

## SELEZIONE DI MICRORGANISMI ATTIVI CONTRO IL MARCIUME BRUNO SU MELE (°)

M. BONINO, C. FIORETTA, Tilde BERIO e M. Lodovica GULLINO  
DI.VA.P.R.A. - Patologia vegetale, Università di Torino

### RIASSUNTO

Tra circa 200 microrganismi isolati dalla carposfera di mele, tre isolati batterici (ME 1, ME 13 e, in particolare, ME 134) hanno manifestato una buona efficacia contro il marciume bruno (*Monilia* sp.), su mele (cv Golden delicious). Tali ceppi, usati alla concentrazione di  $10^8$  cellule/ml, sono risultati in grado di contenere efficacemente il marciume bruno su frutti inoculati artificialmente con il patogeno e mantenuti a 2-4 e a 20-22°C. Il trattamento con l'antagonista deve precedere di almeno un'ora l'inoculazione con il patogeno; risultati migliori si ottengono quando l'antagonista viene utilizzato 24 ore prima del patogeno. L'attività contro il marciume bruno è stata confermata anche sulle cv Stark, Morella e Renetta. L'impiego di  $\text{CaCl}_2$  (2 g/l) migliora l'attività di qualche ceppo, mentre l'acido ascorbico (3 g/l) non esplica alcuna attività.

### SUMMARY

#### SELECTION OF MICRORGANISMS ACTIVE AGAINST BROWN ROT OF APPLE

The screening of the biocontrol activity against brown rot of apple (*Monilia* sp.) of about 200 microorganisms isolated from the carposphere of apple fruit, led to the selection of three bacterial isolates (ME 1, ME 13 and, particularly, ME 134) showing an interesting activity. Such isolates, used at  $10^8$  cells/ml, satisfactorily and consistently controlled brown rot of apple fruit (cv Golden delicious) artificially inoculated with the pathogen, at both 2-4 and 20-22°C. Biocontrol activity is enhanced if treatment with the antagonist precedes of 24 hours the inoculation with the pathogen. Biocontrol activity was confirmed also on the cv Stark, Morella and Renetta. Use of  $\text{CaCl}_2$  (2 g/l) enhances the biocontrol activity of some strains. On the contrary, ascorbic acid (3 g/l) did not improve biocontrol activity.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, sempre più frequentemente si è assistito alla comparsa di attacchi di *Monilia* sp. su mele in post-raccolta. Tale fenomeno è stato osservato con crescente intensità non solo nel caso di cultivar particolarmente suscettibili a tale patogeno quali la 'Renetta del Canada' (Trevisan *et al.*, 1992), ma anche su altre meno sensibili, quale ad

(°) Lavoro svolto con il contributo del Ministero dell'Università e della Ricerca scientifica e tecnologica (MURST 60%: Agricoltura eco-compatibile nel settore frutticolo: il modello Valle Bronda).

esempio 'Golden delicious', soprattutto in aziende in cui, grazie al ricorso a strategie di difesa integrata, si effettua un numero sempre minore di interventi chimici durante la coltivazione o, ancor più frequentemente, in aziende che praticano agricoltura biologica. Considerando l'esigenza sempre più sentita di evitare, soprattutto nella difesa in post-raccolta, il ricorso a mezzi chimici (Wilson *et al.*, 1989), fatto del resto irrinunciabile nel caso di aziende orientate verso l'agricoltura biologica, si è inteso procedere alla ricerca di microrganismi efficaci nel contenere gli attacchi di *Monilia* sp. su mele in conservazione. Il presente lavoro riporta i risultati ottenuti nel corso di prove volte alla individuazione di potenziali antagonisti e al saggio della possibilità di un loro impiego in condizioni controllate.

