



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI SCIENZE AGRARIE E ALIMENTARI

Corso di Laurea in
Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio
Montano

**GLI STREPTOMICETI QUALI POTENZIALI
AGENTI DI CONTROLLO BIOLOGICO
DELL'ANTRACNOSI DELLA CIPOLLA**

Relatore: Prof. Marco Saracchi

Correlatore: Dott.ssa Daniela Bulgari

Elaborato finale di:

Rosanna Minello

Matricola 00769A

Anno accademico 2023/2024

Sommario

1	Introduzione	3
1.1	<i>Allium cepa</i> L.	4
1.2	<i>Colletotrichum</i> spp.	6
1.3	Scopo del tirocinio	15
2	Materiali e metodi	17
2.1	Substrati colturali utilizzati	17
2.2	Microrganismi impiegati	18
2.3	Preparazione dell'inoculo di <i>Colletotrichum circinans</i> per le prove <i>in planta</i>	19
2.4	Preparazione dei semi di cipolla	20
2.5	Prove di infezione sperimentale e di controllo biologico in pianta	21
	Prova 1	21
	Prova 2	22
	Prova 3: Prova di confronto tra gli attinomiceti	23
	Prova 4: Prova di controllo biologico dell'antracnosi della cipolla	24
3	Risultati	26
3.1	Crusca inoculata con <i>C. circinans</i> X	26
3.2	Crescita attinomiceti su differenti substrati colturali	27
3.3	Prove di germinazione di semi sterilizzati su carta bibula e in terriccio	29
3.4	Prove di confronto tra tesi sane, infette e batterizzate	32
3.5	Prova 1	32
3.6	Prova 2	34
3.7	Prova 3: Prova di confronto tra i ceppi di attinomiceti	36
3.8	Prova 4: prova di controllo biologico in pianta	42
4	Discussione	57
5	Conclusioni	60
6	Riassunto	61
7	Bibliografia	63
	Ringraziamenti	70

1 Introduzione

L'agricoltura sta affrontando un periodo storico che necessita di particolari attenzioni e strumentazioni adeguate. Il cambiamento climatico, l'aumento della domanda di approvvigionamento dovuto alla crescita della popolazione mondiale e un numero sempre maggiore di malattie alle colture sono problematiche che riguardano tutto il mondo agricolo e a cui è necessario porre dei rimedi (Ali *et al.*, 2024). L'agricoltura è chiamata a rispondere e a dare il suo contributo nella mitigazione dei cambiamenti climatici. I grandi eventi estremi vanno ad aumentare il bilancio dei danni diretti (perdita del raccolto a causa dei fenomeni naturali) e indiretti (suoli non più coltivabili, aumento delle malattie) ai raccolti. L'aumento delle temperature porta ad un aumento dell'evapotraspirazione, con una conseguente maggior richiesta di acqua da parte del terreno e quindi un maggior impatto sulle risorse acquifere. (Parra-Lopez *et al.*, 2024).

Ogni anno, a causa delle malattie delle piante, vengono spesi 220 miliardi di dollari, con una perdita delle colture stimata dal 20 al 40% della produzione mondiale a causa degli agenti patogeni (FAO, 2019). Nello studio condotto da Savary *et al.* (2019), è stato dimostrato mediamente dal 10 al 30% delle principali produzioni agricole è perso a causa di malattie causate da parassiti. Molti di questi agenti, modificano la loro capacità di sopravvivere e proliferare.

La relazione tra patogeni e cambiamenti climatici risulta evidente, con conseguenze dirette e indirette. Il cambiamento della temperatura e delle condizioni atmosferiche e ambientali, causano una modifica delle dinamiche all'interno della popolazione, che altera gli equilibri naturali (Ali *et al.*, 2024).

Modificando le condizioni ambientali in laboratorio, è possibile analizzare in che modo i patogeni fungini reagiscono e si adattano alla nuova situazione. I veri limiti degli studi in ambiente controllato riguardano le tempistiche limitate delle sperimentazioni e le difficoltà nel poter unire più dinamiche contemporaneamente. Quanto viene studiato da Gullini *et al.* (2018) e Koo *et al.* (2016), ha riguardato principalmente le colture orticole. La relazione tra l'aumento della CO₂ e il comportamento del patogeno fungino non è sempre costante, in quanto è stato notato che in certe condizioni la virulenza aumenta mentre in altri casi decresca (Trębicki e Finlay, 2018).

Il modo migliore per prevenire e limitare la diffusione di agenti patogeni è attraverso l'analisi del rischio, la sorveglianza e il monitoraggio, la cooperazione internazionale e lo scambio di

informazioni, le pratiche preventive e delle buone pratiche agronomiche (IPPC Secretariat, 2021).

Il seguente documento rappresenta l'elaborato finale prodotto a conclusione del Corso di Laurea in Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano. Questo studio riporta i risultati del percorso di tirocinio svolto nel periodo da marzo a luglio 2024 nel laboratorio di micologia del Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DEFENS) dell'Università degli Studi di Milano.

1.1 *Allium cepa* L.

Allium cepa L. è classificato nella famiglia delle Amaryllidaceae (theplantlist.org). Le cipolle (*Allium cepa*), sono una delle colture agroalimentari più coltivate e consumate nel mondo. La loro produzione è in continua crescita dal 1994 ad oggi, nonostante negli anni si siano verificati degli andamenti non sempre costanti (FAOSTAT). Si osserva che l'andamento della produzione delle cipolle e la superficie coltivata negli ultimi anni, nonostante le oscillazioni, rimangono abbastanza stabili (Figura 1.1). Nel mondo, al 2022, la superficie coltivata risulta di 230063 ettari, mentre la produzione globale risulta di circa 4970000 tonnellate.



Figura 1.1: Andamento della superficie agricola utilizzata per la produzione di cipolle e scalogno a livello mondiale (in blu) e produzione delle cipolle e scalogno a livello mondiale (in rosso) (Fonte: FAOSTAT).

È la terza coltura orticola più coltivata, piazzandosi dopo la coltivazione di patate e di pomodori (Teshika *et al.*, 2018). Esistono tante differenti varietà di cipolle che vengono coltivate in tutto il mondo, come le cipolle gialle, rosse, bianche, verdi (scalogno) e la loro classificazione viene fatta in base alla loro composizione fisico-chimica (Slimestad *et al.*, 2007).

Al 2022, è la Cina è la Nazione con la maggior produzione di cipolle, la quale, ha raggiunto in tale anno circa 864000 tonnellate. In Figura 1.2, si osserva la distribuzione geografica della produzione media di cipolle e scalogno nell'anno 2022.

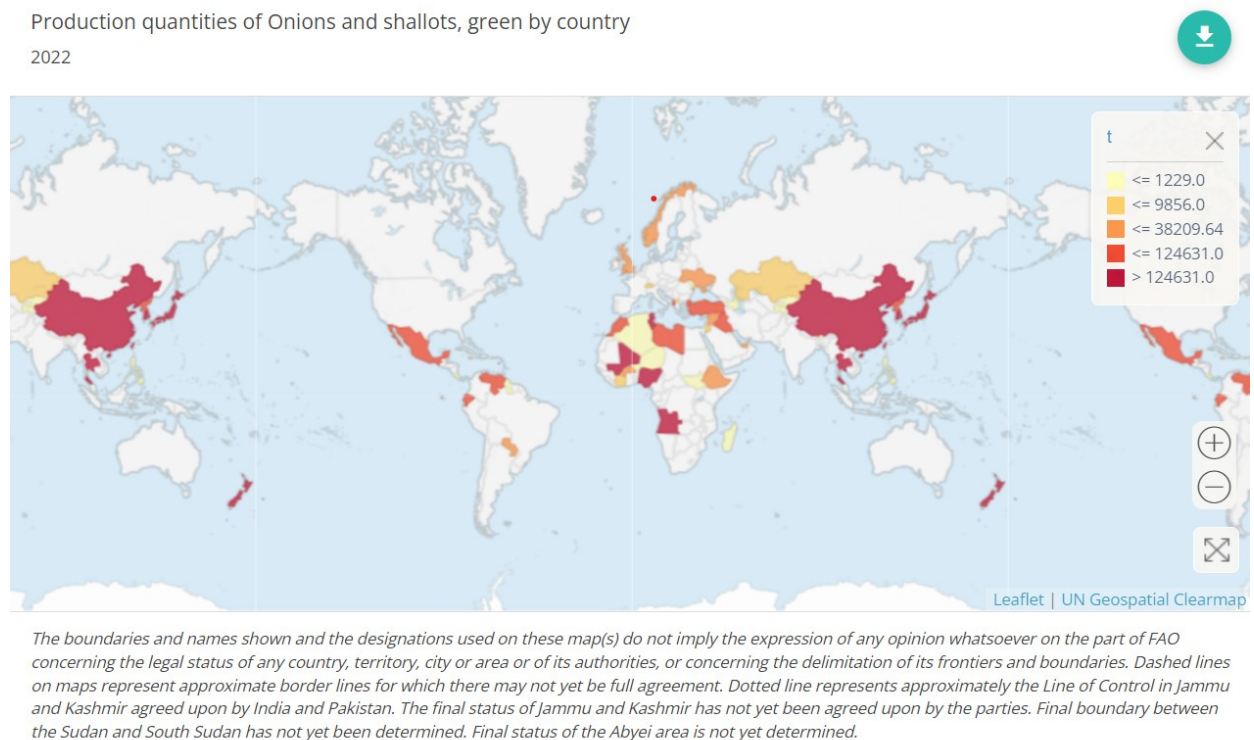


Figura 1.2: Distribuzione geografica della produzione media di cipolle e di scalogno nell'anno 2022 (Fonte: FAOSTAT).

Le cipolle vengono utilizzate da sempre sia nella cucina che nella medicina tradizionale e la loro assunzione ha un impatto positivo sulla salute. Sono stati dimostrati gli aspetti benefici legati al consumo di tale alimento per quanto riguarda le malattie cardiovascolari, grazie alla loro attività anti-diabetica e anti-trombotica. A queste funzioni si aggiunge anche l'attività anti-microbica, anti-cancerogena, anti-asmatica e immunomodulante (Corzo-Martinenéz *et al.*, 2007).

La coltivazione delle cipolle è sensibile a diversi elementi e per poter ottenere una produzione che rispetti un certo livello di quantità e qualità, è necessario prestare attenzione a tutte le pratiche agricole che vengono messe in atto, dalle accortezze che devono essere

compiute prima della semina, quelle durante il ciclo vegetativo e infine durante la conservazione del prodotto finale. Se tutte queste pratiche vengono applicate con rigore, i bulbi saranno più soggetti a essere ritenuti idonei al mercato (Kiran *et al.*, 2023).

Le cipolle hanno una larga quantità di antagonisti, tra cui batteri, funghi, nematodi, virus, fitoplasmi e piante parassitiche, agenti causali di malattie alla coltura, che portano alla diminuzione della resa e della qualità del prodotto. I principali agenti fungini che attaccano la coltura causano malattie come la peronospora della cipolla, il mal bianco, il marciume del colletto e l'antracnosi (BAYER, 2024).

Le cipolle hanno al loro interno dei composti che presentano una spiccata attività antimicotica nei confronti di *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* spp. Tra i vari composti presenti nei bulbi di cipolla, l'etil acetato in particolare potrebbe essere in futuro utilizzato come principio attivo nella formulazione di agrofarmaci contro *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum* spp. (Cornago *et al.*, 2011; Somwanshi *et al.*, 2016). Le differenti varietà di cipolle hanno permesso di osservare diverse resistenze all'attacco di *Colletotrichum circinans*. Le cipolle a tunica colorata, rossa o gialla mostrano una maggiore resistenza al patogeno fungino, grazie alla presenza di composti fenolici antagonisti nelle zone pigmentate rispetto alle cipolle a tunica bianca (Walker, 1925; Agosteo *et al.*, 1997; Vannacci *et al.*, 2021).

1.2 *Colletotrichum* spp.

Il genere *Colletotrichum* spp. è un gruppo di funghi appartenenti al phylum degli Ascomycota e rappresenta un importante numero di patogeni fungini responsabili di antracnosi sulle più importanti specie alimentari e ornamentali (Dickman, 2000; EPPO). *Colletotrichum* spp. è in grado di attaccare sia piante monocotiledoni che dicotiledoni (Baroncelli *et al.*, 2024).

Nel 2012, il genere *Colletotrichum* è stato inserito all'ottavo posto nella lista dei dieci agenti patogeni fungini con un maggior impatto socioeconomico a livello mondiale. Tale studio è stato condotto da Dean *et al.* (2012) e per ottenere tale risultato sono stati coinvolti 495 membri della comunità scientifica internazionale.

La distribuzione geografica del patogeno è diffusa in tutto il globo, nonostante risulti maggiormente comune delle zone temperate. (Kumar *et al.*, 2015).

Ciclo di *Colletotrichum* spp.

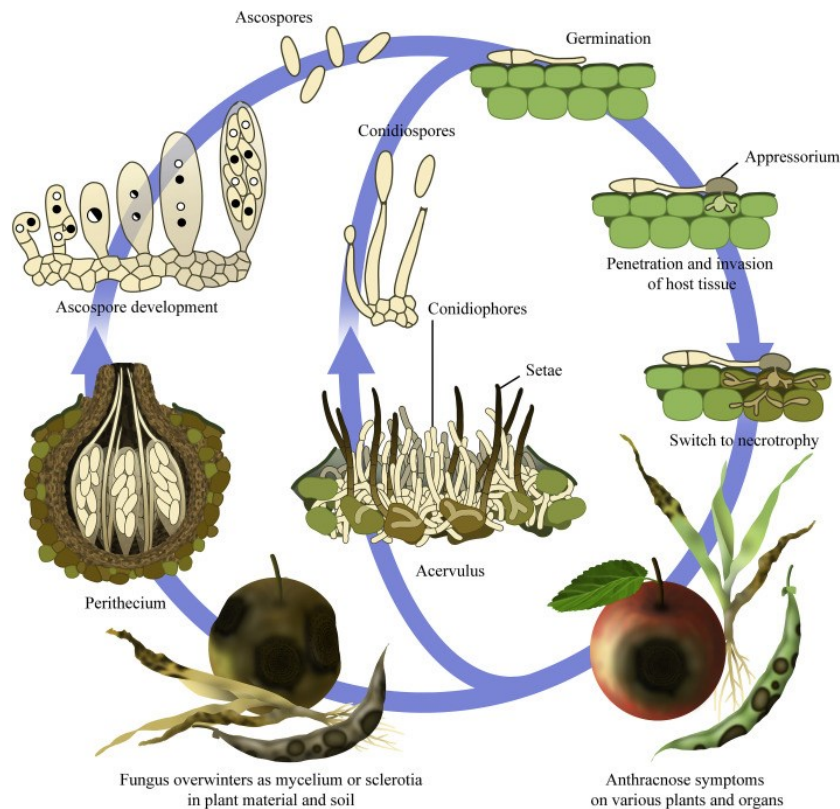


Figura 1.3: Ciclo generico di *Colletotrichum* spp. (Fonte: De Silva *et al.*, 2017).

I patogeni appartenenti al genere *Colletotrichum*, presentano un ciclo generico tipico del phylum degli Ascomycota. Possono sopravvivere durante l'inverno rimanendo protetti da residui vegetali nel terreno, in parti di piante danneggiate, nei frutti secchi o nelle piante infette sottoforma di miceli o scleroziosi. Appena l'ambiente circostante lo consente, i periteci formati per proteggere gli aschi si rompono e permettono la fuoriuscita degli aschi e l'infezione primaria. Il ciclo inizia con l'adesione da parte delle spore alla superficie esterna della pianta ospite, la germinazione delle spore e la formazione dell'appressorio che penetra nella superficie della pianta (De Silva *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2023).

L'infezione secondaria avviene con la rottura degli acervoli durante la stagione vegetativa che promuovono ulteriormente la diffusione del patogeno (EFSA PLH Panel, 2021; Vannacci *et al.*, 2021; Salotti *et al.*, 2023).

La capacità di *Colletotrichum* spp. di attaccare una larga quantità di ospiti con adattamenti e caratteristiche differenti rende pericolosa la diffusione di tale patogeno. Le specie attaccate possono variare da piante arboree a erbacee. Tra le piante agroalimentari più colpite troviamo: fragole, agrumi, il mango, avocado, banane, caffè, mais, zucchero di canna e sorgo

(Cannon *et al.*, 2012). L'importanza degli attacchi non è collegata solo all'ospite attaccato, ma deve essere messo in relazione anche con l'ambiente circostante. *Colletotrichum dematium* è stato inoltre riconosciuto come patogeno del cataranto in Florida, degli spinaci in Australia, il Daikon in Giappone e le fragole in India. (Machowicz-Stefaniak e Zalewska, 2011). Il patogeno è stato studiato anche in altri paesi, tra cui l'Argentina (Kiehr *et al.*, 2012), le provincie cinesi di Gansu e Liaoning (Chen *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022). L'impatto economico del patogeno fungino non risiede esclusivamente nelle piante agro-alimentari, bensì anche nel settore delle colture ornamentali. In Italia, per comprendere l'impatto socioeconomico sulle colture ornamentali sono state condotte delle interviste per un periodo di 5 anni, che hanno permesso di caratterizzare l'aggressività e la patogenicità degli agenti fungini testati appartenenti a *Colletotrichum* spp. Tutti i ceppi di *Colletotrichum* testati in laboratorio sono risultati patogenici e hanno presentato sintomi simili a quelli ritrovati nelle serre e nei vivai (Guarnaccia *et al.*, 2020). Nell'articolo pubblicato da Winder e Watson (1994), *C. dematium* viene studiato per la sua azione di biocontrollo nei confronti dell'*Epilobium angustifolium*, conosciuto anche come "fireweed". In questo studio viene preso in considerazione il patogeno come mezzo di controllo dalla pianta pioniera, considerata un'antagonista alla riforestazione del territorio a seguito di incendi. Inoltre, *Colletotrichum* spp. possono essere entomopatogeni e patogeni opportunisti dell'uomo (Talhinhas e Baroncelli, 2021).

Nel lavoro pubblicato da Talhinhas e Baroncelli (2021) viene fatto un tentativo di studio delle specie del fungo e una revisione delle stesse mediante l'uso di approcci molecolari. Viene proposta la seguente classificazione in cladi: *acutatum*, *agaces*, *boninense*, *caudatum*, *dematium*, *destructivum*, *dracaenophilum*, *gigasporum*, *gloeosporioides*, *graminicola*, *magnum*, *orbiculare*, *orchidearum*, *spaethianum*, *truncatum*. Ciascuna clade presenta delle caratteristiche distintive.

Durante lo svolgimento del tirocinio è stato utilizzato il patogeno fungino *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans*. Per tale motivazione, viene ritenuto utile approfondire le caratteristiche specifiche della clade *dematium*.

Inizialmente, il complesso clade *dematium* conteneva 6 specie, tuttavia, negli ultimi anni il numero delle specie è aumentato rapidamente, arrivando a contare 17 specie.

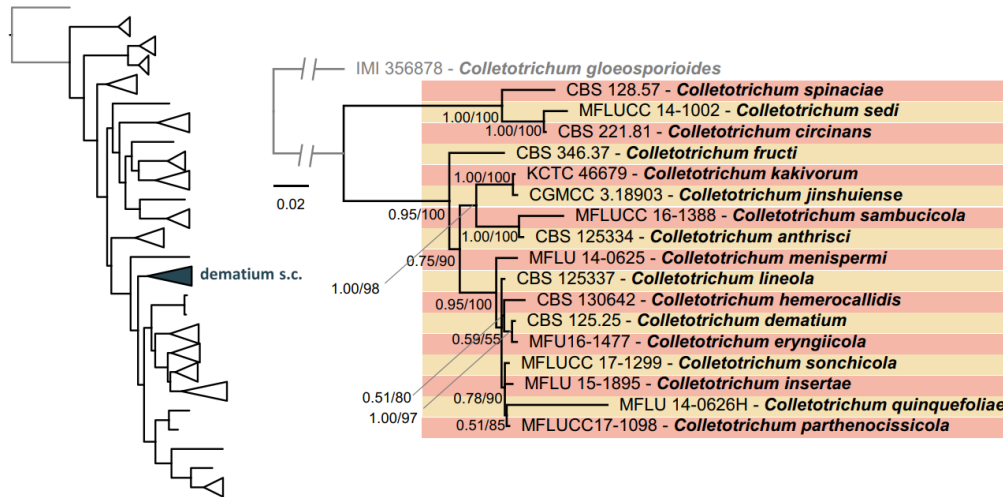


Figura 1.4: Albero filogenetico del complesso *dematium* (Fonte: Talhinhos e Baroncelli, 2021).

È stato osservato che i membri del complesso *dematium* sono associati a 33 ospiti vegetali e alcuni di essi hanno la capacità di infettare i tessuti umani come la cornea, provocando una malattia chiamata cheratite (Machowicz e Zalewska, 2011; Buchta *et al.*, 2019).

Il complesso clade *dematium* è stato approfondito nello studio condotto da Wijesekara e Agarwal (2006), dove vengono riportate le caratteristiche principali delle strutture dell'agente patogeno. Le ife hanno una colorazione inizialmente ialina, che raggiungendo la maturità virano verso il colore marrone. Gli acervuli possono essere singoli o raggruppati e le sete sono numerose, di colore marrone scuro. La dimensione dei conidi è 10.98-32.96 x 2.38-6.10 μm per ciascuna cellula, di colorazione ialina e di forma che può variare da falcata a fusiforme. Gli appressori sono in numero abbondante, generalmente di forma circolare o clavata.

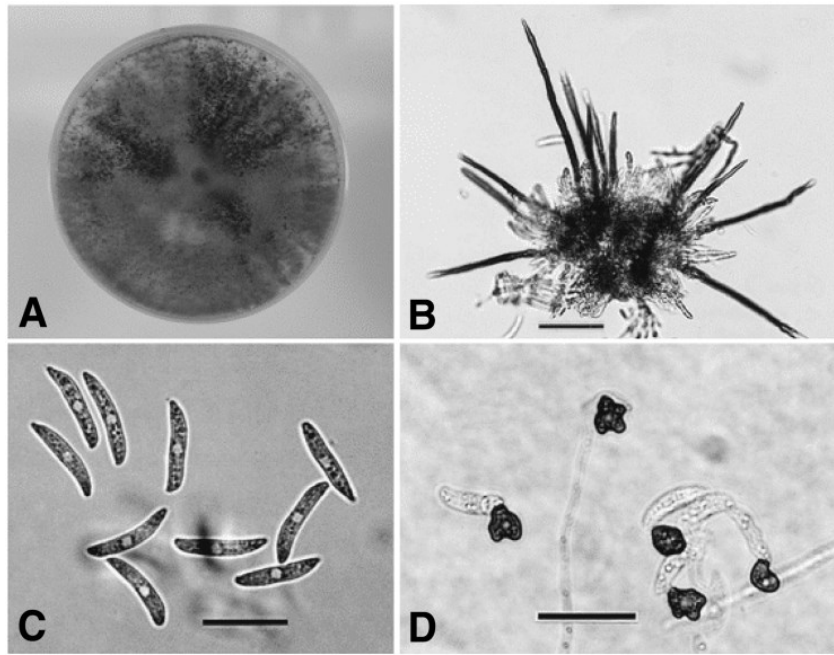


Figura 1.5: *Colletotrichum circinans* isolato dalle foglie di *Allium fistulosum* (Welsh onion). (A) Colonia cresciuta su PDA per 20 giorni a 24°C; (B) Sete sulla lesione; (C) Conidi; (D) Appressori (Fonte: Kim et al., 2008). Sintomi di *Colletotrichum circinans* su cipolla, le macchie possono essere sparse sul bulbo (E) oppure essere ravvicinate (F).

