

IMPIEGO DI PRODOTTI A BASE DI MICROORGANISMI FUNGINI PER LA
PROTEZIONE DI COLTURE ORTICOLE DA PATOGENI AD HABITAT TERRICOLO

W. CORTELLINI, C. ALOI, M. ARTECONI, M. CHIANELLA, C. MALLEGNI

I.C.C. - Divisione SIAPA - G.E.R., via Vittorio Veneto, 7
40015 Galliera (BO)

Riassunto

Vengono presentati i risultati di alcune prove condotte per la protezione della bietola da taglio da *Rhizoctonia solani* e della rucola da *Sclerotinia sclerotiorum*. Un prodotto liquido a base di propaguli di *Trichoderma harzianum* ceppo I252 e di *Gliocladium* sp. ceppo I10 alla dose di 100 kg/ha, nonchè conidi pregerminati degli stessi antagonisti alla dose di 0,1 kg/ha con doppio intervento, hanno mostrato buona attività in vaso garantendo una percentuale di piante sane del 70-80% in presenza di una mortalità del 70-90% sul testimone. Nelle prove in tunnel, con mortalità sul testimone del 20-25%, la mortalità sulle tesi trattate con antagonisti non ha superato il 13%. Per la difesa del basilico dall' agente della tracheomicosi, *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici*, sono stati impiegati un formulato liquido ed uno in polvere contenenti propaguli dell' antagonista *Fusarium oxysporum* ceppo 251/2 rB, in prove svolte in ambiente protetto ed in vaso. Entrambi i prodotti somministrati al terreno 3-6 giorni prima della semina, alla dose di 100 kg/ha, hanno garantito una buona protezione della coltura, mediamente oltre il 50% di piante sane, a fronte di un' incidenza della malattia sul testimone compresa tra il 65 e il 98%

Parole chiave: antagonisti, formulazioni, lotta biologica.

Summary

USE OF FUNGAL MICROORGANISMS BASED PRODUCTS FOR THE PROTECTION OF
HORTICULTURAL CROPS FROM SOILBORNE PATHOGENS

Results are given of some greenhouse trials carried out in soil and pots for the control of *Sclerotinia sclerotiorum* on rucola (bitter salad) and *Rhizoctonia solani* on leaf-beet. The liquid formulation of *Trichoderma harzianum* strain I252 and *Gliocladium* sp. strain I10 at the dosage rate of 100 kg/ha and the germinated conidia of the same strains at 0.1 kg/ha in doubled applications were both effective, giving 70-80% control against 70-90% mortality in the untreated. Trials under tunnel gave no more than 13% of dead plants against 20-25% mortality in the untreated. For the control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici*, which causes fusarium wilt of basil, liquid and dry powder formulations, based on the antagonistic strain 251/2 rB of *Fusarium oxysporum*, were tested both in soil and pots under greenhouse conditions. Both formulations applied to the soil 3 to 6 days before sowing at a ratio of 100 kg/ha, guaranteed an average of more than 50% of healthy plants, against a disease incidence ranging between 65% and 98% in untreated control.

Key words: antagonists, formulations, biological control.

Introduzione

L'impiego di funghi antagonisti nella lotta contro patogeni fungini ad habitat terricolo può costituire una valida integrazione alle tecniche di lotta chimica tradizionale, e può inoltre fornire efficaci soluzioni alternative su alcune colture per le quali la lotta chimica è fortemente limitata dall'esiguo numero di fungicidi autorizzati.

La messa a punto di formulazioni che permettano un razionale impiego dei prodotti biologici, garantendo ragionevoli conservabilità e praticità d'uso, oltre a favorire l'attività biologica del preparato, rappresenta il punto nodale sulla via della loro accettazione definitiva da parte degli utilizzatori e quindi della loro affermazione su vasta scala.

Si è inteso, nel presente lavoro, valutare l'efficacia di due ceppi antagonisti di *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium* sp. usati in associazione contro *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* e di un ceppo di *Fusarium oxysporum* antagonista del proprio simile patogeno *F. oxysporum* f.sp. *basilici*, ponendo l'attenzione sulle metodologie di applicazione in generale, e in particolare sull'influenza delle diverse formulazioni nell'attività antagonistica dei funghi saggiati.

