ATTI Giornate Fitopatologiche
1994, 3, 327-334

VALUTAZIONE *IN VITRO* DELL'ATTIVITA' ANTAGONISTICA SU *RHIZOCTONIA SOLANI* E DELLA CONSERVABILITA' DI MUTANTI DI *TRICHODERMA HARZIANUM* RESISTENTI A FUNGICIDI.

SILVIA BORELLI E G. VANNACCI
Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle specie legnose,
Sezione di Patologia vegetale - Università di Pisa

RIASSUNTO

Sono riportati i risultati della valutazione *in vitro* dell'attività antagonistica di mutanti di *Trichoderma harzianum* resistenti a vinclozolin e propiconazole e delle prove di conservazione di tali mutanti in pellets di alginato di sodio. I mutanti sono stati in grado, come il ceppo selvaggio, di formare "coilings" attorno alle ife del patogeno mentre non sono stati rilevati effetti inibitori riferibili aalla produzione di antibiotici. L'attività antagonistica di V1 nei confronti del patogeno sembra ricavare un vantaggio dalla presenza, nel mezzo, di vinclozolin a concentrazioni pari o superiori a 3,72 µg ml^{-1} mentre PP5 non sembra particolarmente favorito dalla presenza di propiconazole. La prova di formulazione in alginato di sodio indica come la conservazione a 4°C garantisca la massima germinabilità dopo un anno dalla preparazione. Ambedue i mutanti sopravvivono meglio del ceppo selvaggio e in particolare PP5, in presenza di propiconazole, fornisce le più alte percentuali di sopravvivenza in tutte le condizioni saggiate.

SUMMARY

In vitro evaluation of two fungicide resistant mutants of *Trichoderma harzianum*.

Microscopic examinations of hyphal interactions showed that vinclozolin (V1) and propiconazole (PP5) resistant mutants of *T.harzianum* produced extensive coilings around the pathogen hyphae. Dual cultures against the pathogen did not showed any evidence of production of antibiotic-like metabolites from antagonistic strains. Both findings confirmed the behaviour of the wild strain I252. Antagonistic activity of V1 was improved by the presenze of vinclozolin (3.72 µg ml^{-1} or higher) in the medium while the presence of propiconazole did not increased the activity of PP5. One year storage of sodium alginate pellets, prepared from a suspension of conidia, sieved bran and each respective fungicide, under different temperature conditions showed that the highest recovery was obtained at 4°C. Both mutants survived better than the wild strain but PP5 plus propiconazole gave the highest recovery percentages under all tested conditions.

INTRODUZIONE

La possibilità di migliorare geneticamente microrganismi antagonisti ha ricevuto, recentemente, molta attenzione (Hayes, 1992) ed uno dei possibili obiettivi è stato quello di ottenere ceppi resistenti a fungicidi di ampio impiego. L'acquisizione della resistenza può modificare anche altri caratteri fenotipici dell'organismo, ad es. la capacità di colonizzare la rizosfera (Papavizas *et al.*, 1982), può, quindi, risultare utile verificarne l'influenza su caratteristiche note del ceppo selvaggio di origine. Tra queste si possono includere la capacità di formare "coilings" sulle ife del patogeno, interpretabile come indizio di micoparassitismo, o la capacità di sopravvivere come "prodotto formulato" durante la conservazione, considerata caratteristica desiderabile in un organismo che deve essere sviluppato commercialmente. Un metodo di formulazione che ha ricevuto notevole attenzione, forse anche perché adatto a produzioni su piccola scala come si realizzano nei laboratori di ricerca, è quello che prevede l'immobilizzazione della biomassa dell'antagonista in una maglia di polimeri organici, in particolare per *Trichoderma* è stato impiegato l'alginato di sodio (Lumsden e Lewis, 1989).

MATERIALI E METODI

Microrganismi

T.harzianum I252 è stato isolato da terreno, usando come esca sclerozi di *Sclerotinia minor* (Vannacci e Pecchia, 1987) ed è stato impiegato contro funghi formanti sclerozi (Vannacci *et al.*,1989) e contro *R.solani* (Cortellini *et al.*, 1989). I252 ha una DE_{50} nei confronti di vinclozolin pari a 3,75 µg ml^{-1} e nei confronti di propiconazole pari a 0,16 µg ml^{-1}.