Nel complesso clade *dematium* viene inserita la forma speciale *circinans*. Il *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans* è l'agente causale dell'antracnosi della cipolla (Talhinhas e

Baroncelli, 2023). Come riportato dagli autori, l'antracnosi della cipolla è conosciuta anche come “*Onion Twister Disease*”. Nella Figura 1.6 viene riportata la distribuzione geografica dell'agente patogeno *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans*.

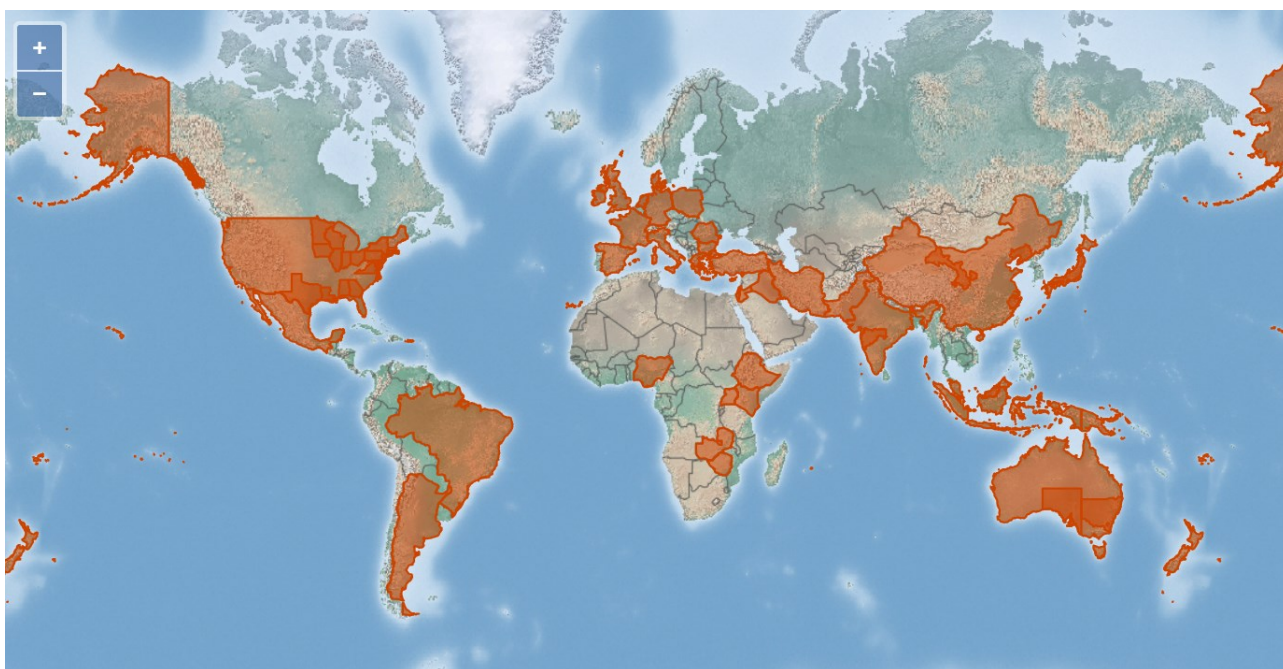


Figura 1.6: Distribuzione geografica del patogeno *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans* (Fonte: PlantwisePlus Knowledge Bank).

I sintomi principali si manifestano come macchie inizialmente verde scuro che diventano nere sul tegumento esterno dei bulbi (da cui il nome anglosassone “*Smudge onion*”), l'attorcigliamento delle foglie e l'allungamento del colletto. La formazione di macchie porta ad una riduzione della produzione e alla successiva esclusione dei bulbi dalla commercializzazione. (Fonte: PlantwisePlus Knowledge Bank).

C. dematium f. sp. *circinans* è stato in passato associato esclusivamente ad agente patogeno su bulbi di cipolla, tuttavia, grazie allo studio di Damm *et al.* (2009), è emerso che il patogeno è in grado di adattarsi a diversi ospiti. I sintomi provocati da *C. circinans* su cipolla sono riassumibili con macchie scure concentrate in anelli concentrici a formare delle macchie fino a 1 cm di diametro, altrimenti possono essere punti separati tra loro (Figura 1.5 - E, F). Queste macchie sono costituite da masse stromatiche e da piccoli acervuli costituiti da sete rigide e scure (Kiehr *et al.*, 2012).

La colonia formata dal patogeno ha una colorazione dal marrone al grigio. Sclerozi e sete vengono prodotti in maniera abbondante sulla superficie. I conidi sono fusiformi e affusolati alle due estremità. Gli appressori hanno una colorazione dal marrone al marrone scuro, con forme da globosi a clavato a irregolare.

Per poter contrastare le epidemie di antracnosi, è stato ideato un modello che permette di capire il loro potenziale sviluppo in anticipo e quindi gestirle in maniera adeguata, partendo dalle condizioni ambientali e delle caratteristiche comuni e specifiche di ciascuna clade di *Colletotrichum* spp. (Salotti *et al.*, 2023).

Oltre all'impatto economico causato dal patogeno fungino e dalla gamma elevata di ospiti, devono essere presi in considerazione ulteriori aspetti, tra cui la preferenza di ospiti, le diverse modalità di riproduzione e le differenti strategie di infezione a seconda dell'ospite.

Russo e Pappelis (1981) hanno osservato che la penetrazione da parte dell'agente patogeno *C. dematium* f. sp. *circinans* su cipolle a tunica bianca, gialla o rossa avviene nelle 24 ore successive all'inoculazione. I siti di penetrazione del patogeno sono stati descritti, a seguito della colorazione con sostanze fluorescenti dell'epidermide, come aloni meno intensamente colorati, a causa della degradazione della pectina e della cellulosa della parete cellulare (Karabetsos *et al.*, 1987).

Grazie allo studio a partire da più di 180 articoli scientifici, Salotti *et al.* (2022), hanno permesso di attestare come le cladi reagiscono in base alle condizioni di temperatura differenti. Analizzando la crescita del micelio, è stato osservato che la maggior parte delle specie di *Colletotrichum* cresce in un intervallo di temperatura compreso tra i 10 °C e i 35°C, la germinazione tra i 10 °C e i 30 °C e l'infezione avviene tra i 20 °C e i 25 °C. Il comportamento della clade *dematium* rientra in questi range di temperatura.

Anche la presenza di acqua ha dimostrato di avere una certa importanza nella germinazione da parte del patogeno. In base allo studio condotto da Shumway *et al.* (1983), è stato constatato che gli strati di cipolle lavati e successivamente inoculati con *C. dematium* f. sp. *circinans* evidenziano una percentuale di germinazione del patogeno maggiore rispetto agli strati non lavati. Questa considerazione permette una riflessione sulle condizioni di propagazione del patogeno e del potenziale effetto che le piogge possono avere durante il ciclo del vegetale.

Oltre alle condizioni di cui sopra, lo studio condotto da Russo *et al.* (1979), si è soffermato sullo studio del patogeno *in vitro*, andando ad analizzare e modificare i tassi di luce e dello scambio gassoso. Per farlo sono state modificate le ore di esposizione della luce in laboratorio e per i gas le tesi sono state chiuse. È stato riportato che la presenza di luce e CO₂ siano essenziali per la germinazione di alcuni funghi. Il lavoro ha permesso di arrivare alla conclusione che la germinazione viene solo parzialmente influenzata dalle differenti condizioni di luce e di scambio gassoso, mentre lo sviluppo successivo risulta molto più

influenzato. Queste informazioni, se meglio approfondite, potrebbero portare a delle migliori tecniche colturali per poter controllare in maniera più efficiente la diffusione del patogeno. In uno studio condotto da Aveling (2002), viene presa in considerazione anche l'età della pianta (e quindi dei tessuti) che viene inoculata. Nello studio, la pianta considerata è *Vigna unguiculata* L Walp e il patogeno analizzato è *Colletotrichum dematium*. Dallo studio emerge la maggior sensibilità dimostrata delle piante più vecchie rispetto a quelle più giovani nella risposta al patogeno.

L'inoculazione sperimentale su un determinato ospite, non garantisce una relazione ospite-patogeno specie specifica, tuttavia indica l'infezione potenziale che può avvenire. Inoltre, la combinazione ospite patogeno specie specifica è un elemento complesso e importante da evidenziare, in quanto permette una migliore gestione del patogeno (Freeman *et al.*, 1998). Alla base della prevenzione (conosciuta anche come profilassi), in patologia, esistono tre principali modalità di intervento di cui si parlerà in seguito: l'esclusione (l'impedimento di contatto tra il patogeno e l'ospite), l'eradicazione (l'eliminazione di potenziali focolai o inoculi del patogeno) e la protezione (ovvero l'utilizzo di sostanze di varia natura sulla pianta). (Vannacci *et al.*, 2021).

Il gruppo di ricerca guidato da Zaki et al. (2021) ha proposto un modello di riconoscimento della malattia utilizzando delle immagini. Questo permette di facilitare e anticipare una diagnosi con margine inferiore di errore. La ricerca si è concentrata sulla peronospora della cipolla (causata dal patogeno fungino *Alternaria porri*), ma la previsione è la possibilità di sfruttare questo metodo per il riconoscimento di altre malattie. In simil modo, anche Ali *et al.* (2024), si avvicinano all'utilizzo dell'Intelligenza Artificiale come aiuto per arrivare al riconoscimento delle malattie.

Le pratiche agronomiche e le condizioni ambientali influenzano l'epidemiologia del patogeno. Le buone pratiche agronomiche introducono azioni concrete nel gestire il campo prima della semina, durante il ciclo vegetativo e nella fase di conservazione del prodotto. Per controllare le epidemie è necessario, ove le condizioni lo consentono, utilizzare varietà più resistenti (cipolle a tunica gialla o rossa), praticare la rotazione delle colture, utilizzare piante sane, ma anche raccogliere le cipolle in condizioni di bassa umidità e stocarle in maniera corretta nel minor tempo possibile. Se non gestite correttamente, le cipolle possono sviluppare i sintomi anche durante la fase di conservazione (BAYER, 2024). Nelle condizioni favorevoli al patogeno, *Colletotrichum* spp. si diffonde in maniera più rapida. Per questa motivazione, la conoscenza del patogeno fungino e del suo comportamento è

fondamentale per una gestione adeguata in campo. Ad oggi, tuttavia, la soluzione ancora più efficace per contrastare l'agente patogeno sono ancora le sostanze chimiche. (Dutta *et al.*, 2022). Per ottenere il trattamento più efficace tramite l'utilizzo dei fungicidi, le sostanze devono essere irrorate a 40, 60 e 80 giorni dalla semina. In particolare, il trattamento a 80 giorni è risultato il migliore per ridurre al minimo le macchie causate dalle infezioni di *Colletotrichum circinans* (Mesta e Kukanur, 2013). Uno studio condotto da Materatski *et al.* (2019), ha portato l'attenzione al fenomeno di resistenza ad agrofarmaci con il genere *Colletotrichum* spp. che si sta verificando su piante di olivo a causa dell'utilizzo indiscriminato delle sostanze chimiche.

Molti studiosi hanno concentrato i propri studi sulla creazione di potenziali fungicidi naturali ottenibili grazie a estrazioni a partire da foglie di altri vegetali. Sudirga e Parwanayoni (2022) si sono concentrati sull'agente patogeno responsabile dell'antracnosi sulle piante di Papaya tramite l'estratto di foglie di *Ficus septica* Burm F, mentre Hasibuan *et al.* (2020), hanno rivolto l'attenzione alla coltivazione dei peperoncini tramite l'utilizzo di *Gliricidia maculata* per contrastare più agenti patogeni fungini (*Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum* e *Cercospora capsici*).

Lo studio condotto da Amallia *et al.* (2023), ha portato invece l'attenzione ad altri agenti biologici e ai loro potenziali meccanismi di contrasto contro la malattia. Nello studio viene riportato l'utilizzo del *Rhizophagus intraradices* e *Bacillus thuringiensis* contro l'antracnosi dello scalogno. Entrambi i microrganismi sono conosciuti da tempo per i loro meccanismi sfruttati in campo agricolo e nella lotta integrata come agenti di biocontrollo.

Un'ulteriore modalità di inibizione di crescita sperimentata in vitro sul micelio di *Colletotrichum circinans*, è stata fatta a partire da derivati di *Satureja hortensis* L. (oli essenziali, idrosol, materiale macinato ed estratto). L'estratto ha inibito completamente la crescita del patogeno fungino (Boyraz e Özcan, 2013).

Nello studio condotto nel 2004 da Alam *et al.*, sono stati utilizzati degli estratti a partire da piante facilmente reperibili e che avessero componenti antifungini naturali: *Allium sativum*, *A. cepa*, *Zingiber officinale*, *Platycodon grandiflorum*, *Oenanthe javanica* e *Capsella brusapastoris*. Ognuno di questi è stato testato su differenti agenti patogeni fungini per verificarne l'efficacia. Nel caso del *Colletotrichum dematium*, gli estratti che hanno dato un riscontro positivo per limitare la crescita della colonia sono *Zingiber officinale* (zenzero) e *Allium sativum* (aglio).

Tra le soluzioni proposte che vengono analizzate ci sono gli streptomiceti, i quali presentano una spiccata attività preventiva nei confronti di alcune malattie, avendo un comportamento tipico degli agenti antibatterici ad ampio spettro, con la produzione di un'elevata quantità di antibiotici. Sono stati testati con buoni risultati anche su altri agenti patogeni, tra cui i patogeni fungini (Song *et al.*, 2020).

È stato infatti riportato che l'attività dei ceppi degli streptomiceti possa controllare malattie delle piante causate da funghi e batteri, e che il loro spettro d'azione si estenda anche con altri microrganismi, tra i quali anche il *Colletotrichum*. Nello studio condotto nel 2014 da Bhat *et al.* (2014), sono stati prelevati dalla rizosfera di piante di peperoncino 66 streptomiceti ed è stato appurato che ben 21 di questi avessero attività antagonista ad almeno una delle specie appartenenti a *Colletotrichum* spp.

Jepsen *et al.* (2022) hanno utilizzato gli streptomiceti per condurre una ricerca sul *Colletotrichum acutatum*, riuscendo, con le sostanze organiche volatili prodotte dai vari ceppi di streptomiceti a ritardare il marciume delle mele.

Un'ulteriore conferma dell'efficienza dell'utilizzo degli streptomiceti contro *Colletotrichum* spp., deriva dallo studio condotto da Piedra *et al.* (2019). Il lavoro si è basato sull'isolamento di ceppi di streptomiceti dal suolo (prelevato nel distretto Reque, situato nella regione Chiclayo, in Perù) e testata la loro attività su ceppi di *Colletotrichum* spp. Quello che risulta interessante da notare è che l'attività di inibizione in vitro risulta particolarmente simile a quella dei fungicidi che possono essere utilizzati in campo e dunque, procedendo ulteriormente con la sperimentazione, potrebbero risultare dei buoni surrogati agli agrofarmaci.

Gli streptomiceti sono un genere appartenente al phylum degli Attinomiceti. La loro importanza risiede nella capacità di produrre metaboliti secondari che rivestono numerose funzioni, tra cui attività antibiotica, antivirale, antitumorale e in campo agricolo (Sanglier *et al.*, 1993). Data l'importanza del fenomeno della resistenza agli agrofarmaci, l'utilizzo degli streptomiceti risulta importante nella gestione delle colture come surrogato a tali sostanze chimiche. (Alam *et al.*, 2022). Gli streptomiceti sono batteri Gram positivi e hanno sviluppato la capacità di essere un gruppo di microrganismi estremamente resistente, capace di crescere in condizioni ostili (Bhat *et al.*, 2014).

1.3 Scopo del tirocinio

Il tirocinio svolto è stato svolto nel contesto delle sperimentazioni condotte presso il laboratorio di Patologia vegetale del DeFENS (Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la

Nutrizione e l'Ambiente, dell'Università degli Studi di Milano) dove sono in corso ricerche che hanno come obiettivo il controllo biologico di *Colletotrichum circinans*, agente dell'antracnosi della cipolla.

Il primo obiettivo della sperimentazione è stato valutare diversi metodi di inoculazione sperimentale del patogeno in piantine di cipolla. La possibilità di riprodurre la malattia durante tutto l'anno in ambiente controllato consente infatti di studiare il rapporto ospite-patogeno-agenti di biocontrollo senza dipendere dalla presenza naturale del patogeno e di svincolare la crescita dell'ospite dalla stagionalità.

Un ulteriore obiettivo del tirocinio è stato determinare la capacità antagonista di diversi ceppi di streptomiceti, attivi *in vitro*, nei confronti dell'agente patogeno *C. circinans in planta*.

Sulla base di quanto osservato in precedenti ricerche, si è inoltre voluto valutare l'eventuale effetto dei ceppi di streptomiceti selezionati sullo sviluppo vegetativo delle piante di cipolla.

2 Materiali e metodi

2.1 Substrati colturali utilizzati

Per le diverse fasi della sperimentazione, sono stati utilizzati diversi tipi di substrati, a seconda della necessità e dal tipo di utilizzo che ne è stato fatto. Di seguito sono riportati i substrati utilizzati e le rispettive modalità di preparazione.

Czapek-yeast extract (CZY)

Brodo di Czapek-Dox	35 g
Estratto di lievito	2 g
Acqua	1000 mL
Agar	15 g

Gli ingredienti sono stati miscelati in acqua fredda, quindi il substrato è stato portato ad ebollizione per consentire la fusione dell'agar e portato a volume finale 1L compensando l'eventuale acqua evaporata. In questa fase è stato anche corretto il pH portandolo a 7.

La sterilizzazione è stata effettuata in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121°C e pressione di 1 atm.

Potato Dextrose Agar (PDA)

Patate	200g
Agar	18 g
Destrosio	20g
Acqua	1000 mL

Dopo aver sbucciato e tagliato le patate a cubetti queste sono state lasciate bollire per 45 minuti in acqua deionizzata. Il brodo ottenuto è stato filtrato attraverso uno strato di cotone idrofobo e uno strato di garza per eliminare i residui grossolani di polpa.

Al composto filtrato è stato aggiunto l'agar e il destrosio e si è quindi proceduto a una nuova bollitura per consentire la fusione dell'agar. Al termine di questa fase il substrato è stato corretto al valore di pH 7 e portato a volume. Anche in questo caso la sterilizzazione è stata effettuata in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121°C e pressione di 1 atm.

Crusca (sterile)

Crusca disoleata	30 g
Acqua deionizzata	50 mL

Il substrato è stato preparato unendo 30 g di crusca disoleata e 50 mL di acqua deionizzata avendo cura di miscelare bene fino a creare un composto il più possibile privo di grumi. Il substrato è stato distribuito in scatole di plastica trasparente a base quadrata (10 x 10 x 9 cm) munite di coperchio, contenenti ciascuna 80g di substrato per la fermentazione in stato solido. Le scatole sono state quindi sterilizzate in autoclave per 20 minuti a 121°C e alla pressione di 1 atm.

2.2 Microrganismi impiegati

Per le prove sperimentali è stato utilizzato il ceppo X di *Colletotrichum circinans* isolato da cipolle sintomatiche provenienti da campi localizzati in provincia di Verona. Il ceppo fa parte della collezione micologica del laboratorio di micologia del Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DEFENS) dell'Università degli Studi di Milano.

Inoltre, sono stati impiegati 5 diversi ceppi di *Streptomyces* spp. (Tab. 2.1), anch'essi appartenenti oggi alla stessa collezione e che in prove *in vitro*, condotte in precedenza, avevano mostrato attività di antibiosi nei confronti del patogeno.

DEF 07
DEF 19
DEF 39
DEF 48
DEF 58

Tabella 2.1: Ceppi di streptomiceti utilizzati per le prove sperimentali

Per il trattamento dei semi sono state preparate delle sospensioni concentrate di spore dei cinque ceppi di streptomiceti in uso. Allo scopo sono state predisposte provette contenenti 1mL di acqua addizionata con lo 0,01% di Tween 20 come tensioattivo capace di favorire la dispersione delle spore idrofobiche che sono state prelevate con una ansa sterile da colture dei ceppi ben sporulate prelevate dalla collezione del laboratorio. Queste sospensioni sono state impiegate per inoculare piastre Petri di CZY (200 µL per piastra) che sono state poste ad incubare alla temperatura costante di 21°C per 7/10 giorni. La raccolta delle spore da

queste nuove colonie è stata fatta versando in ogni piastra 2 ml di acqua sterile addizionata con lo 0,01% di Tween 20 e scarificando la loro superficie con una ansa sterile. La sospensione ottenuta è stata raccolta e la concentrazione di spore è stata determinata mediante l'uso di un vetrino emocitometrico (cella Thoma).

2.3 Preparazione dell'inoculo di *Colletotrichum circinans* per le prove in pianta

Crusca colonizzata da *C. circinans*

Il patogeno è stato inoculato su un substrato predisposto come descritto nel paragrafo precedente. L'inoculo è stato effettuato addizionando per ciascuna scatola di crusca 5 dischetti di agar-micelio (diametro 5 mm) prelevate da piastre della coltura di *C. circinans* di 10 giorni di età.

I dischetti sono stati appoggiati con la colonia rivolta verso il basso, a diretto contatto con la crusca.

La crusca inoculata è stata posta ad incubare in termostato a temperatura costante di 25°C per 10 giorni. Le scatole contenenti i substrati sono state monitorate giornalmente al fine di verificare la crescita del fungo e l'eventuale comparsa di inquinanti microbici.

Dopo 10 giorni di crescita, 30 g di crusca colonizzata da *C. circinans* sono stati addizionati a 570 g di suolo per ottenere una concentrazione finale del patogeno nel suolo pari al 5 % m/m.

