

CONCIA DEL SEME DI FRUMENTO CON ANTAGONISTI FUNGINI NEI CONFRONTI DEL MAL DEL PIEDE

R. ROBERTI, P. FLORI, P. MAGONI

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare - Centro di Fitofarmacia -
Università - Via Filippo Re, 8 - 40126 Bologna

Riassunto

E' stata verificata, in pieno campo, l'attività di cinque microrganismi fungini (*Gliocladium roseum* '11A', *Penicillium frequentans*, *Trichoderma harzianum* '312', *T.koningii* '1A' e *T.viride* '144') contro agenti del mal del piede del frumento ed è stata saggiata, in laboratorio, la loro capacità di colonizzare la rizosfera. In campo gli antagonisti sono stati somministrati per concia sotto forma di sospensione conidica (1×10^8 conidi/ml) su seme di grano duro 'Vitron' e 'Simeto' infetto naturalmente da *F.culmorum*, *F.avenaceum* e *F.nivale* (12% e 8% rispettivamente) seminato su terreno a ringrano. La miscela prochloraz+mancozeb (30+106,6 g p.a./kg seme) è stata impiegata come standard chimico di riferimento. Le tesi non trattate hanno mostrato una progressione della malattia nel tempo da gennaio a giugno (da 2,2% a 52,5% su 'Vitron' e da 1,1% a 70,5% su 'Simeto') e una maggiore suscettibilità al mal del piede da parte della varietà Simeto. Su 'Simeto', a partire dal secondo rilievo, tutti gli antagonisti hanno ridotto in maniera significativa, e uguale tra di loro, la percentuale d'infezione. All'ultimo rilievo e su entrambe le varietà i cinque antagonisti hanno contenuto la malattia pur in maniera differenziata. Su 'Vitron' la migliore azione antagonistica è stata ottenuta con *T. viride* '144' che ha ridotto l'infezione da 52,5% (nel testimone) a 9,1%. Su 'Simeto' la maggiore riduzione dell'infezione (da 70,5% nel testimone a 40% e 48,3%) è stata ottenuta con *T. koningii* '1A' e *T. viride* '144' rispettivamente. Tutti gli antagonisti, ed in particolare *T. koningii* '1A', hanno mostrato buone capacità di colonizzazione della rizosfera di frumento.

Parole chiave: frumento, mal del piede, concia seme, lotta biologica, colonizzazione rizosfera.

Summary

WHEAT SEED DRESSING WITH ANTAGONISTIC FUNGI AGAINST FOOT ROT

Five antagonistic fungi (*Gliocladium roseum* '11A', *Penicillium frequentans*, *Trichoderma harzianum* '312', *T.koningii* '1A' and *T.viride* '144') were tested in two field trials in order to confirm their effectiveness against foot rot pathogens of wheat (cvs Vitron and Simeto) and their rhizosphere competence was measured in laboratory. 'Vitron' and 'Simeto' seeds, infected by *F.culmorum*, *F.avenaceum* and *F.nivale* (12% and 8% respectively), were treated with a conidial suspension of each antagonist (1×10^8 conidia/ml) and the mixture prochloraz+mancozeb (30g + 106.6g a.i./kg seed) as chemical control, and seeded in a field which was cropped to wheat in the last two years. The non treated control showed a progression of the disease from January to June (2.2%-52.5% on 'Vitron' and 1.1%-70.5% on 'Simeto') and the highest susceptibility of 'Simeto' to the disease. At the second assessment (March) all the antagonists reduced the percentage of infected plants on 'Simeto' in the same way. In May the microorganisms controlled wheat foot rot on both cvs. *T.viride* '144' reduced the infection from 52.5% (control) to 9.1% most on 'Vitron', while both *T.koningii* '1A' and *T.viride* '144' showed the best control of the disease on 'Simeto' (from 70.5 in the control to 40% and 48.3% respectively). All the antagonists were rhizosphere competent on wheat.

Key words: wheat, foot rot, seed dressing, biological control, rhizosphere competence.