## MATERIALI E METODI

**Isolamento dei microrganismi.** Gli isolati di lieviti e batteri saggiati nelle diverse prove sono stati ottenuti dalla carposfera di mele provenienti da frutteti condotti secondo i principi della lotta integrata e, in qualche caso, dell'agricoltura biologica. L'isolamento è avvenuto effettuando lavaggi della carposfera in acqua distillata sterile ed inoculando le sospensioni ottenute da diluizioni successive su substrati semiselettivi per lieviti NYDA (2% agar, 0,8% brodo nutritizio, 0,4% estratto di lievito e 0,15% destrosio) e per batteri LPGA (2% agar, 1% glucosio, 0,5% bacto-peptone e 0,5% estratto di lievito).

**Valutazione dell'attività antagonistica.** I microrganismi così ottenuti venivano saggiati per valutare l'eventuale attività antagonistica su mele ferite equatorialmente (3 ferite/frutto, 1,5 mm di diametro, 4 mm di profondità). I microrganismi erano coltivati per 48 ore in agitazione (120 rpm) su un substrato liquido di Sabouraud al 2% (Sabouraud - Glucose-bouillon Merck), centrifugati (3000 rpm per 20'), risospesi in soluzione isotonica (Ringer Merck, 1 compressa/500 ml H<sub>2</sub>O, pH 6,9) e quindi applicati direttamente nelle ferite (20 µl/ferita) alla concentrazione di 10<sup>7</sup> cellule/ml per i lieviti e di 10<sup>8</sup> per i batteri. L'inoculazione con il patogeno è stata effettuata utilizzando una sospensione conidica (10<sup>5</sup> conidi/ml), preparata da colture di isolati di *Monilia* sp., ottenuti da mele gravemente colpite da marciume bruno e cresciuti per 10 giorni su PDA; l'inoculazione avveniva dopo aver mantenuto i frutti preinoculati con i potenziali antagonisti per 24 ore a 22°C. I frutti inoculati erano conservati a T° ambiente (20-22°C) per 8 giorni o a 2-4°C per 15 giorni e portati poi a T° ambiente per 7 giorni, dopo i quali si provvedeva a misurare il diametro del marciume sviluppatosi a partire da ciascuna ferita.

I fungicidi usati come riferimento sono stati, a seconda delle prove, vinclozolin (Ronilan, 50% p.a.) e tiabendazolo (Siatek 41,8% p.a.), rispettivamente alle dosi di 0,75 e 1 g/l. In alcune prove sono stati anche utilizzati i lieviti *Candida* sp. 4.4 e *Trichosporon* sp. 2.33, precedentemente descritti per la loro attività contro *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* su mele (Gullino *et al.*, 1991).

Per quattro batteri (ME 1, ME 13, ME 14, ME 134) e due lieviti (2.33, 4.4) è stata valutata l'efficacia contro il marciume bruno su cultivar diverse (Stark, Morella e Renetta).

**Effetto dell'intervallo di applicazione tra antagonista e patogeno.** In alcune prove, svolte con il microrganismo rivelatosi più interessante, l'intervallo tra applicazione dell'antagonista ed inoculazione con il patogeno è stato fatto variare da 1 a 30 ore.

**Effetto del cloruro di calcio e dell'acido ascorbico.** Nel caso dei tre microrganismi considerati più interessanti si è valutato l'effetto del cloruro di calcio (2 g/l) e dell'acido ascorbico (3 g/l), applicati secondo le stesse modalità con cui si impiegava l'antagonista, sull'attività di contenimento del marciume bruno.

**Effetto della temperatura sull'accrescimento *in vitro*.** Nel caso del batterio ME 134 è stato valutato l'accrescimento a temperature diverse, variabili da 20 a 37°C, su NYDA, LPGA, SABOURAUD e trapianto batteri (estratto di carne 0,5%, bacto-peptone 0,3%, agar 1,5%). La coltura batterica è stata fatta sviluppare al buio per 24 ore su LPGB (temperatura 22°C, agitazione 120 rpm); è stata centrifugata, risospesa in soluzione isotonica, diluita ed inocolata sui quattro terreni di crescita (5 capsule per ogni terreno e per ogni temperatura). Dopo 96 ore di incubazione si conteggiava il numero di colonie sviluppatesi per capsula.

