

STREPTOMICETI QUALI POSSIBILI AGENTI DI BIOCONTROLLO NEI CONFRONTI DI PATOGENI RADICALI

M. BONALDI, A. KUNOVA, P. SARDI, P. CORTESI, M. SARACCHI

Dipartimento di Protezione dei Sistemi Agroalimentare e Urbano e Valorizzazione delle Biodiversità (DiPSA), Università degli Studi di Milano - Via G. Celoria, 2, 20133 Milano

RIASSUNTO

Gli attinomiceti, componenti fondamentali delle comunità microbiche del suolo e della rizosfera, possiedono grandi potenzialità quali agenti di biocontrollo delle malattie radicali. In questa ricerca, ceppi di streptomiceti, isolati dalle radici di piante diverse, sono stati saggiati *in vitro* e *in vivo* nei confronti di diversi patogeni agenti di marciumi radicali, con particolare riferimento alle specie orticole coinvolte nelle produzioni di IV gamma. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la diffusa attività antifungina di questi microrganismi e l'influenza che alcuni di essi esercitano sullo sviluppo vegetale. Alcuni fra i ceppi saggiati hanno inoltre mostrato caratteristiche promettenti per l'impiego come agenti di biocontrollo.

Parole chiave: *Streptomyces*, funghi, rizosfera, antagonismo, attinomiceti

SUMMARY

STREPTOMYCETES AS POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS AGAINST SOIL- BORNE FUNGAL PATHOGENS

The actinomycetes, key components of the soil and rhizosphere microbial communities, have great potential as biocontrol agents of root diseases. In this study, streptomyces strains, isolated from roots of various plants, were tested *in vitro* and *in vivo* against several pathogenic agents of root rot, with particular reference to tomato, lettuce, corn salad, rocket, and onion. The results highlighted the widespread antifungal activity of these microorganisms and the influence they exert on the development of some crops. Some of the tested strains also showed promising characteristics for the use as biocontrol agents.

Keywords: *Streptomyces*, fungi, rhizosphere, antagonism, actinomycetes

INTRODUZIONE

Nell'agricoltura moderna, i fungicidi rappresentano una linea efficiente e difficilmente sostituibile per la protezione delle colture. Tuttavia, il loro impatto sull'uomo, sull'ambiente e sugli organismi "non-target" ha portato negli anni ad un utilizzo sempre più mirato e a una legislazione via via più severa, che ne determinerà una riduzione d'impiego a favore dei mezzi alternativi di protezione. Pertanto, sono sempre più numerose le ricerche volte ad individuare agenti di biocontrollo.

Questa strategia, inoltre, costituisce una delle linee guida indicate dalla direttiva europea 2009/128/EC "sustainable biological, physical and other non-chemical methods must be preferred to chemical methods if they provide satisfactory pest control" di prossima attuazione.

La produzione di ortaggi in ambiente protetto è caratterizzata spesso da monocoltura o da alternanza di poche specie vegetali, a volte dello stesso genere, che favoriscono epidemie di malattie radicali causate da patogeni quali *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., difficili da contenere sia per la carenza di mezzi di intervento efficaci sia per i cicli colturali particolarmente brevi. Attualmente, la prassi più seguita è la geosterilizzazione, eventualmente ripetuta nell'anno, a volte seguita dall'uso di competitori microbici, principalmente a base di *Trichoderma* spp., ma non sempre efficace nei confronti dei patogeni

citati. La disponibilità di una vasta gamma di competitori microbici risulta pertanto strategica per la sostenibilità della protezione delle colture.

Nella popolazione microbica dei suoli sono spesso presenti organismi capaci sia di competere con le forme patogene, sia di favorire lo sviluppo delle piante, come nel caso dei “plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)” (Kloepper *et al.*, 1989). Gli attinomiceti, componente quantitativamente e qualitativamente importante della microflora del suolo e della rizosfera (Doubou *et al.*, 2001; Petrolini *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1989), hanno dimostrato la capacità di colonizzare gli strati corticali delle radici di molte specie vegetali, coltivate e spontanee (Sardi *et al.*, 1992; Petrolini *et al.*, 1996). Questo aspetto, la diffusa attività antagonista e la produzione di un’ampia gamma di metaboliti secondari, quali siderofori, antibiotici, enzimi e ormoni (Dimkpa *et al.*, 2008; Khamna *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 1984), li fanno considerare una probabile fonte di agenti di biocontrollo dei patogeni radicali (Crawford *et al.*, 1993; Doubou *et al.*, 2001; Khamna *et al.*, 2009; Knudsen *et al.*, 1997; Lechevalier, 1988; Quaroni e Saracchi, 1994).

