ATTIVITÀ ANTAGONISTICA *IN VITRO* DI MICRORGANISMI VERSO *STEMPHYLIUM VESICARIUM* AGENTE DELLA MACULATURA BRUNA DEL PERO

R. ROBERTI, A. VERONESI, A. BRUNELLI
Centro di Fitofarmacia - Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare, Università degli Studi -Viale G. Fanin, 46, 40127 Bologna
roberta.roberti@unibo.it

RIASSUNTO

È stata studiata *in vitro* l'attività antagonistica su *Stemphylium vesicarium* dei seguenti microrganismi: *Trichoderma harzianum* T22 (T.h. T22), *T. asperellum* ICC012 (T.a. ICC012), *T. gamsii* ICC080 (T.g. ICC080), *T. harzianum* ITEM908 (T.h. ITEM908), *Streptomyces griseoviridis* K61 (S.g. K61) e *Bacillus subtilis* QST713 (B.s. QST713). Questi sono stati saggiati per gli effetti sullo sviluppo micelico di due isolati di *S. vesicarium* (SVS e SVR), per la colonizzazione del substrato, per i meccanismi di parassitismo, antibiosi e produzione di enzimi litici della parete cellulare del patogeno. La crescita micelica di SVS e SVR è stata inibita maggiormente da S.g. K61 e T.h. T22, mentre T.h. ITEM908 ha evidenziato la più elevata colonizzazione del substrato. Tutti i ceppi di *Trichoderma* hanno parassitizzato *S. vesicarium* con lisi ed avvolgimenti ifali. Tutti i microrganismi hanno prodotto metaboliti capaci di ridurre la crescita del patogeno in PDA. I metaboliti prodotti in coltura liquida (PDB) hanno spesso modificato l'emissione del numero di tubuli germinativi/conidio e la loro lunghezza media. T.h. ITEM908 su SVS e SVR e B.s. QST713 su SVR, hanno ridotto il numero dei tubuli germinativi. Le riduzioni più significative della lunghezza media dei tubuli germinativi sono state ottenute con T.a. ICC012 + T.g. ICC080 sia su SVS che SVR. Tutti i microrganismi hanno prodotto enzimi chitinolitici; S.g. K61 ha evidenziato la più elevata attività chiotobiosidasica, B.s. QST713 la maggiore azione glucosaminidasica, mentre T.g. ICC080 la più elevata attività endochitinasica.

Parole chiave: funghi e batteri antagonisti, meccanismi d'azione, *Stemphylium vesicarium*

SUMMARY

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS AGAINST *STEMPHYLIUM VESICARIUM* CAUSAL AGENT OF BROWN SPOT OF PEAR

The *in vitro* antagonistic activity against *Stemphylium vesicarium* was studied by the following microorganisms: *Trichoderma harzianum* T22 (T.h. T22), *T. asperellum* ICC012 (T.a. ICC012), *T. gamsii* ICC080 (T.g. ICC080), *T. harzianum* ITEM908 (T.h. ITEM908), *Streptomyces griseoviridis* K61 (S.g. K61) and *Bacillus subtilis* QST713 (B.s. QST713). They were tested for inhibitory effect against mycelial growth of two *S. vesicarium* isolates (SVS and SVR), for substrate colonization, parasitism, antibiosis and lytic enzymes. S.g. K61 and T.h. T22 were the most active in inhibiting the pathogen mycelial growth both of SVS and SVR, while T.h. ITEM908 showed the highest substrate colonization. *Trichoderma* strains exhibited parasitic action of pathogen hyphae, visible as coiling, lysis and collapse. All antagonists produced non volatile metabolites in PDA active in reducing mycelial growth of the pathogen. Metabolites from liquid culture (PDB) reduced the number of germ tubes/conidium (T.h. ITEM908 on SVS and SVR and B.s. QST713 on SVR) and their elongation (T.a. ICC012 and T.g. ICC080). All microorganisms produced chitinolytic enzymes. B. s. QST713 produced the highest level of glucosaminidase activity, S. g. K61 the highest level of chitobiosidase and T.a. ICC012 the highest level of endochitinase.

Keywords: antagonistic fungi and bacteria, mechanisms of action, *Stemphylium vesicarium*