Introduzione

La sindrome del mal del piede del frumento è determinata da un complesso di microrganismi fungini alquanto eterogeneo facilmente adattabile a condizioni ambientali molto diversificate, così da rappresentare un'avversità temibile in tutte le aree di coltivazione. In Italia la malattia è provocata da diverse specie di *Fusarium* (Piglionica, 1974; Piglionica e Frisullo, 1975; Piglionica *et al.*, 1975; Innocenti e Branzanti, 1986; Frisullo e Rossi, 1991) che possono causare gravi infezioni delle piantine con conseguenti fallanze di investimento e, talvolta, anche riduzioni consistenti di produzione. In particolare *F.culmorum* risulta essere la specie più diffusa al Sud, poiché predilige un clima caldo-secco (Piglionica *et al.*, 1975), pur essendone stata constatata la presenza anche in Emilia-Romagna (Innocenti e Branzanti, 1986), in relazione, soprattutto, alla diffusione dell'investimento delle aree cerealicole a grano duro, notoriamente più sensibile alla fusariosi. La lotta contro *F.culmorum* è particolarmente difficile per le caratteristiche biologiche del patogeno; infatti esso si conserva come micelio nei residui colturali, adattandosi a vita saprofitaria, nelle cariossidi, su molte graminacee spontanee, e nel terreno sotto forma di clamidospore, essendo così in grado di sopravvivere anche in assenza dell'ospite. Nonostante la forma di perpetuazione come micelio insediato nelle cariossidi sia la meno importante, almeno in Italia meridionale (Piglionica *et al.*, 1975), l'infezione del seme, in nostre prove condotte in Emilia-Romagna (Roberti *et al.*, 1988), è risultata causa di gravi fallanze e proporzionalmente correlata alla quantità d'inoculo.

La concia del seme costituisce il sistema più diretto per intervenire contro le malattie derivanti da un inoculo seminale e quello più pratico contro le fitopatie derivanti dalla presenza dell'inoculo nel terreno; a tale riguardo la letteratura fornisce indicazioni riguardanti soprattutto trattamenti a base di prodotti chimici contro il patogeno (Cariddi e Piglionica, 1980 e 1981; Roberti *et al.*, 1988; Flori *et al.*, 1991; Roberti *et al.*, 1992).

L'impiego di mezzi biologici in patologia vegetale costituisce argomento di ricerca che, in vari casi, si trova in una fase già abbastanza avanzata; ciò, unitamente al fatto che tale aspetto risulta essere scarsamente studiato su seme di frumento contro agenti del mal del piede (Sivan e Chet, 1986; Harman *et al.*, 1989; Tahvonven e Avikainen, 1990; Roberti e Ghisellini, 1992), ci ha indotto a verificare in pieno campo l'attività di microrganismi fungini che in prove precedenti (di serra e di campo) avevano fornito un certo grado di protezione contro agenti del mal del piede (Roberti *et al.*, 1996). Si è poi voluto studiare l'eventuale capacità di tali microrganismi di colonizzare la rizosfera delle piante di frumento.

Materiali e metodi

Prove di campo

Le prove di campo hanno avuto luogo negli anni 1993-94 a Baricella (BO) in un terreno di natura argillosa ed in condizioni di ringrano. E' stato impiegato seme di frumento duro selezionato delle varietà Vitron e Simeto che, sottoposto a preventiva analisi fitosanitaria su substrato agarizzato, era risultato già infetto da *F.culmorum* (12% e 8% rispettivamente). Per le due varietà è stato adottato lo stesso protocollo sperimentale di seguito descritto.

I semi sono stati trattati, un giorno prima della semina, con sospensioni conidiche (1×10^8 conidi/ml) di ciascuno dei seguenti cinque antagonisti: *Gliocladium roseum* '11A', *Penicillium frequentans*, *Trichoderma harzianum* '312', *T.koningii* '1A' e *T.viride* '144'. Le sospensioni conidiche sono state ottenute disperdendo in acqua, addizionata con Tween 20 (1% v/v), i conidi sviluppatasi da colonie allevate su PDA in piastre Petri a 25-26°C al buio per

10 giorni. Una parte del seme delle due varietà è stata trattata con una miscela di prochloraz+mancozeb alle dosi rispettive di 0,3+1,07 g di p.a./kg seme (corrispondenti a 2 g formulato/kg seme) ed una parte è stata impiegata tal quale, come testimone. La semina è stata effettuata il 24 novembre 1993 dopo una ordinaria preparazione del terreno, impiegando 200 kg seme/ha, ripetendo ogni tesi cinque volte e distribuendo le parcelle (2,5x12 m) secondo lo schema del blocco randomizzato per ciascuna varietà.