I ceppi impiegati sono mutanti naturali selezionati su PDA addizionato con vinclozolin o propiconazole (Pecchia, comunicazione personale); V1 è resistente a vinclozolin (DE_{50}=641 µg ml^{-1}, FR=171,4) e PP5 è resistente a propiconazole (DE_{50}=1,33 µg ml^{-1}, FR=8,1).

R.solani 323 è stata isolata da radice di carota.

I ceppi mutati sono stati mantenuti su PDA addizionato con i rispettivi tossici, mentre il patogeno e I252 su PDA.

Prove di antagonismo *in vitro*

E' stata valutata l'influenza dei fungicidi (Ronilan, 50%; Tilt 10EC 10,6%) sull'antagonismo *in vitro* tramite colture duali su PDA avvelenato, alle concentrazioni di 0,93, 3,72, 15, 60 µg p.a. ml^{-1}, o su PDA non avvelenato usato come controllo. Dischetti di 6 mm di diametro sono stati prelevati dal bordo di colonie in attivo accrescimento e sono stati deposti, capovolti ed a quattro cm uno dall'altro, in piastre Petri di 9 cm di diametro contenenti 15 ml di substrato. Dopo sette giorni sono state osservate le piastre per valutare la crescita e le interazioni tra i funghi saggiati. Per esprimere quantitativamente questi rapporti, per ciascun ceppo è stata determinata l'area della piastra occupata dalla colonia e l'area di quella porzione di colonia di *R.solani* sulla quale

era evidente la crescita di *Trichoderma*. I risultati sono la media di tre replicazioni.

Ulteriori osservazioni sulle interazioni tra antagonisti e patogeno sono state condotte tramite colture duali effettuate su dischi di cellophane appoggiati su agar-acqua al 2% (Chet *et al.*, 1981). Porzioni di cellophane sono state rimosse dalla zona di contatto tra i due funghi ed osservate al microscopio.

La germinazione di conidi di I252, V1 e PP5 è stata osservata su PDA dopo 24 e 48 ore di incubazione a 25°C al buio.

Conservazione degli antagonisti

I pellets sono stati preparati secondo la metodologia descritta da Walker e Connick (1983) e Lewis e Papavizas (1985).

In un becker contenente 1 l di acqua distillata sono stati aggiunti 20 g di alginato di sodio, 25 g di crusca (setacciata a 32 mesh) ed una sospensione conidica di ciascun ceppo di *Trichoderma* portando la concentrazione finale a 10^5 conidi ml^{-1}; in questo modo ogni pellet conteneva circa 10^4 conidi. Nelle tesi che lo richiedevano è stato aggiunto Ronilan (30 µg ml^{-1} p.a.) o Tilt (0,47 µg ml^{-1} p.a.). Le tesi saggiate (combinazioni tra ceppi e fungicidi) sono riportate in Tab.1. Le sospensioni sono state fatte gocciolare in una soluzione di gluconato di calcio (44,89 mg ml^{-1}); a contatto con questa le gocce della sospensione conidica si solidificavano formando delle sferule gelificate; dopo 20 minuti queste sono state prelevate, risciacquate con acqua distillata e messe ad essiccare a 25°C in corrente d'aria. I pellets ottenuti sono stati conservati in frigorifero a 4°C, in termostato a 25°C ed a temperatura ambiente. Al termine dell'essiccamento e dopo un anno di conservazione è stata determinata la percentuale di germinazione dei pellets su substrato agarizzato addizionato, o meno, dei rispettivi tossici.

L'ANOVA è stata condotta dopo trasformazione angolare ed i confronti multipli sono stati effettuati secondo il test di Tukey.

RISULTATI

Prove di antagonismo *in vitro*

La crescita dei singoli ceppi ed i rapporti tra le due colonie presenti sulla medesima piastra sono, come atteso, fortemente influenzati dalla presenza o meno della sostanza tossica nel substrato. I risultati ottenuti sono riassunti in Fig.1. Questi dati devono essere interpretati tenendo presente che lo spazio a disposizione dei due microrganismi era limitato (cm^2 56,74) e che in molte tesi i due microrganismi avevano occupato interamente la piastra.