Tutte le prove sono state ripetute almeno due volte, utilizzando almeno tre replicazioni, ed i risultati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza ed al test di Duncan.

## RISULTATI

**Attività antagonistica.** Sono stati saggiati, per la loro attività contro *Monilia* sp., 118 batteri e 61 lieviti. La maggior parte dei microrganismi saggiati (79%) non ha contenuto, nelle condizioni in cui si è operato, il marciume bruno delle mele, mostrando un'efficacia inferiore al 25%. Solo alcuni isolati (4% tra i batteri e 1,6% tra i lieviti), hanno manifestato un'attività superiore al 50% (tab. 1).

**Tabella 1.** Efficacia di diversi microrganismi ottenuti da carposfera di mela, contro il marciume bruno su mele (cv Golden delicious).

Efficacia %	N°isolati	
	Batteri	Lieviti
< 10	52	29
11-25	39	22
26-50	23	9
51-75	3	1
> 75	1	0
Totale	118	61

Tre batteri, codificati come ME 1, ME 14, ME 134, hanno mostrato una buona efficacia contro il marciume bruno, sia su frutti mantenuti a 20-22°C sia su frutti prerefrigerati a 2-4°C. L'efficacia di questi tre isolati era simile o, in qualche caso, addirittura superiore rispetto a quella manifestata dal fungicida usato come riferimento. Alcuni isolati (ME 12, ME 13) hanno manifestato una buona attività solo a 20-22°C, mentre altri (ME 10, ME 27, ME 28) hanno manifestato una migliore efficacia a 2-4°C (tab. 2).

**Effetto dell'intervallo tra l'applicazione dell'antagonista e del patogeno.** L'intervallo di tempo che intercorre tra l'applicazione dell'antagonista ME 134 e l'inoculazione con il patogeno influenza il livello di contenimento della malattia. Un intervallo di 24 ore sembra ottimale sia a 20-22°C che dopo prerefrigerazione a 2-4°C; l'antagonista risulta tuttavia parzialmente attivo anche quando applicato 1 ora prima del patogeno. Di difficile interpretazione è il calo di efficacia osservato regolarmente ad entrambe le temperature, quando tra trattamento con l'antagonista ed inoculazione con il patogeno intercorrevano intervalli intermedi (tab. 3).

**Efficacia di alcuni antagonisti su cultivar diverse.** Tra i microrganismi utilizzati in questa prova, gli isolati ME 1 ed ME 134 manifestano la stessa attività quando applicati su cultivar differenti, nelle diverse condizioni di conservazione saggiate. Tra gli altri microrganismi, ME 13 è apparso meno efficace sulla cv Morella, nel caso di conservazione della frutta a 4°C. I lieviti 2.33 e 4.4 sono risultati meno attivi sulla cv Stark a 22°C e sulla cv Morella a 4°C. ME 14, infine, è risultato più attivo sulla cv Renetta a 4°C (tab. 4).

**Effetto del cloruro di calcio e dell'acido ascorbico.** Il cloruro di calcio, che da solo non esplica alcuna attività, influenza positivamente l'attività antagonistica dei microrganismi in prova solo in alcuni casi (ad esempio per ME 1) (tab. 5). L'effetto del CaCl<sub>2</sub> appare legato all'isolato utilizzato ed alle condizioni di conservazione: esso esercita un'influenza positiva nei confronti di ME 1, sia a 22°C che a 4°C; nel caso di ME 13 interagisce positivamente solo a 4°C. L'acido ascorbico invece ha mostrato un effetto nullo o negativo sull'attività degli antagonisti contro il marciume bruno.