Per la verifica degli effetti dei trattamenti si è proceduto a tre rilievi: il primo (22 gennaio) sull'emergenza, valutata in ogni parcella su due tratti di fila di un metro ciascuna, e gli altri due (18 marzo e 14 maggio) sullo stato sanitario delle piante prelevando queste ultime dalle tre ripetizioni centrali (B, C e D) delle due prove, su due tratti di fila di un mezzo metro cadauno. Le piante sono state portate in laboratorio dove, dopo un esame visivo dei sintomi del mal del piede, si è proceduto a verificare la presenza dei patogeni operando su campioni selezionati, disinfettati superficialmente con NaOCl (1% di cloro attivo) e deposti su PDA per circa 10 giorni a 25-26°C in condizioni di luce/buio. Le diverse specie fungine sviluppatesi sono state poi allevate in purezza per procedere alla loro identificazione.

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il Multiple Range Test di Duncan al 5% di probabilità.

Prove di laboratorio

In laboratorio si è indagato sull'eventuale capacità dei microrganismi antagonisti di colonizzare l'apparato radicale delle piantine di frumento. A tale scopo semi di frumento 'Vitron' sono stati disinfettati superficialmente per 10 min con NaOCl all'1% di cloro attivo, risciacquati in acqua sterile, asciugati e trattati con una sospensione conidica di ciascun antagonista (1×10^6 conidi/ml) in acqua distillata sterilizzata. I semi sono stati quindi posti a germinare, sempre operando in condizioni di sterilità, in un substrato autoclavato e umidificato composto da terreno, torba e sabbia in proporzioni volumetriche uguali, contenuto in cilindri di vetro aperti alle due estremità e posti in una scatola trasparente con coperchio. Dopo 15 giorni di incubazione a 20°C in presenza di cicli di 12 ore di luce/buio, si è proceduto all'analisi della rizosfera adottando la tecnica descritta da Ahmad e Baker (1987). Dai contenitori è stato dapprima estratto tutto il cilindro di terra: questo è stato poi diviso longitudinalmente in due parti e la pianta rimossa e scossa per eliminare la terra eccedente dalle radici. Queste sono poi state tagliate in segmenti di 1 cm che, dopo pesatura, sono stati posti dentro tubi da saggio contenenti 5 ml di acqua distillata, preventivamente sterilizzata, e tenuti in agitazione. Da questi tubi sono state quindi allestite diluizioni e si è infine proceduto a versarne quantità note in piastre Petri contenenti PDA. Dopo tre giorni di incubazione a 25°C al buio è stato determinato il numero di colonie sviluppatesi (CFU: colony forming units=propaguli in grado di dare origine ad una colonia) su ogni capsula riferendo poi tale valore alla rizosfera, vale a dire a quella quantità di terreno aderente alla radice e calcolata per differenza tra il peso dei segmenti prima e dopo la rimozione della rizosfera stessa. Il numero delle CFU è stato infine rapportato per grammo di rizosfera e trasformato in Log_{10} per la rappresentazione grafica.

Risultati

Prove di campo

Prima di commentare i risultati riportati nelle tabelle 1 e 2, va precisato che dalle analisi fitosanitarie effettuate sui campioni di piante prelevate in campo, sono stati isolati diversi patogeni tra i quali i più rappresentati sono risultati appartenere alle specie *Fusarium culmorum*, *F.nivale* e *F.avenaceum*. La percentuale d'infezione cui si farà riferimento riguarderà, pertanto, l'insieme dei patogeni riscontrati.

Tabella 1 - Effetto di trattamenti con funghi antagonisti su seme di frumento 'Vitron**.

Tesi	Date dei rilievi					
	22. 01.1994		18.03.1994		14.05.1994	
	n.piante/m	%infez.	n.piante/m	%infez.	n.cespi /m	%infez.
<i>G.roseum</i> '11A'	62,0 a	2,7 b	56,7 a	2,4 b	16,7 b	19,7 c
<i>P.frequentans</i>	67,3 a	2,0 b	55,3 a	1,9 b	16,0 b	33,3 d
<i>T.harzianum</i> '312'	64,7 a	2,1 b	56,7 a	2,0 b	16,7 b	18,1 c
<i>T.koningii</i> '1A'	64,7 a	2,2 b	55,3 a	1,2 b	17,3 b	38,5 d
<i>T.viride</i> '144'	60,0 a	1,2 b	56,0 a	1,4 b	16,7 b	9,1 b
Prochloraz+mancozeb	67,3 a	0,5 a	58,0 a	0 a	16,0 b	0 a
Testimone	60,7 a	2,2 b	59,3 a	2,1 b	12,7 a	52,5 e

*A lettere uguali corrispondono, nella stessa colonna, valori significativamente uguali secondo il test di Duncan per P=5%.

