



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

RELAZIONE TECNICA DELLE ATTIVITÀ ATTUATE ED ANCORA IN CORSO

PROGETTO DI RICERCA

**Sviluppo di protocolli colturali per la produzione
di zafferano volti al miglioramento dello stato
fisiologico delle piante e alla salvaguardia della
coltura contro il fungo patogeno *Fusarium
oxysporum***

Ai sensi della Legge Regionale 53/1997

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

Proposta progettuale: Sviluppo di protocolli colturali per la produzione di zafferano volti al miglioramento dello stato fisiologico delle piante e alla salvaguardia della coltura contro il fungo patogeno *Fusarium oxysporum*.

Acronimo progetto: PRO.ZAFF

Proponente: Laboratorio di Microbiologia Agroambientale – Università degli studi dell'Aquila

Responsabili scientifici: Maddalena Del Gallo, Marika Pellegrini

SINTESI DEL PROGETTO

Nell'ambito della prima annualità della proposta progettuale "Sviluppo di protocolli colturali per la produzione di zafferano volti al miglioramento dello stato fisiologico delle piante e alla salvaguardia della coltura contro il fungo patogeno *Fusarium oxysporum*" le sperimentazioni svolte dal laboratorio di Microbiologia Agroambientale dell'Università degli Studi dell'Aquila hanno avuto come obiettivo lo sviluppo di protocolli colturali per la produzione di zafferano (*Crocus sativus* L.) attraverso l'applicazione di PGPB utili alla promozione della crescita delle piante e al biocontrollo di ceppi fungini patogeni appartenenti alla specie *Fusarium oxysporum*.

Le attività, in particolare, hanno riguardato:

- Il campionamento di cormi di zafferano e suolo rizosferico da aziende aquilane con problemi di fusariosi più o meno diffuse;
- L'isolamento e purificazione di ceppi patogeni autoctoni di *Fusarium oxysporum* dai campioni di cormi e di suolo;
- La caratterizzazione della capacità di biocontrollo di alcuni **PGPB antagonisti**, appartenenti alla ceppoteca del laboratorio di microbiologia agroambientale dell'Università degli Studi dell'Aquila (LMA-UNIVAQ), contro gli isolati autoctoni di *Fusarium oxysporum*;
- L'applicazione di **PGPB biostimolanti**, provenienti dalla ceppoteca del laboratorio di microbiologia agroambientale dell'Università degli Studi dell'Aquila (LMA-UNIVAQ), in coltivazioni in serra e in campo per il miglioramento dello stato fisiologico dei suoli.
- Elaborazione risultati e pianificazione ricerca annualità successive.

Nelle successive sezioni verranno presentati i materiali e metodi applicati per ciascuna attività, i risultati e le prassi agricole sviluppate.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

ATTIVITÀ 1.1 – Campionamento di cormi di zafferano e suolo rizosferico da aziende aquilane con problemi di fusariosi più o meno diffuse;

I campionamenti dei cormi di zafferano e di suolo rizosferico sono stati effettuati nel periodo Febbraio-Marzo 2021, tre diversi campi di coltivazione dello Zafferano dell'Aquila DOP, in località S. Pio delle Camere (L'Aquila, AQ), in particolare:

- Campo 1, sito in “Via Agnelli”;
- Campo 2, sito in località “Caporciano”;
- Campo 3, sito in località “Renare”.

Per ogni campo, sono stati prelevati:

- campioni di suolo;
- campioni di cormi con visibili segni di avvizzimento da *Fusarium oxysporum*, come ingiallimento del colletto e delle foglie, imbrunimento e marciume del corno (Figure 1.1-1, 1.1-2, 1.1-3).



A)



B)

Figura 1.1-1. Campione di suolo (A) e corno con segni di fusariosi (B) nel Campo 1



A)



B)

Figura 1.1-2. Campione di suolo (A) e corno con segni di fusariosi (B) nel Campo 2

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*



A) B)
Figura 1.1-3. Campione di suolo (A) e corno con segni di fusariosi (B) nel Campo 3.

I campioni di suolo e piante sono stati prelevati e trasportati all'interno di buste da campionamento sterili. Il prelievo dei campioni di suolo è stato effettuato con l'ausilio di un trapiantatore da giardinaggio, rimuovendo la terra e i detriti dello strato superficiale ed arrivando alla profondità di 15-20 cm di suolo. I campioni di cormi e suolo sono suddivisi in due gruppi, un primo gruppo è stato processato il giorno stesso del campionamento mentre un secondo gruppo è stato conservato a -20°C (campione utile per eventuali successive analisi).

Dai diversi campionamenti effettuati è stato possibile notare come l'areale di patogenesi è più intenso e nei campi in cui è presente una meccanizzazione delle lavorazioni di scavatura e messa a dimora. Le piante presenti sul campo 2 e 3 con meccanizzazione completa delle operazioni di scavatura e messa a dimora presentavano una fusariosi molto evidente e estesa in tutto il campo e cormi in marcescenza (stadio avanzato della patogenesi). Il campo 1, invece, gestito con raccolta e messa a dimora manuale presentava una fusariosi a macchia di leopardo, meno estesa e piante con segni di patogenesi ridotta.

Tabella 1.1-1 – Risultati attesi e risultati ottenuti dall'attività sperimentale 1.1.

Risultato atteso	Risultato ottenuto
Campioni da almeno 3 campi colpiti da fusariosi più o meno pregressa.	Sono stati prelevati diversi campioni da 3 campi siti nel comune di San Pio delle Camere, zona duramente colpita da fusariosi con areali di patogenesi più o meno pregressi.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

ATTIVITÀ 1.2 – Isolamento e purificazione di ceppi patogeni autoctoni di *Fusarium oxysporum* dai campioni di cormi e di suolo