**Effetto della temperatura sull'accrescimento *in vitro*.** Il batterio ME 134 ha rivelato uno sviluppo notevolmente ridotto a 35°C, mentre a 37°C, dopo 96 ore di incubazione, non è stato osservato alcun accrescimento (tab. 6).

## DISCUSSIONE

I risultati degli studi preliminari condotti nel corso di questo lavoro hanno consentito di individuare tre isolati batterici che hanno mostrato una buona attività contro Monilia sp. su mele. Tali batteri sono risultati attivi sia su mele mantenute a 20-22°C, sia dopo un periodo di prerefrigerazione delle mele a 2-4°C.

Anche nel caso dell'isolato più attivo (ME 134), non si è ottenuto generalmente un contenimento completo del marciume bruno, ma occorre considerare che le condizioni sperimentali adottate sono più favorevoli nei confronti della malattia rispetto a quelle che si incontrano normalmente in situazioni commerciali. Il miglioramento dell'attività antagonistica osservato con l'impiego di CaCl<sub>2</sub> conferma, nel caso di qualche isolato, quanto osservato da Mc Laughlin *et al.* (1990) operando con Candida sp. contro Penicillium expansum su mela. L'effetto positivo del CaCl<sub>2</sub> sull'attività antagonistica non è comunque sempre presente: ad esempio l'attività del ceppo ME 134 non pare influenzata dall'aggiunta di CaCl<sub>2</sub>.

Del resto, il CaCl<sub>2</sub> non risulta influire positivamente sul

Tabella 2. Attività di alcuni microrganismi contro *Monilia* sp., valutata su mele mantenute a 2-4°C e 20-22°C. I risultati sono espressi come percentuale di attività calcolata dopo aver fatto uguale a 100 l'attacco sul testimone. Rilievi effettuati dopo 7 gg dall'inoculazione del patogeno per la prova condotta a 22°C, dopo 10 gg di preraffrigerazione e 4 gg a 20-22°C per quella riproducete le condizioni di frigoconservazione.

TRATTAMENTO *	ATTACCO % n °C	
	22	4
B ME 1	32 a-d**	22 ab
B ME 2	83 e-i	84 l-n
B ME 3	81 e-i	68 e-n
B ME 4	72 c-i	41 b-h
L ME 6	77 e-i	63 d-n
B ME 7	42 a-e	40 b-h
B ME 8	43 a-f	51 b-l
L ME 9	59 c-i	55 b-l
L ME 10	56 c-h	36 a-f
B ME 11	77 g-i	96 mn
B ME 12	8 a	51 b-l
B ME 13	8 a	42 b-h
B ME 14	17 ab	34 a-c
B ME 15	62 c-i	88 l-n
B ME 17	100 i	45 b-i
B ME 18	58 c-i	42 b-h
B ME 19	89 g-i	96 mn
B ME 20	86 g-i	67 e-n
B ME 21	99 i	96 mn
B ME 22	95 h-i	88 l-n
B ME 23	86 g-i	79 h-n
B ME 24	84 f-i	75 g-n
B ME 25	68 c-i	74 f-n
B ME 26	74 d-i	81 i-n
B ME 27	74 e-i	26 a-d
L ME 28	53 b-g	32 a-e
B ME 29	89 g-i	94 mn
L ME 30	91 g-i	64 e-n
B ME 31	69 c-i	75 g-n
L ME 32	72 c-i	92 b-h
B NE 33	74 d-i	73 f-n
B ME 35	91 g-i	96 mn
B ME 36	62 c-i	61 c-m
B ME 134	13 a	2 a
Vinclozolin (0,75 g/l)	8 a	39 b-g
Testimone inoculato	100 i (65)***	100 n (65)

\* L=lievito; B=batterio.

\*\* I valori della stessa colonna seguiti dalla medesima lettera non differiscono significativamente tra loro con una probabilità di errore del 5% secondo il test di Duncan.

\*\*\* Diametro del marciume in mm.