La crescita di V1, I252 ed *R.solani* (Fig.1A) sembra risentire poco della presenza di vinclozolin nel substrato fino a 0,93 µg ml^{-1}. A partire da questa concentrazione V1 prende decisamente il sopravvento su *R.solani*, mentre I252 riduce drasticamente il proprio accrescimento consentendo al patogeno di espandersi sulla piastra, tuttavia anche il patogeno risente dell'attività tossica del fungicida a partire

da 3,72 µg ml^{-1}. A questa concentrazione I252 è tuttavia ancora in grado di crescere sulla colonia di *R.solani* (Fig.1C).

La prova condotta con PP5 ha fornito risultati sostanzialmente diversi (Fig.1B); infatti, si può osservare come PP5 tragga un certo vantaggio dalla presenza del fungicida nel mezzo soltanto fino a 3,72 µg ml^{-1} contenendo, in una certa misura, lo sviluppo di *R.solani*; a concentrazioni superiori PP5 rallenta sensibilmente il proprio sviluppo consentendo al patogeno di prendere il sopravvento a 15 µg ml^{-1}. A 60 µg ml^{-1} l'attività tossica del propiconazole si manifesta su tutti gli organismi.

In nessun caso, nelle colture duali, è stata osservata la produzione di sostanze ad attività antibiotica.

L'indagine al microscopio ha permesso di osservare indizi di micoparassitismo nei confronti di *R.solani*: infatti sia I252 che V1 presentano frequenti "coilings" sul micelio del patogeno, mentre PP5 mostra lo stesso fenomeno con frequenza inferiore.

La prova di germinazione ha mostrato come i conidi di I252 e di V1 dopo solo 24 ore abbiano già prodotto ife ramificate, mentre PP5 non mostri ancora alcun segno; dopo altre 24 ore i conidi di PP5 avevano abbondantemente iniziato la germinazione.

Conservazione degli antagonisti

I risultati della prova di conservazione degli antagonisti in pellets di alginato di sodio sono riassunti in Tab.1.

Per quanto riguarda V1, l'ANOVA dei dati, ad un anno dalla preparazione, ha indicato che oltre alla significatività delle fonti principali di variabilità (antagonista, temperatura, fungicida) risultano altamente significative anche le interazioni antagonista x fungicida e temperatura x fungicida.

In Tab.2 sono riassunti i dati medi relativi alle fonti principali di variabilità, mentre in Fig.2A,B sono illustrate le due interazioni significative. L'analisi complessiva dei dati forniti da V1 ci consente di affermare come il mutante sia leggermente più resistente del ceppo selvaggio e come i 4°C garantiscano percentuali di germinazione superiori; tuttavia, l'aggiunta di vinclozolin ai pellets diminuisce la germinabilità degli stessi, in particolare - come atteso - di quelli contenenti il ceppo selvaggio.

L'analisi dei dati di germinabilità di PP5, ad un anno dalla preparazione, ha mostrato come esistano differenze significative tra antagonisti, tra temperature di conservazione e tra fungicidi; altamente significativa è risultata l'interazione antagonista x fungicida.

In Tab.3 sono riassunti i dati medi di germinabilità riordinati sulla base delle fonti principali di variabilità per quanto riguarda PP5. Da questa tabella si evince come il mutante mantenga una germinabilità superiore a quella del ceppo selvaggio, come la conservazione a 4°C fornisca risultati nettamente migliori rispetto alle altre due temperature e come l'aggiunta di propiconazole garantisca una maggior germinabilità.