1.2.1 Isolamento e purificazione dei ceppi patogeni

Per poter ottenere l'isolamento di un microrganismo da un campione ambientale in laboratorio la fase successiva al campionamento è quella relativa alla formazione di un inoculo rappresentativo della comunità microbica che contenga il numero di cellule adeguato alla crescita in piastra con terreno di coltura sintetico. La preparazione dell'inoculo viene effettuata attraverso un processo di estrazione della componente microbiologica dalla matrice ambientale mediante l'omogeneizzazione del campione in soluzioni appropriate che permettano il mantenimento della vitalità cellulare. L'estrazione della componente microbica è stata effettuata omogeneizzando il campione di corno/soilo in soluzione fisiologica (9 g/L di NaCl in acqua distillata) per 1 ora (rapporto matrice/soluzione 1:10). Per migliorare il passaggio della componente microbica nella soluzione è stato utilizzato un tensioattivo non ionico, il *Tween 20* per facilitare l'emulsione e l'entrata in soluzione della componente microbica. L'omogeneizzazione dal suolo è stata ottenuta mediante agitazione magnetica per 1 h, utilizzando beute sterili contenenti il campione in soluzione e un magnete (Figura 1.2.1 A). L'omogeneizzazione dai cormi è stata ottenuta mediante BagMixer per 1 h alla massima velocità, utilizzando buste sterili contenenti il campione in soluzione (Figura 1.2.1 B).

Dalla soluzione tal quale (10^{-1}) ottenuta dall'omogeneizzazione, si è proceduto a effettuare le diluizioni seriali per ciascun campione (10^{-2} e 10^{-3}). Le soluzioni delle diverse soluzioni seriali (100 μ L) sono state seminate su terreno solido SFA (*Selective Fusarium Agar*) in condizioni di sterilità. L'SFA è un terreno selettivo per il genere *Fusarium*, la cui composizione è riportata di seguito:

- Destrosio 20 g/L
- KH_2PO_4 0.5 g/L
- NaNO_3 2 g/L
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L
- Yeast extract 1 g/L
- 1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (soluzione) 1 ml/L

Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente (25°C) per due giorni, al fine di disidratare l'inoculo ed arginare probabili contaminazioni batteriche, e poi incubate a 30°C per 5 giorni.

Passato il tempo di incubazione, dalle piastre iniziali sono stati isolati i funghi andando a prelevare le porzioni del micelio in crescita e trasferendolo su nuovo terreno SFA e su PDA (*Potato Dextrose Agar* – prodotto in polvere acquistato da Merk Millipore, USA). Mediante trasferimenti consecutivi su nuovi terreni, osservazioni al microscopio e instaurazione di colture pure, si è ottenuta la purificazione di diversi ceppi di *Fusarium oxysporum*.

Dai diversi isolamenti è stato possibile evidenziare come oltre alla presenza del *Fusarium oxysporum* i cormi e il suolo dei campi 2 e 3, con scavatura e messa a dimora meccanica, fossero più associati alla presenza di una carica fungina patogena maggiore rispetto a quella del campo 1, gestito invece con scavatura e messa a dimora manuale.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax +39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

1.2.2 Riconoscimento e classificazione tassonomica dei ceppi isolati

I ceppi di *Fusarium oxysporum* isolati sono stati caratterizzati attraverso osservazione morfologica, analisi molecolare e test di patogenicità. La specie del fungo è stata riconosciuta inizialmente mediante studio della colorazione delle ife fungine sviluppate in piastra e di diverse caratteristiche microscopiche (microconidi e macroconidi). Il micelio del *Fusarium oxysporum*, infatti, è caratterizzato da ife rosa-violacee, con conidi che si raggruppano in false teste e macroconidi a falce. La concomitante presenza di queste caratteristiche permette di classificare i ceppi isolati in questa specie. Sono stati tenuti in considerazione i principali caratteri morfologici riferiti a *Fusarium oxysporum* su PDA, come:

- floccosità e colorazione rosa-violacea del micelio;
- forma affusolata e ricurva, simile ad una falce, dei macroconidi tipicamente trisetati;
- presenza di corte monofialidi sulle cellule conidiogene.

Per la conferma della specie sono state inoltre effettuate le analisi molecolari: le ife fungine cresciute su terreno colturale PDA solido sono state utilizzate per il sequenziamento e l'analisi delle regioni ITS del rDNA. Il micelio (circa 0,15 g) è stato posto in una provetta Eppendorf da 200 µL contenente:

- Sieroalbumina bovina (20 mg µL⁻¹) - 2 µL
- Taq polimerasi (5U µL⁻¹) - 1.5 µL
- Buffer (10X) - 5 µL
- dNTP (10 mM) - 1 µL
- MgCl₂ (50 Mm) - 4 µL
- Primer forward ITS1F - 2 µL
- Primer reverse ITS4 - 2 µL
- H₂O - 32.5 µL.

In tutte le reazioni di PCR è stato inserito un controllo negativo contenente acqua al posto del DNA.

Le reazioni di PCR sono state effettuate in un termociclatore Life Eco della Bioer Technology con il seguente programma: 1 ciclo da 8 min a 95 °C e 30 s a 94°, 30 cicli della durata di 30 s a 55 °C e 45 s a 728 °C e 1 ciclo da 7 min a 72°C e ristabilimento e mantenimento finale a una temperatura di 7°C.

Gli ampliconi sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1.5%, dopo colorazione con GelRed™ in tampone Tris-acetato-EDTA (TAE); dopo corsa elettroforetica il gel è stato osservato attraverso transilluminatore-UV.

Il sequenziamento è stato effettuato dall'azienda Microsynth AG (Switzerland), partendo dalla soluzione di ampliconi ottenuta mediante PCR. Le sequenze ITS sono state confrontate con quelle disponibili nella banca dati genetica NCBI (National Center for Biotechnology Information); utilizzando l'algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

I test di patogenicità, svolti dopo aver avuto conferma che i tre ceppi appartenessero alla specie *Fusarium oxysporum*, sono stati effettuati per valutare le diverse *formae speciales* (ff. spp.) a cui i cormi dello zafferano (*Crocus sativus*) risultano più suscettibili. Alcune di esse, infatti sono morfologicamente simili ma possono essere differenziate sulla base della loro specificità di patogenesi. In particolare, *F. oxysporum* f. sp. *saffrani* sembra essere specifico per lo zafferano a

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**

differenza di *F. oxysporum* ff.ssp. *croci* e *iridiacearum*, che possono attaccare rispettivamente diverse specie del genere *Crocus* e, più in generale, diversi generi della famiglia delle Iridiaceae (Palmero et al., 2014). Il saggio è stato svolto utilizzando sospensioni di spore dei tre diversi isolati fungini su cormi di zafferano, su cormi di crochi ornamentali (*Crocus vernus*) e crochi di narciso (*Narcissus* sp.). Per ogni specie è stata inoltre predisposto un controllo, messo in coltura con la stessa metodologia ma senza l'infezione fungina. I cormi son stati lasciare crescere per alcune settimane e durante lo sviluppo della pianta è stata valutata l'insorgenza della patogenesi attraverso l'osservazione di avvizzimento delle piante e marciume delle radici. Il ceppo *F. oxysporum* f. sp. *saffrani* è stato riconosciuto in quanto capace di attaccare ed indurre patogenesi solo sui cormi di zafferano e non sui cormi ornamentali e di narciso.