Tabella 3. Effetto dell'intervallo tra il trattamento con l'antagonista e l'inoculazione con il patogeno sull'efficacia del batterio ME 134 contro *Monilia* sp. su mele (cv Golden delicious).

TRATTAMENTO (Intervallo in ore) *	ATTACCO % A °C	
	22	4
B ME 134 (1)	37 b **	52 ab
B ME 134 (2)	38 b	80 cd
B ME 134 (8)	66 c	68 bc
B ME 134 (12)	73 c	34 a
B ME 134 (24)	12 a	39 a
B ME 134 (30)	27 ab	36 a
Testimone inoculato	100 d (60)***	100 d (62)

\*, \*\*, \*\*\* Vedi tabella 2.

Tabella 4. Efficacia di alcuni microrganismi contro il marciume bruno su cultivar diverse a 22 e 2-4°C. Rilievi effettuati a 7 gg dall'inoculazione del patogeno per la prova condotta a 22°C, dopo 7 gg a 22°C e 15 gg di preraffrigerazione per quella riproducete le condizioni di frigoconservazione.

ATTACCO % A 22 °C				
TRATTAMENTO *	'Golden delicious'	'Stark'	'Morella'	'Renetta'
L 2.33	45 b-d **	73 cd	45 ab	10 a
L 4.4	37 a-d	60 c	29 ab	30 a
B ME 1	35 a-c	22 ab	26 ab	42 a
B ME 13	32 ab	12 a	45 ab	39 a
B ME 14	62 cd	52 bc	47 b	43 a
B ME 134	16 a	4 a	12 a	23 a
Vinclozolin(0,75 g/l)	63 d	61 c	23 ab	42 a
Testimone inoculato	100 e (51)***	100 d(42)	100 c (65)	100 b (33)

ATTACCO % A 4°C				
TRATTAMENTO *	'Golden delicious'	'Stark'	'Morella'	'Renetta'
L 2.33	25 b **	36 bc	51 c	7 a
L 4.4	4 a	18 ab	28 b	12 a
B ME 1	6 a	3 a	3 a	0 a
B ME 13	0 a	5 a	70 d	0 a
B ME 14	57 c	55 c	28 b	10 a
B ME 134	3 a	19 ab	9 a	4 a
Vinclozolin(0,75 g/l)	12 ab	1 a	0 a	0 a
Testimone inoculato	100 d (67) ***	100 d(72)	100 e (81)	100 b (67)

\*, \*\*, \*\*\* Vedi tabella 2

contenimento di Monilia fructicola su pesche da parte di alcuni ceppi di Kloeckera apiculata (Mc Laughlin et al., 1992).

L'isolato dotato di maggiore attività, ME 134, ha mantenuto lo stesso livello di efficacia su cultivar diverse, mentre ha risentito dell'effetto dell'intervallo tra l'applicazione del patogeno e dell'antagonista, mostrando attività maggiore per intervalli di 24 ore. L'intervallo di tempo che deve intercorrere tra trattamento con l'antagonista ed inoculazione con il patogeno è un fattore molto importante per arrivare ad operare in condizioni commerciali. Un dato positivo, in questo senso, può essere rappresentato dalla già parziale attività di ME 134 quando applicato appena 1 ora prima del patogeno. Saranno peraltro necessarie ulteriori indagini per chiarire la relazione esistente tra l'attività biologica e l'intervallo di applicazione, in particolare per intervalli compresi tra 1 e 12 ore. Sarà necessario insistere nella selezione di ceppi in grado di contenere gli attacchi di marciume bruno anche quando applicati ad un intervallo molto breve (1 ora) prima dell'inoculazione con il patogeno.

L'assenza di sviluppo a 37°C del batterio ME 134 rappresenta un elemento rassicurante in quanto sembra escludere una potenziale patogenicità per l'uomo di questo isolato.