Tab.1 - Schema riassuntivo della prova di formulazione degli antagonisti

Antagonista	Fungicida (a)	Conservazione	Germinazione (b) I	Germinazione (b) II
I 252	BIANCO	Ambiente	100,0	0,0
		25°C	100,0	0,0
		Frigorifero	100,0	59,7
	VINCLOZOLIN	Ambiente	100,0	0,0
		25°C	100,0	0,0
		Frigorifero	100,0	5,6
	PROPICONAZOLE	Ambiente	100,0	0,0
		25°C	100,0	0,0
		Frigorifero	100,0	50,0
V 1	BIANCO	Ambiente	100,0	17,4
		25°C	100,0	10,4
		Frigorifero	100,0	80,4
	VINCLOZOLIN	Ambiente	100,0	15,9
		25°C	100,0	16,7
		Frigorifero	100,0	70,0
PP 5	BIANCO	Ambiente	100,0	24,1
		25°C	100,0	36,7
		Frigorifero	100,0	86,3
	PROPICONAZOLE	Ambiente	100,0	62,6
		25°C	100,0	65,9
		Frigorifero	100,0	98,2

(a) vinclozolin 30 µg ml^{-1}; propiconazole 0,47 µg ml^{-1};
(b) espressa come percentuale media di germinazione dei pellets; I, subito dopo la preparazione e l'essiccazione dei pellets, II dopo un anno di conservazione.

Tab.2 - Germinabilità (%), ad un anno di distanza, dei pellets contenenti V1 ed I252.

Antagonisti	%	Conservazione	%	Fungicida	%
I252	10,9a	25°C	6,8a	Vinclozolin	18,0a
V1	35,1 b	Ambiente	8,3a	Bianco	28,0 b
		4°C	53,9 b		

A lettere diverse corrispondono medie significativamente diverse per $P \leq 0,05$.

Tab.3 - Germinabilità (%), ad un anno di distanza, dei pellets contenenti PP5 ed I252.

Antagonisti	%	Conservazione	%	Fungicida	%
I252	18,3a	Ambiente	21,7a	Bianco	35,4a
PP5	62,3 b	25°C	25,7a	Propiconazole	46,1 b
		4°C	73,6 b		

A lettere diverse corrispondono medie significativamente diverse per $P \leq 0,05$.

Una migliore interpretazione dei risultati, tuttavia, è consentita dall'esame dell'interazione antagonista x fungicida, visualizzata in Fig.2C. L'aggiunta di propiconazole ha effetti ben diversi sul mutante e sul ceppo selvaggio garantendo, infatti, una miglior germinabilità al solo mutante.

DISCUSSIONE

Dei due mutanti saggiati, V1, resistente a vinclozolin, ha fornito sicuramente i risultati più incoraggianti. La mutazione selezionata non ha sostanzialmente modificato le caratteristiche del ceppo selvaggio che sono state valutate (velocità di germinazione, capacità di formare "coilings" attorno alle ife del patogeno e capacità di crescita e sporulazione sulla colonia di *R.solani*) mentre su substrato addizionato di vinclozolin ha fornito un vantaggio evidente consentendo al mutante un contenimento dello sviluppo del patogeno, a partire da 3,72 µg ml^{-1}, superiore a quello manifestato dal ceppo selvaggio su PDA non avvelenato.

La disponibilità di un formulato di facile impiego che già includa un tossico selettivo per l'antagonista, oltre all'antagonista stesso potrebbe fornire a questo ultimo un vantaggio selettivo al momento della sua immissione nell'ambientte ed estendere l'efficacia del trattamento anche nei confronti di microrganismi non sensibili all'attività dell'antagonista. Il metodo di formulazione prescelto, in pellets di alginato di sodio, è stato ampiamente studiato (Connick *et al.*, 1990) anche se, in prove di lotta, ha fornito risultati erratici (Lewis e Papavizas, 1991); l'adozione del calcio gluconato come agente gelificante è stata decisa in quanto sembra garantire, più a lungo di altri agenti gelificanti, la vitalità dei propaguli (Fravel *et al.*, 1985).

La conservazione a 4°C ha confermato di garantire, ad un anno dalla preparazione, livelli di germinabilità sufficienti (Lewis e Papavizas, 1985). Tuttavia, in condizioni sperimentali differenti, questo parametro non sembra influenzato dalla temperatura (Walker e Connick, *l.c.*). Ambedue i mutanti, ma in particolare PP5, resistono meglio del selvaggio alla conservazione e l'aggiunta di propiconazole consente a PP5 di mantenersi vitali anche a temperatura ambiente ed a 25°C. E' opportuno considerare, tuttavia, che questo effetto potrebbe non essere dovuto al principio attivo ma ai coformulanti, ipotesi che meriterebbe di essere valutata più approfonditamente per le implicazioni pratiche che comporta. Infatti la possibilità di allungare sufficientemente la vita media di propaguli fungini "formulati" mediante l'oculata scelta di coformulanti, evitando così la conservazione in ambiente termocondizionato, riveste carattere di priorità.