È stato possibile isolare tre ceppi di *F. oxysporum* (FIS51, FIS52, FIS53) dalla piastra contenente inoculo della soluzione tal quale (10^{-1}) del campione di suolo del Campo 1, denominata FIS5 (figura 1.2-1).

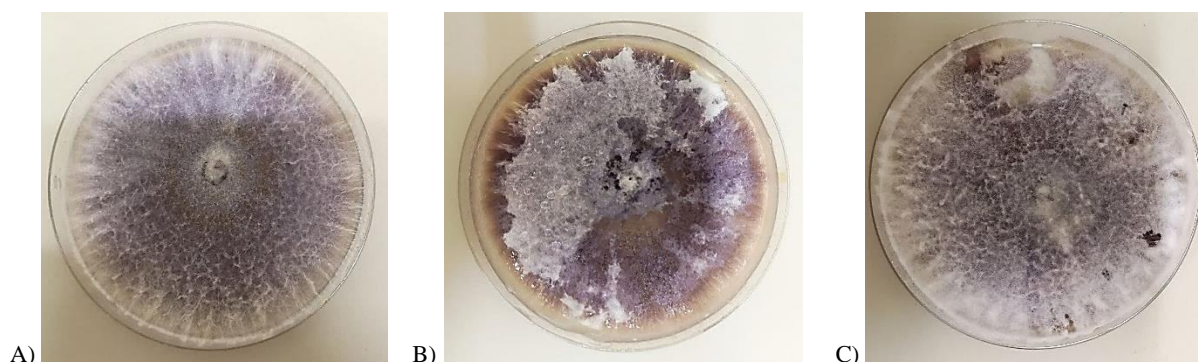


Figura 1.2-1. I tre diversi isolati di *Fusarium oxysporum*: FIS51 (A), FIS52 (B), FIS53 (C).

I test di patogenicità hanno permesso di evidenziare alta selettività nei confronti dei cormi di zafferano (*Crocus sativus*) dell'isolato FIS5C e ciò ha permesso di designare per questo ceppo di *F. oxysporum* la *forma specialis saffrani*; mentre gli altri cormi di *Crocus vernus* e *Narcissus* sp. non hanno mostrato alcun segno di sofferenza, avvizzimento o marciume della radice, confermando la selettività della *forma specialis* individuata per lo zafferano.

Tabella 1.2-1 – Risultati attesi e risultati ottenuti dall'attività sperimentale 1.2.

Risultato atteso	Risultato ottenuto
Isolamento e purificazione di almeno 2 ceppi patogeni appartenenti alla specie <i>Fusarium oxysporum</i> .	Sono stati ottenuti 3 ceppi appartenenti alla specie <i>Fusarium oxysporum</i> . Il test di patogenesi (da ripetere anche su altre specie vegetali per confermare il risultato) ha confermato che 1 dei 3 isolati è appartenente alla <i>forma specialis saffrani</i> .

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

ATTIVITÀ 1.3 – Caratterizzazione della capacità di biocontrollo di alcuni PGPB antagonisti, appartenenti alla ceppoteca del laboratorio di microbiologia agroambientale dell'Università degli Studi dell'Aquila (LMA-UNIVAQ), contro gli isolati autoctoni di *Fusarium oxysporum*

Per valutare la potenziale attività di biocontrollo da parte di alcuni batteri benefici, nello specifico PGPB e PGPA (*Plant-Growth Promoting Bacteria* e *Plant-Growth Promoting Actinobacteria*), si è proceduto con un test di antagonismo *in vitro*, utilizzando, per un primo *screening*, la tecnica colturale dello striscio incrociato (*Cross streak method*) e, in seguito, quella della co-cultura in piastra (*Dual culture method*) e dell'*Agar plug test*.

Il primo metodo ha permesso di testare in maniera efficiente e rapida più ceppi di batteri ed attinomiceti selezionati per la prova. In particolare, sono stati testati:

- i batteri *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia ambifaria*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Bacillus pumilus*;
- ceppi di attinomiceti isolati dal deserto del Sahara (R1, R2, WB1, WB2, BR1, BR2, BR3, BL1, WG3, WG4, WG5, WG6, INB1, INB2, INB3, INB4, WC1, WC2, WG1, WG2);
- ceppi di attinomiceti isolati in ambiente ipogeo (BC2, BC2_1, BC2_2, BC6, BC6AII, BC9)

Il metodo prevede di strisciare il ceppo fungino al centro e su tutta la lunghezza della piastra Petri con terreni miscelati, per ottimizzare la crescita dei ceppi utilizzati, in particolare:

- piastre contenenti terreni PDA/ISP2 che verranno utilizzate per il test con gli attinomiceti
- piastre contenenti terreni PDA/NA utilizzate, invece, per gli strisci dei batteri.

Le piastre con il solo striscio fungino vengono incubate a 28-30°C per 2/3 giorni per permetterne la crescita fino a un massimo di 2 cm di diametro.

Dopo il tempo previsto, nelle piastre vengono strisciati i ceppi da testare, effettuando 3 strisci consecutivi per ciascun ceppo con una rotazione di 90° rispetto a quello del fungo, come mostrato in figura 1.3-1.

Per i batteri le piastre PDA/NA vengono incubate nuovamente a 37°C per 24 ore; mentre per gli attinomiceti le piastre PDA/ISP2 vengono incubate a 28°C per 5/7 giorni.