INTRODUZIONE

La difesa del pero dalla maculatura bruna, causata da *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E. Simmons (*Pleospora allii*), è attuata soprattutto con mezzi chimici, anche se nuove opportunità sono offerte dall'integrazione con prodotti biologici basati, ad esempio, sul fungo antagonista *Trichoderma*. È infatti riportato che *Trichoderma* può ridurre l'inoculo del patogeno a livello del cotico erboso (Rossi e Pattori, 2009). Lo scopo di questo studio è stato quello di saggiare *in vitro* l'attività competitiva di alcuni formulati, costituiti da microrganismi antagonisti, nei confronti di due isolati di *S. vesicarium* e di evidenziare alcuni dei meccanismi d'azione quali parassitismo, antibiosi e produzione di enzimi litici.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati due isolati di *S. vesicarium*, SVS e SVR, rispettivamente sensibile e resistente ai fungicidi dicarbossimidici, e microrganismi antagonisti isolati in purezza dai formulati seguenti: Rootshield (*Trichoderma harzianum* T22 [T.h. T22]), Remedier (*T. asperellum* ICC012 [T.a. ICC012] e *T. gamsii* ICC080 [T.g. ICC080]), Trichover (*T. harzianum* ITEM908 [T.h. ITEM908]), Mycostop (*Streptomyces griseoviridis* K61 [S.g. K61]) e Serenade (*Bacillus subtilis* QST713 [B.s. QST713]). E' stata esaminata in coltura duale antagonista-patogeno, su agar patata destrosio (PDA, 3,9%), la capacità degli antagonisti di colonizzare il substrato Camporota (1985) e di inibire la crescita micelica di SVS e SVR (Manandhar *et al*., 1987). Allestimenti su vetrino portaoggetto sono serviti per le osservazioni microscopiche delle interazioni ifali (Innocenti *et al*., 2003). Sono stati inoltre condotti saggi per evidenziare effetti di antibiosi di metaboliti non volatili, prodotti dagli antagonisti dopo 48 ore d'incubazione in substrato solido (PDA), sulla crescita micelica (Dennis e Webster, 1971), e, dopo 6 giorni d'incubazione in coltura liquida (brodo di patata destrosio, PDB), sulla germinazione conidica e sullo sviluppo dei promiceli (Krupke *et al*., 2003). Gli antagonisti sono stati infine valutati per la loro capacità di produrre enzimi litici degradativi della parete cellulare dei funghi, quali β-*N*-acetylhexosaminidase (glucosaminidasi), chitin 1,4-β-chitobiosidase (chitobiosidasi) ed endochitinasi attraverso metodi spettrofotometrici (Yedidia *et al*., 1999). Tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti ad elaborazione statistica (analisi della varianza seguita dal test DMS per $P \leq 0{,}05$ e test del *t* di student).

RISULTATI

Tutti i microrganismi antagonisti saggiati hanno ridotto significativamente la crescita micelica dei due isolati di *S. vesicarium*. Gli effetti inibitori maggiori sono stati osservati per S.g. K61 e T.h. T22 sia su SVS che SVR. T.h. ITEM908 ha inibito la crescita micelica di SVS in maniera significativa come S.g. K61 e T.h. T22 ed ha inoltre evidenziato la più elevata colonizzazione del substrato in presenza dei due isolati del patogeno, mostrando quindi un'eccellente attività competitiva (dati non mostrati).

Tutti i ceppi di *Trichoderma* hanno evidenziato fenomeni di parassitizzazione del micelio del patogeno sotto forma di avvolgimenti ifali, lisi e collassamenti visibili al microscopio ottico nella zona d'interazione patogeno-antagonista, mentre i ceppi batterici non sono mai venuti a contatto diretto con il micelio del patogeno che è stato inibito a distanza da presunte sostanze ad attività antibiotica.

I metaboliti non volatili prodotti in PDA da tutti i microrganismi hanno ridotto sensibilmente ed in ugual misura la crescita delle colonie del patogeno, causando anche alterazioni morfologiche delle ife (dati non mostrati). I metaboliti non volatili prodotti in PDB non hanno influenzato la percentuale di geminazione conidica, ma hanno modificato l'emissione del numero di tubuli germinativi/conidio e la loro lunghezza media. In particolare il numero dei tubuli germinativi è stato ridotto significativamente, rispetto al testimone, da

T.h. ITEM908 su SVS e SVR e da B.s. QST713 su SVR, mentre T.a. ICC012 + T.g. ICC080 hanno causato un aumento dei tubuli germinativi/conidio su entrambi gli isolati del patogeno. Un aumento altamente significativo è stato ottenuto anche per effetto dei metaboliti di S.g. K61 limitatamente ad SVS (tabella 1). La lunghezza media dei tubuli germinativi è stata invece sempre ridotta, e spesso in maniera statisticamente significativa, dai metaboliti degli antagonisti; le riduzioni maggiori rispetto al testimone sono state ottenute per effetto dei metaboliti prodotti da T.a. ICC012 + T.g. ICC080 sia su SVS che SVR (tabella 2). Si rileva che T.h. T22 non ha influenzato né l'emissione dei tubuli germinativi per conidio né la loro lunghezza.

Tutti i microrganismi hanno invece prodotto enzimi chitinolitici in varia misura; la più elevata attività chiotobiosidasica è stata rilevata per S.g. K61, la maggiore azione glucosaminidasica per B.s. QST713, mentre la più elevata attività endochitinasica è stata osservata per T.g. ICC080 (figura 1).

