

**CRA**  
CONSIGLIO PER LA RICERCA  
E LA SPERIMENTAZIONE  
IN AGRICOLTURA



# Atti del 9° Convegno AISITEC

**Un mondo di cereali**

**Potenzialità e sfide**

Bergamo 12 - 14 giugno 2013



a cura di

**R. Acquistucci, M. G. D' Egidio, G. Panfili, R. Redaelli**



## Attività antagonistica, *in vitro*, di *Bacillus velezensis* nei confronti di funghi responsabili del "Mal del piede" dei cereali

V. Campanella\*, C. Miceli, V. Angileri, C. Mandalà, A. Aronadio

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di Sperimentazione e Certificazione delle Sementi, Viale Regione Siciliana sud-est 8669 - 90121 Palermo.

\*E-mail: [vito.campanella@entecra.it](mailto:vito.campanella@entecra.it)

### Abstract

One of the most dangerous durum wheat diseases in Southern Italy is foot rot and root rot complex. Soil borne durum wheat pathogens as *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. compactum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *Microdochium nivale*, *Rhizoctonia cerealis* are difficult to control because they are not readily identifiable, and above all, because they survive, for many years, without their hosts, in the soil through durable spores. Environmental pollution due to agrochemicals and food safety had led to demanding alternatives to diseases chemical control. For an environmental friendly control, interesting application prospects are the use of microorganisms. This study was conducted to evaluate the antagonistic activity, *in vitro*, of *Bacillus velezensis* against *B. sorokiniana*, *F. culmorum*, *F. sambucinum* and *R. cerealis*, some of the most dangerous pathogens responsible of foot rot and root rot complex, in Sicily.

### Riassunto

Il "Mal del piede" dei cereali è una delle alterazioni parassitarie più gravi per la coltivazione dei cereali. Numerose sono le specie fungine responsabili di tale malattia, tra queste *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. compactum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *Microdochium nivale*, *Rhizoctonia cerealis*. Il controllo della malattia si basa su pratiche agronomiche, sull'impiego di seme sano e/o conciato con prodotti di provata efficacia e per mezzo di interventi anticrittogamici da eseguire nelle prime fasi di sviluppo della coltura. Nell'ottica di una difesa ecocompatibile, integrata alla normale gestione colturale dei cereali, interessanti prospettive di applicazione suscitano l'impiego di taluni prodotti biologici a base di microrganismi. Il presente contributo riporta i risultati dell'attività, *in vitro*, di *Bacillus velezensis* (IT45), nei confronti di *B. sorokiniana*, *F. culmorum*, *F. sambucinum*, e *R. cerealis*, alcuni tra i più pericolosi patogeni riscontrati frequentemente nei comprensori granoturricoli siciliani e responsabili del "Mal del piede". *B. velezensis* usato per ammendare piastre Petri contenenti un substrato agarizzato sterile, ha significativamente ridotto lo sviluppo di *B. sorokiniana* (99,6%), di *F. culmorum* (80,2%), di *F. sambucinum* (80,5%) e di *R. cerealis* (91,5%) rispetto al testimone. Il microrganismo ha mostrato attività fungistatica verso l'accrescimento vegetativo dei patogeni, bloccando anche lo sviluppo dei conidi subito dopo la loro germinazione.

### Introduzione

Il "Mal del piede" dei cereali è una malattia ad eziologia complessa tra le più gravi per la coltivazione del frumento duro, in Sicilia (Campanella e Miceli, 2009). I funghi responsabili della malattia sono numerosi, tra questi *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoem, *F. acuminatum* (Ellis & Everhart), *F. avenaceum* (Fries) Saccardo, *F. compactum* (Wollenweber) Gordon, *F. crookwellense* (Burgess, Nelson & Toussoun), *F. culmorum* (W.G. Smith) Saccardo, *F.*