“Frullato” del patogeno cresciuto su PDA

L'inoculo era composto da un “frullato” di agar micelio omogenato in un mixer (Sterilmixer Lab, VWR). Indicativamente, per tre colonie di *C. circinans* cresciute per 10 giorni su CZY sono stati aggiunti 40 ml di acqua sterile per favorire l'omogenazione. Dopo aver rimosso il frullato, il bicchiere del frullatore è stato ulteriormente risciacquato con 20 ml di acqua per rimuovere il più possibile del materiale adeso alle pareti e questo liquido è stato aggiunto al “frullato” precedentemente ottenuto.

Per inoculare il terreno necessario con il patogeno, è stato necessario l'uso di tre vasi di uguali dimensioni (10 x 10 x 9 cm). Le opportune dosi di terriccio (circa 600 cm³) e inoculo (equivalente del frullato ottenuto da una piastra Petri) sono stati miscelati a mano tra loro in un vassoio e disposti nei contenitori.

2.4 Preparazione dei semi di cipolla

Per le prove sperimentali sono stati utilizzati semi di cipolla bianca *Allium cepa* “Extra Early” comunemente utilizzata per la produzione di cipolline da sottaceto.

I semi sono stati trattati in due differenti modalità, una destinata a rimuovere la componente microbica contaminante la superficie esterna (sterilizzazione), l’altra destinata a ricoprire la superficie dei semi con spore degli streptomiceti saggiati (batterizzazione).

Sterilizzazione dei semi

Per sterilizzare i semi di cipolla, essi sono stati messi in un bicchiere di vetro e ricoperti con una quantità sufficiente di ipoclorito di sodio 1 % e lasciati immersi per 5 minuti. Sono stati poi effettuati 5 lavaggi con acqua sterile per eliminare gli eventuali residui di ipoclorito.

Con i semi sterilizzati sono state eseguite delle prove preliminari per accertare che il trattamento non abbia interferito con la germinabilità degli stessi. A tal fine due gruppi di 50 semi sono stati disposti in germinatoi sulla superficie di carta da filtro imbibita di acqua sterile. Analoghi due gruppi di semi non trattati sono stati predisposti come controllo (Figura 2.1). I germinatoi sono stati quindi posti in termostato a 24 °C e quotidianamente è stato annotato il numero di semi germinati.

2 prove sono state fatte su carta Bibula, posizionando 50 semi trattati distanziati tra di loro in maniera omogenea e 2 prove di controllo con semi non sterilizzati. È stata eseguita una prova in terra con semi sterilizzati, con rispettivo controllo con semi non sterilizzati.



Figura 2.1: Allestimento delle prove preliminari per verificare la germinabilità dei semi su carta Bibula.

Batterizzazione dei semi con streptomiceti

Per la batterizzazione dei semi sono state utilizzate le sospensioni di spore di streptomiceti preparate come descritto in precedenza. La loro concentrazione è stata portata a 10^6 spore/mL mescolando opportunamente dosi calcolate di sospensione concentrata e acqua sterile.

I lotti di semi necessari per gli esperimenti sono stati bagnati abbondantemente con la sospensione di spore all'interno di piastre Petri sterili. Dopo qualche minuto di immersione l'eccesso di liquido è stato rimosso e i semi lasciati asciugare nel flusso di aria sterile di una cappa a flusso laminare.

Per verificare sia la vitalità degli attinomiceti sia l'uniformità del trattamento al seme, una parte di questi ultimi è stata prelevata e collocata sulla superficie di piastre Petri contenenti CZY. Le piastre sono state quindi poste a incubate in termostato a 28°C, periodicamente controllate allo stereomicroscopio per verificare la comparsa di colonie degli streptomiceti sulla superficie dei semi, la loro distribuzione più o meno uniforme e la germinabilità dei semi stessi.

2.5 Prove di infezione sperimentale e di controllo biologico in pianta

Terriccio (suolo)

Per i test di controllo biologico condotti su cipolla, è stato utilizzato un terriccio ottenuto miscelando in proporzione 1:1 due terricci base Vigorplant: Ser_CA_V7 (semina balance) e SER_COCCO_A special TNA 2. Questo substrato è stato la base per tutte le preparazioni delle tesi che verranno descritte in questo paragrafo (2.5).

Sono state eseguite 4 prove sperimentali, differenti per metodologia, allo scopo di provocare la comparsa della malattia in plantule di cipolla e valutare l'effetto degli streptomiceti nel contenimento della malattia.

Prova 1

Questa prima prova è stata eseguita con lo scopo di valutare quali fossero le adeguate concentrazioni di fungo patogeno cresciuto su crusca per poter osservare e valutare i sintomi e l'incidenza della malattia sulla pianta, senza che il substrato di crescita del fungo (crusca) interferisse con la germinazione del seme.

In questa prova sono state confrontate 4 tesi:

- Solo suolo
- Suolo e crusca al 5 %
- Suolo e 1 % (m/m) di crusca colonizzata da *C. circinans*
- Suolo e 5 % (m/m) crusca colonizzata da *C. circinans*

Per ciascun vaso (10 x 10 x 9 cm), il substrato totale è 240 g. Per la prima tesi, il substrato era formato esclusivamente da suolo vergine, mentre per le altre, sono state utilizzate le fonti di inoculo descritte in precedenza, alle dosi sopraccitate. Per ogni tesi sono state eseguite due repliche.

I semi collocati in ciascuna vaschetta sono 50 suddivisi in 3 righe (in due righe sono stati seminati 17 semi, nella terza 16 semi). In questo caso, sono stati utilizzati solo semi non batterizzati.

I vasi seminati sono stati posti ad incubare in celle alle seguenti condizioni:

- temperatura 25°C
- umidità relativa 55 %
- fotoperiodo: 18 ore di luce e 6 di buio
- flusso luminoso 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ di fotoni (spettro 400-700 nm)

I dati della germinazione sono stati raccolti a 5, 7, 14, 16 e 18 giorni dopo la semina. I dati relativi alla valutazione della lunghezza del germoglio sono stati raccolti a 46, 65 e 95 giorni dalla data di semina.

Prova 2

Questa prova è stata eseguita nuovamente con lo scopo di valutare quali fossero le adeguate concentrazioni di crusca colonizzata con il fungo patogeno per poter osservare una germinazione sufficiente e per valutare successivamente i sintomi e l'incidenza della malattia sulla pianta.

In questa prova sono state valutate 5 tesi:

- Solo suolo
- Suolo e crusca al 1 %
- Suolo e crusca al 3 %
- Suolo e 1 % (m/m) di crusca colonizzata da *C. circinans*
- Suolo e 3 % (m/m) di crusca colonizzata da *C. circinans*

Per ciascun vaso (10 x 10 x 9 cm) il substrato totale è di 80 g. Per la prima tesi, il substrato era formato da suolo esclusivamente vergine, mentre per le altre sono state utilizzate le fonti di inoculo precedentemente descritte, con le dosi sopracitate.

I semi collocati in ciascun vaso sono 25 suddivisi equamente in 5 righe. In questo caso, sono stati utilizzati solo semi non batterizzati. Per ogni tesi sono state eseguite quattro repliche.

I vasi seminati sono stati posti ad incubare in celle alle seguenti condizioni:

- temperatura 25°C
- umidità relativa 55 %
- fotoperiodo: 18 ore di luce e 6 di buio
- flusso luminoso 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ di fotoni (spettro 400-700 nm)

I dati della germinazione sono stati raccolti a 7, 9 e 16 giorni. I dati relativi alla valutazione della lunghezza dei germogli delle prove sono stati raccolti a 37, 56 e 86 giorni dalla data di semina.

Prova 3: Prova di confronto tra gli attinomiceti

Questa prova è stata fatta con lo scopo di confrontare la reazione della pianta alla crescita in relazione all'applicazione sui semi dell'attinomicete.

In questa prova sono stati valutati 6 ceppi di streptomiceti:

- DEF 07
- DEF 19
- DEF 39
- DEF 48
- DEF 58
- Solo suolo

Per ciascun vaso (10 x 10 x 9 cm) il substrato totale è di 80 g. I semi delle prime 5 tesi sono stati trattati con il relativo attinomicete, mentre l'ultima tesi era formata da suolo esclusivamente vergine.

I semi collocati in ciascuna vaschetta sono 25 suddivisi equamente in 5 righe. In questo caso, sono stati utilizzati solo semi trattati con gli attinomiceti. Per ogni tesi sono state eseguite quattro repliche.

I vasi sono stati posti ad incubare in celle alle seguenti condizioni:

- temperatura 25°C
- umidità relativa 55 %

- fotoperiodo: 18 ore di luce e 6 di buio
- flusso luminoso $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ di fotoni (spettro 400-700 nm)

I dati della germinazione sono stati raccolti a 10, 18, 37 e 68 giorni dalla semina. I dati riguardanti la valutazione della lunghezza della plantula sono stati fatti a 18, 37 e 68 giorni dalla data di semina. I dati riguardanti il diametro dei bulbi sono stati fatti a 106 giorni dalla semina.

Prova 4: Prova di controllo biologico dell'antracnosi della cipolla

Questa prova è stata eseguita con lo scopo di valutare l'interazione tra il patogeno, pianta, crusca e attinomicete per capire se ci fossero delle interazioni positive o negative tra gli agenti.

In questa prova sono state valutate 10 tesi:

- Suolo e crusca al 3 % (A)
- Suolo e crusca al 1 % (B)
- Solo suolo (C)
- Suolo e DEF 48 (D)
- Suolo e 1 % (m/m) di crusca colonizzata da *C. circinans* (E)
- Suolo e 3 % (m/m) di crusca colonizzata *C. circinans* (F)
- Suolo e AGAR "frullato" inoculato con *C. circinans* (G)
- DEF 48 e 1 % (m/m) di crusca colonizzata da *C. circinans* (H)
- DEF 48 e 3 % (m/m) di crusca colonizzata da *C. circinans* (I)
- DEF 48 e AGAR "frullato" inoculato con *C. circinans* (L)

Per ciascun vaso (10 x 10 x 9 cm) il substrato totale è di 80 g. Per le prime due tesi, il substrato era formato da suolo e crusca, la terza da formata da suolo esclusivamente vergine, la quarta da suolo e attinomicete, mentre per le altre sono state utilizzate le fonti di inoculo precedentemente descritte con diverse combinazioni di attinomicete e patogeno alle dosi sopracitate.

I semi collocati in ciascun vaso sono 25 suddivisi equamente in 5 righe. Per ogni tesi sono state eseguite quattro repliche.

I vasi sono stati posti ad incubare in celle alle seguenti condizioni:

- temperatura 25°C
- umidità relativa 55 %
- fotoperiodo: 18 ore di luce e 6 di buio

- flusso luminoso $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ di fotoni (spettro 400-700 nm)

I dati della germinazione sono stati raccolti a 10, 18, 37 e 68 giorni dalla semina. I dati riguardanti la valutazione della lunghezza della plantula sono stati fatti a 18, 37 e 68 giorni dalla data di semina. I dati riguardanti il diametro dei bulbi sono stati rilevati a 106 giorni dalla semina.

3 Risultati

3.1 Crusca inoculata con *C. circinans* X

Per predisporre le prove, è stata necessaria la preparazione della crusca inoculata con il patogeno e della relativa crusca di controllo (non inoculata con il patogeno). Le Figure mostrano la crusca sterile (3.1) e quella inoculata (3.2 e 3.3), entrambe dopo 11 giorni di incubazione nel termostato a temperatura costante di 24°C e controllate periodicamente.

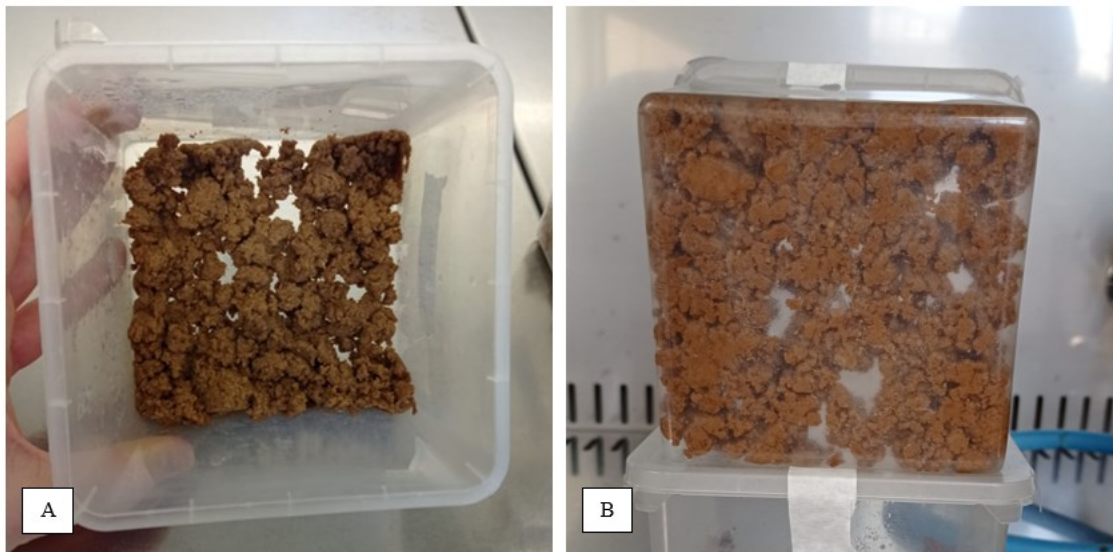


Figura 3.1: Controllo non inoculato di crusca, dopo 11 giorni di incubazione a 24°C, visione dall'alto (A) e dal basso (B).

Come si può osservare in Figura 3.2 e in Figura 3.3, la crescita del patogeno avviene radialmente. Nonostante gli inoculi fossero stati posizionati sulla superficie della crusca, il patogeno riesce a colonizzare in breve tempo sia la porzione superiore che quella sottostante, arrivando al fondo della scatola di crescita.

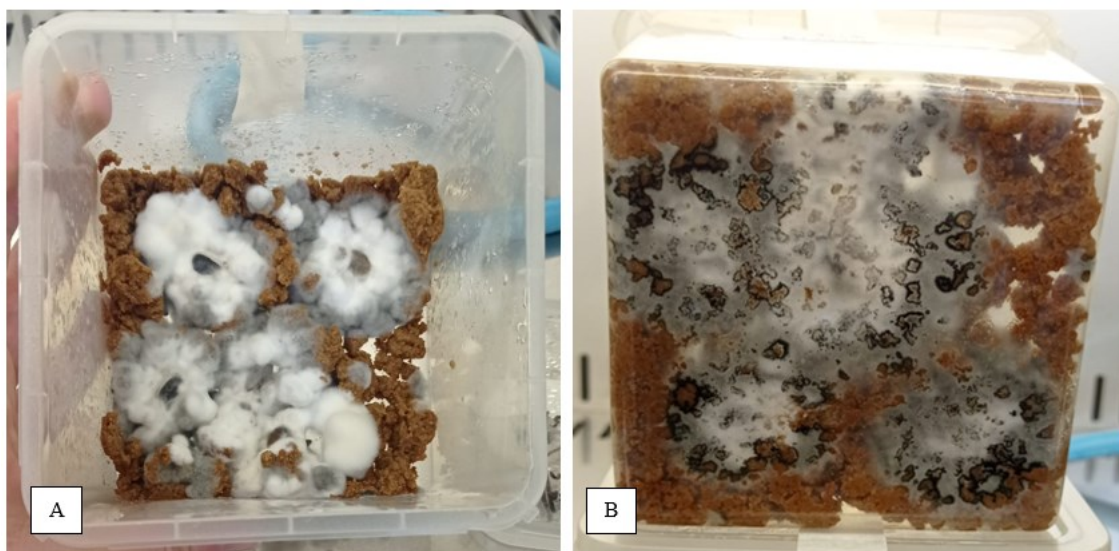


Figura 3.2: Crusca inoculata con *C. circinans* X, dopo 11 giorni di incubazione a 24°C, visione dall'alto (A) e dal basso (B).

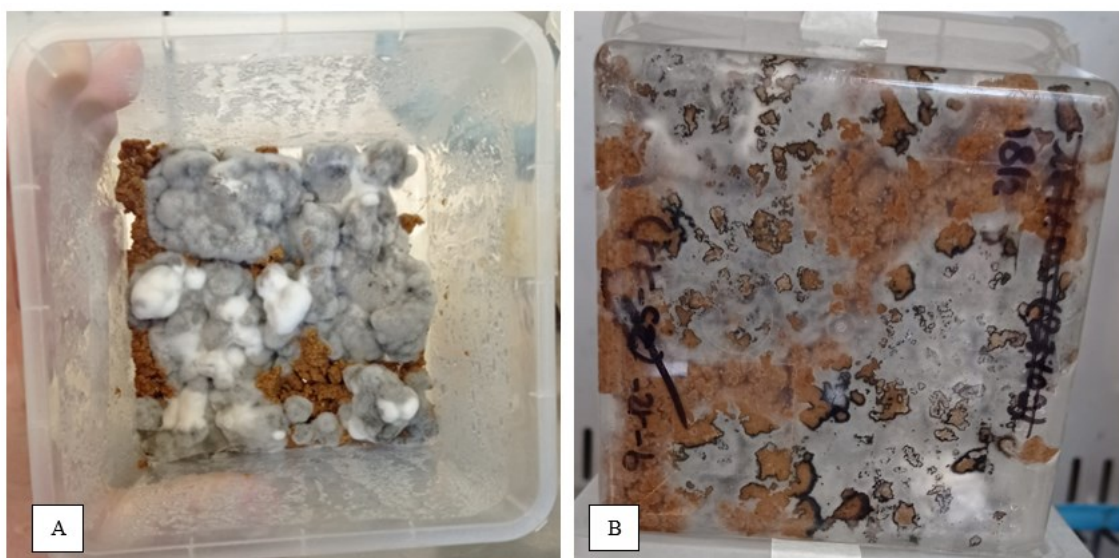


Figura 3.3: Crusca inoculata con *C. circinans* X, dopo 11 giorni di incubazione a 24°C, visione dall'alto (A) e dal basso (B).

3.2 Crescita attinomiceti su differenti substrati colturali

Le piastre sono state utilizzate per verificare innanzitutto la vitalità dei ceppi dopo un periodo di conservazione a bassa temperatura e la formazione delle colonie conferma la loro capacità di iniziare nuovamente il loro ciclo di sviluppo. Inoltre, si è voluto valutare, seppur sommariamente, quale fosse il substrato nel quale avveniva maggiore sporulazione, ai fini di una loro raccolta sufficiente a condurre le prove di laboratorio.

Su substrato CZY (Figura 3.4 - A) la crescita del ceppo DEF 07 è abbastanza contenuta, la produzione di micelio aereo e, quindi di spore, è limitata e ciò lo si deduce facilmente

dall'osservazione visiva della crescita e anche una assenza di colorazione intensa della sua superficie. Diverso è risultato il comportamento del microrganismo su terreno PDA (Figura 3.4 - B): la colonia presenta una superficie polverulenta, rilevata leggermente dalla superficie del substrato, con una colorazione rosa intenso dovuta alla massa delle spore differenziate. Il diverso sviluppo delle colonie su substrati differenti è palese anche per quanto riguarda il ceppo DEF 48 (Figura 3.5) che dimostra una maggior capacità di sviluppo su PDA (B) anziché CZY (A).

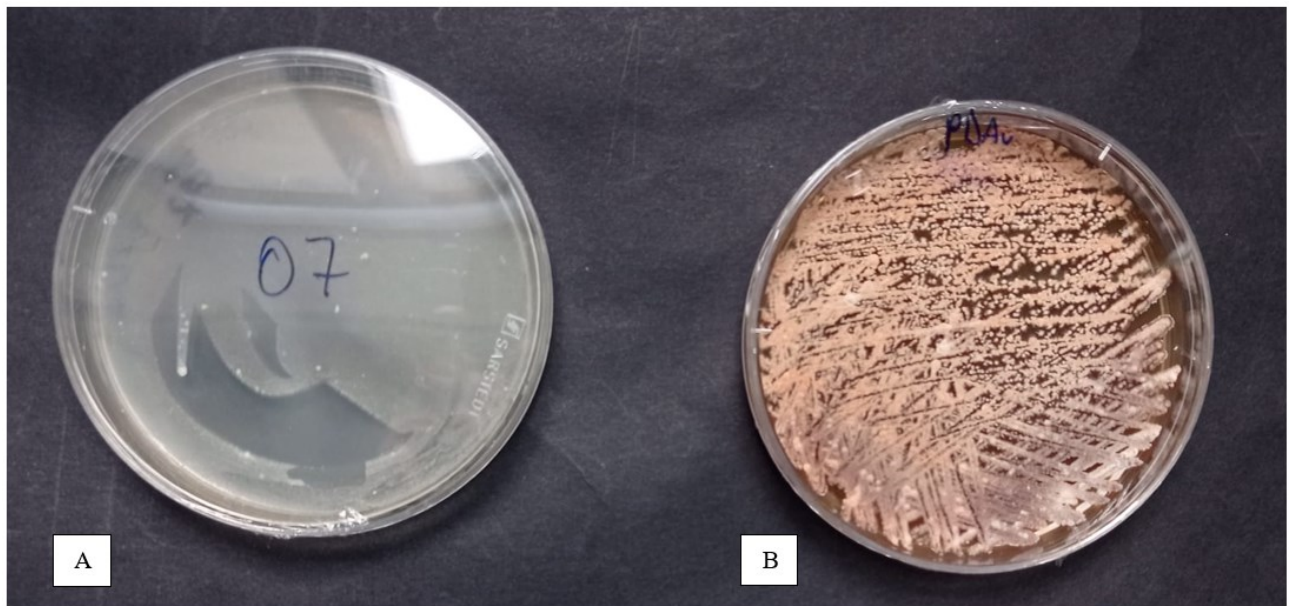


Figura 3.4: Crescita dell'attinomicete DEF 07 su piastra con substrato CZY (A) e PDA (B). La piastra a sinistra è stata inoculata e tenuta in incubazione 22 giorni nella cella a 24°C, mentre la seconda è stata conservata nella medesima cella per 12 giorni.