Materiali e metodi

Produzione e formulazione dei microorganismi

L'isolato I252 di *T. harzianum* e l'isolato I10 di *Gliocladium* sp. sono stati coltivati:

- in fermentazione sommersa, con l'impiego di fermentatori automatici a regolazione elettronica di temperatura, velocità di agitazione, pH, e ossigenazione; la biomassa, concentrata per centrifugazione, è stata quindi formulata per ottenere un prodotto liquido contenente una miscela di clamidospore, conidi e frammenti di micelio, per complessive $5 \cdot 10^6$ CFU (Colony Forming Units)/g. Tale formulato è stato saggiato alle dosi di 100 e 10 kg/ha.

- su supporti solidi porosi impregnati di un terreno di coltura analogo a quello impiegato in fermentatore, per l'ottenimento di conidi formulati poi in polvere secca a $5 \cdot 10^9$ CFU/g, utilizzata poi nelle prove a 0,1 kg/ha in doppio intervento.

Coltivati separatamente, gli antagonisti sono stati poi formulati e impiegati come miscela contenente pari quantità dei due ceppi.

L'isolato 251/2 rB di *F. oxysporum* è stato coltivato in fermentazione sommersa come già descritto; la biomassa concentrata è stata poi formulata sia in polvere secca contenente clamidospore, sia come liquido costituito da una sospensione di conidi, clamidospore e frammenti di micelio; il titolo di entrambe le formulazioni era 10^9 CFU/g. Le dosi saggiate sono state 100 e 50 kg/ha.

Prove in serra (Tab. 1)

Le prove sono state condotte presso le serre del C.E.R.-STAPA situate in Galliera (BO) e in Casalbeltrame (NO). Per le prove contro *R. solani* su bietola da taglio sono stati usati un terriccio organico sterilizzato in autoclave (121°C per 60 min) e successivamente inoculato artificialmente, in ragione di 1 g di coltura per litro di terriccio, con un isolato di *R. solani* fatto sviluppare su cariossidi di frumento sterilizzate; e un terreno naturalmente infetto, prelevato in una azienda in cui l'incidenza della malattia era particolarmente grave.

Contro *S. sclerotiorum* si è operato utilizzando rucola seminata in terreno naturalmente infetto.

Le prove contro la tracheofusariosi del basilico sono state eseguite sia con terriccio sterilizzato che naturale, artificialmente inoculato con $5 \cdot 10^3$ clamidospore/ml di un isolato di *F. oxysporum* f.sp. *basilici*.

L' efficacia dell' antagonista è stata valutata sulla varietà di basilico "Genovese a foglia fine", particolarmente suscettibile alla tracheofusariosi.

Prove in campo

Le prove sono state eseguite presso le aziende e con le caratteristiche elencate in tabella 1, organizzate secondo lo schema del blocco randomizzato a tre replicazioni.

I rilievi di tutte le prove sono stati effettuati conteggiando la percentuale di piante sane in ogni parcella ed i dati ottenuti dopo trasformazione nei corrispondenti valori angolari stati sottoposti all' analisi della varianza ed al test di Duncan.

Tabella 1 - Condizioni sperimentali delle prove di antagonismo di *T. harzianum* e *Gliocladium* sp. contro *R. solani* su bietola da taglio e *S. sclerotiorum* su rucola, (prove 1-4), e delle prove di antagonismo con *F. oxysporum* 251/2 rB contro *F. oxysporum* f.sp. *basilici* su basilico (prove 5-9).