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il potenziale di una vasta collezione di streptomiceti, isolati dallo strato corticale di radici di piante diverse, quali potenziali agenti di biocontrollo nei confronti di alcuni patogeni radicali di specie orticole, specialmente legate alle produzioni di IV gamma.

MATERIALI E METODI

Microrganismi utilizzati

Presso i laboratori del DiPSA è conservata una collezione di ceppi di streptomiceti isolati dallo strato corticale di radici di numerose piante in buone condizioni vegetative. Circa 500 di essi sono stati raggruppati sulla base delle caratteristiche morfoculturali, fisiologiche e di attività antagonista verso microrganismi test (Petrolini *et al.*, 1996). Per questo studio sono stati selezionati 35 ceppi, rappresentanti dei gruppi più numerosi (tabella 1). I funghi fitopatogeni impiegati sono stati: *Alternaria alternata* ceppo FW350, *Botrytis cinerea* ceppo FW351, *Colletotrichum dematium* f.sp. *circinans* ceppo FW346, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* ceppo FW286, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* ceppi FW345 e FW347, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* ceppo FW329, *Fusarium roseum* ceppo FW353, *Rhizoctonia solani* ceppo FW352, *Sclerotinia sclerotiorum* ceppo FW361.

Saggio di attività antagonista

L’attività antagonista *in vitro* di ceppi di streptomiceti nei confronti di una selezione di funghi patogeni dell’apparato radicale è stata valutata in colture duali allestite in capsule Petri contenenti Agar Czapek (Difco) addizionato con 2 g/l di estratto di lievito (CZY). Al centro di ciascuna piastra è stato posto un tassello di 5 mm di diametro prelevato dal margine di una colonia del ceppo fungino cresciuta su CZY per 7 giorni a 24°C. Attorno a questo sono state collocate, a 3 cm di distanza, quattro gocce di sospensione di spore (5 µl, 10⁷ spore/ml) dei ceppi di streptomiceti, ottenute scarificando con acqua sterile e Tween 20 (0,01%) colonie di 2/3 settimane, abbondantemente sporulate. Per ogni combinazione fungo/streptomicete sono state allestite tre repliche. Le piastre sono state incubate a 24°C e gli aloni di inibizione della crescita fungina sono stati valutati dopo 4 e 7 giorni.

Test di germinazione *in vitro*

Al fine di valutare l’effetto della batterizzazione sulla germinazione dei semi di alcune specie orticole sono stati impiegati i ceppi di *Streptomyces* spp. CMJ58I, ER08W, MRX13R, VT111I e ZEA17I, che nel corso dei saggi di antibiosi avevano evidenziato gli spettri di

attività più ampi. Semi di lattuga (*Lactuca sativa* “Bionda riccia”), pomodoro (*Lycopersicon esculentum* “Marmande”), rucola (*Eruca sativa* “comune”) e cipolla (*Allium cepa* “Eclipse” e “Pompei”) sono stati immersi, per 30 sec, in sospensioni di spore (10^7 spore/ml), asciugati all’aria, disposti in germinatoio, su carta da filtro mantenuta umida, e incubati a 20°C. Il saggio è stato condotto allestendo germinatoi contenenti 50 semi ciascuno. Le letture sono state effettuate a tempi variabili, in funzione della specie vegetale, valutando la presenza di colonie di streptomiceti e funghi sui tegumenti seminali e la germinazione dei semi. Al termine della prova (7/14 giorni di incubazione) sono state valutate la lunghezza degli ipocotili, quella delle radici primarie e il numero di radichette secondarie.