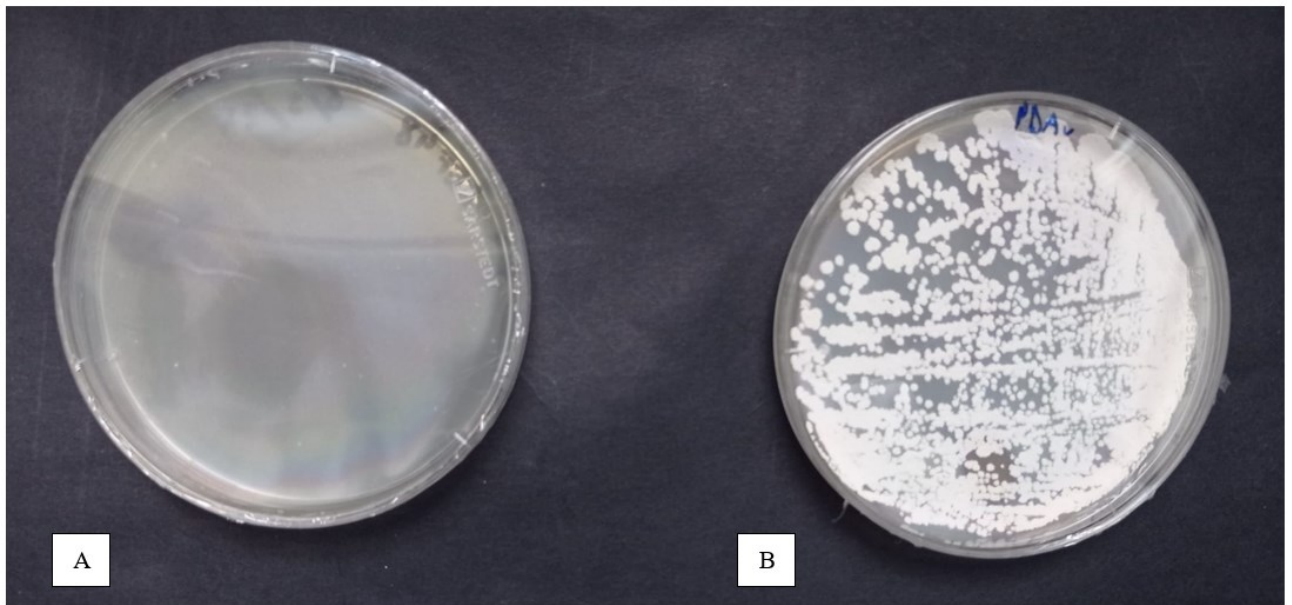


Figura 3.5: Crescita dell'attinomicete DEF 48 su substrato di CZY (A) e PDA (B). La piastra a sinistra è stata inoculata e tenuta in incubazione 22 giorni nella cella a 24°C, mentre la piastra a destra è stata conservata nella medesima cella per 12 giorni.

3.3 Prove di germinazione di semi sterilizzati su carta bibula e in terriccio

Le prove di laboratorio svolte a partire da semi trattati con ipoclorito di sodio e posti su carta bibula per un periodo di 7 giorni, hanno evidenziato che il trattamento eseguito modifica il potere germinativo dei semi sterilizzati. Dal grafico (Figura 3.6) si evince che la germinazione dei semi non sterilizzati risulta variabile: l'83 % dei semi germina dopo 4 giorni dalla semina e raggiunge l'85 % dopo 7 giorni dalla semina. Nel saggio condotto su semi sterilizzati, la percentuale di germinazione dopo 4 giorni dalla semina è del 48 % e raggiunge il 65 % dopo 7 giorni.

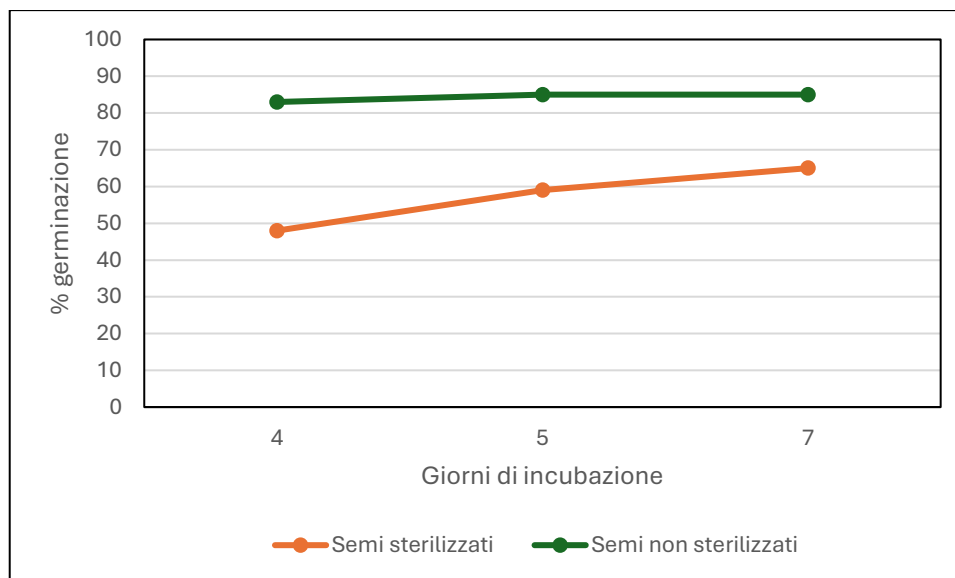


Figura 3.6: Andamento della percentuale di germinazione su carta bibula dei semi di cipolla sterilizzati e non sterilizzati.

Giorni di incubazione	Vitro semi sterilizzati - piastra A	Vitro semi sterilizzati - piastra B	Vitro semi non sterilizzati - piastra A	Vitro semi non sterilizzati - piastra B
4	29	19	41	42
5	33	26	43	42
7	36	29	43	42

Tabella 3.1: Numero di semi germinati suddivisi per ciascuna tesi. I germinati sono stati tenuti in una cella a temperatura costante di 24°C per tutta la durata della prova e controllate dopo 4, 5 e 7 giorni dalla semina.

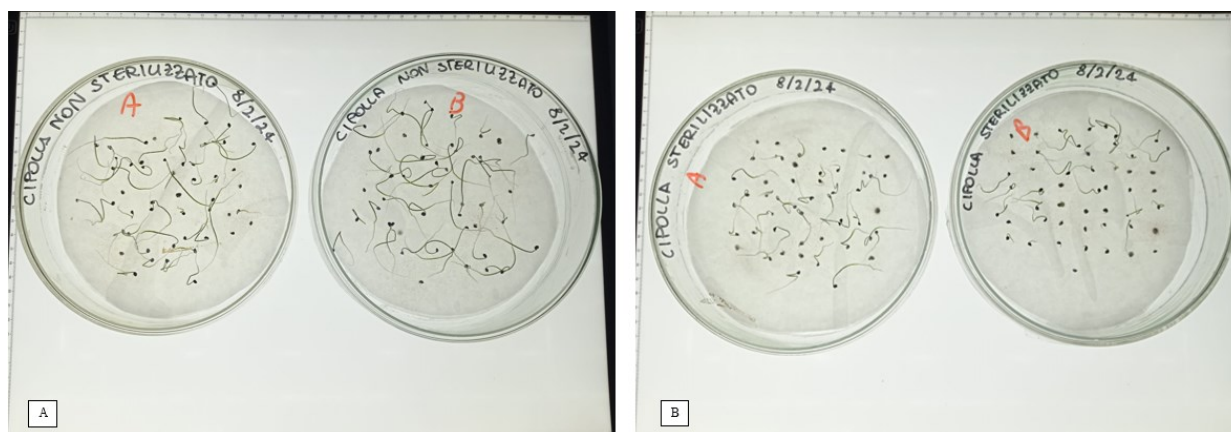


Figura 3.7: Germinazione dei semi di cipolla non sterilizzati (A) e sterilizzati (B) su carta bibula, dopo 7 giorni di incubazione a 24°C.

In modo analogo, sono state condotte delle determinazioni su semi posti in terriccio. Queste hanno permesso di attestare la percentuale di germinazione nell'arco di 22 giorni. Sono state eseguite delle osservazioni periodiche, constatando che il potere germinativo risulta maggiore nei semi sterilizzati che nei semi non sterilizzati. La germinazione dei semi

sterilizzati dopo 2 giorni dalla semina è del 60 % e raggiunge l'82 % dopo 6 giorni. La germinazione dei semi non sterilizzati dopo 2 giorni dalla semina è del 64 %, dopo 6 giorni è del 66 % e raggiunge il 70 % dopo 22 giorni dalla semina (Figura 3.8).

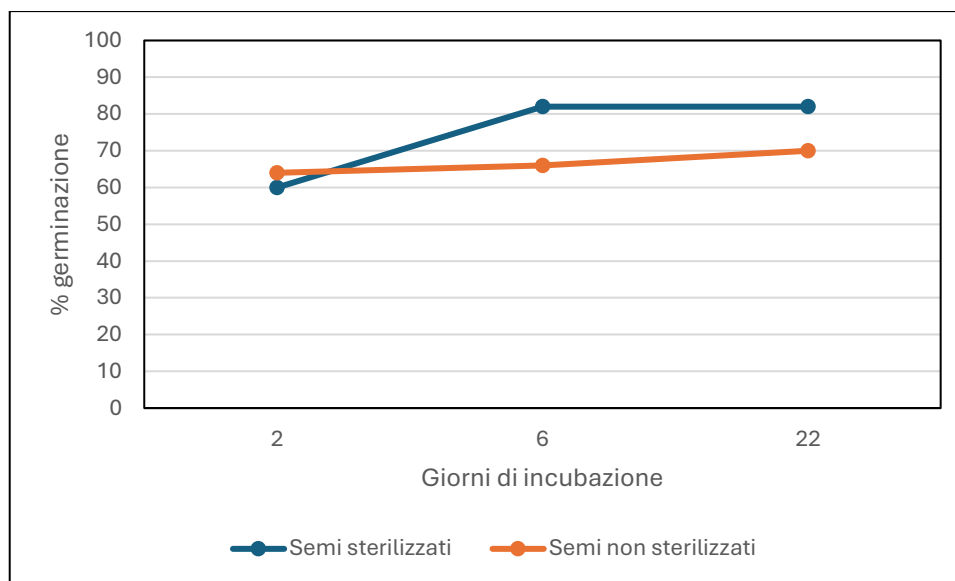


Figura 3.8: Percentuale di germinazione in terriccio dei semi di cipolla sterilizzati e non sterilizzati. Il grafico mostra l'andamento della germinazione percentuale dopo 2, 6 e 22 giorni dalla semina.

giorni di incubazione	In terra semi sterilizzati	In terra semi non sterilizzati
2	30	32
6	41	33
22	41	35

Tabella 3.2: Numero di semi germinati suddivisi per ciascuna tesi. I germinatoi sono stati tenuti in una cella a temperatura costante di 24°C per tutta la durata della prova e controllate periodicamente.



Figura 3.9: Germinazione dei semi di cipolla non sterilizzati (A) e sterilizzati (B) in terriccio, dopo 7 giorni di incubazione a 24°C.

3.4 Prove di confronto tra tesi sane, infette e batterizzate

Nell'ambito delle prove sperimentali sull'influenza della presenza del patogeno *C. circinans* e di suoi potenziali agenti di biocontrollo distribuiti sui semi tramite concia, i confronti tra le differenti tesi si sono basati su differenti parametri acquisiti durante lo sviluppo delle piantine. In particolare, sono stati considerati i seguenti parametri: la germinazione dei semi, l'accrescimento in altezza delle plantule ed, esclusivamente per la Prova 3 e la Prova 4, sono stati misurati anche il diametro dei bulbi delle cipolle e la mortalità delle plantule. Di seguito saranno commentate le singole prove condotte.

3.5 Prova 1

La prima prova condotta ha mostrato il legame tra l'accrescimento della pianta in relazione alla presenza di crusca e crusca inoculata con il patogeno. Come si evince dal grafico (Figura 3.10), tutte e quattro le tesi mostrano una germinazione che può essere considerata stabile dopo 14 giorni dalla semina.

Osservando i dati relativi agli ultimi giorni di osservazioni, si nota una maggiore germinabilità dei semi presenti nel solo suolo o nel suolo addizionato con crusca sterile. La percentuale di germinazione si attesta all'80 % nel controllo, mentre nelle tesi inoculate con il patogeno a più bassa concentrazione risulta del 74 %, riducendosi fino al 60 % nella tesi in cui al suolo era stato aggiunto il 5 % di inoculo fungino. Anche il substrato contenente

suolo e 5 % di crusca sterile mostra una germinazione di cipolle ridotta rispetto al controllo, aggirandosi intorno al 64 %, percentuale molto vicina alla tesi con il patogeno inoculato in maggior quantità. Nella Tabella 3.3 vengono riportati i valori medi dei semi germinati.

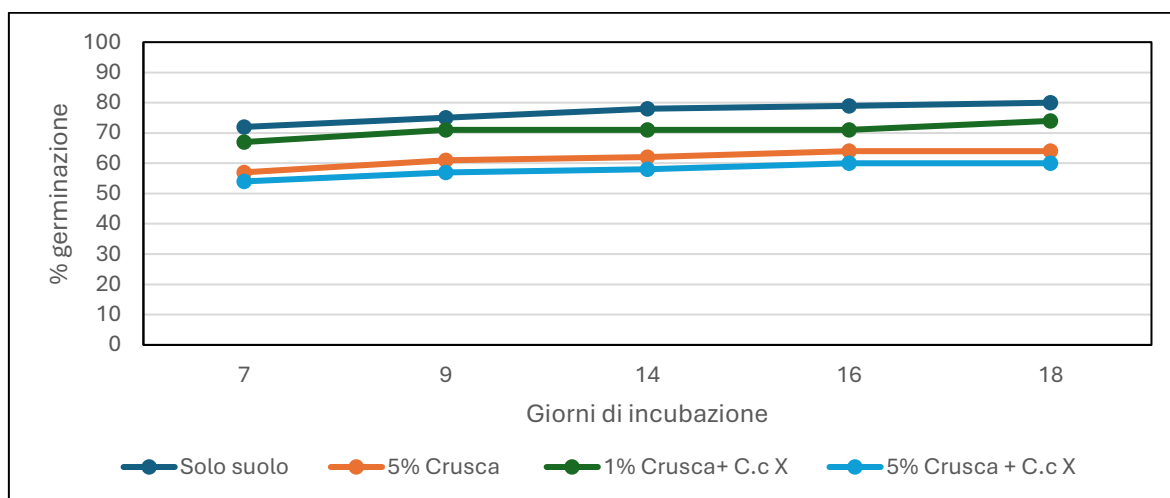


Figura 3.10: Percentuale di germinazione dei semi di cipolla con diversi rapporti crusca-patogeno durante il corso della Prova 1. Il grafico mostra l'andamento della germinazione percentuale.

giorni di incubazione	Solo suolo		Crusca 5%		1% Crusca+ C.c X		5% Crusca + C.c X	
7	36	± 0.00	28.5	± 0.71	33.5	± 0.71	27	± 1.41
9	37.5	± 0.71	30.5	± 0.71	35.5	± 2.12	28.5	± 2.12
14	39	± 1.41	31	± 1.41	35.5	± 2.12	29	± 1.41
16	39.5	± 2.12	32	± 2.83	35.5	± 2.12	30	± 1.41
18	40	± 2.83	32	± 2.83	37	± 4.24	30	± 1.41

Tabella 3.3: Numero medio di semi germinati suddivisi per tesi. Le tesi sono state tenute in una cella a temperatura costante di 24°C per tutta la durata della prova e controllate periodicamente.

Al termine della prova sono state mantenute le piante non inoculate col patogeno per monitorare la loro crescita per tempi più lunghi.

Nella Figura 3.11, è rappresentato il grafico che mostra l'andamento delle lunghezze dei germogli in funzione dei giorni di incubazione nelle tesi sane. In tutte e quattro le prove, fino al giorno 65, la lunghezza delle plantule aumenta. Successivamente, la prima tesi, "Solo suolo A", diminuisce a causa della scomparsa delle foglie più vecchie. L'altezza delle plantule non risulta influenzata in maniera particolarmente negativa dalla presenza di crusca, anche se le misure dei germogli delle plantule nel suolo con crusca al 5 % risultano leggermente inferiori rispetto alle tesi di controllo. I germogli posti nel suolo vergine raggiungono, rispettivamente nella replica A e B, una lunghezza di 35.32 ± 5.44 cm e 39.03 ± 5.54 cm. I germogli nella tesi con crusca 5 %, replica A, raggiungono al giorno 95 una

lunghezza di 35.04 ± 2.83 cm, mentre nella replica B, allo stesso giorno, i germogli raggiungono una lunghezza di 32.9 ± 5.79 cm.

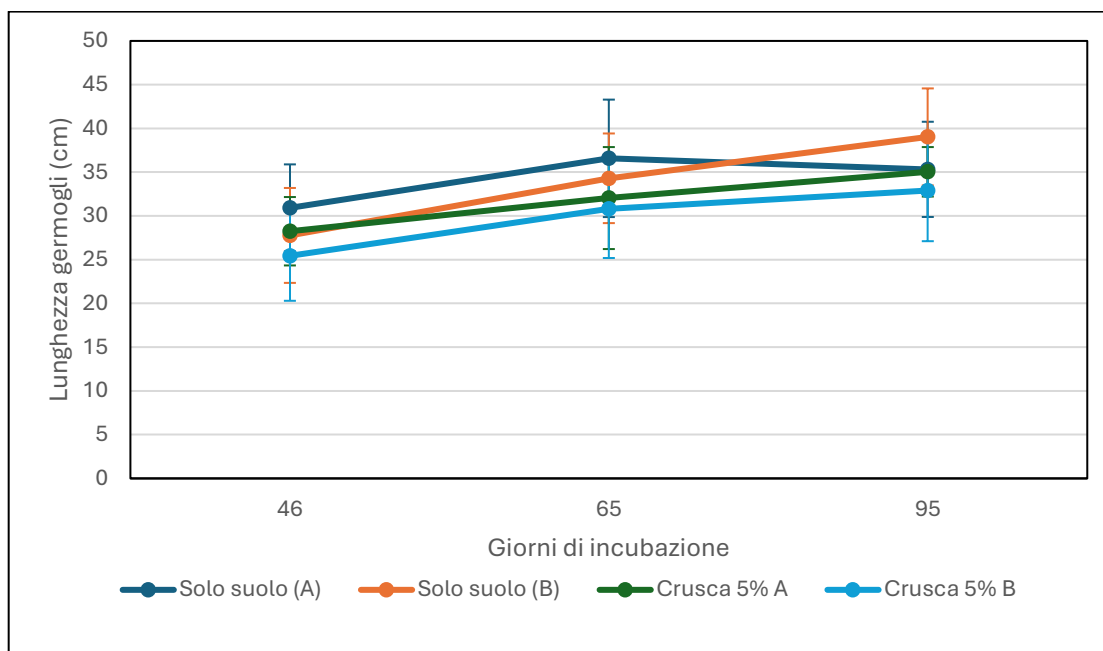


Figura 3.11: Grafico dell'andamento medio delle lunghezze dei germogli di cipolla rilevate durante la Prova 1.

giorni di incubazione	Solo suolo (A)		Solo suolo (B)		Crusca 5% A		Crusca 5% B	
46	30.92	± 4.97	27.77	± 5.42	28.25	± 3.91	25.44	± 5.14
65	36.58	± 6.71	34.3	± 5.12	32.04	± 5.83	30.82	± 5.63
95	35.32	± 5.44	39.03	± 5.54	35.04	± 2.83	32.90	± 5.79

Tabella 3.4: Altezze medie delle plantule di cipolla durante i giorni di incubazione. I dati della tabella sono espressi in cm.

3.6 Prova 2

Nel grafico in Figura 3.12, viene riportata la germinazione dei semi di cipolla valutata nel corso di questa prova. È possibile osservare che, a esclusione della tesi con 1 % di crusca colonizzata da *C. circinans* che rimane costante durante i 16 giorni di incubazione, le altre tesi aumentano la propria percentuale di germinazione. I semi posti a germinare in suolo e crusca sterile al 3 % hanno germinato con valori compresi tra 70 e 79 % mentre quelli seminati in substrato inoculato con il patogeno hanno mostrato una variazione percentuale meno ampia, tra 73 e 75 %. Il valore della percentuale dei semi germinati posti solo in suolo è 75 %.

Dal grafico si rileva la scarsa influenza che la crusca e il patogeno hanno sulla capacità di germinazione: nel grafico è possibile notare che tutti i germogli, al termine del periodo della

rilevazione, mostrano una percentuale di germinazione sufficientemente elevata, compresa tra il 70 % e 80 %.

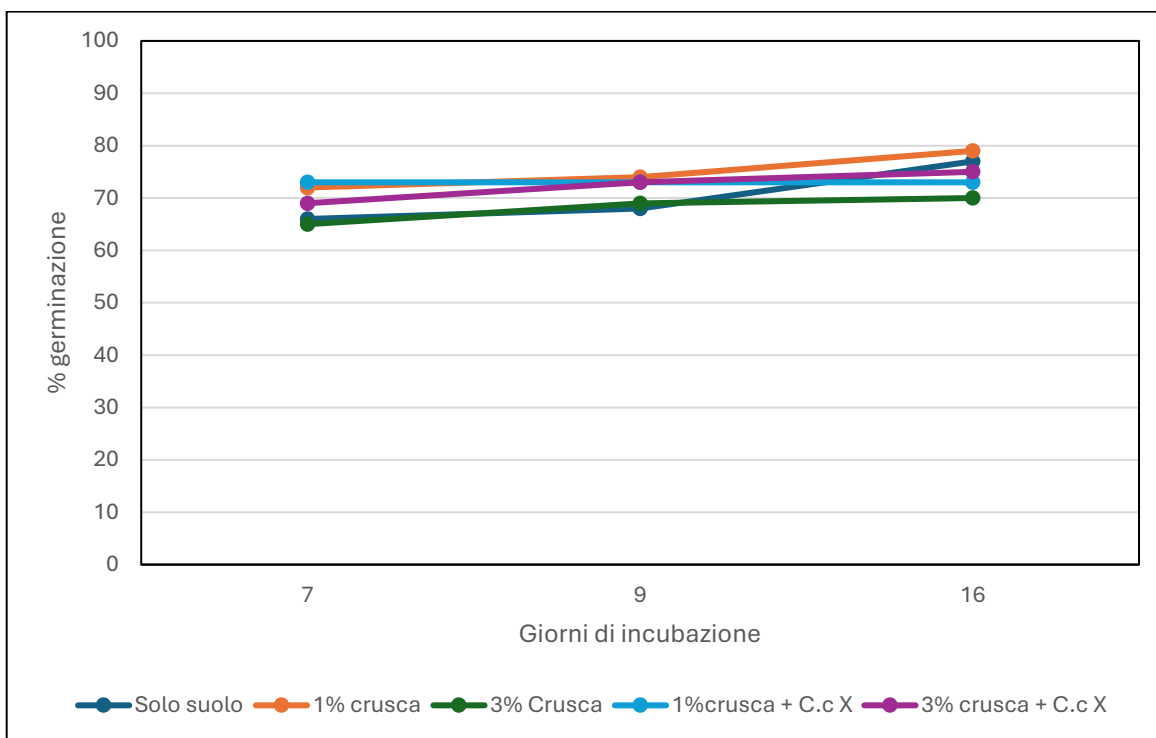


Figura 3.12: Percentuale di germinazione dei semi di cipolla con diversi rapporti crusca-patogeno durante il corso della Prova 2. Il grafico mostra l'andamento della germinazione percentuale.

giorni di incubazione	Solo suolo		1% crusca		3% Crusca		1%crusca + C.c X		3% crusca + C.c X	
7	16.50	± 2.38	18.00	± 2.16	16.25	± 0.96	18.25	± 2.06	17.25	± 1.89
9	17.00	± 2.58	18.50	± 3.32	17.25	± 0.96	18.25	± 2.06	18.25	± 2.63
16	19.25	± 2.22	19.75	± 2.99	17.50	± 1.00	18.25	± 2.06	18.75	± 3.40

Tabella 3.5: Numero medio di semi germinati suddivisi per tesi. Le tesi sono state tenute in una cella a temperatura costante di 24°C per tutta la durata della prova e controllate periodicamente.