*graminearum* (Schwabe), *F. sambucinum* (Fuckel), *M. nivale* (Samuel & Hallet), *R. cerealis* (E. P. van der Hoeven). Nel suolo, le principali fonti di inoculo della malattia sono rappresentate dai residui colturali infetti e dalle strutture di quiescenza dei patogeni, quest'ultime in grado di sopravvivere indisturbate per diversi anni. Il controllo della malattia si basa su pratiche agronomiche come l'adozione di razionali rotazioni colturali, sull'impiego di seme sano e/o conciato e sulla difesa fitosanitaria utilizzando specifici prodotti anticrittogamici nelle prime fasi di sviluppo della coltura. Nell'ottica della salvaguardia dell'ambiente e di un uso razionale e sostenibile degli input energetici, interessanti prospettive di applicazione suscitano l'impiego di taluni prodotti biologici a base di spore di microrganismi antagonisti. Nel presente contributo, il prodotto commerciale Cilus Plus (IT 45 ITHEC), a base di spore di *B. velezensis* è stato saggiato, *in vitro*, per valutarne la capacità di agente di biocontrollo verso *B. sorokiniana*, *F. culmorum*, *F. sambucinum*, e *R. cerealis*, isolati da piante di frumento duro affette da "Mal del piede" (Fig. 1).

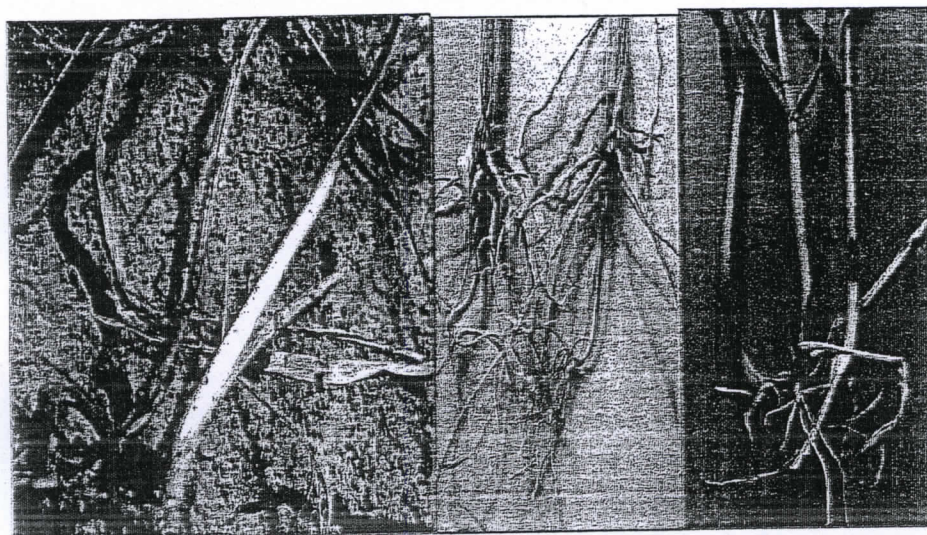


Figura 1. Imbrunimenti parassitari causati da agenti del "Mal del piede" dei cereali; *F. culmorum* e *F. sambucinum* (sinistra), *B. sorokiniana* (centro) *R. cerealis* (destra).

#### Materiali e metodi

Capsule Petri contenenti Potato Dextrose Agar (PDA, 37g/L Oxoid), sono state ammendate con 1 ml di una sospensione di *B. velezensis* ( $1 \times 10^{10}$  CFU/g.) alla concentrazione del 2% (P/V). Le piastre, fatte asciugare sotto cappa, sono state insemiinate con tasselli di 5 mm di  $\phi$ , prelevati dai margini di colonie, di *B. sorokiniana*, *F. culmorum*, *F. sambucinum* e *R. cerealis*, in fase di attiva crescita precedentemente allevate su PDA. Piastre non ammendate con il batterio ed insemiinate con gli isolati in saggio sono state usate come testimoni. Per ogni isolato sono state allestite 5 ripetizioni. Le piastre sono state quindi poste ad incubare in termostato a  $20 \pm 1$  °C con un fotoperiodo di 8 ore sotto luce NUV. L'attività antagonistica di *B. velezensis* è stata valutata misurando lo sviluppo diametrico della colonia, ogni 24 ore per 7 giorni e calcolandone la riduzione percentuale, rispetto al testimone, secondo Skidmore e Dickenson (1976). La prova è stata ripetuta due volte ed i dati analizzati statisticamente mediante l'analisi della varianza e le medie separate con il test di Duncan.