PROVA E COLTURA	LOCALITA' E AZIENDA	APPLICAZIONE ANTAGONISTI	TIPO DI TERRENO	INVESTIMENTO PIANTE/PARCELLA	INCOLAZIONE
1 Bietola in vaso	Casalbeltrame (NO) CER SIAPA	24 ore prima della semina	organico medio impasto	120	Artificiale
2 Bietola sotto tunnel	Moncalieri (TO) Az. Nada	24 ore prima della semina	medio impasto	720	Naturale
3 Rucola in vaso	Casalbeltrame (NO) CER SIAPA	24 ore prima della semina	organico medio impasto	80	Naturale
4 Rucola sotto tunnel	Moncalieri (TO) Az. Prinetto	24 ore prima della semina	medio impasto	ca. 1000	Naturale
5 Basilico in vaso	Casalbeltrame (NO) CER SIAPA	5 giorni prima della semina, tranne tesi 5 e 6	organico non sterilizzato	35	Artificiale
6 Basilico in vaso	Galliera (BO) CER SIAPA	6 giorni prima della semina, tranne tesi 5 e 6	organico non sterilizzato	60	Artificiale
7 Basilico in vaso	Casalbeltrame (NO) CER SIAPA	5 giorni prima della semina, tranne tesi 5	organico non sterilizzato	35	Artificiale
8 Basilico in vaso	Casalbeltrame (NO) CER SIAPA	5 giorni prima della semina, tranne tesi 5 e 6	organico sterilizzato	35	Artificiale
9 Basilico in vaso	Galliera (BO) CER SIAPA	4 giorni prima della semina	organico sterilizzato	60	Artificiale

Per tutte le prove è stato seguito lo schema del blocco randomizzato a 3-4 ripetizioni.

Applicazione degli antagonisti

Nella lotta contro *R. solani* e *S. sclerotiorum* gli antagonisti in formulazione liquida sono stati applicati 24 ore prima della semina, mentre la formulazione in polvere è stata impiegata in due applicazioni, la prima 24 ore prima della semina e la seconda alla germinazione o sulla coltura emersa allo stadio di foglie cotiledonari; tale formulazione è stata distribuita al terreno dopo 24 ore di incubazione in una soluzione acquosa allo 0,1% di saccarosio.

Su basilico, l' applicazione del *F. oxysporum* 251/2 rB è stata eseguita al terreno 3-6 giorni prima della semina e dell' inoculazione artificiale del patogeno, o come applicazione al terreno immediatamente prima della semina.

I fungicidi chimici sono stati applicati al terreno immediatamente prima della semina.

Risultati

R. solani: nella prova 1 condotta in vaso, in presenza di un indice di malattia nel testimone molto elevato (77% di mortalità) una buona efficacia è stata osservata per tutte le formulazioni degli antagonisti: in particolare la formulazione liquida impiegata a 100 kg/ha e i conidi pregerminati con doppio intervento hanno consentito di ottenere una soddisfacente protezione della coltura (Tab. 2).

I risultati vengono confermati dalla prova n.2 svolta successivamente in tunnel con infezione naturale; in questo caso le differenze appaiono meno vistose a causa della mortalità non elevata del testimone, ma statisticamente significative, e ulteriormente avvalorate dal rilievo eseguito sulla produzione commerciabile (Tab. 2).

Tabella 2 - Effetto di *Gliocladium* sp. I10 e *T. harzianum* I252 in diverse formulazioni e modalità di intervento per il contenimento di *R. solani* su bietola da taglio. Dati espressi come % di piante sane.

Prove n. 1 e 2.

PRODOTTI	DOSI kg/ha di p.a. o CFU/ha	Prova n. 2		
		56 GDS†	28 GDS	PRODUZIONE q/ha
1) TOLCLOFOS METILE	0,75	96,9 a*	93,2 a	359 a
2) I10/I252 LIQUIDO	5·10 ¹¹	71,7 b	87,0 c	306 b
3) I10/I252 LIQUIDO	5·10 ¹⁰	42,2 c	82,8 d	241 c
4) I10/I252 CONIDI	5·10 ¹¹ † 5·10 ¹¹	71,1 b	91,6 b	330 ab
5) TESTIMONE INOCULATO	-	23,3 d	80,4 e	246 c

Per la tesi 4 il secondo intervento è stato effettuato allo stadio di foglie cotiledonari.

† GDS = Giorni dopo la semina

* I dati seguiti dalle stesse lettere nella stessa colonna non differiscono statisticamente per P=0,05 secondo il test di Duncan.