Come per la Prova 1, anche in questo caso le sole tesi non inoculate col patogeno sono state mantenute al fine di verificare eventuali sviluppi delle piantine tra le varie condizioni a confronto.

Il grafico in Figura 3.13 mostra l'andamento della lunghezza dei germogli durante un periodo di incubazione di 86 giorni. Tutte le piante mostrano un andamento di costante crescita.

Per quanto riguarda i dati sulle altezze delle plantule, la quantità di crusca non sembra aver influito sull'accrescimento. I germogli posti in suolo sano raggiungono, al giorno 86, una lunghezza di 34.93 ± 5.69 cm, mentre i semi posti nel suolo addizionato a crusca alla concentrazione del 1 % e 3 %, raggiungono nel medesimo giorno rispettivamente la lunghezza di 35.98 ± 4.34 cm e 37.90 ± 3.75 cm. I germogli posti nel suolo e crusca

colonizzata da *C. circinans* alla concentrazione del 1 % raggiunge al giorno 86 la lunghezza di 38.42 ± 4.9 cm, mentre le repliche colonizzate da *C. circinans* alla concentrazione del 3 %, raggiungono le lunghezze di 36.82 ± 2.64 cm e 35.95 ± 8.43 cm.

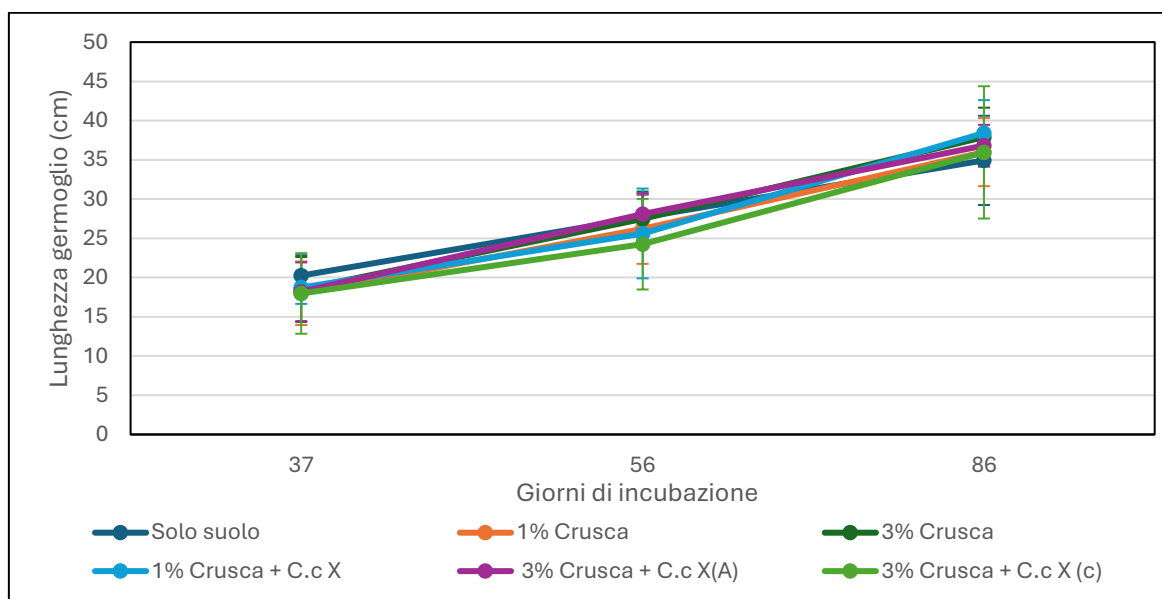


Figura 3.13: Andamento medio delle lunghezze dei germogli di cipolla rilevate durante la Prova 2.

giorni incubazione	Solo suolo	1% Crusca	3% Crusca	1% Crusca + C.c X	3% Crusca + C.c X(A)	3% Crusca + C.c X (c)
37	20.25 ± 2.60	18.00 ± 4.05	18.48 ± 4.14	18.73 ± 2.08	18.19 ± 3.74	17.97 ± 5.13
56	27.70 ± 2.86	26.22 ± 4.48	27.46 ± 3.50	25.62 ± 5.73	28.10 ± 2.65	24.25 ± 5.77
86	34.93 ± 5.69	35.98 ± 4.34	37.90 ± 3.75	38.42 ± 4.19	36.82 ± 2.64	35.95 ± 8.43

Tabella 3.6: Andamento medio delle lunghezze dei germogli di cipolla rilevate durante la Prova 2. I dati della tabella sono espressi in cm.

A seguito delle osservazioni tratte dai grafici della Prova 2, sono state eseguite delle considerazioni sulle quantità percentuali di crusca che sono diventate la premessa per lo svolgimento della prova di controllo biologico.

3.7 Prova 3: Prova di confronto tra i ceppi di attinomiceti

Il grafico in Figura 3.14 mostra la percentuale di germinazione dei semi di cipolla in relazione al tempo di incubazione. È stato osservato che il procedimento di batterizzazione con i diversi ceppi di attinomiceti non modifica il potere germinativo dei semi, che infatti mantengono una variabilità germinativa piuttosto elevata, compresa tra il 90 e 95 %. Dopo i primi 37 giorni di incubazione, la germinabilità dei semi nelle differenti tesi non varia ulteriormente. Nella Tabella 3.7 vengono riportati i valori medi dei semi germinati.

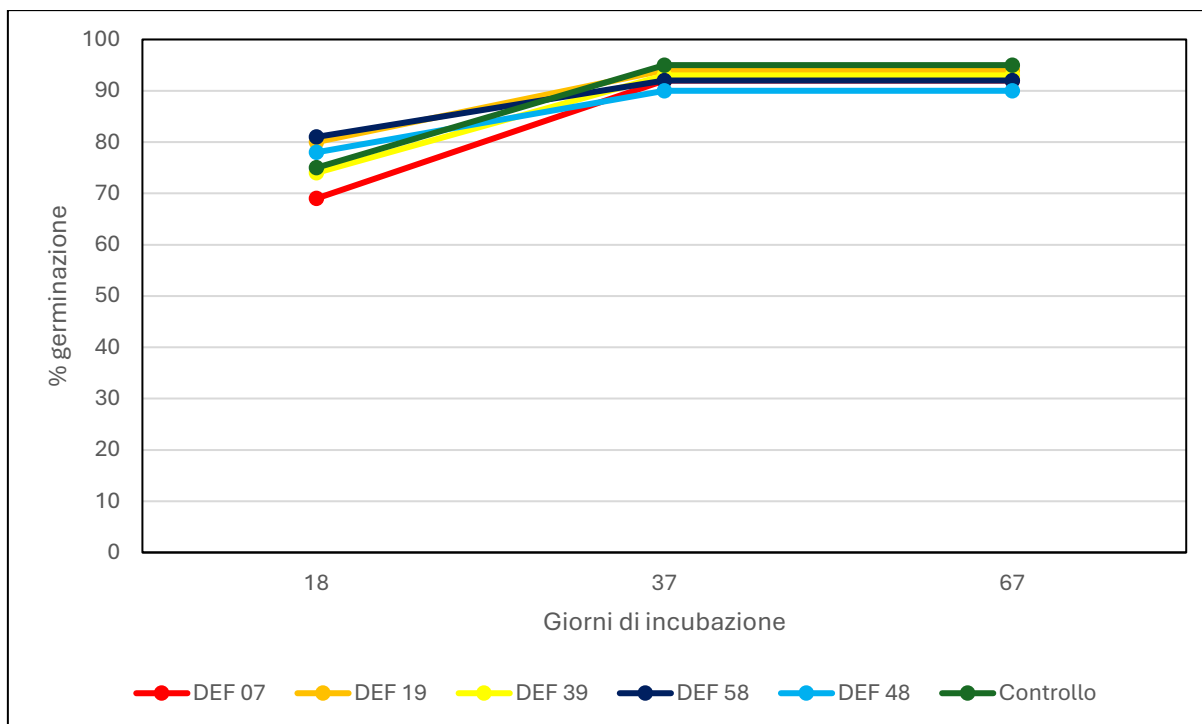


Figura 3.14: Andamento della germinazione dei semi posti in terriccio con differenti attinomiceti utilizzati. Le tesi sono state conservate ad una temperatura costante di 24°C.

giorni di incubazione	DEF 07	DEF 19	DEF 39	DEF 48	DEF 58	Controllo
18	17.25 ± 1.50	20.00 ± 1.83	18.50 ± 1.91	19.50 ± 2.08	20.25 ± 2.36	18.75 ± 1.26
37	23.00 ± 0.82	23.50 ± 1.00	23.25 ± 1.26	22.50 ± 1.00	23.00 ± 0.82	23.75 ± 1.26
67	23.00 ± 0.82	23.50 ± 1.00	23.25 ± 1.26	22.50 ± 1.00	23.00 ± 0.82	23.75 ± 1.26

Tabella 3.7: Numero medio di semi germinati suddivisi a seconda dell'attinomicete utilizzato.

Il grafico in Figura 3.15 riporta la lunghezza espressa in centimetri delle plantule nel tempo. Le plantule crescono fino al giorno 37 di incubazione, per poi diminuire. I germogli appartenenti al controllo sano mostrano una lunghezza maggiore rispetto alle altre plantule. In base a quanto riporta il grafico, la batterizzazione sembra influire sull'accrescimento delle piante, rallentandone il ciclo vitale. Il controllo ha, infatti, una lunghezza dei germogli molto maggiore rispetto alle tesi trattate con i diversi attinomiceti, raggiungendo 24.58 ± 3.97 cm di lunghezza. L'attinomicete che meno influisce sulla lunghezza delle plantule è il DEF 07, che le rende di lunghezza paragonabile a quella del controllo a 67 giorni dopo la semina, con una lunghezza di 23.63 ± 4.70 cm. I ceppi di streptomiceti DEF 19 e DEF 58 hanno influito maggiormente sull'accrescimento delle plantule, rendendo i germogli più corti, rispettivamente di 14.21 ± 3.19 cm e 12.81 ± 2.93 cm. Nella Tabella 3.8 vengono riportati i valori medi delle lunghezze dei germogli nel tempo.

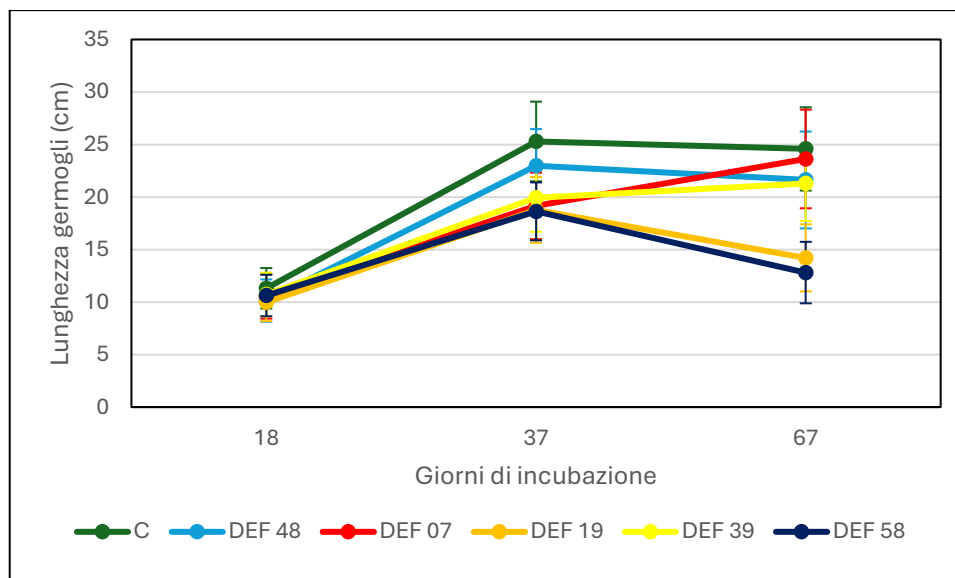


Figura 3.15: Andamento medio delle lunghezze dei germogli di cipolla rilevate durante la prova di confronto tra gli attinomiceti. Dati espressi in cm.

giorni di incubazione	C		DEF 48		DEF 07		DEF 19		DEF 39		DEF 58	
18	11.31	± 1.93	10.14	± 2.01	10.54	± 2.12	9.98	± 1.80	10.72	± 2.08	10.62	± 1.98
37	25.29	± 3.79	22.98	± 3.49	19.16	± 3.17	18.77	± 3.12	19.92	± 3.23	18.63	± 2.76
67	24.58	± 3.97	21.62	± 4.61	23.63	± 4.70	14.21	± 3.19	21.29	± 3.57	12.81	± 2.93

Tabella 3.8: Andamento medio delle lunghezze dei germogli di cipolla rilevate durante la prova di confronto tra i ceppi di attinomiceti. I dati della tabella sono espressi in cm.

Nella Tabella 3.9 vengono riportati i casi di significatività che sono stati rilevati tramite il t-test di Student eseguito tramite software Excel. I valori sono stati divisi in due gradi di significatività e identificati nella tabella nel seguente modo:

- *: $0.01 < p < 0.05$, differenza statisticamente significativa

- **: $p < 0.01$, differenza statisticamente molto significativa

Dopo 18 giorni dalla semina dei semi di cipolla, le lunghezze dei germogli dei semi di cipolla batterizzati con DEF 19 e DEF 48 risultano significativamente inferiori rispetto a quelle del controllo. Al giorno 37, sono significative tutte le differenze osservate tra il controllo e il trattamento con gli attinomiceti, ma anche tra l'attinomicete DEF 48 e ciascun attinomicete. Al giorno 67, risultano significative tutte le differenze in lunghezza osservate tra il controllo e i trattamenti con gli attinomiceti ad eccezione del DEF 07 i cui germogli aumentano in lunghezza e dunque perdono significatività statistica in combinazione con la tesi di controllo. Si nota che il trattamento con i ceppi di attinomiceti DEF 19 e DEF 58 porta ad una lunghezza dei germogli statisticamente inferiore rispetto agli altri attinomiceti e al controllo (dal

grafico, si può notare, in effetti, lo scarto particolarmente significativo che raggiungono i germogli in lunghezza rispetto alle altre tesi).

	Giorni della rilevazione		
Grado di significatività (p-value)	18	37	67
* 0.05 < p < 0.01	-	-	DEF 07-DEF 39 DEF 19-DEF 58
** p < 0.01	C-DEF 19 C-DEF 48	C-DEF 07 C-DEF 48 C-DEF 19 C-DEF 39 C-DEF 58 D-DEF 07 D-DEF 19 D-DEF 39 D-DEF 58	C-DEF 48 C-DEF 19 C-DEF 39 C-DEF 58 D-DEF 19 D-DEF 58 DEF 07-DEF 19 DEF 07-DEF 58 DEF 19-DEF 39 DEF 39-DEF 58

Tabella 3.9: Significatività ottenuta tramite t-Test di Student (*: $0.05 < p < 0.01$; **: $p < 0.01$). Nella tabella vengono riportate le combinazioni che hanno mostrato un p-value significativo, suddivise in base al grado di significatività e al giorno della rilevazione (18, 37 e 67 giorni dopo la semina).

Il grafico in Figura 3.16 mostra l'andamento delle percentuali di plantule morte durante la prova di confronto tra gli attinomiceti. Si nota che negli ultimi giorni di rilevazioni, la prova che ha mostrato una maggior influenza negativa sulla sopravvivenza delle piante è l'attinomicete DEF 07, la cui mortalità arriva al 40 %. Dal grafico si evince che l'attinomicete DEF 58 è quello che presenta il valore minore di mortalità (23 %).

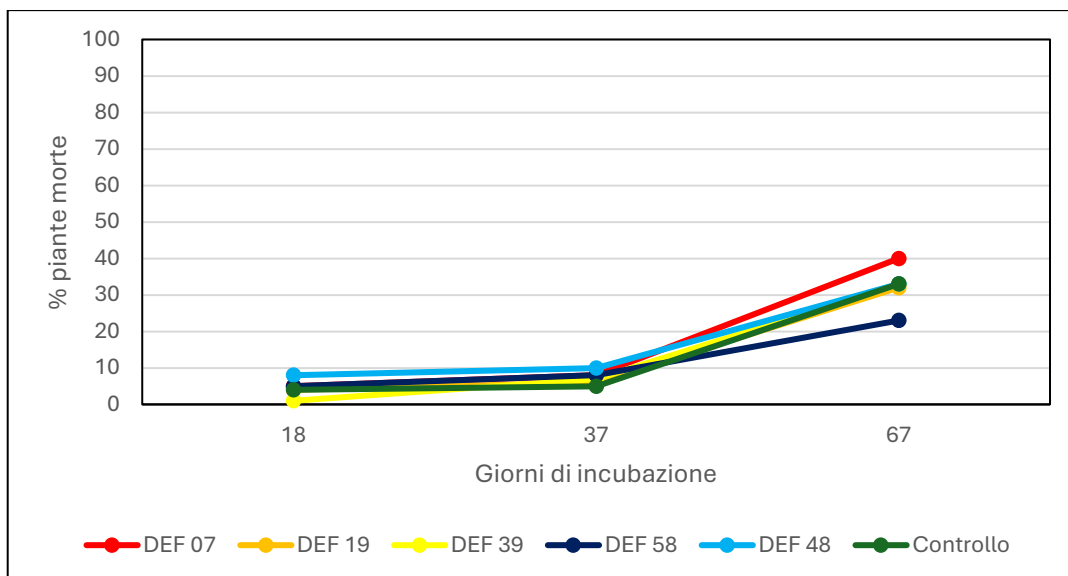


Figura 3.16: Grafico dell'andamento delle percentuali delle plantule di cipolla morte rilevate nel corso della prova di controllo di attinomiceti.

Nel grafico in Figura 3.17 è riportata la percentuale di bulbi appartenenti ad ogni tesi suddivisa per classe diametrica (espressa in millimetri). Dal grafico si evince che ci sono tre classi diametriche comuni a tutte le tesi: 2-4 mm, 4-6 mm e 6-8 mm.

La Figura 3.17 riporta la suddivisione dei bulbi per classe diametrica e per tesi. La Tabella 3.10 mostra che la classe diametrica con maggior numero di bulbi è la classe 3 (da 4 a 6 mm). Dalla Tabella 3.10 si evidenzia la tesi che mostra un maggior numero di bulbi, risulta essere la tesi batterizzata con il DEF 58. La tesi batterizzata con il ceppo DEF 48 ha una suddivisione delle classi diametriche simile a quelle del controllo sano.

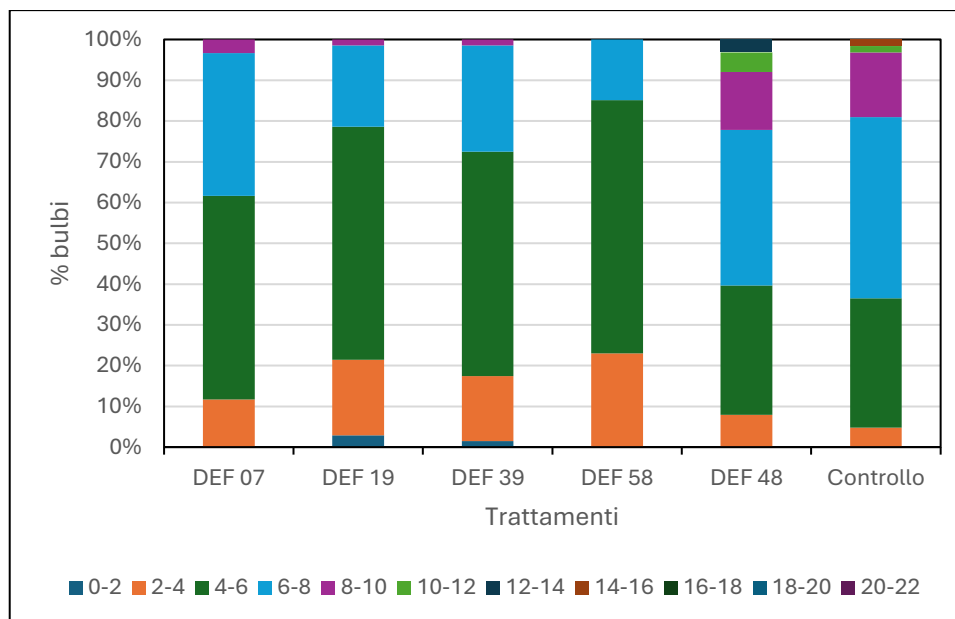


Figura 3.17: Suddivisione dei bulbi raccolti di ciascuna tesi a confronto, per ogni classe di diametro considerata. Dati espressi come percentuale sul numero di bulbi raccolti.

classi di diametro (mm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22	
tesi:												
DEF 07	0	7	30	21	2	0	0	0	0	0	0	Totale riga (n°)
DEF 19	2	13	40	14	1	0	0	0	0	0	0	60
DEF 39	1	11	38	18	1	0	0	0	0	0	0	70
DEF 58	0	17	46	11	0	0	0	0	0	0	0	69
DEF 48	0	5	20	24	9	3	2	0	0	0	0	74
Controllo	0	3	20	28	10	1	0	1	0	0	0	63
Totale colonna (n°)	3	56	194	116	23	4	2	1	0	0	0	399

Tabella 3.10: Numero di bulbi suddivisi per ciascuna classe diametrica. Dati espressi in millimetri.

3.8 Prova 4: prova di controllo biologico in pianta

Nella Tabella 3.11 viene riportata schematicamente la composizione delle 10 tesi.

Tesi	Controllo (suolo)	Crusca 1%	Crusca 3%	<i>C.</i> <i>circinans</i> 1%	<i>C.</i> <i>circinans</i> 3%	AGAR frullato	DEF 48
A			X				
B		X					
C	X						
D							X
E				X			
F					X		
G						X	
H				X			X
I					X		X
L						X	X

Tabella 3.11: la tabella riporta schematicamente i componenti utilizzati per ciascuna tesi.