## Risultati e discussione

Il *B. velezensis* alla dose e alle modalità di applicazione utilizzate nella prova ha significativamente ( $p \leq 0,01$ ), ridotto lo sviluppo di tutti i patogeni in saggio, rispetto al testimone. In tabella 1, sono riportati i dati relativi ai rilievi eseguiti a 72 (Fig. 2) e 144 ore. L'attività di inibizione del batterio è stata evidenziata sin dal rilievo iniziale (24 ore) con una riduzione dello sviluppo, rispetto al testimone, del 93,7%, 56,9%, 18,1% e 64,6% rispettivamente per *B. sorokiniana*, *F. culmorum*, *F. sambucinum* e *R. cerealis*. I dati mostrano un'inibizione dello sviluppo delle colonie via via crescente nei rilievi successivi al primo, per quasi tutti i patogeni saggiati, fatta eccezione per *B. sorokiniana*, i cui i valori sono stati sempre costantemente elevati sin dal primo rilievo. Inoltre, proprio per *B. sorokiniana* è stata osservata la maggiore riduzione di sviluppo (99,6%), nel rilievo a 144 ore. Il batterio, inoltre, usato in presenza dei soli conidi di *F. culmorum* e di *F. sambucinum* ne ha bloccato lo sviluppo subito dopo la loro germinazione. I nostri dati evidenziano un'attività fungistatica del batterio nei confronti dei patogeni in saggio in tutti i rilievi. Le indicazioni bibliografiche relative all'attività, *in vitro*, di *B. velezensis* confermano quanto da noi osservato circa la capacità del batterio di inibire lo sviluppo di funghi patogeni ad *habitus* tellurico (Kim *et al.*, 2008). Inoltre, evidenziano anche una interessante attività di controllo, in campo, di talune affezioni parassitarie come la fusariosi della fragola (Nam *et al.*, 2009). Le problematiche di natura ambientale, igienico sanitario e legislative stanno accrescendo l'interesse verso metodi alternativi di controllo delle malattie delle piante più sicuri per la salute dell'uomo, degli animali e dell'ambiente. Negli ultimi anni crescente è stato l'interesse del mondo della ricerca in merito all'uso di sostanze di origine naturale e di microrganismi per controllare malattie causate da funghi patogeni ad *habitus* tellurico. Tra le prime il chitosano, che saggiato con la stessa metodica impiegata per *B. velezensis* contro *B. sorokiniana*, *F. avenaceum* e *F. sambucinum* (Campanella, dati non pubblicati), ha mostrato risultati analoghi a quelli rilevati nelle nostre prove con il batterio, risultando efficace anche nel controllare un patogeno chiave per la coltivazione degli agrumi (Campanella *et al.*, 2004). Nell'ambito dei microrganismi, interessanti prospettive hanno evidenziato *Streptomyces griseoviridis* per il controllo della fusariosi della lenticchia da *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (Campanella e Miceli, 2009), *Pseudomonas chlororaphis* per il controllo di *Drechslera graminea*, *D. teres*, *D. avenae*, *Ustilago avenae*, *U. hordei* e *Tilletia caries* (Johnsson *et al.*, 1998; Linser *et al.*, 2006), *Pantoea agglomerans* per il controllo di *F. culmorum* (Johansson *et al.*, 2003). I risultati rilevati nei saggi, *in vitro*, suggeriscono di candidare *B. velezensis* come potenziale agente di controllo per alcuni tra i principali agenti patogeni responsabili della sindrome del "Mal del piede". Ulteriori indagini sono in corso, sia per valutare l'attività antagonistica di *B. velezensis* su isolati di *B. sorokiniana*, *F. culmorum*, *F. sambucinum* e *R. cerealis* provenienti da diverse aree cerealicole, sia per definire le possibilità di applicazioni per il controllo in campo della malattia.