Test di germinazione *in vivo*

Per i test di germinazione in terriccio dei semi batterizzati sono stati utilizzati semi di pomodoro e delle due varietà di cipolla, batterizzati come precedentemente descritto con i ceppi CMJ58I, VT111I e ZEA17I. E’ stato utilizzato un terriccio a base di torba (Growing medium, Vigor-Plant) allestendo vaschette contenenti 100 semi ciascuna. La prova è stata condotta in cella climatica a 24°C, umidità relativa 60% e fotoperiodo di 18 ore. Il numero delle plantule emerse è stato valutato dopo 7, 14 e 21 giorni. Nel caso di pomodoro è stata anche misurata l’altezza dello stelo mentre in cipolla è stato contato il numero di foglie per plantula e misurata quella maggiormente sviluppata.

Al termine della prova è stata valutata anche la colonizzazione delle radici da parte di streptomiceti, adottando la metodologia descritta da Sardi *et al.* (1992).

RISULTATI

Attività antagonista

In numerose combinazioni è stata rilevata la presenza di aloni di inibizione della crescita del fungo con una dimensione variabile da 2 a 15 mm (tabella 1). Solo 12 ceppi non hanno evidenziato alcuna attività antagonista nei confronti dei 10 funghi utilizzati. I ceppi maggiormente attivi sono risultati AZ112I, AZ117I, CMJ58I, ER08W, MRX13RM VT111I e ZEA17I, che hanno inibito almeno 5 ceppi dei funghi considerati.

I funghi maggiormente inibiti sono risultati *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. dematium* f.sp. *circinans*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*, mentre i meno sensibili alla presenza degli streptomiceti sono stati *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis*, *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* e *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Un comportamento particolare è stato evidenziato dai due diversi ceppi di *F. oxysporum* f.sp. *lactucae*; solamente uno di essi è stato, infatti, inibito da 4 streptomiceti mentre il secondo non ha mai subito alcuna riduzione di crescita.

Test di germinazione *in vitro*

La presenza degli streptomiceti è stata rilevata sui tegumenti di tutti i semi trattati. Le colonie (figura 1) sono state isolate, coltivate *in vitro* e ne è stata valutata la corrispondenza dei caratteri morfo-colturali con quelli dei ceppi impiegati per la batterizzazione.

Gli effetti indotti dagli streptomiceti sulla germinazione dei semi sono risultati spesso variabili in funzione alla combinazione ceppo/specie vegetale (Tabella 2-3).

Nel caso della lattuga (tabella 2) i ceppi CMJ58I, VT111I, ZEA17I ed ER08W, hanno ritardato la germinazione dei semi, che a 7 giorni è risultata ancora leggermente inferiore a quella della tesi di controllo per i primi tre isolati e sensibilmente ridotta nel caso di ER08W.

Tabella 1. Attività antagonista, determinata *in vitro*, dei ceppi di *Streptomyces* spp. nei confronti di alcuni funghi fitopatogeni

Streptomiceti	Funghi fitopatogeni ^a									
	FW350	FW351	FW346	FW286	FW345	FW347	FW329	FW353	FW352	FW361
AM12A		+	++						+	+
AST25I										
AZ112I	++	++						+	+	++
AZ117I		++	++	+				+	+	
AZ144I	+++		++							+
C014W			++							
CMJ57I	++	++		+					+	++
CMJ58I		++		+	+				+	++
CMJ60I	++	+			+		+	+	+	++
CN09W										
CU13W										
EP11W	+									
EP17A		+++		+						
ER08W	++	+	+	+	+		+	+	++	
FS01W										
FT05W										
LMP64I			++							
LMP72I								+		
LMP74I										
MR01W										
MR02W										
MR05W	+	+							+	+
MRX13R	++			++	+		+		+++	
MRX44R										
PO03W			+							
QR26W										
SG10W								+++		+
VT098I										
VT101I										
VT104I	+++	++							+	
VT105I		++	++						++	+
VT111I		+	++						+	+
ZEA07I								+		
ZEA13I	+++		++							+
ZEA17I	++	++						+	+	+

^a Ceppi fungini: FW350 *Alternaria alternata*, FW351 *Botrytis cinerea*, FW346 *Colletotrichum dematium* f.sp. *circinans*, FW286 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis*, FW345 e FW347 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, FW329 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, FW353 *Fusarium roseum*, FW352 *Rhizoctonia solani*, FW361 *Sclerotinia sclerotiorum*. Dimensione degli aloni di inibizione: +++= >8 mm; ++= 4-8 mm; += <4 mm; assente dove non specificato

Un effetto diverso è stato evidenziato dal ceppo MRX13R che dopo 4 giorni mostrava il 96% dei semi germinati contro il 90% del controllo, incremento confermato al termine del periodo di incubazione.