Nel grafico in Figura 3.18 - A è riportata la percentuale di germinazione dei semi durante la prova. L'attinomicete utilizzato per questa prova è il DEF 48. È possibile osservare che i semi delle tesi non inoculate con il patogeno (A, B, C e D) hanno una germinazione scalare per un periodo più lungo nel tempo. Nelle tesi non inoculate i semi hanno una variabilità di germinazione spiccatamente superiore rispetto alle altre tesi, con valori compresi tra il 90 e il 95 %. La tesi D conferma che la batterizzazione con l'attinomicete non influenza la germinabilità dei semi.

I semi della tesi di controllo, dopo 37 giorni dalla semina, raggiungono una germinazione del 95 %, mentre i semi delle tesi inoculate con il patogeno, E, F e G, tendono ad avere una germinazione inferiore, rispettivamente del 71 %, 79 % e 78 %.

Nelle tesi H e L, il cui substrato è inoculato con il patogeno e presenta i semi batterizzati, i semi di cipolla risultano avere una germinabilità di poco inferiore ai semi presenti nei substrati non inoculati con il patogeno, a riprova dell'effettiva presenza e attività dell'attinomicete in contrasto con l'azione del patogeno. Infatti, nella tesi H ed L, i semi mostrano una percentuale di germinazione rispettivamente del 84 % e del 80 %. Le tesi che mostrano una germinabilità drasticamente inferiore al controllo sono le tesi E e I, i cui valori

sono rispettivamente del 71 % e 67 %. Di seguito vengono riportati dei grafici che mostrano le dinamiche riguardanti la germinabilità dei semi di cipolla nel corso della prova di controllo biologico.

Vengono riportati di seguito i grafici che sono stati elaborati in modo da permettere la lettura agevolata delle combinazioni di tesi simili che avessero dei punti comuni da analizzare, come le diverse quantità di crusca utilizzata o la batterizzazione dei semi di cipolla con gli attinomiceti.

Nella Figura 3.18 - B, sono poste a confronto le tesi dove non è stato inoculato il patogeno. Si osserva che nessuna delle due concentrazioni di crusca influenza in maniera negativa la percentuale di germinazione, che rimane in un intervallo molto vicino a quello del controllo sano.

Nella Figura 3.18 - C, vengono messe in relazione le tesi inoculate con il patogeno. In particolare, si evince che il potere germinativo in percentuale dei semi nelle tesi con il patogeno, sia inferiore rispetto al controllo sano, la cui germinabilità è maggiore di 16 punti percentuale. La tesi con minor germinabilità del grafico è la E.

Nella Figura 3.18 - D, vengono mostrate le tesi inoculate con il patogeno e batterizzate. Si evince che la tesi I risulta quella più influenzata nella sua capacità di germinazione. Nelle tesi H e L, seppur i semi mostrino un potere germinativo ridotto, la percentuale di germinabilità si avvicina maggiormente ai valori del controllo sano, nonostante 10 punti percentuale di scarto.

Nella Figura E, è possibile osservare che i semi batterizzati mostrano un potere germinativo molto superiore (84 %) rispetto a quelli non batterizzati (71 %). Nella Figura 3.18 - F, il grafico mostra che la tesi batterizzata presenta un potere germinativo molto inferiore (67 %) rispetto alla tesi senza il trattamento (79 %). Infine, nel grafico in Figura 3.18 - G, notiamo che le tesi sono quasi sovrapposte, dove la tesi batterizzata presenta un valore di 80 % e quella non batterizzata del 78 %. Nella Tabella 3.12 sono riportati i valori medi dei semi germinati.

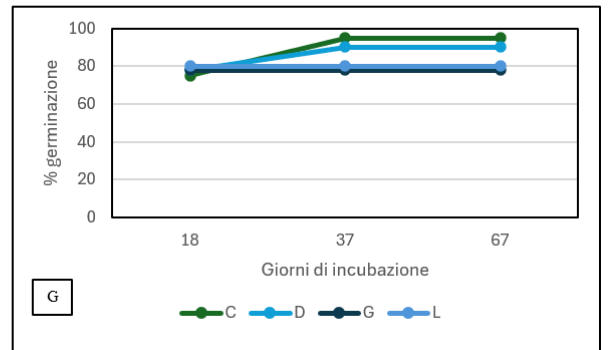
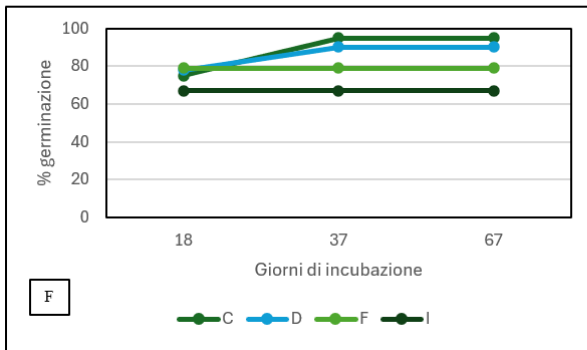
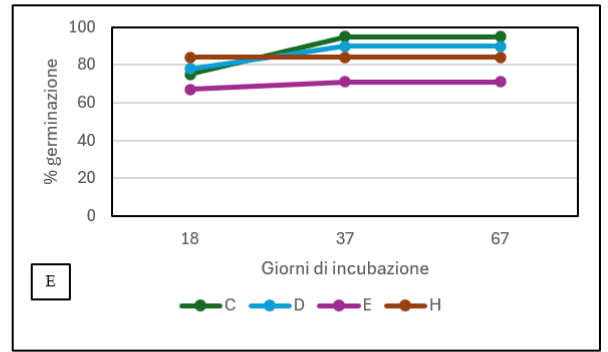
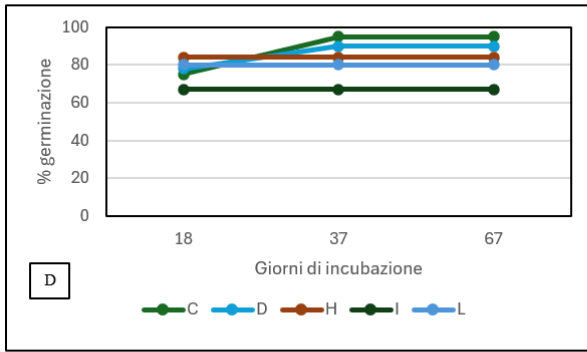
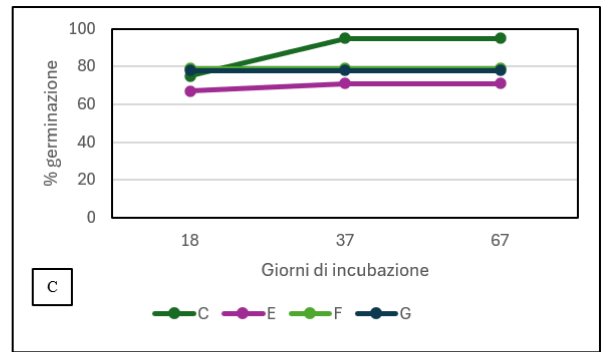
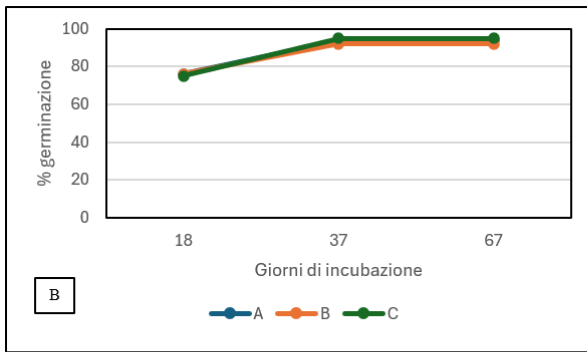
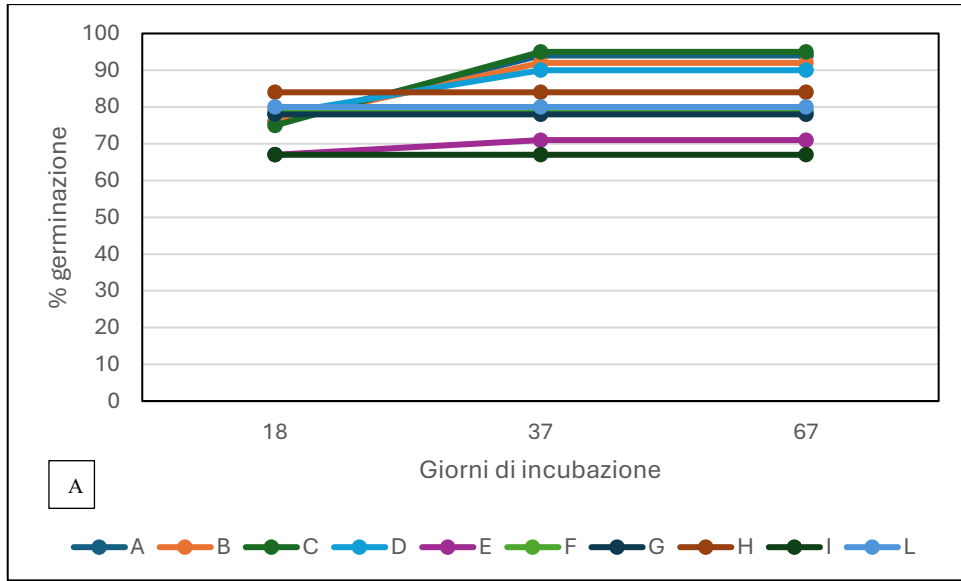


Figura 3.18: Andamento della di germinazione dei semi posti in terriccio trattato con differenti concentrazioni di crusca e con il patogeno. Le tesi sono state conservate a temperatura costante di 24°C.

giorni di incubazione	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L
18	19.00 ± 1.83	19.00 ± 2.16	18.75 ± 1.26	19.50 ± 2.08	16.75 ± 0.96	19.75 ± 1.26	19.50 ± 1.73	21.00 ± 1.63	16.75 ± 2.75	20.00 ± 2.45
37	23.50 ± 1.73	23.00 ± 0.82	23.75 ± 1.26	22.50 ± 1.00	17.75 ± 2.50	19.75 ± 1.26	19.50 ± 1.73	21.00 ± 1.63	16.75 ± 2.75	20.00 ± 2.45
67	23.50 ± 1.73	23.00 ± 0.82	23.75 ± 1.26	22.50 ± 1.00	17.75 ± 2.50	19.75 ± 1.26	19.50 ± 1.73	21.00 ± 1.63	16.75 ± 2.75	20.00 ± 2.45

Tabella 3.12: Numero medio delle quattro repliche di semi germinati suddivisi per tesi. Le tesi sono state tenute in una cella a temperatura costante di 24°C per tutta la durata della prova e controllate periodicamente.

Nel grafico in Figura 3.19 - A è riportato il confronto dell'andamento in lunghezza delle plantule di cipolla riportate in centimetri. Il grafico mostra tutte le tesi svolte nella prova di controllo biologico. È possibile notare che le tesi crescono con tendenze differenti fino al giorno 37 e ad esclusione di due tesi (I e L) le altre diminuiscono o rimangono pressoché costanti.

È osservabile la differenza tra le tesi sane, con lunghezze delle plantule dai 25 ai 28 cm, dalle tesi inoculate e batterizzate, che presentano lunghezze comprese tra 22 e 23 cm e infine alle tesi unicamente inoculate con il patogeno, con lunghezze dai 19 ai 20 cm. La presenza del patogeno influisce negativamente sull'accrescimento in altezza delle plantule. Dal grafico si evince che nelle plantule derivanti da semi batterizzati e inoculati, l'effetto di riduzione dell'altezza viene in parte contrastato.

In Figura 3.19 - A, si osserva che in tutte le tesi la lunghezza delle piante di cipolla raggiunge un picco massimo e poi decresce. Come riportato nel capitolo "Materiali e metodi", le misure sulle altezze delle plantule sono state eseguite prendendo sempre le foglie vegetanti più lunghe: in questo modo, durante il ciclo vegetativo, le foglie più vecchie seccando, lasciavano posto a foglie più giovani ma di lunghezza minore.

Nella Figura 3.19 - B, vengono poste a confronto le tesi sane e si evince che la capacità di accrescimento della pianta non risulta particolarmente influenzata dalla presenza di crusca nel suolo. I germogli della tesi A, 37 giorni dopo la semina, sono quelli che hanno raggiunto la lunghezza maggiore di tutta la prova, con 28.11 ± 3.92 cm. I germogli delle tesi B e C raggiungono rispettivamente 25.40 ± 3.77 cm e 25.29 ± 3.79 cm.

Nella Figura 3.19 - C, vengono riportate le tesi inoculate E, F e G in relazione al controllo. Le lunghezze delle plantule sono rispettivamente 20.51 ± 6.71 cm, 19.76 ± 9.16 cm e 20.27 ± 6.42 cm. Si evince che la lunghezza delle tesi viene influenzata particolarmente dal patogeno. La lunghezza delle tesi inoculate, nel momento di maggior vicinanza alla tesi sana, ha comunque uno scarto in negativo di circa 5 centimetri.

Nella Figura 3.19 - D, la tesi H mostra un comportamento analogo alla tesi D, con una lunghezza che arriva a 22.15 ± 4.56 cm. Questo mostra l'effetto positivo che potrebbe avere l'attinomicete nel contrastare l'azione dell'agente patogeno. Le altre tesi, inizialmente

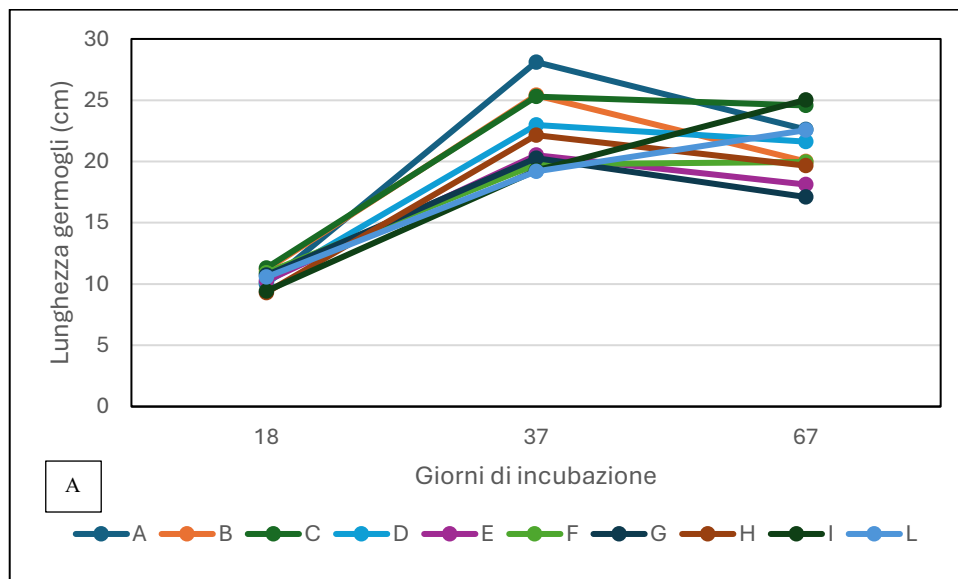
mostrano un accrescimento ridotto, ma con il proseguimento della prova, raggiungono valori comparabili alla tesi sana. Dopo 37 giorni dalla semina, le plantule della tesi I raggiungono i 19.26 ± 7.47 cm, mentre a 67 giorni dalla semina raggiungono 25.03 ± 5.95 cm di lunghezza. Analogamente, le plantule della tesi L a 37 giorni raggiungono 19.19 ± 3.97 cm di lunghezza e a 67 giorni dalla semina arrivano al valore di 22.56 ± 5.24 cm.

Nelle Figure 3.19 - E, 3.19 - F e 3.19 - G, vengono analizzati i confronti tra le tesi inoculate e le stesse tesi trattate con l'attinomicete.

La tesi H sembra contrastare l'azione del patogeno, rendendo le altezze delle plantule maggiori e confrontabili con le lunghezze delle tesi sane, mentre la tesi solo inoculata risulta avere una lunghezza molto ridotta rispetto al controllo.

In maniera ancor più evidente, nella Figura 3.19 - F, si evidenzia che la tesi con i semi batterizzati mostra un allungamento crescente, fino a raggiungere i valori della tesi sana di circa 25 cm.

Dal grafico in Figura 3.19 - G, si evidenzia un comportamento analogo, dove la tesi batterizzata raggiunge il massimo a 22.5 cm, mentre la tesi sana si attesta a circa 24 cm.



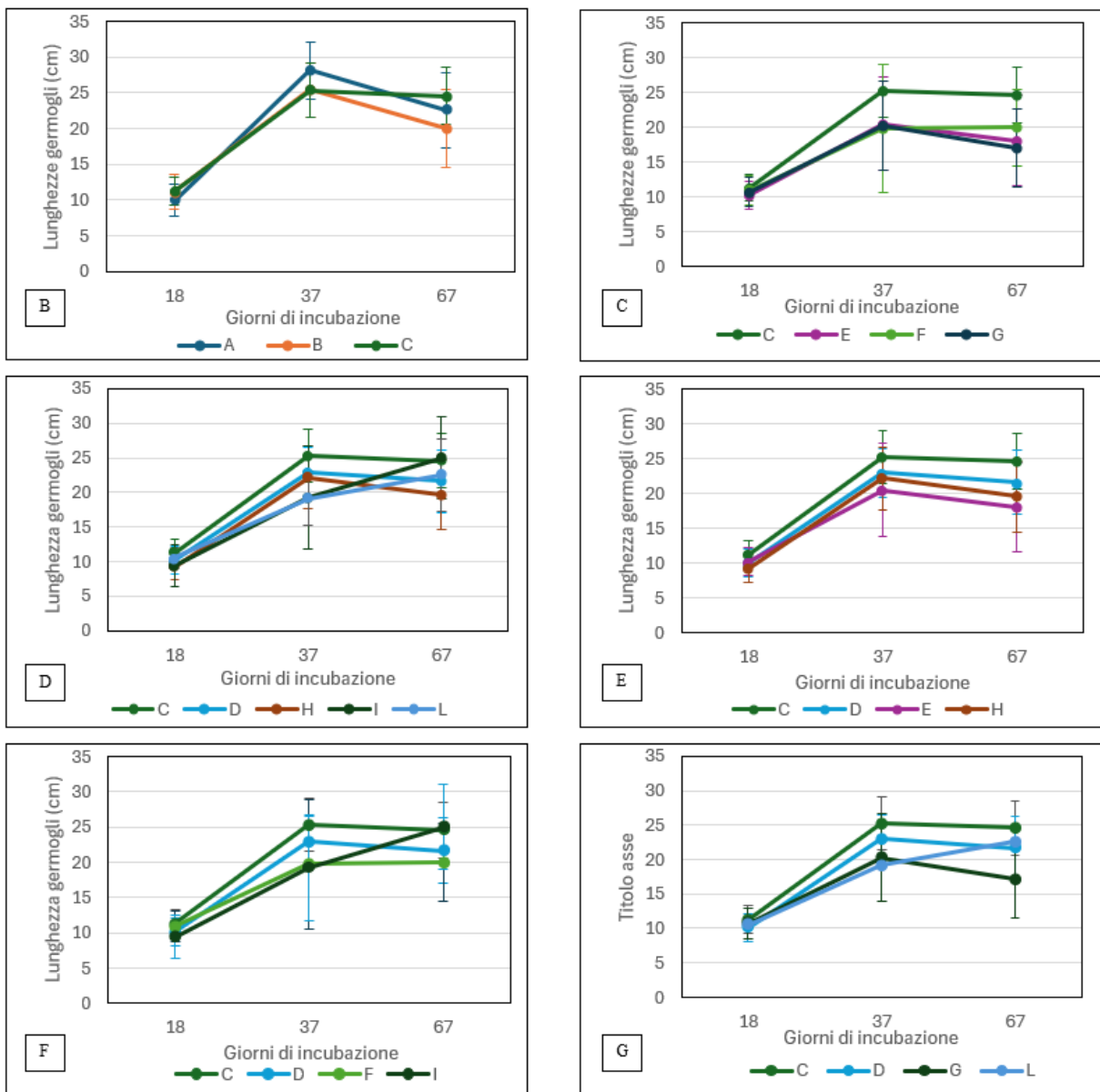


Figura 3.19: Andamento medio delle lunghezze dei germogli di cipolla rilevate durante la prova di controllo biologico. Dati espressi in centimetri.

giorni di incubazione	A	B	C	D	E	F	G	H	I	L
18	9.99 ± 2.32	11.18 ± 2.48	11.31 ± 1.93	10.14 ± 2.01	10.25 ± 2.05	10.92 ± 2.13	10.72 ± 2.15	9.30 ± 1.98	9.42 ± 3.09	10.56 ± 1.52
37	28.11 ± 3.92	25.40 ± 3.77	25.29 ± 3.79	22.98 ± 3.49	20.51 ± 6.71	19.76 ± 9.16	20.27 ± 6.42	22.15 ± 4.56	19.26 ± 7.47	19.19 ± 3.97
67	22.61 ± 5.28	20.01 ± 5.52	24.58 ± 3.97	21.62 ± 4.61	18.13 ± 6.40	19.96 ± 5.55	17.09 ± 5.60	19.65 ± 5.09	25.03 ± 5.95	22.56 ± 5.24

Tabella 3.13: Andamento medio delle lunghezze dei germogli di cipolla rilevate durante la prova di controllo biologico. I dati della tabella sono espressi in cm.

Nella Tabella 3.14 vengono riportati i casi di significatività che sono stati rilevati tramite il t-test di Student eseguito tramite software Excel. I valori sono stati divisi in due gradi di significatività e identificati nella tabella nel seguente modo:

- *: $0.01 < p < 0.05$, differenza statisticamente significativa

- **: $p < 0.01$, differenza statisticamente molto significativa

Dal confronto con i grafici della Figura 3.19 e con la Tabella 3.14, si possono ottenere le seguenti informazioni.

La differenza nella lunghezza dei germogli tra il controllo e il trattamento con l'attinomicete DEF 48 ha significatività in tutti i giorni delle rilevazioni.

Dal grafico C, si nota che la significatività statistica è presente solo con le combinazioni della tesi di controllo e quelle trattate con gli attinomiceti. Il confronto a coppie dei ceppi di attinomiceti non ha riportato significatività statistica.