S. sclerotiorum: si conferma l'efficienza antagonistica di *T. harzianum* I252 e *Gliocladium* sp. I10, sia come conidi pregerminati con doppio intervento che come formulato liquido alla dose di 100 kg/ha; tale buona attività è stata evidenziata sia dalla prova in vaso che nella prova sotto tunnel. In questo ultimo caso, in presenza di un'infezione meno elevata, anche la formulazione liquida a dose più bassa (10 kg/ha) è risultata attiva (Tab. 3).

Tabella 3 - Effetto di *Gliocladium* sp. I10 e *T. harzianum* I252 in diverse formulazioni e modalità di intervento per il contenimento di *Sclerotinia sclerotiorum* su rucola. Dati espressi come % di piante sane.

Prove n. 3 e 4.

PRODOTTI	DOSI p.a. kg/ha o CFU/ha	Prova n. 3	Prova n. 4
		67 GDS ¹	42 GDS
1) PROCLIMIDONE + TOLCLOFOS METILE	0,375 + 0,375	98 a*	100 a
2) I10/I252 LIQUIDO	5·10 ¹¹	90 c	81,7 b
3) I10/I252 LIQUIDO	5·10 ¹⁰	90 c	53,3 c
4) I10/I252 CONIDI	5·10 ¹¹ + 5·10 ¹¹	95 b	86,3 b
5) TESTIMONE INOCULATO	-	75 d	3,3 d

Applicazione antagonisti 24 h prima della semina. tesi 4 anche alla germinazione.

¹ e * vedi tabella 2

Tabella 4 - Effetto di *F. oxysporum* 251/2 rB in diverse formulazioni e modalità di intervento per il contenimento della tracheofusariosi del basilico. Dati espressi come % di piante sane.

Prove n. 5, 6, 7, 8, 9

PRODOTTI	DOSI CFU/ha	TERRENO NON STERILIZZATO			TERRENO STERILIZZATO	
		PROVA 5 50 GDS ¹	PROVA 6 55 GDS	PROVA 7 69 GDS	PROVA 8 50 GDS	PROVA 9 52 GDS
1) 251/2rB POLVERE PRE-SEMINA	10 ¹³	70,7 ab*	56,3 ab	56,4 b	79,1 a	54,4 b
2) 251/2rB POLVERE PRE-SEMINA	5·10 ¹²	40,7 c	42,1 ab	ns	34,9 bc	ns
3) 251/2rB LIQUIDO PRE-SEMINA	10 ¹³	81,8 a	46,2 ab	ns	77,1 a	77,8 a
4) 251/2rB LIQUIDO PRE-SEMINA	5·10 ¹²	53,0 bc	65,9 a	ns	73,8 a	ns
5) 251/2rB LIQUIDO ALLA SEMINA	10 ¹³	67,1 ab	64,0 ab	73,1 a	57,4 ab	ns
6) 251/2rB LIQUIDO ALLA SEMINA	5·10 ¹²	60,5 abc	64,1 a	ns	56,6 ab	ns
7) TESTIMONE INOCULATO	-	22,2 d	35,4 b	19,3 c	25,8 c	1,8 c

¹ e * vedi tabella 2

F. oxysporum f.sp. *basilici*: i risultati hanno indicato nelle formulazioni liquida e in polvere secca alla dose di 100 kg/ha e nell'applicazione al terreno alcuni giorni prima della semina, la metodologia d'impiego del *F. oxysporum* antagonista più costante nel garantire una soddisfacente protezione della coltura dalla tracheofusariosi. La dose di 50 kg/ha, pur fornendo risultati positivi, non ha raggiunto i livelli di attività della dose superiore.

L'intervento con la formulazione liquida al momento della semina ha fornito risultati non costanti, generalmente inferiori al trattamento anticipato (Tab. 4).

Conclusioni

Le prove di efficacia riportate nel presente contributo mostrano come la prospettiva di introdurre prodotti a base di microrganismi antagonisti, a basso impatto ambientale, nella difesa fitosanitaria, si riveli ormai molto prossima, grazie anche alla disponibilità di formulazioni che consentono una ragionevole praticità d'impiego.

Particolare interesse ci sembra rivestire l'applicazione di conidi pregerminati di *Trichoderma* e *Gliocladium* in miscela; la scelta di porli in incubazione per 24 ore in una soluzione di saccarosio per permetterne la germinazione prima dell'applicazione al terreno, ha lo scopo di superare i fenomeni di inibizione alla germinazione (fungistasi) che possono intervenire per fattori biotici o abiotici (Papavizas, 1985).