Tabella 2 - Effetto di trattamenti con funghi antagonisti su seme di frumento 'Simeto**.

Tesi	Date dei rilievi					
	22. 01.1994		18.03.1994		14.05.1994	
	n.piante/m	%infez.	n.piante/m	%infez.	n.cespi /m	%infez.
<i>G.roseum</i> '11A'	60,0 a	1,5 a	62,0 a	1,8 b	20,0 a	70,0 d
<i>P.frequentans</i>	52,0 a	1,3 a	59,3 a	1,4 b	20,7 a	51,5 c
<i>T.harzianum</i> '312'	59,3 a	1,1 a	55,4 a	1,1 b	19,3 a	62,2 d
<i>T.koningii</i> '1A'	61,3 a	1,3 a	51,4 a	1,3 b	20,0 a	40,0 b
<i>T.viride</i> '144'	53,3 a	1,1 a	57,4 a	1,4 b	19,3 a	48,3 bc
Prochloraz+mancozeb	52,6 a	1,1 a	54,0 a	0 a	18,6 a	28,7 a
Testimone	54,6 a	1,1 a	52,0 a	7,7 c	16,7 a	70,5 d

*Vedi tabella 1.

Sulla varietà Vitron (Tab. 1) al primo ed al secondo rilievo non sono state ottenute differenze significative per quanto riguarda il numero di piante per metro, mentre, relativamente alla percentuale d'infezione, solo la tesi trattata con la miscela chimica ha fornito una protezione statisticamente significativa rispetto al testimone. All'ultimo rilievo (14.05.94) è possibile osservare che nel testimone infetto è presente un minor numero di cespi e nessuna differenza si evidenzia tra le tesi trattate. L'esame fitosanitario delle piante ha messo in rilievo un notevole aumento dell'infezione a carico del testimone infetto (52,5% di cespi infetti) ed ha permesso di

constatare che tutti i trattamenti hanno in qualche modo contenuto la malattia. In particolare il risultato migliore è stato ottenuto con l'impiego di *T.viride* '144' (9,1% di piante infette) e secondariamente con *T.harzianum* '312' e con *G.roseum* '11A' (18,1% e 19,7% di piante infette rispettivamente). *P. frequentans* e *T. koningii* '1A', pur riducendo gli attacchi dei patogeni hanno contenuto in misura minore la malattia (33,3% e 38,5 % di infezione), anche se significativamente rispetto al testimone. Nessuna infezione è stata infine riscontrata nella tesi trattata con prochloraz+mancozeb.

Per quanto concerne la prova condotta sulla varietà Simeto (Tab. 2), anche in questo caso non sono state osservate differenze significative nel numero di piante per metro tra tutte le tesi, sia al primo che al secondo rilievo. Riguardo la percentuale d'infezione, mentre al primo rilievo non è stata notata alcuna differenza, al secondo rilievo in tutte le tesi trattate sono emersi valori significativamente inferiori a quelli del testimone. Gli antagonisti hanno contenuto la malattia nella stessa misura ed il prodotto chimico ha completamente impedito l'attacco da parte dei patogeni. All'ultimo rilievo riguardo il numero dei cespi per metro, non è stata osservata nessuna differenza significativa tra tutte le tesi. A parte *G.roseum* '11A' e *T.harzianum* '312', tutti gli altri trattamenti hanno invece ridotto l'infezione in misura significativa rispetto al testimone nel quale, tra l'altro, la percentuale d'infezione è risultata molto alta (70,5%). La miscela prochloraz+mancozeb ha dimostrato la più elevata efficacia. Tra gli antagonisti il maggior contenimento del "mal del piede" è stato ottenuto per azione di *T.koningii* '1A' e *T.viride* '144' (40% e 48,3% di piante infette rispettivamente). Un effetto significativamente uguale a quello di *T.viride* '144' è stato esercitato da *P.frequentans*.