Dal grafico D, si osserva che quasi tutte le significatività statistiche riguardano le coppie di tesi di controllo e quelle trattate con gli attinomiceti. Fa eccezione il confronto tra le tesi con i semi batterizzati in cui il patogeno è stato inoculato in modo diverso (H-L): nelle tesi in cui il patogeno è stato inoculato mediante crusca, i germogli hanno una lunghezza statisticamente inferiore rispetto a quelli dove il patogeno è stato inoculato mediante agar 'frullato' in tutti i giorni di rilevazione. Dopo 37 giorni dalla semina, la lunghezza dei germogli nelle tesi L e I è statisticamente inferiore rispetto alla tesi D. Dopo 67 giorni dalla semina, c'è significatività statistica anche nella combinazione H-I.

Nel grafico E, c'è rilevanza statistica tra le tesi E-H solo nel primo giorno di rilevazione.

Nel grafico F, la combinazione F-I ha rilevanza statistica sia dopo 18 giorni dalla semina che dopo 67 giorni.

Nel grafico G, solo dopo 67 giorni dalla rilevazione, la combinazione G-L è statisticamente significativa.

Nella descrizione sono state commentate solo le combinazioni che sono state ritenute interessanti da un punto di vista del lavoro di cui si parla in questo elaborato. Nel grafico sono stati inseriti i p-value significativi relativi ai grafici esposti nell'elaborato.

Grafico	Grado di significatività (p-value)	Giorni della rilevazione		
		18	37	67
B	*	A-B	-	A-B
	**	A-C	A-B A-C	B-C
C	*	C-E	C-F	-
	**	-	C-E C-F	C-E C-F C-G
D	*	-	D-I	D-I H-L
	**	C-D C-H C-I H-L	C-D C-H C-I C-L D-L H-L	C-D C-H H-I
E	*	C-E E-H	-	D-E
	**	C-D C-H	C-D C-E C-H	C-D C-E C-H
F	*	F-I	D-I	D-I
	**	C-D C-I	C-D C-F C-I	C-D C-F F-I
G	*	-	-	-
	**	C-D	C-D C-G C-L D-L	C-D C-G D-G G-L

Tabella 3.14: Significatività ottenuta tramite t-Test di Student (*: $0.05 < p < 0.01$; **: $p < 0.01$). Nella tabella vengono riportate le combinazioni che hanno mostrato un p-value significativo, suddivise in base al grado di significatività e al giorno della rilevazione (18, 37 e 67 giorni dopo la semina).

In Figura 3.20, il grafico mostra l'andamento delle percentuali delle plantule di cipolla morte rilevate nel corso della prova di controllo biologico. Le tesi sane mostrano, negli ultimi giorni di incubazione, una percentuale di piante morte con una variabilità compresa tra il 31 e il 37 %. Le tesi inoculate con il patogeno mostrano invece una percentuale molto più elevata, compresa tra il 60 e il 72 %. Le tesi inoculate a confronto con le tesi inoculate e batterizzate, non sembrano avere sostanziali differenze. Nelle immagini sottostanti vengono riportati dei grafici che vogliono relazionare e mettere a confronto le dinamiche riguardanti la mortalità delle piante di cipolla durante il corso della prova di controllo biologico.

Nel grafico in Figura 3.20 - B, si osserva che le tesi sane hanno tutte un valore di mortalità sufficientemente contenuto, compreso tra valori di 33 e 37 %.

Dalle altre immagini, è possibile estrapolare un andamento comune: nei primi 37 giorni di incubazione, tutte le tesi mostrano una mortalità compresa tra il 20 e il 40 % che rimane costante. L'unica tesi che inizialmente presenta una mortalità inferiore a tale intervallo è la tesi E.

Dopo il primo periodo, la mortalità aumenta in maniera massiccia, arrivando ai dati prelevati nell'ultimo giorno di rilevazioni, dove tutte le percentuali di mortalità hanno raggiunto il 60 %. Può essere fatta una considerazione generale sulle tesi a partire dai dati dei grafici. Si nota che le tesi batterizzate (Figura 3.20 - D) hanno una mortalità compresa tra il 69 % e il 71 %, intervallo leggermente inferiore rispetto a quello delle tesi inoculate (Figura 3.20 - C), la cui mortalità è compresa tra 65 e 76 %.

Analizzando meglio i grafici, si possono fare delle ulteriori osservazioni. Si evince che le tesi inoculate e batterizzate hanno mortalità simili (combinazioni delle tesi prese in esame per il confronto: H-E, F-I, G-L) quindi l'attinomicete non sembra aver avuto successo nel ridurre la mortalità delle piante di cipolla.

Tra le tesi inoculate, quella che più ha sofferto la presenza del patogeno è la tesi G, la cui mortalità arriva al 76 %, mentre quella che meglio ha contrastato la presenza del patogeno, è la tesi H, la cui mortalità è stata del 60 %.

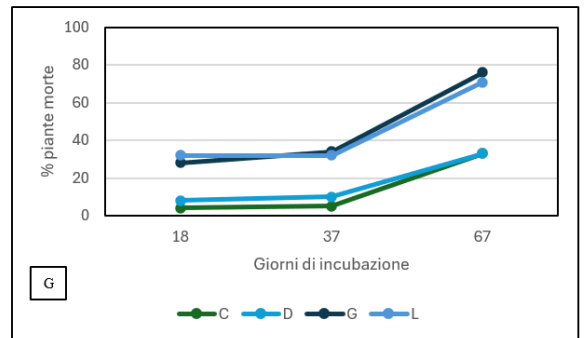
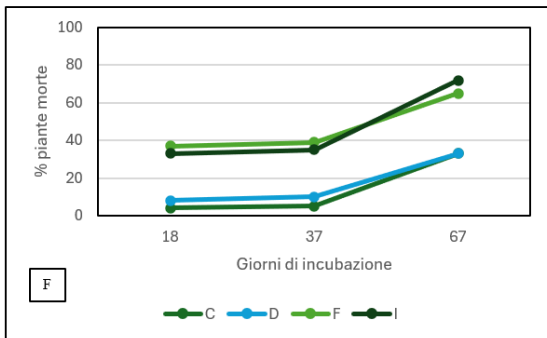
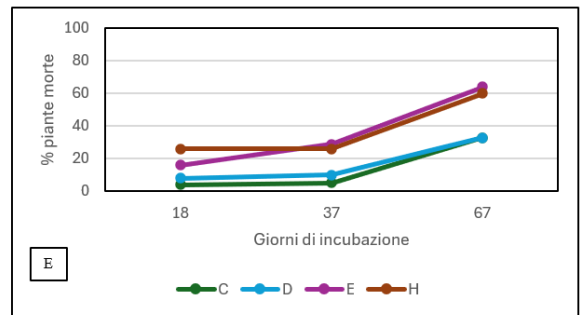
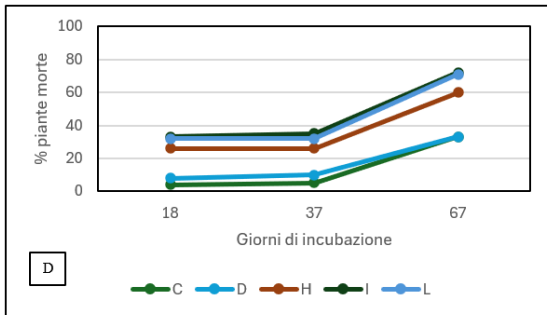
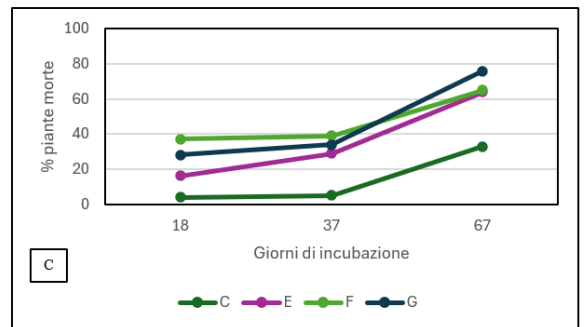
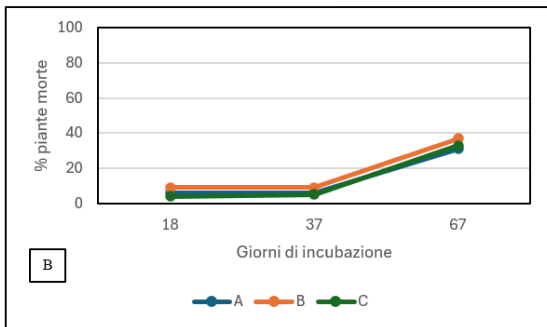
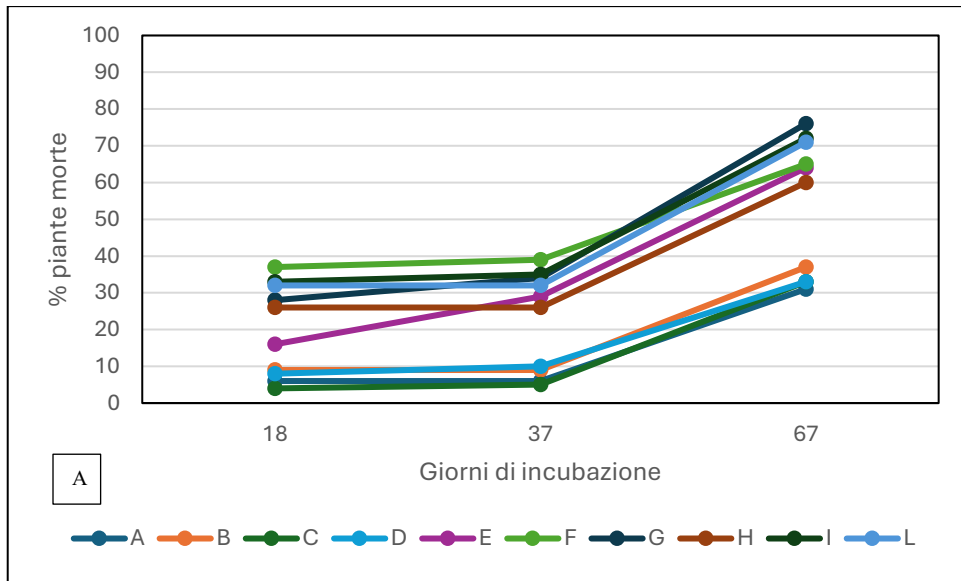


Figura 3.20: Grafico dell'andamento delle percentuali delle piantule di cipolla morte rilevate nel corso della prova di controllo biologico.

Nel grafico in Figura 3.21 è riportata la percentuale di bulbi appartenenti ad ogni tesi suddivisa per classe diametrica (le classi vengono espresse in millimetri). Dal grafico si

evince che tutte le tesi hanno in comune 3 classi diametriche: 4-6 mm, 6-8 mm e 8-10 mm. Un'altra classe diametrica presente in quasi tutte le tesi è la classe diametrica 2-4 mm, che non è stata misurata nella tesi I.

La Tabella 3.15 riporta la suddivisione dei bulbi per classe diametrica e per tesi. Sempre in Tabella 3.15, viene evidenziato anche che la classe diametrica che presenta in totale la maggior quantità di bulbi è la classe 4 (da 6 mm a 8 mm). Si evince anche la tesi che ha ottenuto più bulbi è la tesi A.

Nelle prove i bulbi risultano di dimensioni particolarmente ridotte, considerando che le misure ottimali dovrebbero rientrare in un intervallo diametrico compreso tra 16 e 23 mm. Tra le considerazioni fatte, sembra poter avuto un effetto negativo l'elevata densità di semina che ha causato competizione per i nutrienti. Durante il periodo di incubazione, alcune prove hanno risentito inoltre di una carenza idrica, dovuta a una mal posizionamento delle griglie sulle quali le tesi erano riposte.

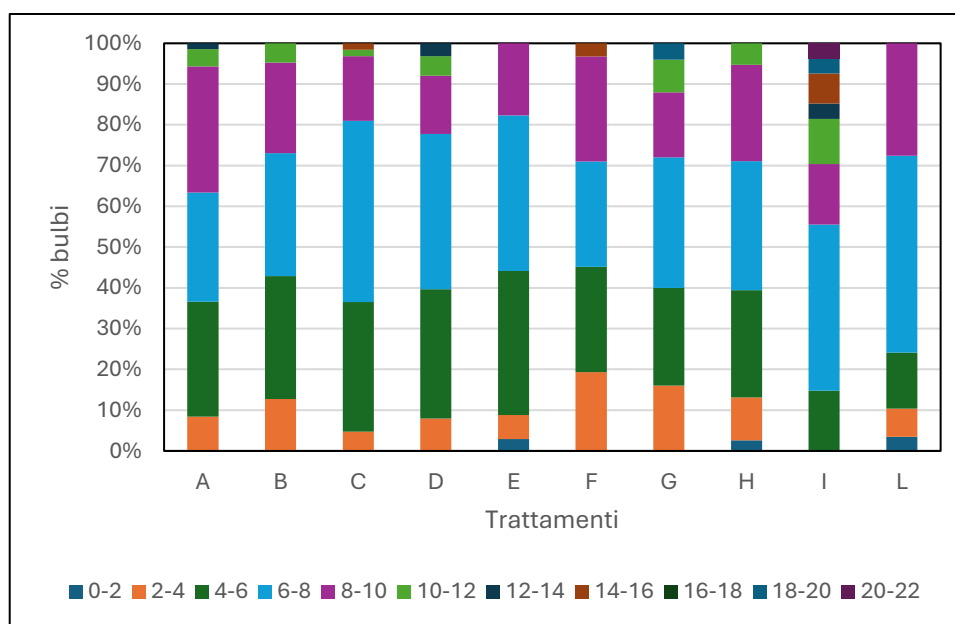


Figura 3.21: Suddivisione dei bulbi raccolti di ciascuna tesi a confronto, per ogni classe di diametro considerata. Dati espressi come percentuale sul numero di bulbi raccolti.

classi di diametro (mm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
	0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20	20-22		
tesi:													Totale riga (n°)
A	0	6	20	19	22	3	1	0	0	0	0		71
B	0	8	19	19	14	3	0	0	0	0	0		63
C	0	3	20	28	10	1	0	1	0	0	0		63
D	0	5	20	24	9	3	2	0	0	0	0		63
E	1	2	12	13	6	0	0	0	0	0	0		34
F	0	6	8	8	8		0	1	0	0	0		31
G	0	4	6	8	4	2	0	0	0	1	0		25
H	1	4	10	12	9	2	0	0	0	0	0		38
I	0	0	4	11	4	3	1	2	0	1	1		27
L	1	2	4	14	8	0	0	0	0	0	0		29
Totale colonna (n°)	3	40	123	156	94	17	4	4	0	2	1		444

Tabella 3.15: Numero di bulbi suddivisi per ciascuna classe diametrica. Dati espressi in mm.

Nel grafico riportato in Figura 3.22, vengono mostrate tramite un istogramma, le tesi inoculate della prova di controllo biologico e la loro distribuzione percentuale in base alla presenza di sintomi dovuti all'agente patogeno. Le due tesi maggiormente colpite sono la tesi F (45 % di bulbi sintomatici) e la tesi I (56 % dei bulbi sintomatici). Interessante da notare che le percentuali di inoculo in queste due tesi sono le stesse, la differenza è nella presenza di batterizzazione. Da quanto si osserva a partire dal grafico, il DEF 48 non ha effetto sulla protezione nella formazione di sintomi sulla superficie. Nella Tabella 3.16 troviamo i dati corrispettivi di ciascuna replica.

È interessante porre l'attenzione alla differenza tra le tesi inoculate con il patogeno inoculato al 1 % e 3 %. Sia nel caso in cui sia presente solo l'inoculo, che nel caso della batterizzazione, si osserva che la percentuale di bulbi sintomatici nelle tesi la cui concentrazione è al 3 %, è tre volte tanto che nelle tesi la cui concentrazione è al 1 %. Si osserva che la tesi F presenta il 45 % dei bulbi sintomatici, mentre la tesi E solo il 15 %; in maniera analoga, la tesi I presenta il 56 % di bulbi sintomatici e la tesi H solo il 18 % (Figura 3.22).

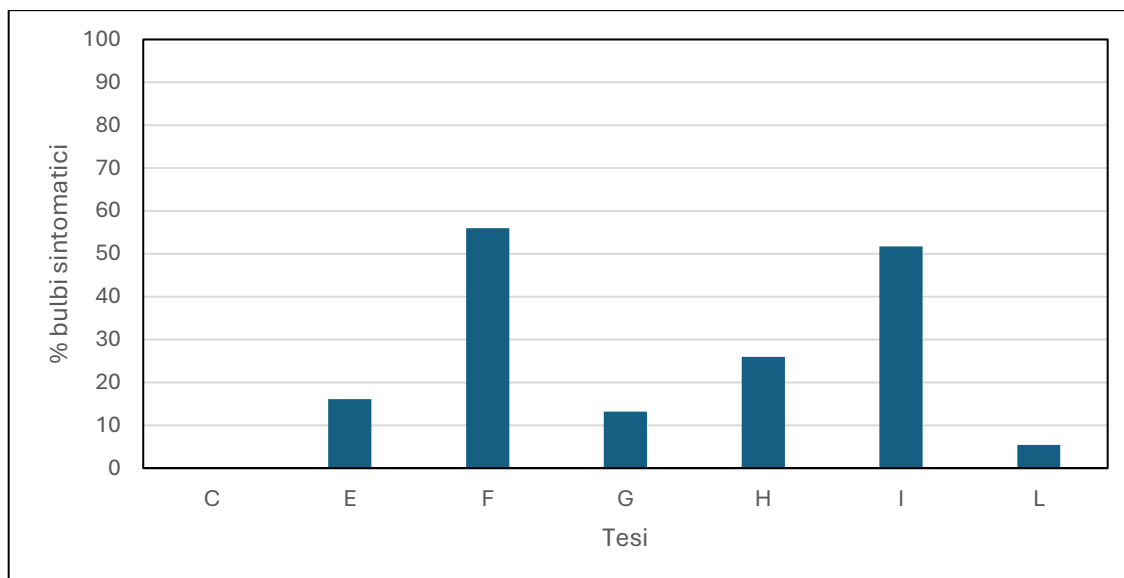


Figura 3.22: Suddivisione in percentuale dei bulbi sintomatici per le tesi inoculate con il patogeno.

Tesi	Bulbi sintomatici	Bulbi non sintomatici	Totale
E	5	29	34
F	14	17	31
G	5	20	25
H	7	31	38
I	15	12	27
L	10	19	29
Totale complessivo	56	128	184

Tabella 3.16: Numero di bulbi sintomatici e non sintomatici suddivisi per tesi.

3.9 Foto sintomi

Nelle Figure 3.23 e 3.24, possono essere osservati i sintomi tipici causati dall'agente dell'antracnosi *C. circinans*. I sintomi tipici sono lesioni necrotiche e la decolorazione delle foglie, con colletti allungati e bulbi di dimensioni minori. Le lesioni possono manifestarsi sul colletto o sul bulbo, con colori (dal verde scuro al nero) e forme (ovale, angolare...) che possono variare durante tutto il ciclo fenologico della pianta. Le macchie possono essere distribuite sporadicamente sulla superficie del bulbo o essere raggruppate. Nelle Figure 3.23 e 3.24, vengono proposti due principali gruppi di piante a confronto: quelle inoculate con il

patogeno e quelle che presentano sia il patogeno inoculato nel substrato che la batterizzazione prima della semina.

Nella Figura 3.23 vengono mostrati i sintomi su bulbi di tesi i cui semi non sono stati batterizzati. Oltre a presentare un diametro piuttosto ridotto, i bulbi risultano colpiti in particolar modo nella zona del colletto e nei centimetri immediatamente superiori. Il colore delle foglie risulta più giallo rispetto a quello che è stato osservato invece nelle piante con il controllo sano.



Figura 3.23: Bulbi sintomatici della tesi F (a sinistra) e della tesi G (a destra).

Nella Figura 3.24, vengono riportate le tesi il cui substrato è inoculato con il patogeno e i semi batterizzati con l'attinomicete DEF 48. È visibile in maniera evidente il sintomo principale sulle piantine di cipolla. Tuttavia, risulta interessante notare che, nonostante una presenza particolarmente abbondante di sintomi, i diametri siano generalmente più grandi. Anche in questo caso, la colorazione delle foglie risulta leggermente più chiara rispetto al controllo sano. Nelle immagini 3.24, contrassegnate dalla sigla I2 e I4, è inoltre ben evidente un altro sintomo tipico dell'antracnosi della cipolla, un attorcigliamento delle foglie. Tale evidenza è responsabile del nome anglofono attribuito alla malattia, chiamata infatti "twisting disease".

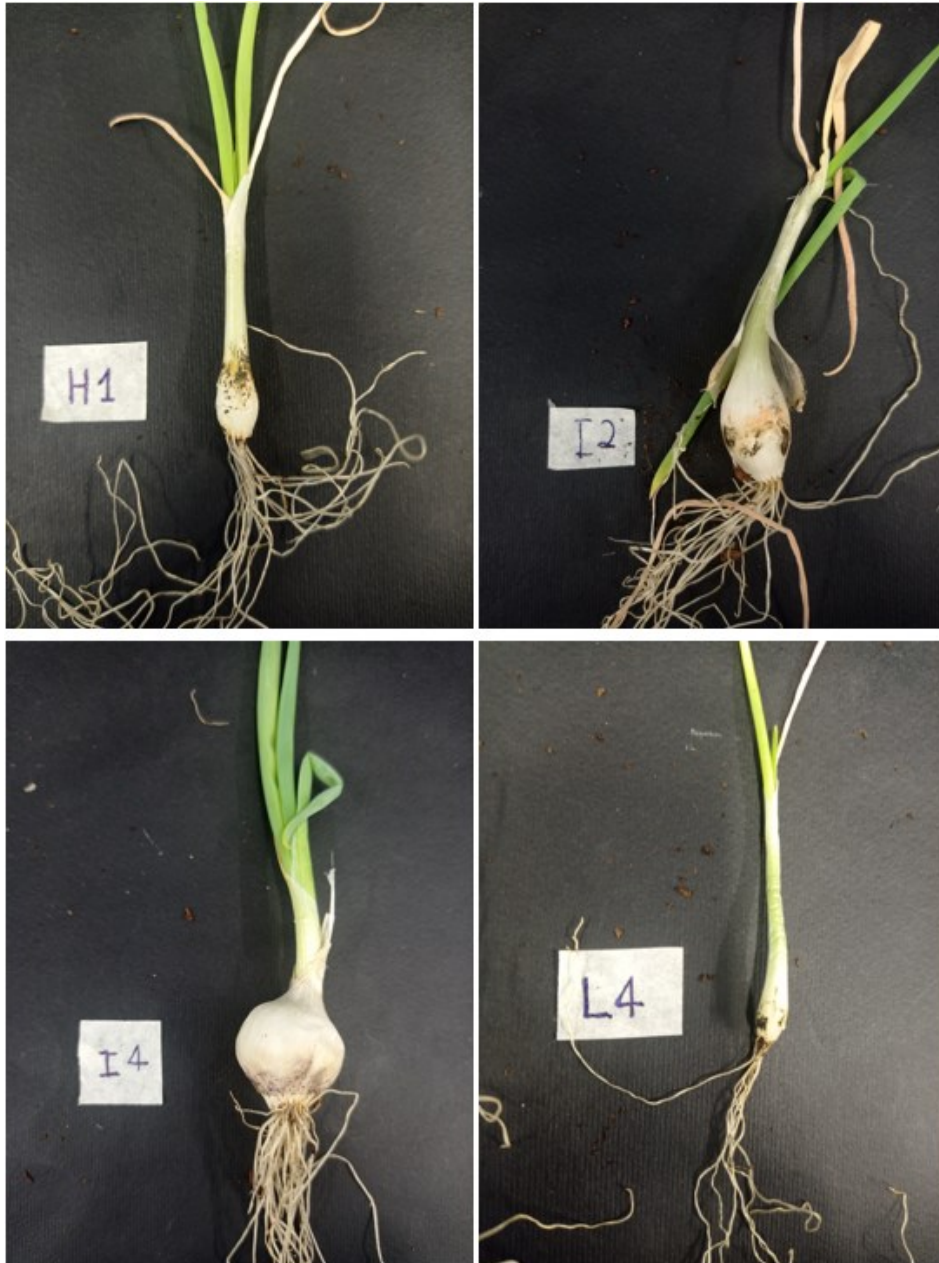


Figura 3.24: Bulbi sintomatici appartenenti alla tesi H (in alto a sinistra), della tesi I (in alto a destra e in basso a sinistra) e della tesi L (in basso a sinistra).