In questo caso, come detto in precedenza, si è voluto valutare quali ceppi di quelli selezionati in principio potessero avere delle potenzialità di inibizione dei ceppi di *F. oxysporum* isolati, senza calcolare la percentuale d'inibizione che invece è stata calcolata nelle metodologie seguenti.

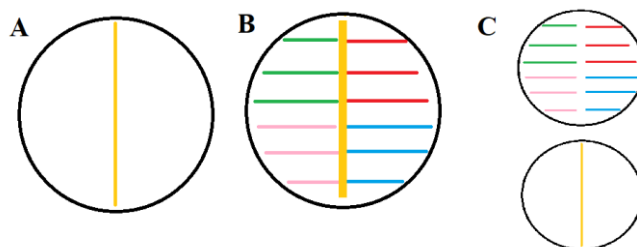


Figura 1.3-1. Metodo di co-coltivazione PGPB-fungo secondo il Cross Streak method

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

I ceppi che hanno mostrato capacità di biocontrollo contro i ceppi di *F. oxysporum* isolati sono stati testati per valutare la percentuale d'inibizione contro il fungo attraverso la co-coltura in piastra e l'*agar plug test*.

Nello specifico, il metodo della co-coltura in piastra è stato utilizzato per i ceppi batterici selezionati, mentre l'*agar plug test* per i ceppi di attinomiceti anch'essi selezionati dal primo test effettuato.

Il metodo della co-coltura in piastra (Sharma et al., 2018) è stato realizzato come segue:

- Messa in coltura del micelio su terreno colturale PDA e incubazione a 28°C per 7 giorni;
- preparazione di brodi di coltura dei singoli ceppi batterici;
- i ceppi batterici, al raggiungimento della fase esponenziale (24 h), sono stati prelevati e strisciati ai lati delle piastre Petri contenenti terreno colturale PDA/NA e incubati a 28°C per 24 ore (figura 6);
- Sul micelio, trascorso il tempo necessario per la crescita, sono state effettuate sezioni circolari di 5mm, chiamate *plug*, e ottenute mediante puntali sterili; le sezioni sono state posizionate al centro di piastre contenenti il terreno PDA per poi essere di nuovo incubate a 24°C (figura 6);
- La deposizione del micelio viene effettuata su piastre di PDA/NA con assenza di batteri (controllo) e con presenza di batteri (co-coltura).

Ogni prova è stata allestita in triplo.

L'*agar plug test*, invece, utilizzato per i ceppi di attinomiceti selezionati, ha previsto:

- Messa in coltura dell'attinomicete su terreno colturale ISP2 e incubazione a 28°C per 7 giorni;
- Realizzazione di sezioni circolari di 5mm (ottenute mediante puntali sterili) sulla colonia cresciuta e posizionamento al margine di una piastra PDA/ISP2 essere di nuovo incubate a 28°C per 3/5 giorni;
- Realizzazione sezioni circolari di 5mm (ottenute mediante puntali sterili) e le sezioni sono state posizionate al centro di piastre contenenti il terreno PDA/ISP2 per poi essere di nuovo incubate a 28°C;
- La deposizione del micelio viene effettuata su piastre di PDA/ISP2 con assenza di attinomiceti (controllo) e con presenza di attinomiceti.
- La prova è stata allestita in modo tale da testare in una singola piastra tre differenti ceppi di attinomiceti, le sezioni dei quali sono state posizionate ai margini della piastra ruotando, dalla prima posizione, la piastra di circa 60° (figura 1.3-2).

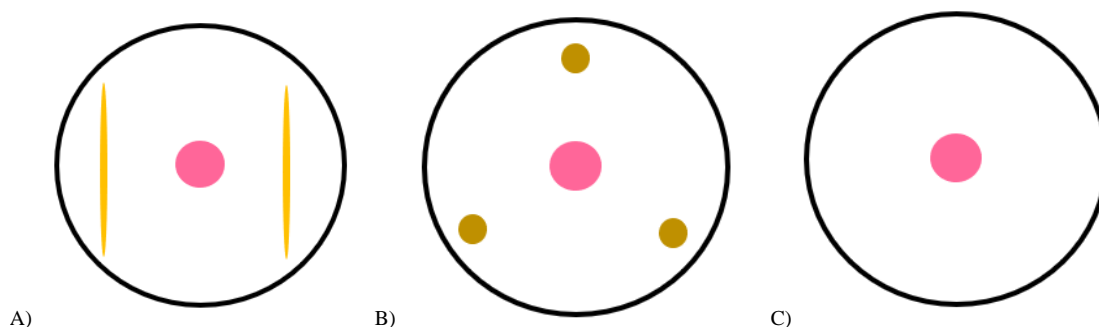


Figura 1.3-2. Immagine piastra del metodo della co-coltura in piastra (A), dell'*agar plug test* (B) e del controllo (C)

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

In entrambi i test è stata valutata la percentuale d'inibizione di crescita del micelio dei ceppi del fungo patogeno, comparandola alla crescita dello stesso in presenza del microrganismo di controllo, seguendo la seguente formula:

$$\%inibizione = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Dove C = crescita del micelio nella piastra di controllo (diametro), T = crescita del micelio nella piastra con presenza di batteri o attinomiceti. I diametri sono stati registrati ogni 24 ore fino alla copertura completa della piastra di controllo da parte del micelio.

Tutti i risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente mediante l'uso del programma XLSTAT 2016 (Addinsoft, Francia).

Il primo *screening* effettuato attraverso il *Cross Streak method*, ha permesso di selezionare i ceppi con potenzialità nel biocontrollo del *F. oxysporum*.

In particolare:

- *Bacillus pumilus*
- i seguenti 7 ceppi di attinomiceti: BC6, BC6 AII, WB1, WB2, WG5, WG6

Il controllo da parte dei suddetti ceppi è stato visibile già macroscopicamente sia con un'evidente inibizione della crescita miceliare sulla superficie della piastra sia con formazione di ife aeree in prossimità della zona d'inibizione (figura 1.3-3).

Visualizzando la zona d'inibizione allo stereo microscopio è stato possibile osservare due fenomeni coinvolti nell'inibizione della crescita miceliare: la disgregazione ifale e la vacuolizzazione delle cellule fungine (figura 1.3-4).