La lunghezza delle radichette delle plantule nelle tesi trattate è quasi sempre risultata inferiore ai controlli e solo nel caso del ceppo ZEA17I leggermente superiore. Per quanto riguarda l'ipocotile, è stata rilevata una generale, contenuta, riduzione dello sviluppo nelle tesi batterizzate. La presenza di funghi contaminanti sui tegumenti dei semi ha interessato il 6% nei non trattati, mentre è risultato scarso nei semi batterizzati e nullo per il ceppo VT111I.

Nel saggio di germinazione *in vitro* dei semi di pomodoro (tabella 2), dopo 8 giorni di incubazione tutte le tesi trattate hanno mostrato una percentuale di semi germinati sensibilmente più bassa che nel controllo.

Tabella 2. Effetti della batterizzazione con ceppi di *Streptomyces* spp. sulla germinazione *in vitro* di semi di lattuga, pomodoro e rucola e caratteristiche delle plantule

	Giorni	Controllo	CMJ58I	ER08W	MRX13R	VT111I	ZEA17I
Lattuga							
Germinazione (%)	4 7	90 92	76 88	76 80	96 96	82 88	78 88
Radichetta (mm)	7	23,8 <i>N</i> 46; se 1,07	18,8 <i>N</i> 44; se 0,76	20,1 <i>N</i> 40; se 0,93	19,8 <i>N</i> 48; se 0,89	18,7 <i>N</i> 44; se 1,10	25,6 <i>N</i> 44; se 1,38
Ipocotile (mm)		30,1 <i>N</i> 46; se 0,77	28,8 <i>N</i> 44; se 0,95	27,7 <i>N</i> 40; se 0,80	28,9 <i>N</i> 48; se 0,66	28,5 <i>N</i> 44; se 0,88	28,9 <i>N</i> 44; se 1,20
Pomodoro							
Germinazione (%)	8 14	66 84	44 92	16 74	20 86	22 74	46 82
Radichetta (mm)	14	31,3 <i>N</i> 42; se 2,32	36,9 <i>N</i> 46; se 2,82	8,2 <i>N</i> 37; se 0,52	6,4 <i>N</i> 43; se 0,64	9,7 <i>N</i> 37; se 0,63	35,7 <i>N</i> 41; se 3,14
Ipocotile (mm)		33,7 <i>N</i> 40; se 1,45	43,7 <i>N</i> 42; se 1,80	23,4 <i>N</i> 36; se 1,43	22,7 <i>N</i> 34; se 1,54	26,6 <i>N</i> 35; se 1,56	39,0 <i>N</i> 41; se 1,98
Rucola							
Germinazione (%)	2 6	86 88	84 96	90 94	86 92	84 96	84 92
Radichetta (mm)	6	38,6 <i>N</i> 44; se 2,59	32,1 <i>N</i> 48; se 2,26	35,2 <i>N</i> 47; se 2,11	47,3 <i>N</i> 46; se 3,04	36,9 <i>N</i> 48; se 2,65	47,9 <i>N</i> 46; se 2,12
Ipocotile (mm)		37,4 <i>N</i> 44; se 1,05	29,8 <i>N</i> 48; se 1,28	26,8 <i>N</i> 47; se 0,79	25,9 <i>N</i> 46; se 3,82	24,4 <i>N</i> 48; se 0,63	36,0 <i>N</i> 46; se 1,16

Nel caso delle tesi CMJ58I e MRX13R questa differenza si è successivamente annullata, superando il controllo non trattato. Lo sviluppo della radichetta della plantula è risultato notevolmente ridotto nel caso dei ceppi ER08W, MRX13R e VT111I e leggermente superiore al controllo nei semi trattati con CMJ58I e ZEA17I. Analoga influenza dei ceppi è stata rilevata sulla lunghezza dell'ipocotile. Lo sviluppo di funghi contaminanti sui tegumenti di pomodoro ha riguardato il 10% di quelli non trattati e nella tesi ZEA17I; riduzioni sono state invece rilevate nelle altre tesi.