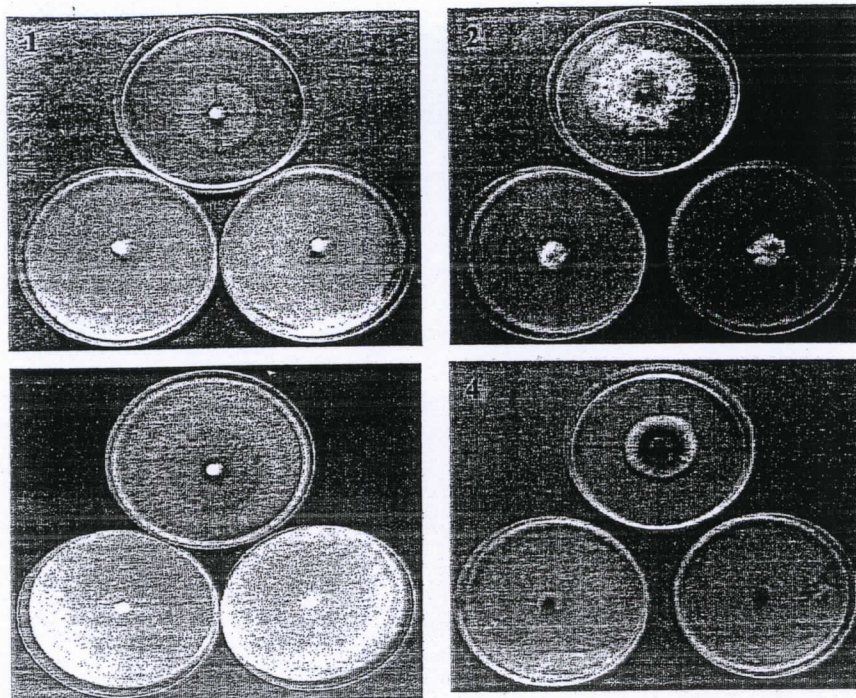


Figura 2. Sviluppo di *F. culmorum* (1), *F. sambucinum* (2), *R. cerealis* (3) e *B. sorokiniana* (4), su PDA ammendato con *B. velezensis* rispetto al testimone (in alto) dopo 72 ore di incubazione.

Tabella 1. Effetto di *B. velezensis* su alcuni funghi responsabili del "Mal del piede", valutato come percentuale di riduzione di sviluppo.

Patogeni	Riduzione sviluppo (%)	
	72 h	144 h
<i>B. sorokiniana</i>	99,1	99,6
<i>F. culmorum</i>	56,8	80,2
<i>F. sambucinum</i>	66,4	80,5
<i>R. cerealis</i>	91,2	91,5



## Bibliografia

- Campanella V., Schena L., Nigro F., Ippolito A. 2004. Effect of chitosan on citrus root rot due to *Phytophthora nicotianae*. 10<sup>th</sup> International Citrus Congress 20-25 febbraio 2004, Agadir, Marocco, pp. 738-743.
- Campanella V., Miceli C. 2009. Durum wheat root and foot rot complex in Sicily. Atti del XV Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia Vegetale 28 Settembre-1 ottobre 2009, Locorotondo, Bari, pp. 84.
- Campanella V., Miceli C. 2009. Preliminary results of biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* wilt of lentil landrace "Ustica". Atti del XV Congresso Nazionale della Società Italiana di Patologia Vegetale 28 Settembre-1 ottobre 2009, Locorotondo, Bari, pp. 188.
- Johnsson L., Hokeberg M., Gerhardson B. 1998. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA 342 against cereal seed borne diseases in field experiments. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 701-711.
- Johansson P.M., Johnsson L., Gerhardson B. 2003. Suppression of wheat seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. *Plant Pathology*, 52: 219-227.
- Kim W.G., Weon H.Y., Lee S.Y. 2008. In vitro antagonistic effects of *Bacillus* isolates against four soilborne plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Pathology*, 24: 52-57.
- Kropp B.R., Thomas E., Pounder J.I., Anderson A. J. 1996. Increased emergence of spring wheat after inoculation with *Pseudomonas chlororaphis* isolate 2E3 under field and laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 23: 200-206.
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Ltd, 1: 388.
- Linser A., Cazzara L., Barbieri G. 2006. Cedemon (*Pseudomonas chlororaphis* MA342) il primo conciante a base naturale per frumento duro, tenero ed orzo. *Atti Giornate Fitopatologiche*, II: 27-34.
- Nam M.H., Park M.S., Kim H.G., Yoo S.J. 2009. Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 420-524.
- Skidmore A.M., Dickinson C.M. 1976. Colony interactions and hyphal interferences between *Septoria nodorum* and *Phylloplane fungii*. *Transaction of the British Mycological Society*, 66: 57-64.





**ISBN: 978-88-906680-1-2**