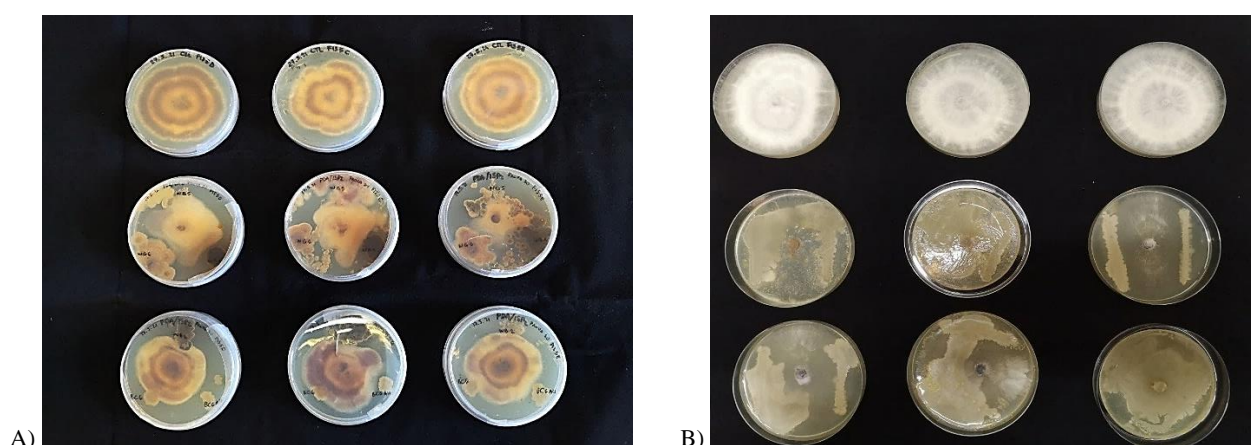


Figura 1.3-3. Inibizione *in vitro* degli attinomiceti (A) e di *Bacillus pumilus* (B). Si noti la differenza della crescita miceliare rispetto alle piastre di controllo dei singoli isolati fungini nella prima riga.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

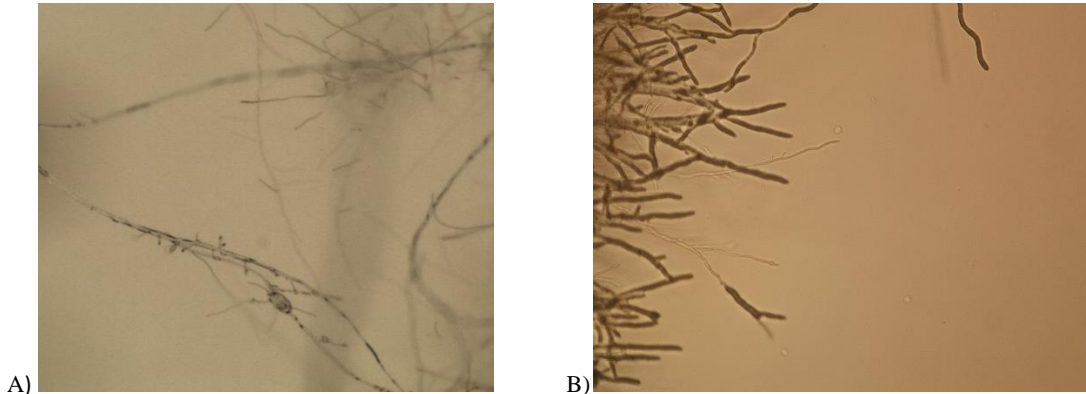


Figura 1.3-4. Dettaglio di fenomeno di vacuolizzazione (A) e disgregazione ifale (B) nella zona d'inibizione.

I risultati delle percentuali d'inibizione vengono mostrati nei *barplot* presentati nelle figure 1.3-5, 1.3-6 e 1.3-7, dove vengono mostrati i risultati statisticamente significativi (p -value < 0.05). I ceppi che mostrano maggior percentuale di inibizione sono: BC6, WB2, WG5, WG6 e *Bacillus pumilus*. Tra questi, il ceppo WG6 ha mostrato una %inibizione maggiore del 35% contro tutti i 3 ceppi di *Fusarium oxysporum* e con risultati più alti e statisticamente significativi rispetto agli altri ceppi.

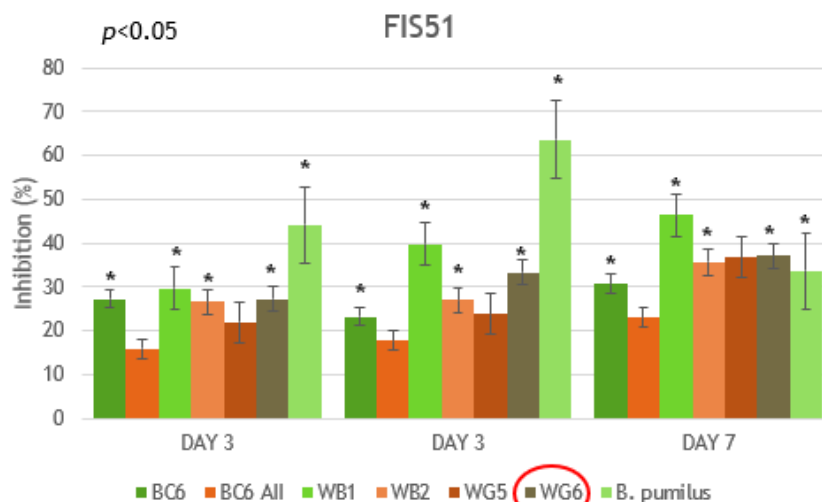


Figura 1.3-5. Percentuale (%) dell'inibizione di crescita del ceppo FIS51 da parte dei cinque ceppi batterici selezionati

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

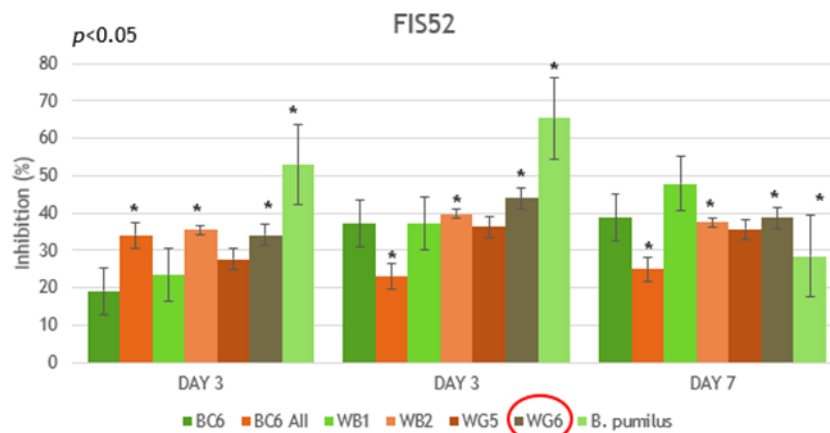


Figura 1.3-6. Percentuale (%) dell'inibizione di crescita del ceppo FIS52 da parte dei cinque ceppi batterici selezionati.