Nel caso di rucola tutte le tesi trattate hanno evidenziato un incremento della percentuale di germinazione dei semi rispetto al controllo e nel caso del ceppo ER08W è stato rilevato anche un notevole anticipo (Tabella 2). Le radichette delle plantule nate da semi trattati con CMJ58I, ER08W e VT111I sono risultate raccorciate rispetto ai controlli, mentre sono apparse più sviluppate nel caso degli altri due ceppi. Lo sviluppo di funghi sui tegumenti è risultato molto limitato in tutte le tesi, compresa quella non trattata, e nullo in quelle batterizzate con i ceppi MRX13W e VT111I.

Nei test di germinazione con semi di valeriana (tabella 3) è emerso un diffuso anticipo di germinazione dei semi batterizzati rispetto al controllo ma solo in due casi (CMJ58I e MRX13R) tale incremento si è mantenuto sino al termine della prova. I ceppi ER08W, VT111I e ZEA17I hanno ridotto sensibilmente il numero dei semi germinati, rispettivamente del 34%, 34% e 14%. Le radichette emerse dai semi batterizzati hanno tutte, mediamente, superato in lunghezza quelle del controllo mentre l'opposto è stato rilevato per quanto riguarda la lunghezza dell'ipocotile, in particolare per i ceppi CMJ58I e ER08W. Lo sviluppo di funghi contaminanti sui tegumenti dei semi di valeriana, contenuto nel caso del controllo, è risultato maggiore in almeno tre delle tesi batterizzate (ER08W, MRX13R e VT111I).

L'ultima specie considerata è stata la cipolla (tabella 3). I ceppi di streptomyceti si sono comportati in modo diverso tra loro e in funzione delle due cultivar impiegate. La germinabilità della cv. Eclipse è stata stimolata da tre isolati e ridotta dagli altri tre, con variazioni massime pari al 5%. Lo sviluppo della radice primaria ha subito influenze contrastanti, da una riduzione pari al 46% nel caso della tesi ER08W ad un incremento medio del 69% nel caso della tesi VT111I. La lunghezza della prima foglia emessa non ha subito influenze particolari. Solo nel caso della tesi ER08W è stata riscontrata una riduzione pari al 32% e nella tesi VT111I un maggiore allungamento medio pari al 35%. La cv. Pompei ha evidenziato germinabilità dei semi batterizzati anticipata rispetto al controllo e sensibilmente maggiore, al termine della prova, in quattro ceppi (ER08W, MRX13R, VT111I, ZEA17I) del controllo con un incremento massimo del 32% per i semi trattati con il ceppo MRX13W. Le radici primarie delle plantule di tre tesi (CMJ58I, VT111I e ZEA17I) sono risultate più lunghe di quelle del controllo, con incrementi anche elevati (>70%). Sulle foglie non sono state riscontrate differenze degne di nota nelle tesi trattate, a eccezione di quella batterizzata col ceppo ER08W, che sono risultate mediamente più lunghe del 59%. Lo sviluppo di funghi sui tegumenti è risultato sensibilmente maggiore che nelle altre specie e, mediamente, i controlli hanno evidenziato oltre il 40% di semi contaminati. La batterizzazione in diversi casi ha ridotto sensibilmente tale presenza, come nel caso del ceppo MRX13R sui semi della cv. Eclipse e di MRX13R e ZEA17I, che hanno dimezzato la presenza di contaminanti, e CMJ58I, che la ha annullata, sulla cv. Pompei.

Test di germinazione *in vivo*

Le prove condotte in serra utilizzando semi di pomodoro batterizzati ha evidenziato una sensibile influenza positiva sulla germinabilità da parte dei ceppi CMJ58I e ZEA17I (Tabella 4), passata da un valore medio del 68% al 94% delle tesi trattate, emersa sin dalle prime letture. Lo sviluppo della porzione epigea è risultato analogo in tutte le tesi a confronto.