Prove di laboratorio

Nella Fig.1 si può osservare, in generale, che i cinque antagonisti presi in esame hanno colonizzato le radici del frumento in tutta la loro lunghezza. *T.koningii* '1A', in particolare, si è dimostrato il più attivo evidenziando, tra l'altro, la massima concentrazione in corrispondenza del primo cm di profondità della radice e poi un calo progressivo con un solo leggero aumento a 5 cm. Un comportamento pressoché omogeneo lungo tutta la radice è stato notato per *P.frequentans* con valori di CFU piuttosto elevati, inferiori solo a quelli di *T. koningii* '1A'.

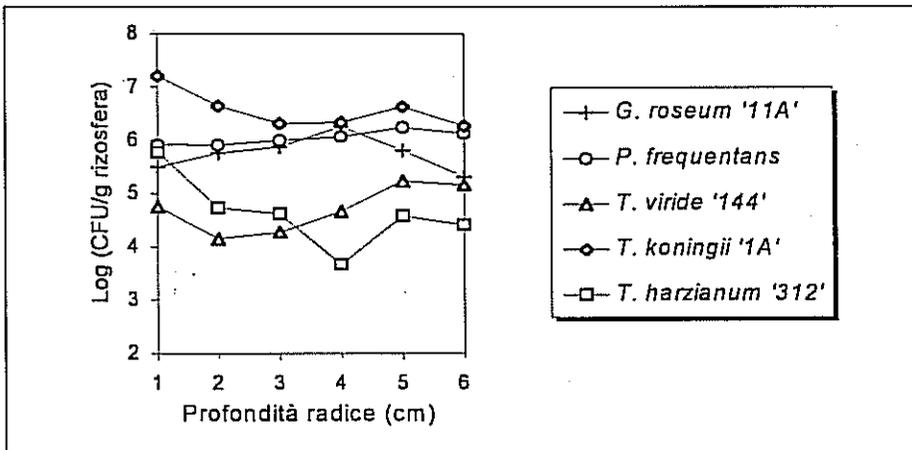


Figura 1 - Colonizzazione della rizosfera di frumento da parte dei cinque microrganismi antagonisti.

T. harzianum '312' ha mostrato una tipica colonizzazione rizosferica a 'C', con una riduzione in corrispondenza dei 4 cm di profondità. Concentrazioni di CFU vicine a quelle di *P. frequentans* e di *T. harzianum* '312' sono state ottenute per *G. roseum* '11A' al primo cm di profondità; la colonizzazione da parte di questo microrganismo è poi aumentata progressivamente fino ai 4 cm per poi scendere rapidamente al sesto cm con concentrazioni di propaguli fungini superiori a quelle di *T. harzianum* '312', ma inferiori a *P. frequentans*. Il più basso livello di densità di popolazione è stato registrato per *T. viride* '144' ai primi 3 cm di profondità, mentre i valori corrispondenti ai successivi 3 cm sono aumentati progressivamente.

Conclusioni

A conclusione delle prove esposte si può considerare innanzitutto che gli antagonisti non hanno manifestato, in gennaio, alcun effetto su entrambe le varietà ed anche in marzo su 'Vitron': ciò potrebbe dipendere dalla bassa pressione infettiva registrata in campo in questi periodi (1-2% di piante infette) la quale non ha permesso di poter discriminare le tesi trattate con tali microrganismi dal testimone. Nell'ultimo rilievo, effettuato nel mese di maggio invece, la malattia si è presentata con notevole intensità nelle due varietà, pur con una maggiore incidenza su 'Simeto'. E' presumibile che tale infezione sia dovuta in massima parte alla presenza dei patogeni nel terreno in quanto si è operato in condizioni di ringrano e, pur essendo risultato infetto il seme impiegato per la semina, non è stata ottenuta nessuna differenza di emergenza. L'intensa pressione infettiva manifestatasi ha influito notevolmente sull'esito delle prove; infatti, anche se gli antagonisti hanno dimostrato di poter contenere in qualche misura l'infezione, il prodotto chimico ha permesso di ottenere, ovviamente, risultati migliori. Va detto, infatti, che la miscela prochloraz+mancozeb rappresenta uno dei preparati fungicidi a migliore ed ottimale efficacia contro gli agenti del mal del piede. Quanto dimostrato da queste prove risulta essere in accordo a nostri precedenti risultati contro gli stessi agenti di malattia, nei confronti dei quali, tra l'altro, sono stati constatati anche alcuni degli effetti dell'antagonismo, quali parassitizzazione e produzione di metaboliti volatili e non (Roberti *et al.*, 1995). E' stato qui dimostrato, inoltre, che gli antagonisti impiegati, anche se in maniera differenziata, sono in grado di colonizzare attivamente la rizosfera delle piantine di grano, in particolare a livello dei primi cm, ed è con tale presupposto che pare verosimile la constatazione di un loro effetto contro gli agenti del mal del piede a distanza di alcuni mesi dalla semina.