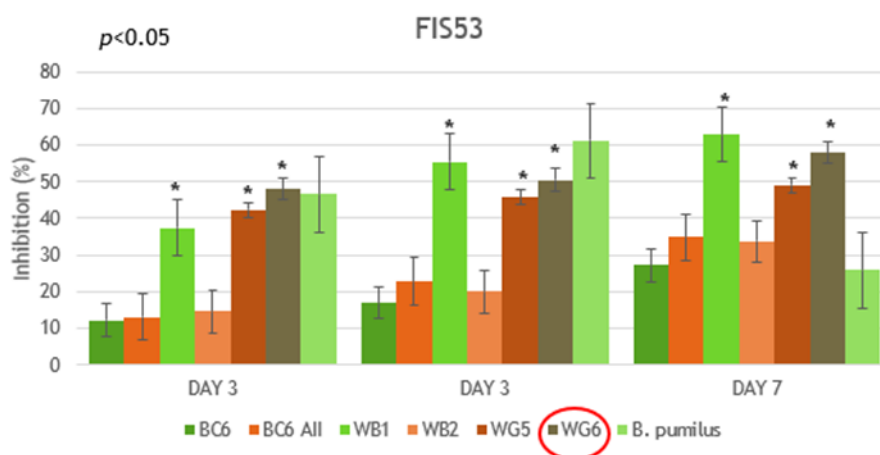


Figura 1.3-7. Percentuale (%) dell'inibizione di crescita del ceppo FIS53 da parte dei cinque ceppi batterici selezionati

Tabella 1.3-1 – Risultati attesi e risultati ottenuti dall'attività sperimentale 1.3.

Risultato atteso	Risultato ottenuto
Selezione di almeno 2 PGPB con tratti di biocontrollo.	Sono stati selezionati 4 ceppi PBPG con tratti di biocontrollo che potranno essere applicati sui cormi di zafferano per testarne l'efficacia in condizioni naturali.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

ATTIVITÀ 1.4 – Applicazione di PGPB biostimolanti, provenienti dalla ceppoteca del laboratorio di microbiologia agroambientale dell'Università degli Studi dell'Aquila (LMA-UNIVAQ), in coltivazioni in serra e in campo per il miglioramento dello stato fisiologico dei suoli.

1.4.1 Ceppi PGPB

Le sperimentazioni relative al miglioramento dello stato fisiologico delle hanno riguardato l'utilizzo dei ceppi batterici:

- *Azospirillum brasilense*
- *Burkholderia cepacia*
- *Gluconacetobacter diazotrophicus*
- *Herbaspirillum seropedicae*

I suddetti ceppi sono presenti nella ceppoteca del laboratorio di Microbiologia Agroambientale della Prof.ssa Del Gallo – Università degli studi dell'Aquila e sono stati utilizzati in consorzio in diverse sperimentazioni. Quest'ultime hanno evidenziato un'ampia capacità di applicazione del consorzio su diverse specie vegetali, quali carota, cipolla, sorgo, grano, grani antichi, canapa industriale, pomodoro e patate, nelle quali è stata riscontrato un miglioramento dei parametri fisiologici rispetto alla condizione colturale di controllo, gestita con tecniche colturali standard convenzionali e biologiche. I 4 ceppi sono stati messi in coltura liquida utilizzando il terreno colturale T4 (Botta et al., 2013), e una volta ottenuti i brodi di coltura dei singoli ceppi è stato preparato un consorzio di lavoro con una densità cellulare pari a 10^8 UFC/mL, che è stato poi successivamente impiegato come soluzione di ammollo per i cormi. Il contatto in ammollo dei cormi con la soluzione batterica è stato mantenuto per 18 ore e prima di essere messi a dimora nuovamente in vaso o in campo i cormi sono stati lasciati ad asciugare ad una temperatura costante di 20°C per ulteriori 18 ore. Nella Figura 1.4-1 sono stati riportati i passaggi della procedura effettuata.



Cormi prima del
trattamento con PGPB



Cormi durante
trattamento con PGPB



Cormi dopo trattamento
con PGPB

Figura 1.4-1. Passaggi della procedura di inoculo dei cormi di zafferano.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

1.4.2 Coltivazioni in serra e in campo

I cormi trattati e non trattati con il consorzio PGPB sono stati trasferiti presso le aziende con coltivazioni in serra e in campo coinvolte nella sperimentazione e localizzate rispettivamente a Celano (Fucino) e a L'Aquila (Zona Mausonia). La sperimentazione in serra è stata effettuata su 150 cormi, 75 cormi trattati con PGPB e 75 cormi di controllo. I cormi sono stati messi a dimora singolarmente in vasi da 5L preparati con una base di argilla espansa e riempiti con terreno da semina commerciale misto ad agriperlite. I cormi sono stati lasciati crescere in condizioni di luce e temperatura naturali in serra (valori medi: temperatura 18-20°C, umidità 50%). Sono stati allestiti 4 blocchi sperimentali, posizionando all'interno di essi in posizione casuale i vasi di controllo e trattato per eliminare eventuali variabili di posizionamento nella serra. Nella figura 1.4-2 sono riportate le operazioni eseguite per la messa a dimora in vaso per la coltivazione in serra.



Preparazione terreno e allestimento vasi

Posizionamento vasi in serra

Figura 1.4-2. Passaggi della procedura di messa a dimora dei cormi di zafferano in vaso.