Per quanto riguarda le due cultivar di cipolla, esse hanno fornito risposte simili, almeno come tendenza (tabella 4). Nel caso della cv. Eclipse, la germinazione in tutte le tesi trattate è risultata anticipata e maggiore rispetto al controllo, con incrementi medi variabili dal 12 al 22%. Le piante delle tesi trattate hanno mostrato uno sviluppo anticipato e una lunghezza delle foglie superiore del 9% rispetto al controllo.

Tabella 3. Effetti della batterizzazione con ceppi di *Streptomyces* spp. sulla germinazione *in vitro* di semi di valeriana, cipolla cv. Eclipse e cv. Pompei e caratteristiche delle plantule

	Giorni	Controllo	CMJ58I	ER08W	MRX13R	VT111I	ZEA17I
Valeriana							
Germinazione (%)	4	18	66	10	44	48	68
	7	82	88	48	88	48	68
Radichetta (mm)	7	3,6 <i>N</i> 41; se 0,25	4,5 <i>N</i> 44; se 0,20	7,9 <i>N</i> 24; se 0,81	7,0 <i>N</i> 44; se 0,58	6,3 <i>N</i> 24; se 0,47	10,1 <i>N</i> 34; se 0,63
Ipocotile (mm)		30,9 <i>N</i> 40; se 1,38	19,5 <i>N</i> 43; se 1,58	19,4 <i>N</i> 24; se 1,78	20,9 <i>N</i> 44; se 1,00	26,2 <i>N</i> 24; se 0,73	27,5 <i>N</i> 34; se 1,37
Cipolla cv Eclipse							
Germinazione (%)	4	14	16	12	10	20	15
	8	40	35	28	44	41	40
	14	46	42	42	50	50	50
Radichetta (mm)	14	10,2 <i>N</i> 23; se 1,44	13,6 <i>N</i> 21; se 1,49	5,5 <i>N</i> 21; se 0,75	4,9 <i>N</i> 25; se 0,27	17,3 <i>N</i> 25; se 1,93	13,8 <i>N</i> 25; se 1,37
Germinello (mm)		42,4 <i>N</i> 17; se 5,5	39,0 <i>N</i> 21; se 3,5	28,7 <i>N</i> 26; se 8,76	36,7 <i>N</i> 22; se 3,78	57,2 <i>N</i> 25; se 0,42	43,7 <i>N</i> 25; se 3,7
Cipolla cv Pompei							
Germinazione (%)	8	20	18	14	12	16	25
	8	56	58	60	78	57	58
	14	48	48	56	80	48	48
Radichetta (mm)	14	14,7 <i>N</i> 24; se 2,16	27,5 <i>N</i> 24; se 2,61	19,1 <i>N</i> 28; se 1,05	5,8 <i>N</i> 40; se 1,05	26,4 <i>N</i> 24; se 2,78	50,4 <i>N</i> 24; se 2,15
Germinello (mm)		43,7 <i>N</i> 24; se 4,31	44,5 <i>N</i> 24; se 2,30	69,7 <i>N</i> 28; se 4,23	39,7 <i>N</i> 40; se 6,28	42,5 <i>N</i> 24; se 2,79	46,6 <i>N</i> 24; se 3,02

Tabella 4. Effetti della batterizzazione con ceppi di *Streptomyces* spp. sulla germinazione in terriccio di semi di pomodoro, cipolla cv Eclipse e cipolla cv Pompei e caratteristiche delle plantule