Tali constatazioni fanno ritenere che, specie su varietà poco suscettibili al mal del piede o in condizioni di bassa pressione infettiva, sia possibile sfruttare le capacità di questi antagonisti nel contenere la malattia.

Lavori citati

- AHMAD J.S., BAKER R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 7, 182-189.
- CARIDDI C., PIGLIONICA V. (1980). La concia delle cariossidi di frumento. Risultati ottenuti nel biennio 1978-1979. *La Difesa dei Cereali*, suppl. n.3, *Atti Giornate Fitopatologiche*, 67-85.
- CARIDDI C., PIGLIONICA V. (1981). Efficacia di anticrittogamici impiegati come concianti delle cariossidi di frumento seminate su terreni a ringrano. Atti Convegno "La difesa dei cereali nell'ambito dei progetti finalizzati del CNR", Ancona, 10-11 dicembre, 269-274.

- FLORI P., ROBERTI R., GHISELLINI L. (1991). Trattamenti al seme di frumento per la difesa da *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc.. *La difesa delle Piante*, 14(2), 9-20.
- FRISULLO S., ROSSI V. (1991). Variazioni delle popolazioni fungine associate al "mal del piede" del frumento duro nell'Italia meridionale. *Petria*, 1(2), 99-110.
- HARMAN G.E., TAYLOR A.G., STASZ T.E. (1989). Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. *Plant Disease*, 73, 631-637.
- INNOCENTI G., BRANZANTI B. (1986). Indagini sul mal del piede del frumento in Emili-Romagna: 2° contributo. *Informatore fitopatologico*, 36(10), 32-34.
- PIGLIONICA V. (1974). Avversità del grano duro in Puglia e in alcune zone dell'Italia meridionale. *Informatore fitopatologico*, 24(4), 10-13.
- PIGLIONICA V., FRISULLO S. (1975). Le malattie dei cereali nell'Italia meridionale. IV. Problemi connessi alla presenza di *Fusarium nivale* e del suo stato perfetto di *Calonectria nivalis* su grano. *Phytopathologia mediterranea*, 14, 76-81.
- PIGLIONICA V., GIGANTE F., FRISULLO S. (1975). Le malattie dei cereali dell'Italia meridionale. II. Il *Fusarium roseum* f.sp. *cerealis* su grano duro. *Phytopathologia mediterranea*, 14, 60-68.
- ROBERTI R., FLORI P., BRUNELLI A. (1996). Biological seed treatment for controlling seedborne and soilborne foot rot of wheat. (In corso di stampa).
- ROBERTI R., FLORI P., BUSI L. (1992). Evaluation of chemical seed treatment for the control of seed-borne *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana* on wheat. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 57/2a, 223-230.
- ROBERTI R., FLORI P., GENTILI G., BRANDOLINI V. (1988). Concia di seme di grano contro *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Sacc.. *Atti Giornate fitopatologiche*, 1, 321-330.
- ROBERTI R., GHISELLINI L. (1992). Trattamenti al seme di frumento, cipolla e cetriolo con miceti antagonisti di patogeni terricoli. *Atti Giornate fitopatologiche*, 2, 371-380.
- SIVAN A., CHET I. (1986). Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Phytopathology*, 1161, 39-47.
- TAHVONEN A., AVIKAINAEN..(1990) Effect of *Streptomyces* sp. on seed-borne foot rot diseases of wheat and barley. I. Pot experiments. *Annales Agriculturae Fenniae* 29(3), 187-194. (Riassunto in Review of Plant Pathology 03991).