Se da un lato questo comporta una, pur semplice, operazione in più per lo utilizzatore, gli ottimi risultati conseguiti paiono confortare questo approccio. Sarà senz'altro interessante, nel prosieguo della sperimentazione, quantificare il vantaggio della pregerminazione rispetto all'applicazione di conidi non pregerminati.

La formulazione liquida, d'altra parte, oltre al vantaggio di una maggiore semplicità di impiego e di produzione, permette la diffusione anche di micelio e clamidospore, di facile propagazione nell'habitat terricolo e generalmente meno soggetti dei conidi a fenomeni di fungistasi (Papavizas, loc. cit.).

A questo punto della sperimentazione, prima della diffusione su ampia scala di questi prodotti, risulta di importanza basilare la determinazione di alcune caratteristiche degli isolati in studio, segnatamente l'esecuzione di saggi biologici volti alla determinazione di eventuali metaboliti tossici rilasciati dai miceti. E' dimostrata, infatti, per ceppi di funghi appartenenti a questi generi, una notevole variabilità per la produzione di tossine (Altomare *et al.*, 1990).

I risultati presentati sulla sperimentazione di *F. oxysporum* 251/2 rB contro *F. oxysporum* f.sp. *basilici*, costituiscono un allargamento delle acquisizioni già note su questo antagonista di provata efficacia contro varie tracheofusariosi (Aloi *et al.*, 1992; Minuto *et al.*, 1994).

La formulazione liquida di *Fusarium* antagonista offre, oltre ai vantaggi di praticità già menzionati, una notevole affidabilità fitoiatrica e soprattutto costanza di prestazioni nelle diverse condizioni di impiego. Vale qui la pena di sottolineare l'importanza della metodologia di intervento con lo antagonista ai fini del successo del trattamento. I risultati presentati evidenziano, in particolare, l'utilità di garantire al *F. oxysporum* 251/2 rB un certo intervallo di tempo per colonizzare il suolo prima dell'insediamento della coltura; e probabilmente la formulazione liquida favorisce buona distribuzione e pronta germinazione e colonizzazione del substrato.

Ne risulta un mezzo di difesa che può rivelarsi utilissimo contro la tracheofusariosi, malattia difficile da contenere con mezzi chimici, in particolare su una coltura minore quale il basilico, che conta pochi fungicidi autorizzati.

Nonostante la sperimentazione e gli studi condotti su microrganismi antagonisti sui versanti sia dell'attività biologica, che della formulazione e tossicologia abbiano raggiunto dimensioni ragguardevoli, questi sforzi rischiano di essere vanificati per la mancanza di un chiaro quadro legislativo che permetta l' autorizzazione e la commercializzazione di questi prodotti.

Ringraziamenti

Si ringraziano il prof. G. Vannacci, D.C.D.S.L., Università di Pisa, ed il prof. A. Garibaldi, DI.VA.PRA., Università di Torino, per la gentile concessione dei ceppi di miceti antagonisti.

Si ringrazia il dott. E. Paure, ASPROFRUT, e le aziende Nada e Prinetto per la collaborazione prestata.

Lavori citati

ALOI C., BERGONZONI P., ARTECONI M., MALLEGGNI C., GULLINO M.L. (1992). Biofox C: Un prodotto biologico ad azione antagonistica di *formae speciales* di *Fusarium oxysporum*. Atti Giornate Fitopatologiche 1992, 1, 73-78.

ALTOMARE C., BOTTALICO A., GARIBALDI A., GULLINO M.L. (1990). Indagini sull' attività antagonistica verso *Botrytis cinerea* e sulla tossicità di isolati di *Trichoderma*. Atti Giornate Fitopatologiche 1990, 2, 345-354.

MINUTO G., GARIBALDI A., GULLINO M.L. (1994). Biological control of fusarium wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). Proceedings Brighton Crop Protection Conference, 2, 811-816.

PAPAVIZAS G.C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and potential for Biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 1985, 23, 23-54.