Tabella 5. Efficacia di quattro batteri applicati da soli ed in presenza di cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>) ed acido ascorbico (AA) contro il marciume bruno su mela (cv Golden delicious). Rilievi effettuati a 11 gg dall'inoculazione con il patogeno per la prova condotta a 22 °C, dopo 15 gg di prerefrigerazione e 7 gg a 22 °C per quella riproducete le condizioni di frigoconservazione.

TRATTAMENTO*	ATTACCO % A °C	
	22	4
ME 1	73 e-f**	64 d-e
ME 1 + CaCl <sub>2</sub> (2 g/l)	37 a	38 b-c
ME 1 + AA (3 g/l)	63 c-f	64 de
ME 13	52 a-d	63 de
ME 13 + CaCl <sub>2</sub> (2 g/l)	52 b-e	30 ab
ME 13 + AA (3 g/l)	68 ef	88 ef
ME 14	43 ab	36 a-c
ME 14 + CaCl <sub>2</sub> (2 g/l)	42 a-c	27 a
ME 14 + AA (3g/l)	48 a-c	48 cd
ME 134	37 ab	27 ab
ME 134 + CaCl <sub>2</sub> (2 g/l)	36 ab	27 ab
ME 134 + AA (3g/l)	74 f	81 ef
CaCl <sub>2</sub> (2 g/l)	92 g	87 f
AA (3 g/l)	98 g	88 f
vinclozolin (0,75 g/l)	69 d-f	83 ef
testimone inoculato	100 g (56)***	100 f (57)

\*,\*\*,\*\*\* Vedi tabella 2.

**Tabella 6.** Sviluppo del batterio ME 134 a diverse temperature, espresso come numero di colonie dopo 96 ore di incubazione.

SUBSTRATO	NUMERO COLONIE A °C			
	20	30	35	37
LPGA	201	172	69	0
NYDA	191	194	97	0
TRAPIANTO BATTERI	199	217	115	0
SABOURAUD	163	148	67	0

Nel complesso, i dati ottenuti nel presente lavoro dimostrano che l'isolato ME 134 può essere considerato un potenziale mezzo biologico di lotta contro il marciume bruno delle mele. La sua attività potrà essere migliorata studiandone un'opportuna formulazione (Lewis e Papavizas, 1991) e sottoponendolo, eventualmente, ad un programma di miglioramento genetico per selezionare ceppi più efficaci, soprattutto nelle condizioni commerciali di conservazione. Sarà soprattutto importante, anche ai fini di un corretto e razionale impiego, definire il meccanismo dell'interazione patogeno-antagonista.

#### LAVORI CITATI

**GULLINO M.L., ALOI C., PALITTO M., BENZI D., GARIBALDI A. (1991).** Attempts at biological control of postharvest diseases of apple. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv.Gent, 56/2a, 195-202.

**LEWIS J.A., PAPAVIDAS G.C. (1991).** Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. Crop Protection, 10, 95-105.

**McLAUGHIN R.J., WISNIEWSKI M.E., WILSON C.L., CHALUTZ E. (1990).** Effects of inoculum concentration and salt solutions on biological control of postharvest diseases of apple with Candida sp.. Phytopathology, 80, 456-461.

**McLAUGHIN R.J., WILSON C.L., DROBY S., BEN-ARIE R., CHALUTZ E. (1992).** Biological control of postharvest diseases of grape, peach and apple with the yeast Kloeckera apiculata and Candida guilliermondii. Plant. Dis., 76, 470-473.

**TREVISAN D., DUVERNEY C., PETITJACQUES U., LANTELME C., PRAMOTTON R. (1992).** L'infestation par la moniliose des pommiers de la vallee centrale du Val d'Aoste. Analyse des facteurs de l'infestation. Annales Institut Agricole Regional, 1, 195-205.

**WILSON C.L., WISNIEWSKI M.E. (1989).** Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. Annu. Rev. Phytopathol., 27, 425-441.