Nel complesso i risultati ottenuti indicano come l'aggiunta di un fungicida al momento della formulazione di mutanti resistenti di *Trichoderma* sia praticamente fattibile costituendo, così, un ulteriore tassello in quel difficile "puzzle" che è il trasferimento di tattiche di lotta biologica contro le malattie delle piante.

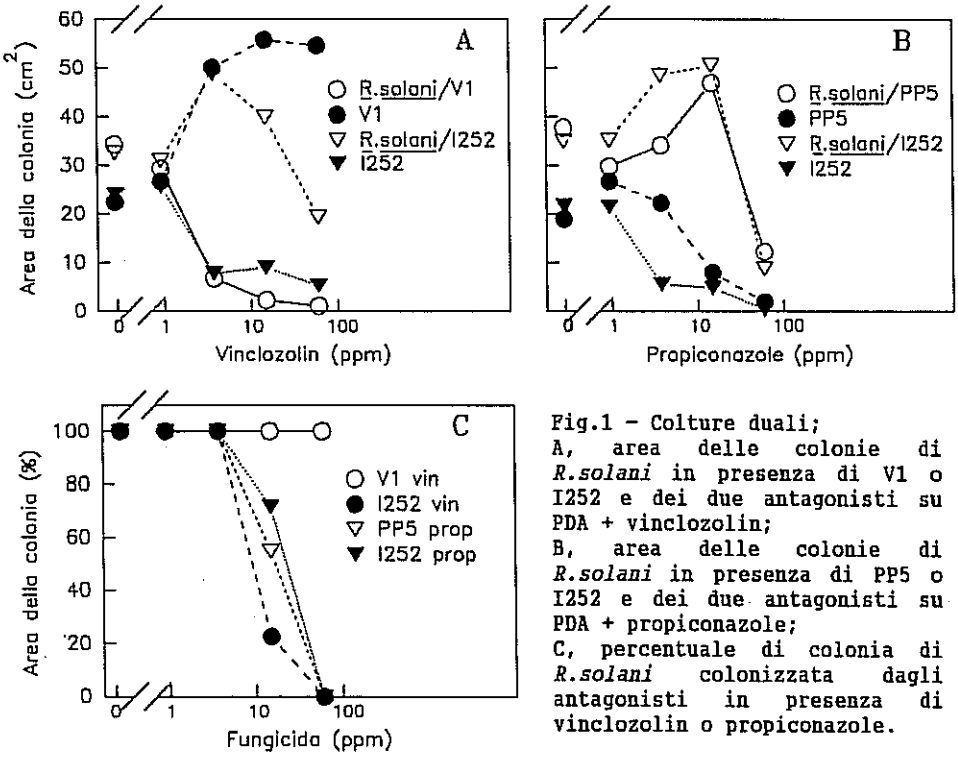

Fig.1 - Colture duali;
A, area delle colonie di *R.solani* in presenza di V1 o I252 e dei due antagonisti su PDA + vinclozolin;
B, area delle colonie di *R.solani* in presenza di PP5 o I252 e dei due antagonisti su PDA + propiconazole;
C, percentuale di colonia di *R.solani* colonizzata dagli antagonisti in presenza di vinclozolin o propiconazole.