La sperimentazione in campo, invece, è stata effettuata su 250 cormi trattati con PGPB. In questo caso, il controllo era rappresentato dal resto del campo, ad esclusione dei filari limitrofi a quelli in cui erano stati messi a dimora i cormi trattati con i PGPB. I cormi sono stati messi a dimora seguendo la procedura tradizionale, andando a posizionare i cormi in solchi con profondità di circa 30 cm e distanziandoli tra di loro di 3-4 cm. Una volta concluso il posizionamento, i cormi sono stati ricoperti con il terreno e lasciati seguire il decorso naturale di crescita e sviluppo. I cormi trattati sono stati posizionati su 2 diversi solchi disposti in prossimità del centro del campo, per eliminare le variabili relative alla posizione in campo degli stessi. Nella figura 1.4-3 sono riportate le operazioni eseguite per la messa a dimora per la coltivazione in campo.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax +39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*



Posizionamento dei bulbi all'interno dei solchi

Copertura con terreno

Campo riservato alla sperimentazione

Figura 1.4-3. Passaggi della procedura di messa a dimora dei cormi di zafferano in campo.

1.4.3 Valutazione degli effetti dei PGPR sulle piante e sul suolo

In entrambe le sperimentazioni in serra e in campo, gli effetti dei PGPB sono stati valutati andando a monitorare nel corso dello sviluppo lo stato fisiologico e il profilo metabolico. Questi parametri sono stati registrati a partire dalla emergenza della parte aerea (90 giorni dopo messa a dimora - GDS) delle piante e seguiti fino alla fine della fioritura (120 GDS). La parte aerea, gli stammi e i petali sono stati studiati per il contenuto di pigmenti, il contenuto fenolico totale e l'attività antiossidante (metodo Folin-Ciocalteu e DPPH). La qualità del suolo in termini di ricchezza e struttura della comunità microbica è stato studiato mediante analisi in conto terzi. L'analisi della comunità microbica del suolo è stata effettuata attraverso lo studio molecolare: i terreni sono stati campionati prima della messa a dimora e dopo la raccolta e il DNA è stato isolato mediante kit di estrazione apposito (Nucleo Spin Soil, MACHEREY-NAGEL) e inviato per le purificazioni e i sequenziamenti alla Biofab Research Srl (Roma, RM). I sequenziamenti sono stati effettuati mediante tecnica Illumina (Next generation Sequencing), andando ad amplificare le regioni ipervariabili V3 e V4 dell'rRNA 16S, che permette di studiare i domini dei batteri e degli archaea (Choi et al., 2020). Tutti i risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente mediante l'uso del programma XLSTAT 2016 (Addinsoft, Francia). I risultati del sequenziamento rRNA 16S sono stati analizzati mediante il programma PRIMER v7 (Massey University, Nuova Zelanda).

In entrambe le sperimentazioni, durante la crescita e lo sviluppo delle piante e la fioritura è stato evidenziato un accorciamento del ciclo vegetativo delle piante di cormi trattati con PGPB. Rispetto alla condizione di controllo, l'emergenza della parte aerea e l'inizio della fioritura nella condizione sperimentale con PGPB sono state anticipate di circa 15 giorni. Le analisi effettuate sui campioni prelevati, inoltre, hanno messo in evidenza come le piante trattate con PGPB presentassero un profilo fisiologico e metabolico distinto rispetto alla condizione di controllo. I risultati ottenuti sono mostrati nelle tabelle 1.4-1 e 1.4-2. In media, nella condizione PGPR per i campioni di parte aerea, petali e stammi è stato registrato un incremento rispetto alla condizione di controllo di +24 % per i pigmenti, +29% di contenuto fenolico totale e +32 % per l'attività antiossidante. In campo, invece,

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA, SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

nei due tempi di valutazione (90 GDS e 120 GDS) nella condizione PGPR per i campioni di parte aerea, petali e stimmi è stato registrato un incremento rispetto alla condizione di controllo di +28 % per i pigmenti, +34% di contenuto fenolico totale e +40 % per l'attività antiossidante. Il confronto delle condizioni sperimentali e una foto rappresentativa delle differenze tra la condizione PGPB e il controllo è riportato in figura 1.4-5.

Tabella 1.4-1 – Tabella riassuntiva incrementi percentuali della condizione PGPB rispetto al controllo registrati per il contenuto di pigmenti, contenuto fenolico totale e attività antiossidante per parte aerea, petali e stimmi coltivati in serra.

	120 GDS		
	Parte aerea	Petali	Stimmi
Pigmenti	+39%	+17%	+17%
Contenuto fenolico totale	+26%	+25%	+36%
Attività Antiossidante	+24%	+40%	+31%

Tabella 1.4-2 – Tabella riassuntiva incrementi percentuali della condizione PGPB rispetto al controllo registrati per il contenuto di pigmenti, contenuto fenolico totale e attività antiossidante per parte aerea, petali e stimmi in campo.

	90 GDS			120 GDS		
	Parte aerea	Petali	Stimmi	Parte aerea	Petali	Stimmi
Pigmenti	+35%	+22%	+27%	+37%	+21%	+28%
Contenuto fenolico totale	+24%	+43%	+29%	+23%	+42%	+22%
Attività Antiossidante	+27%	+37%	+43%	+29%	+34%	+42%

I campionamenti di suolo rizosferico e l'analisi della comunità microbica attraverso le tecniche di biologia molecolare ha permesso di evidenziare un'ulteriore differenza tra la condizione PBPG e quella di controllo. Gli indici di diversità calcolati sui risultati ottenuti, infatti, hanno evidenziato un miglior stato di fertilità del suolo con cormi trattati con PGPB rispetto al controllo. Come è possibile evidenziare nella figura 1.4-7 gli indici della condizione PGPB sono risultati migliori rispetto alla condizione di controllo e a quella di pre-messa a dimora, indice di un miglior stato di fertilità dei suoli.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*



Figura 1.4-4. Confronto delle condizioni sperimentali PGPB e controllo e campo in fioritura.