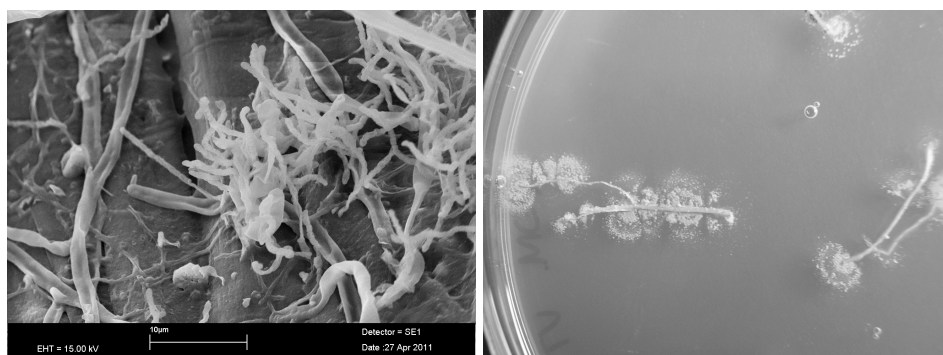
	Giorni	Controllo	CMJ58I	VT11II	ZEAI7I
Pomodoro					
Germinazione (%)	7	62	88	64	82
	14	66	92	72	94
	21	68	94	72	94
Lunghezza stelo (mm)	21	107 <i>N</i> 31; se 5,24	115 <i>N</i> 47; se 3,46	116 <i>N</i> 36; se 4,68	115 <i>N</i> 47; se 4,33
	28	161 <i>N</i> 24; se 6,00	168 <i>N</i> 24; se 5,00	166 <i>N</i> 24; se 5,52	175 <i>N</i> 24; se 3,63
	44	265 <i>N</i> 24; se 12,18	256 <i>N</i> 24; se 14,15	253 <i>N</i> 24; se 12,02	273 <i>N</i> 24; se 10,9
	52	299 <i>N</i> 24; se 16,1	289 <i>N</i> 24; se 14,9	178 <i>N</i> 24; se 14,74	302 <i>N</i> 24; se 12,24
Cipolla cv. Eclipse					
Germinazione (%)	6	48	64	60	64
	9	48	64	60	68
	23	48	66	58	70
Lunghezza foglie (mm)	23	130 <i>N</i> 24; se 7,24	146 <i>N</i> 34; se 5,28	132 <i>N</i> 29; se 4,73	150 <i>N</i> 35; se 5,31
	30	173 <i>N</i> 23; se 7,23	188 <i>N</i> 32; se 3,67	177 <i>N</i> 28; se 3,70	192 <i>N</i> 34; se 5,83
	46	311 <i>N</i> 22; se 11,64	341 <i>N</i> 28; se 11,15	344 <i>N</i> 26; se 10,07	361 <i>N</i> 32; se 5,95
Numero di foglie	23	2	3	2	2
	30	3	3	3	3
	46	4	3	4	4
Cipolla cv. Pompei					
Germinazione (%)	6	64	54	64	78
	9	68	64	74	86
	23	72	78	78	90
Lunghezza foglie (mm)	23	128 <i>N</i> 36; se 4,47	115 <i>N</i> 39; se 6,80	114 <i>N</i> 39; se 5,92	132 <i>N</i> 45; se 5,50
	30	187 <i>N</i> 33; se 6,77	174 <i>N</i> 37; se 6,82	178 <i>N</i> 37; se 6,53	192 <i>N</i> 43; se 6,25
	45	310 <i>N</i> 29; se 8,08	309 <i>N</i> 29; se 9,03	334 <i>N</i> 26; se 7,77	324 <i>N</i> 36; se 10,06
Numero di foglie	23	2	2	2	2
	30	3	3	3	3
	46	3	4	4	4

I semi della cv. Pompei sono stati stimolati dal trattamento, in particolare con il ceppo ZEA17I: la germinazione è passata dal 72% al 90%.

La lunghezza delle foglie delle piante nate da semi trattati è risultato pari o superiore a quelle del controllo, in particolare nelle tesi VT111I e ZEA117I, per la quale tale effetto si è manifestato sin dalle prime misurazioni, effettuate 23 giorni dopo la semina. Le altre tesi hanno, invece, evidenziato un iniziale ritardo nella crescita.

