
- Kloepper J.W., Schroth M.N., Miller T.D., 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70, 1078-1082.
- Kloepper J. W., Tuzun S., Liu L., Wei G., 1993. Pest Management: Biologically Based Technologies: Proceeding of the Beltsville Symposium XVII, pp 10-20, Lumsden R. D., Vaughn J. L., (eds.). American Chemical Society, Washington DC.
- Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N., 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885-886.
- Koning G.P., Köhl J., 1995. Wound protection by antagonists against *Botrytis* stem rot in cucumber and tomato. In: *Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control* pp. 313-316. Manka M. (ed.), The Polish Phytopathological Society, Poznan.
- Lindsey D.L., Baker R., 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology* 57, 1262-1263.
- Linser A., Cazzara L., Barbieri G., 2006. Cedomon (*P. chlororaphis* MA342) il primo conciante a base naturale per frumento duro, tenero e orzo. *Atti Giornate Fitopatologi che, Riccione (RN) 27-29 marzo, 2006, II*, 27-34.
- Lora J.M., De La Cruz J., Benitez T., Llobell A., Pintor-Toro J.A., 1994. A putative catabolic-repressed cell wall protein from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Molec. Gen. Genet.*, 242, 461-466.
- Lorito M., Di Pietro A., Hayes C.K., Woo S.L., Harman G.E., 1993a. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology*, 83, 721-728
- Lorito M., Hayes C.K., Di Pietro A., Woo S.L., Harman G.E., 1994a. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84, 398-405.
- Lorito M., Woo S.L., D'ambrosio M., Harman G.E., Hayes C.K., Kubicek C.P., Scala F., 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 9, 206-213.
- Matta A., 1966. *Ann. Fac.Sci. agr.Univ. Torino*, 3, 85-89.
- Matta A., 1996. *Fondamenti di Patologia vegetale*. Patron, Bologna, 494 pp.
- McQueen-Mason J. and Cosgrove D.J., 1995. Expansin Mode of Action on Cell Walls. *Plant Physiol.* 107, 87-100.
- Minuto A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L., 2006. Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection* 25, 468-475.

- Muthukumar A., Bhaskaran R., 2007. Efficacy of antimicrobial metabolites of *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula against *Rhizoctonia solani* Kuhn. and *Pythium* sp. *J. Biol. Control* 221(1), 105-110.
- Nelson E.B., Pearce M.H., Malajczuk N., 1995. Effects of *Trichoderma* spp. and ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. *Mycol. Res.* 99, 957-962.
- Nelson P.E., Tusson T.A., Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 146-150.
- O'Neill T.M., Niv A., Elad Y., Shtienberg D., 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato stem wounds with *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 635-643.
- Owney B.H., Weller D.M., Thomashow L.S., 1992. Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology* 82, 178-184.
- Paterson R.R.M., Bridge P.D., Biochemical techniques for filamentous fungi. CAB International, International Mycological Institute, IMI Technical Handbook No.1.
- Pierson L.S., Thomashow L.S., 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5, 330-339.
- Pieterse C.M.J. e van Loon L.C., 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Sci.*, 4, 52-58.
- Pozo M.J. *et al.*, 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses of *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot.* 53, 525-534.
- Qadir A., Hewett E.W., Long P.G., 1997. Ethylene production by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 11, 85-91.
- Raijmakers J.M., Weller D.M., 1997 **b**. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. In take-all decline soils. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 144-152.
- Rose J.K.C., Hadfield K.A., Labavitch J.M., Bennett A. 1998. Temporal Sequence of Cell Wall Disassembly in Rapidly Ripening Melon Fruit. *Plant Physiol.* 117, 345-361.
- Sabaratham S., Traquair J.A., 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Control* 23, 245-253.
- Schirmböck M. *et al.*, 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4364-4370. complete
- Schneider A., Späth J., Breiding-Mack S., Zeeck A., 1996. New cineromycins and musacins obtained by metabolite pattern analysis of *Streptomyces griseoviridis* (FH-S 1832). *J. Antibiotics* 49(5), 438-446.
- Sherf A.F., Macnab A.A., 1986. Vegetable disease and their control. Second Edition, John Wiley & Sons, New York, USA, 338-339.
- Stotz H.U., Powell A.L.T., Damon S.E, Greve L.C., Bennett A.B., Labavitch J.M., 1993. Molecular Characterization of a Polygalacturonase Inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett. *Plant Physiol.* 102, 133-138.

- Stravato V.M., Cappelli C., 1996. Marciume pedale dello zucchini in provincia di Latina. *Colture Protette* 7/8, 75-77.
- Surviliené E., 2002. Reaction of mycomycetes to antagonistic organisms and fungicides in substrate. *Biologija* 1, 14-17.
- Tahvonen R., Avikainen H., 1987. The biological control of seed-borne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. *J. Agric. Sci. Finl.* 59, 199–208.
- Tamura M., Gao M., Tao R., Labavitch J.M., Dandekar A.M., 2004. Transformation of persimmon with a pear fruit polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) gene. *Scientia Horticulturae* 130(1),19-30.
- Thomashow L.S., Weller D.M., 1988. The role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bact.* 170, 3499-3508.
- van Loon L.C., Bakker P.A. H.M., Pieterse C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36, 453–483.
- Vannacci G., Gambogi P., 1980. *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* razza 1 su semi di *Cucurbita pepo* L.: reperimento del patogeno e influenza di condizioni colturali sull'andamento della malattia. *Phytopath. Medit.* 19, 103-114.
- Vitale S., Maccaroni M., Belisario A., 2006. First report of zucchini collapse by *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* race 1 and *Plectosporium tabacinum* in Italy. *Plant Dis.* 91(3), 325.
- Viterbo A. *et al.*, 2002. Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). *Curr. Genet.*, 42, 114-122. completare
- Von Rad U., Mueller M.J. Durner J, 2005. Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. *New Phytologist* 165, 192-202.
- Weller D.M., Cook R.J., 1983. Suppressive of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73, 463-469.
- Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B.M., Thomashow L.S., 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40, 309-348.
- Whipps J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 52, Roots Special Issue, 487-511.
- White J.G., Linfield C.A., Lahdenpera M.L., Uoti J., 1990. Mycostop - A novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*. In: *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, 19 –22 November 1990, Brighton, vol.1, 221 –226.
- Yedidia I., Benhamou N., Chet I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1061-1070.
- Yuan W.M., Crawford D.L, 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Envir. Microbiol.* 61(8), 3119-3128.
- Zeilinger S. *et al.*, 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genet. Biol.*, 26, 131-140.