Tabella 1. Effetto di metaboliti non volatili prodotti dagli antagonisti sui tubuli germinativi dei due isolati di *S. vesicarium*

Antagonisti	Numero di tubuli germinativi/conidio			
	SVS		SVR	
	Testimone	Trattato	Testimone	Trattato
S.g.K61	2,40 ± 0,83	3,80 ± 0,86 ***	3,27 ± 1,16	3,80 ± 0,86 ns
B.s.QST713	2,93 ± 0,70	2,60 ± 0,63 ns	3,53 ± 0,83	2,20 ± 0,56 ***
T.h.T22	2,40 ± 0,91	1,80 ± 0,56 ns	3,07 ± 0,96	2,67 ± 0,72 ns
T.a.ICC012 + T.g.ICC080	2,40 ± 0,74	4,07 ± 0,88 ***	1,60 ± 0,63	3,20 ± 1,08 ***
T.h.ITEM908	2,73 ± 0,70	1,53 ± 0,64 ***	2,80 ± 0,77	2,00 ± 0,76 **

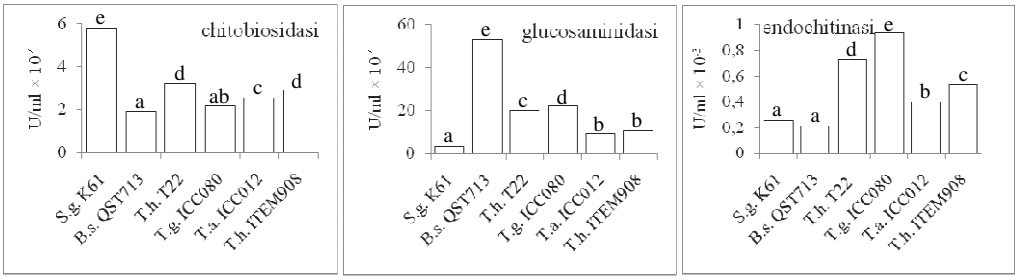
*** significativo per $P \leq 0{,}001$, ** significativo per $P \leq 0{,}01$, ns: non significativo rispetto al testimone secondo il test del *t* di Student

Tabella 2. Effetto di metaboliti non volatili prodotti dagli antagonisti sui promiceli due isolati di *S. vesicarium*

Antagonisti	Lunghezza media (μm) promiceli/conidio			
	SVS		SVR	
	Testimone	Trattato	Testimone	Trattato
S.g.K61	118,5 ± 61,8	75,1 ± 26,1 *	129,1 ± 41,1	98,1 ± 24,9 *
B.s.QST713	95,3 ± 45,8	66,0 ± 24,0 *	195,3 ± 73,4	158,7 ± 71,7 ns
T.h.T22	76,5 ± 26,9	70,7 ± 35,9 ns	150,8 ± 48,9	146,6 ± 42,3 ns
T.a.ICC012 + T.g.ICC080	140 ± 46,7	88,4 ± 42,0 ***	157,3 ± 54,1	35,2 ± 9,4 ***
T.h.ITEM908	83,4 ± 31,7	53,21 ± 18,1 **	187,9 ± 56,1	144,7 ± 35,6 *

*** significativo per $P \leq 0{,}001$, ** significativo per $P \leq 0{,}01$, * significativo per $P \leq 0{,}05$, ns: non significativo rispetto al testimone secondo il test del *t* di Student

Figura 1. Attività enzimatiche valutate nei filtrati colturali degli antagonisti cresciuti per 7 giorni in mezzo sintetico contenente pareti cellulari di *S. vesicarium*. Un'unità enzimatica corrisponde alla quantità di enzima che rilascia, da substrati specifici, 1 ηmole di *p*-nitrofenolo per minuto. Lettere diverse indicano differenze significative secondo il test DMS ($P \leq 0,05$)



CONCLUSIONI

Tutti gli antagonisti saggiati hanno mostrato un'azione di contrasto nei confronti di *S. vesicarium* evidenziata dalla riduzione dello sviluppo della crescita micelica e quasi sempre dalla riduzione della lunghezza dei tubuli germinativi che si formano da ogni singolo conidio. Tale azione può essere imputata alla produzione di enzimi litici della parete cellulare del patogeno ed all'azione antibiotica di metaboliti di varia natura, talvolta accompagnate da parassitizzazione ifale come è stato osservato per i ceppi di *Trichoderma*. Interessante risulta l'azione dei formulati Mycostop e Serenade, costituiti da batteri, in quanto potrebbero essere considerati per l'applicazione in programmi di lotta integrata con fungicidi, riguardo ai quali il Centro di Fitofarmacia sta già operando.

LAVORI CITATI

Camporota P., 1985. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomie*, 5, 613-620.

Dennis C., Webster J., 1971. Antagonist properties of species-groups of *Trichoderma*. I: Production of non volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 25-39.

Innocenti G., Roberti R., Montanari M., Zakrisson E., 2003. Efficacy of microorganisms antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and their cell wall degrading enzymatic activities. *Mycological Reearch,* 107, 421-427.

Krupke O.A., Castle A.J., Rinker D.L., 2003. The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycological Reearch,* 107, 1467-1475.

Manandhar J.B., Thapliyal P.N., Cavanaugh K.J., Sinclair J.B., 1987. Interaction between pathogenic and saprobic fungi isolated from soybean roots and seeds. *Mycopathologia*, 98, 69-75.

Rossi V., Pattori E., 2009. Inoculum reduction of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of brown spot of pear, through application of *Trichoderma*-based products. *Biological Control*, 49, 52-57.

Yedidia I., Benhamou N., Chet I., 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology,* 65, 1061-1070.