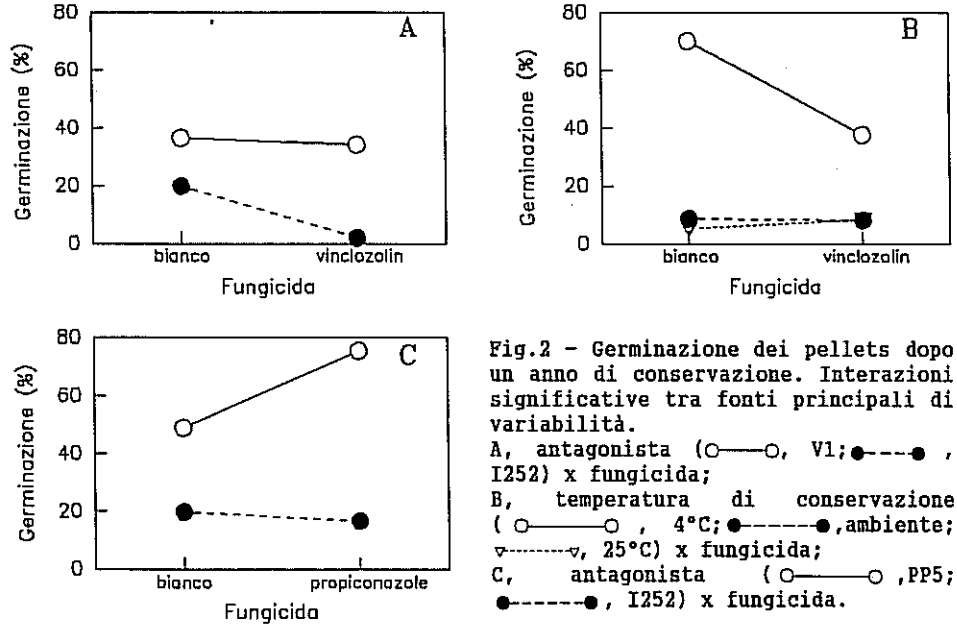

Fig.2 - Germinazione dei pellets dopo un anno di conservazione. Interazioni significative tra fonti principali di variabilità.
A, antagonista (○——○, V1; ●- - -● , I252) x fungicida;
B, temperatura di conservazione (○——○ , 4°C; ●------●,ambiente; ▽·····▽, 25°C) x fungicida;
C, antagonista (○——○ ,PP5; ●------● , I252) x fungicida.

RINGRAZIAMENTI
Ricerca svolta nell'ambito del Gruppo di Ricerca "Patologia delle piante ortensi" del C.N.R., Pubbl. n.283.

LAVORI CITATI

CHET I., HARMAN G.E., BAKER R. (1981). *Trichoderma hamatum*: its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. Microbial ecology, 7, 29-38.
CONNICK W.J., LEWIS J.A., QUIMBY P.C. (1990). Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. In : New directions in biological control (Coord. Baker R.R., Dunn P.E.), 345-372, Alan R.Liss, New York.
CORTELLINI W., VANNACCI G., BERGONZONI P., RAVAGLI S. (1989). Impiego di funghi antagonisti in programmi di difesa biologica in colture orticole. Notiziario sulle malattie delle piante, 110, 252-264.
FRAVEL D.R., MAROIS J.J., LUMSDEN R.D., CONNICK W.J. (1985). Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. Phytopathology, 75, 774-777.
HAYES C.K. (1992). Improvement of *Trichoderma* and *Gliocladium* by genetic manipulation. In: Biological control of plant diseases (Coord. E.S.Tjamos, G.C.Papavizas, R.J.Cook), 277-286. Plenum Press, New York.
LEWIS J.A., PAPAVIZAS G.C. (1985). Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. Plant Pathology, 34, 571-577.
LEWIS J.A., PAPAVIZAS G.C. (1991). Biocontrol of cotton damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in the field with formulations of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. Crop protection, 10, 396-402.
LUMSDEN R.D., LEWIS J.A. (1989). Selection, production, formulation and commercial use of plant disease biocontrol fungi: problems and progress. In: Biotechnology of fungi for improving plant growth (Coord. J.M. Whipps, R.D.Lumsden), 171-190, Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
PAPAVIZAS G.C., LEWIS J.A., ABD-EL MOITY T.H. (1982). Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology, 72, 126-132.
VANNACCI G., PECCHIA S. (1987). Presence of *Sclerotinia minor* antagonists in soils from different mediterranean areas. Med. Fac. Landbouww Rijksuniv. Gent., 52, 777-786.
VANNACCI G., PECCHIA S., RESTA E. (1989). Presence of *Sclerotinia minor* Jagger antagonists in soils from different mediterranean areas. II. Sclerotia decaying fungi. Acta horticulturae, 255, 293-301.
WALKER H.L., CONNICK W.J. (1983). Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. Weed Science, 31, 333-338.