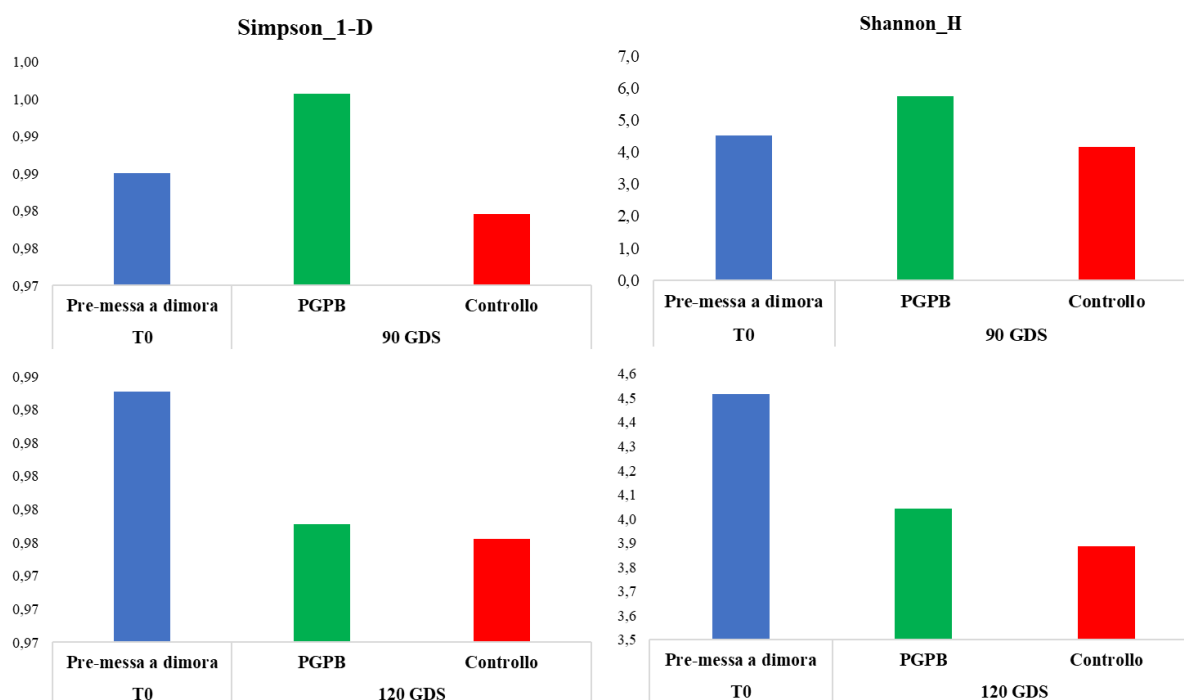


Figura 1.4-5. Risultati degli indici ecologici per i campioni coltivati in serra e in campo.

Tabella 1.4-3 – Risultati attesi e risultati ottenuti dall'attività sperimentale 1.4.

Risultato atteso	Risultato ottenuto
Raccolta parametri biometrici dello stato fisiologico delle piante e dello stato di fertilizzazione dei suoli (in campo). Protocolli colturali e relazione tecnica dei risultati ottenuti. Piano sperimentale annualità successiva.	Sono stati selezionati 4 ceppi PBPG con tratti di biocontrollo che potranno essere applicati sui cormi di zafferano per testarne l'efficacia in condizioni naturali.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA

*DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA,
SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE*

ATTIVITÀ 1.5 – Elaborazione risultati e pianificazione ricerca annualità successive

La raccolta delle informazioni riguardanti le pratiche agricole in uso presso le aziende, i risultati dei campionamenti e degli isolamenti svolti in laboratorio, hanno permesso di mettere in evidenza come la gestione meccanizzata del campo, associata all'uso di macchine agricole per le operazioni di scavatura e la messa a dimora dei cormi, porta a una diffusione maggiore della fusariosi. L'uso delle macchine, infatti, porta al danneggiamento dei cormi che, presentando ferite sulla loro superficie, sono più soggetti agli attacchi fungini. L'uso di macchinari in aree del campo già colpite da fusariosi, inoltre, anche in assenza di sintomatologie evidenti (ingiallimento foglie o marciume cormi), porta all'infezione del macchinario che diventa in questo modo veicolo di infezione durante il suo utilizzo.

Dall'elaborazione dei risultati ottenuti dall'applicazione di PGPB biostimolanti in serra e in campo, è stato messo in evidenza come rispetto a una condizione di controllo, in entrambe le sperimentazioni viene registrato un miglioramento dello stato fisiologico della pianta e del prodotto finale ottenuto. L'uso di questi prodotti permette lo sviluppo di associazioni simbiotiche positive per la pianta, che beneficia di un microbioma più forte che ne promuove la crescita e lo sviluppo e la protegge da agenti patogeni. I PGPB mediante diversi meccanismi diretti e indiretti vanno fornire alla pianta nutrienti prontamente assimilabili, rilasciano fitormoni e ne promuovono la sintesi nelle piante e producono una serie di molecole volatili e diffusibili con azione antagonista nei confronti di organismi patogeni.

I risultati ottenuti in questa prima annualità rappresentano una buona base di partenza scientifica per il proseguimento delle attività. La pianificazione sperimentale relativa alle annualità successive riguarderà l'uso dei PGPB selezionati antagonisti del *Fusarium oxysporum* in esperimenti in serra e in campo aperto e l'applicazione del consorzio PGPB biostimolante in campo aperto, coinvolgendo un numero maggiore di aziende e con variabili pedoclimatiche differenti che permetteranno di testare pienamente l'efficacia sulle colture di zafferano.

Tabella 1.5.1 – Risultati attesi e risultati ottenuti dall'attività sperimentale 1.5.

Risultato atteso	Risultato ottenuto
Protocolli colturali e relazione tecnica dei risultati ottenuti.	Relazione tecnica delle attività attuate ed ancora in corso.
Piano sperimentale annualità successiva.	Pianificazione sperimentale annualità successive.

Segreteria didattica:

P.le Salvatore Tommasi n.1, 67100 L'Aquila, fraz. Coppito – tel. +39 0862 433301, fax + 39 0862 433303

Segreteria amministrativo-contabile:

P.le Salvatore Tommasi n.1, L'Aquila, fraz. Coppito – Tel. +39 0862 434762-3 Fax. +39 0862 433425

CF e P. IVA 01021630668