Dai frammenti di radici, prelevati da tutte le tesi in prova e incubati in piastra, si sono sviluppate numerose colonie di attinomiceti e, in percentuali variabili dal 30 al 60, streptomiceti con caratteristiche morfoculturali corrispondenti a quelle dei ceppi impiegati per la concia (figura 1). Questo risultato evidenzia la capacità degli streptomiceti di colonizzare, a partire dai tegumenti seminali, l'apparato radicale in formazione per l'intera lunghezza. La sterilizzazione superficiale prevista dal metodo analitico ha confermato che la colonizzazione interessa non solo la superficie delle giovani radici o la rizosfera, ma si estende agli strati corticali interni. La presenza sulle radici, sia nelle tesi trattate sia in quelle di controllo, di colonie di streptomiceti differenti da quelli impiegati è giustificata dall'uso di terriccio commerciale non sterilizzato e ribadisce la capacità di questi microrganismi di colonizzare competitivamente tale habitat.

Figura 1. Batterizzazione di semi di pomodoro con il ceppo *Streptomyces* sp. CMJ58I: particolare della crescita dell'attinomicete sui tegumenti del seme (sinistra) e sviluppo di colonie del medesimo streptomicete da radici di piante nate da semi batterizzati (destra)



CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questa ricerca, sebbene preliminari, confermano la possibilità che gli attinomiceti, e in particolare gli streptomiceti, possono rappresentare una fonte di promettenti agenti di biocontrollo delle malattie radicali a eziologia fungina.

I ceppi di streptomiceti saggiati non hanno mostrato il medesimo comportamento nei confronti delle piante finora considerate, ma hanno comunque fornito risultati molto interessanti e degni di essere approfonditi quali, ad esempio, l'incremento della germinabilità dei semi, lo sviluppo maggiore e più rapido delle plantule, il contenimento dello sviluppo della micoflora presente sul seme. Nelle fasi successive della ricerca le prove saranno eseguite in pieno campo dopo aver valutato i metodi più adatti per il trattamento dei semi e la distribuzione dei ceppi di attinomiceti nel suolo. Contemporaneamente, saranno condotte ricerche per approfondire le conoscenze sui rapporti tra streptomiceti e apparati radicali con particolare riguardo all'effetto di biocontrollo dei patogeni radicali.

Questa possibilità, infatti, non dipende solamente dalla diffusa ed evidente attività antifungina esplicata da molti di essi, ma anche dalla capacità di agire come PGPR e dalla loro attitudine a colonizzare il terreno, la rizosfera e le radici stesse, caratteristiche che si sono rese evidenti anche in questa indagine.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato cofinanziato da Università degli Studi di Milano, Regione Lombardia e Sipcam S.p.A. nel contesto del programma "Dote Ricerca Applicata".

LAVORI CITATI

- Crawford D.L., Lynch J.M., Whipps J.M., Ousley M.A., 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3899-3905.
- Dimkpa C.O., Svatoš A., Dabrowska P., Schmidt A., Boland W., Kothe E., 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp.. *Chemosphere*, 74, 19-25.
- Doumbou C.L., Hamby Salove M.K., Crawford D.L., Beaulieu C., 2001. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82, 85-102.
- Khamna S., Yokota A., Lumyong S., 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 25, 649-655.
- Knudsen I.M.B., Hockenhull J., Funck Jensen D., Gerhardson B., Hokeberg M., Tahvonen R., Teperi E., Sundheim L., Henriksen B., 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 775-784.
- Lechevalier M.P., 1988. Actinomycetes in agriculture and forestry. In: Actinomycetes in biotechnology (Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski M. coord.), Academic Press New York, 327-358.
- Muller G., Matzanke B.F., Raymond K.N., 1984. Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores, rhodotorulic acid, and enantio-rhodotorulic acid. *Journal of Bacteriology*, 160, 313-318.
- Petrolini B., Quaroni S., Saracchi M., Sardi P., 1996. Studies on the streptomycete population inhabiting plant roots. *Actinomycetes*, 7, 66-78.
- Quaroni S., Saracchi M., 1994. Effetti indotti sulla produttività vegetale dalla batterizzazione dei semi con ceppi di streptomiceti. *Rivista di Agronomia*, 3, 184-190.
- Sardi P., Saracchi M., Quaroni S., Petrolini B., Borgonovi G. E., Merli S., 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2691-2693.
- Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G., 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.G., coord.) Williams & Willkins Baltimore, vol. 4, 2453-2492.