4 Discussione

Considerando le differenti prove condotte, è stato possibile confrontare le dinamiche osservate nel corso della sperimentazione. Di seguito vengono riportate le considerazioni fatte.

È stata valutata la crescita degli streptomiceti su differenti substrati colturali standard ed è stato osservato che crescono in maniera più significativa su PDA.

Le prove di germinazione su carta bibula e *in vaso* hanno permesso di confermare la vitalità dei semi (sterilizzati e non sterilizzati), inizialmente non sicura, in quanto i semi sono stati conservati in cella frigo per un periodo di tempo abbastanza lungo e la capacità di germinazione avrebbe potuto essere inferiore alla media.

Le prime due prove che sono state descritte sono delle prove di infezione. L'obiettivo prefissato per queste prove è stato principalmente la valutazione della quantità di crusca (non inoculata e colonizzata dal patogeno) da utilizzare successivamente nella prova di controllo biologico *in planta*. Al fine di individuare la concentrazione di inoculo del patogeno mediante crusca colonizzata con *C. circinans* sono state valutate due differenti concentrazioni: 3 % e 5 % di crusca. Dalla prima prova si evince che una quantità eccessiva di crusca risulta di impedimento per la germinazione dei semi e riduce l'allungamento dei germogli. Nella prova 2, la concentrazione di crusca è stata ridotta e sono stati osservati dei valori di germinazione dei semi e di lunghezza dei germogli più omogenei mettendo a confronto le tesi con le differenti quantità di crusca; pertanto, per le prove di controllo biologico è stata selezionata una concentrazione di inoculo del 3 % di crusca colonizzata con il patogeno.

Sarebbe interessante eseguire ulteriori indagini per valutare tale effetto modificando ulteriormente le quantità di inoculo e modalità dello stesso, per monitorare se la crusca sia davvero fitotossica in concentrazioni eccessive. Con la sperimentazione condotta in questo tirocinio, la crusca sembrerebbe essere fitotossica se mescolata al terreno in concentrazione 5 % m/m.

Per le prove di valutazione dell'effetto degli streptomiceti sulla germinazione e crescita della pianta, risulta che la batterizzazione non influisce sulla germinazione dei semi. I semi batterizzati con i ceppi DEF 19 e DEF 58, presentano dei germogli più corti rispetto a quelli osservati nella tesi di controllo. La lunghezza dei germogli dei semi batterizzati con gli altri ceppi di streptomiceti è paragonabile a quelli della tesi di controllo, ma per ottenere tali valori è stato necessario un periodo di tempo maggiore. A seguito di questa osservazione, si

ipotizza un rallentamento del ciclo vitale della pianta, dovuto alla batterizzazione dei semi di cipolla con i ceppi di streptomiceti prima della semina. Sarebbe necessario condurre una sperimentazione con un periodo temporale più lungo, appurando gli effetti del “ritardo” e monitorando lo sviluppo del bulbo, accertandosi che raggiunga le dimensioni volute.

La mortalità delle piante batterizzate risulta maggiore rispetto alla tesi di controllo solo nel caso del DEF 07, a differenza del DEF 58 la cui mortalità è inferiore rispetto a tutte le altre tesi prese in considerazione. Per quanto riguarda le misure dei diametri dei bulbi, la batterizzazione con il ceppo DEF 48 induce nella pianta effetti analoghi a quelli che vengono osservati nella tesi di controllo. I diametri dei bulbi batterizzati con gli altri ceppi di streptomiceti risultano leggermente più piccoli rispetto ai bulbi misurati nelle tesi di controllo.

Per quanto riguarda la prova di controllo biologico *in planta*, è stato possibile fare le seguenti osservazioni. La germinazione dei semi è stata influenzata negativamente nelle tesi inoculate con il patogeno fungino. Le tesi che sono state inoculate e batterizzate, rispetto alle tesi solo inoculate, hanno mostrato dei valori di germinazione dei semi superiori.

La lunghezza dei germogli nelle tesi con i semi batterizzati ed inoculate con il patogeno è superiore rispetto a quella delle tesi solo inoculate con il patogeno. L'analisi della significatività ha permesso di ipotizzare che tale effetto sia dovuto al trattamento del seme con *Streptomyces* sp. DEF48.

Gli streptomiceti non hanno mostrato risultati analoghi per il parametro della mortalità e della quantità di bulbi sintomatici. I semi che sono stati batterizzati e posti in substrato colonizzato dal patogeno, hanno subito una mortalità paragonabile a quella osservata nelle tesi solo colonizzate e una percentuale di bulbi sintomatici superiore rispetto alle tesi solo inoculate. Il metodo di inoculazione sperimentato, ovvero tramite la crusca colonizzata da *C. circinans*, è risultato più efficiente rispetto al “frullato” di AGAR per quanto riguarda la percentuale di bulbi sintomatici che si riescono ad ottenere (la tesi E, F e G hanno rispettivamente 16 %, 56 % e 13 % di bulbi sintomatici). I diametri dei bulbi non sembrano essere stati influenzati né dalla presenza del patogeno né da quella degli streptomiceti. Le ridotte dimensioni dei bulbi misurati, tuttavia, potrebbero essere stati influenzati dall'elevata densità di semina. Per questa sperimentazione non è stata valutata l'interazione in relazione al potenziale effetto dose provocato dell'agente di controllo biologico, verifica che potrebbe essere interessante approfondire nel proseguimento di queste prove.

Dall'analisi dei risultati ottenuti da questo studio, gli streptomiceti sembrerebbero poter essere dei validi agenti di controllo biologico dell'antracnosi della cipolla. Le motivazioni elencate dimostrano il potenziale di questi agenti di controllo biologico, che deve essere ulteriormente approfondito e confermato.

5 Conclusioni

Questo elaborato è relativo alle attività di tirocinio svolte nel contesto di un progetto di ricerca sulla difesa dagli attacchi di *Colletotrichum circinans*, agente dell'antracnosi della cipolla, che si manifesta principalmente sui bulbi. In particolare, gli scopi prefissi riguardavano i) la valutazione di diversi metodi di inoculazione sperimentale del patogeno in piantine di cipolla. ii) la determinazione della capacità antagonista di diversi ceppi di streptomiceti, attivi *in vitro*, nei confronti dell'agente patogeno *C. circinans in planta*. iii) la valutazione di eventuali effetti della batterizzazione dei semi di cipolla con ceppi di streptomiceti selezionati sullo sviluppo vegetativo delle piante.

Le attività svolte hanno fornito risultati soddisfacenti per tutti gli obiettivi preposti e sostengono l'opportunità di continuare le ricerche in tale direzione. Per quanto riguarda la messa a punto di un metodo sperimentale efficace e ripetibile per inoculare sperimentalmente le piante di cipolla col patogeno è stata ribadita la difficoltà di trasmettere malattie telluriche. L'impiego di substrati preventivamente colonizzati dal patogeno, come nel caso specifico la crusca, si è dimostrato efficace nel dosaggio del patogeno stesso, ha favorito la sua distribuzione uniforme nella massa di terreno esplorato dalle radici della cipolla e ha consentito di ottenere incidenze della malattia e intensità dei sintomi utili per lo studio e il controllo della malattia.

È stato dimostrato che la batterizzazione dei semi con ceppi di streptomiceti influenza lo sviluppo delle piante di cipolla e che non sempre è in grado di proteggere i bulbi dall'attacco del patogeno. La gamma di risultati ottenuta conferma che gli effetti sulla pianta e sul patogeno possono essere variabili e ceppo-specifici, sottolineando ulteriormente l'importanza della selezione dei ceppi più adatti agli scopi prefissati per un loro eventuale impiego in contesti agricoli.

6 Riassunto

La cipolla (*Allium cepa* L.) è la terza coltura orticola più coltivata al mondo dopo patate e pomodori. La sua importanza economica è nota e la produzione è ogni anno messa a rischio da molti parassiti e agenti patogeni. Tra questi ultimi, è presente *Colletotrichum dematium* f.sp. *circinans*, un patogeno fungino appartenente al phylum degli Ascomycota, agente causale dell'antracnosi della cipolla, diffuso in molte regioni del mondo, in particolar modo nelle zone temperate. I sintomi principali sono costituiti da macchie nerastre che si formano sulla superficie dei bulbi di cipolla in fase vegetativa avanzata che riducono la sua attitudine alla trasformazione e la qualità dal punto di vista estetico. La difesa delle cipolle da questa malattia tellurica raramente fornisce risultati ottimali.

Lo studio di possibili nuovi approcci alla difesa sarebbe sensibilmente facilitato dalla possibilità di riprodurre la malattia in ambiente controllato, scollegato quindi dalla stagionalità della coltura, e con metodologie di inoculazioni sperimentali del patogeno che consentissero la gestione quali-quantitativa del suo inoculo. Il presente tirocinio è inserito in un progetto di ricerca che viene svolto presso il laboratorio di Patologia vegetale del Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente dell'Università degli Studi di Milano che ha tra i suoi obiettivi anche la messa a punto di metodi di difesa della cipolla dall'antracnosi.

L'attività di tirocinio svolta ha avuto tra gli obiettivi principali la valutazione dei diversi metodi di inoculazione sperimentale del patogeno in piantine di cipolla, la determinazione della capacità di antagonismo dei differenti ceppi di streptomiceti nei confronti dell'agente patogeno e l'eventuale effetto dei ceppi di streptomiceti sullo sviluppo vegetativo delle piante di cipolla.

La sperimentazione condotta ha visto l'allestimento di quattro prove *in planta*. Le prime due sono prove di infezione sperimentale nelle quali sono state saggiati differenti quantitativi di biomassa colonizzata dal patogeno utilizzati per inoculare il terriccio di crescita di piantine di cipolla. Successivamente è stata valutata la capacità di un ceppo selezionato di streptomicete nel proteggere le cipolle dalla fase di germinazione sino alla formazione del bulbo in terricci inoculati sperimentalmente col patogeno. Infine, è stata indagata l'influenza di cinque ceppi di streptomiceti sulla germinazione dei semi e sulla crescita delle plantule di cipolla in vaso.

In dettaglio, è stata valutata la germinazione dei semi e l'accrescimento in altezza delle plantule e, nelle prove che si sono prolungate sino alla formazione dei bulbi è stato

considerato anche il loro diametro. L'influenza della presenza del patogeno è stata giudicata sulla base dell'incidenza e della gravità della malattia, soprattutto sulla base delle piante morte e della presenza dei sintomi sulla superficie dei bulbi.

La batterizzazione dei semi con spore degli streptomiceti saggiati non influisce negativamente né sulla germinazione dei semi né sulla capacità di accrescimento dei germogli. Le dimensioni dei bulbi nati da semi batterizzati sono risultate generalmente inferiori rispetto ai bulbi nelle tesi del controllo sano. Le piante nate dai semi batterizzati hanno mostrato un ciclo vegetativo più lungo rispetto alle tesi di controllo legato ad un rallentamento nella velocità di accrescimento dei germogli e della formazione dei bulbi. Il metodo di infezione sperimentato, è risultato particolarmente efficiente rispetto quanto ottenuto precedentemente utilizzando solo agar-micelio frammentato, infatti, tutte le tesi colonizzate dal patogeno mostrano una sensibile incidenza e intensità dei sintomi.

È stato dimostrato, inoltre, che la batterizzazione dei semi con uno dei cinque ceppi di streptomiceti è in grado di proteggere i bulbi dall'attacco dell'agente patogeno in modo non sempre efficace.

I risultati ottenuti su cipolla confermano ulteriormente che gli streptomiceti possono agire sia sullo sviluppo della coltura sia nei confronti di eventuali patogeni e che tali interazioni possono essere variabili a seconda della specie vegetale considerata e del ceppo microbico utilizzato.

7 Bibliografia

- Agosteo G. E., Polizzi G., 1997. Suscettibilità della cipolla rossa di Tropea a *Colletotrichum dematium* f. sp. *circinans*, agente dell'antracnosi. Informatore fitopatologico, vol. 4
- Alam S., Chang K. C., Han K. D., Hur H., Lee J. M., Lee M. W., Lee T. S., Shim J. O., 2004. In vitro Effects of Plant Extracts, and Phytohormones on Mycelial Growth of Anthracnose Fungi. Mycobiology, vol. 32, n° 3, pag. 134-138
- Alam K., Hao J., Islam S., Li A., Mazumder A., Sarkar R., Sikdar S., Song C., Wang Y., Zhang Y., Zhao Y-M., 2022. Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. Front. Microbiol, 13:968053
- Amallia R., Joko T., Suryanti, 2023. The Potential of Rhizophagus intraradices, Bacillus thuringiensis Bt BMKP and Silica for Anthracnose Disease Control in Shallot. Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture, vol. 38, n°2, pag. 433-446
- Aveling T. A. S., 2002. Effect of plant age, temperature and dew period on severity of anthracnose of cowpea caused by *Colletotrichum dematium*. African Plant Protection, vol 8, n° 65
- BAYER, 2024. Onion disease field guide. <https://www.vegetables.bayer.com/se/en-se/knowledge-centre/disease-guides.html>
- Baroncelli R., Andreopoulos W., Battaglia E., Bauer D., Benocci T., Crouch J. A., Cobo-Díaz J. F., De Vries R. P., Drula E., Grigoriev I., Haridas S., Henrissat B., Koriabine M., Le Floch G., Lipzen A., Peng M., LaButti K., Mäkelä M. R., V., Pangilinan J., Sukno S. A., Thon M.R., 2024. Genome evolution and transcriptome plasticity is associated with adaptation to monocot and dicot plants in *Colletotrichum* fungi. GigaScience, vol. 13, pag. 1-18
- Bhat S. A., Bhat G. A., Nazir R., Shah F. A., 2014. Morphology, Physiology and Taxonomy of *Streptomyces verticillatus*. Journal of Research & Development, vol. 14
- Boyraz N., Özcan M. M., 2013. In Vitro Inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Colletotrichum circinans* by Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Derivatives. Journal of Essential Oil Bearing Plants, vol. 9, n° 2, pag. 107-117

- Buchta V., Bolehovská R., Hubka V., Jirásková N., Nekolová J., Wipler J., 2019. Fungal Keratitis Caused by *Colletotrichum dematium*: Case Study and Review. *Mycopathologia*, vol.184, pag. 441-453
- Cannon P. F., Damm U., Johnston P. R., Weir B. S., 2012. *Colletotrichum* – current status and future direction. *Stud Mycol.*, vol. 73, pag.181-213
- Chen A., Najeeb S., Wang Y., Khan R. A. A., Ling J., Ping X., 2021. First report of *Colletotrichum circinans* causing anthracnose in *Allium fistulosum* L. var *giganteum* Makino in Gansu Province, China. *Plant Disease*, vol. 106, n° 7
- Cornago D. F., Amor E. C., Rivera W. L., 2011. Antifungal activity of onion (*Allium cepa* L.) bulb extract against *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum* spp. *Philipp Agric Scientist*, vol. 94, n° 1, pag. 78-82
- Corzo-Martínez M., Corzo N., Villamiel M., 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, vol.18, n° 12, pag. 609-625
- Damm U., Cannon P.F., Crous P.W., Woudenberg J.H.C., 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, vol. 39, pag. 45-87
- Das A., Ghosh A., Kamil D., Mishra A. K., 2023. Anthracnose Disease in Underutilized Fruits in India and its Management. *Food and Scientific Reports*, vol. 4, n° 9, pag. 52-58
- Dean R., Di Pietro A., Dickman M., Ellis J., Foster G. D., Van Kan J.A.L., Kahmann R., Hammond-Kosack K.E., Pretorius Z.A., Rudd J. J., Spanu P. D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, vol. 13, pag. 414-430
- De Silva D. D., Ades P. K., Crous P. W., Hyde K. D., Taylor P. W. J., 2017. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, vol. 31, n°3, pag. 155-168
- Dutta, R. K., J., Gurav V. S., Manjunathagowda, Nadig, S. M., D. C., Singh M., 2022. Anthracnose of Onion (*Allium cepa* L.): A Twister Disease. *Pathogens*, vol. 11, n° 8, pag. 884
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health) Bragard C., Campese C., Civera A. V., Di Serio F., Gonthier P., Justesen A. F., MacLeod A., Magnusson C. S., Migheli Q., Milonas P., Miret J. A. J., Navas-Cortes J. A., Parnell S., Potting R., Reignault P. L., Streissl F., Thulke H. H., Van der Werf W., Vloutoglou I., Yuen J., Zappala L.,

2021. Pest categorisation of *Colletotrichum plurivorum*. EFSA Journal, vol. 19(11):6886, 35 pag.
- FAO, 2019. New standards to curb the global spread of plant pests and diseases. <https://www.fao.org/newsroom/detail/New-standards-to-curb-the-global-spread-of-plant-pests-and-diseases/en> , visitato in data 14/09/2024
 - Freeman S., Katan T., Shabi E., 1998. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. *Plant Disease*, vol. 82, n° 6, pag. 596-605
 - Guarnaccia V., Garibaldi A., Gilardi G., Gullino M. L., Martino I., 2020. *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on ornamental plants in northern Italy. *Journal of Plant Pathology*, vol. 103, n° 1, pag. 127-137
 - Gullino M. L., Garibaldi A., Gilardi G., Pugliese M., 2018. Effect of increased CO₂ and temperature on plant diseases: A critical appraisal of results obtained in studies carried out under controlled environment facilities. *Journal of Plant Pathology*, vol. 100, pag. 371-389
 - Hasibuan S., Candra D. I. A., Maimunah, Pranata Y., 2020. Potential Antifungal Compound from *Gliricidia Maculate* Leaf Extract against Pathogenic Fungi (*Colletotrichum Capsici*, *Fusarium Oxysporum* And *Cercospora Capsici*) on Chili Pepper. *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*, Jan & Feb, pag. 111-117
 - Jepsen T., Jensen B., Jørgensen N. O. G., 2022. Volatiles produced by *Streptomyces* spp. delay rot in apples caused by *Colletotrichum acutatum*. *Current Research in Microbial Sciences*, vol. 3, 100121
 - Karabetos J. H., Pappelis A. J., Russo V. M., 1987. Visualization of halos in the epidermal cell wall of *Allium cepa* caused by *Colletotrichum dematium* f. *circinans* and *Botrytis allii* using fluorochromes. *Mycopathologia*, vol. 97, pag. 137-141
 - Kiehr M., Azpilicueta A., Delhey R., 2012. Smudge and other disease of onion caused by *Colletotrichum circinans*, in Southern Argentina. *International Journal of Experimental Botany*, vol. 81, pag. 161-164
 - Kim W. G., Hong S. K., Kim J. H., 2008. Occurrence of Anthracnose on Welsh Onion Caused by *Colletotrichum circinans*. *Mycobiology*, vol. 36, n° 4, pag. 274-276

- Kiran P. R., Aradwad P., Kar A., Kumar A. T. V., Mani I., Nayana P. N., Ramya C. S., Sahoo M., Urhe S. B., Yadav R., 2023. A comprehensive review on recent advances in postharvest treatment, storage, and quality evaluation of onion (*Allium cepa*): Current status, and challenges. *Future Postharvest Food*, vol. 1, n° 1, pag. 1-34
- Koo T. H., Hong S. J., Yun S. C., 2016. Changes in the aggressiveness and fecundity of hot pepper anthracnose pathogen (*Colletotrichum acutatum*) under elevated CO₂ and temperature over 100 infection cycles. *The Plant Pathology Journal*, vol. 32, n° 3, pag. 260-265
- Kumar V., Neeraj, Sagar N. A., Sharma S., 2015. Post Harvest Management of Fungal Diseases in Onion- A Review. *International of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol 4, n° 6, pag. 737-752
- Machowicz-Stefaniak Z., Zalewska E., 2011. Occurrence of *Colletotrichum dematium* on selected herbs species and preparations inhibiting pathogen's growth and development in vitro. *Ecological Chemistry and Engineering S.*, vol. 18, n° 14, pag. 465-478
- Materatski P., Campos M. D., Carvalho T., Dias A. B., Félix M. D. R., Gomes L., Nobre T., Rei F., Varanda C., 2019. Effect of Long-Term Fungicide Applications on Virulence and Diversity of *Colletotrichum* spp. Associated to Olive Anthracnose. *Plants (Basel)*, vol. 29, n° 8 (9), pag. 311
- Mesta, R. K., Kukanur, L., 2013. Management of postharvest smudge infections in onion through fungicides. *Acta Horticulturae*, vol. 1012, pag. 627-632
- Parra-López C., Abdallah S. B., Carmona-Torres C., Garcia-Garcia G., Hassoun A., Jagtap S., Sánchez-Zamora P., Trollman H., 2024. Integrating digital technologies in agriculture for climate change adaptation and mitigation: State of the art and future perspectives. *Computers and Electronics in Agriculture*, vol. 226
- Piedra J. L. L., Cabeza J. G., Pico A. A. R., Cornejo M. S., 2019. Identification and in vitro antifungal evaluation of *Streptomyces* sp. of desert soil against *Colletotrichum* spp. *Biotechnología Aplicada*, vol. 36, n° 2
- Russo V. M., Anderson C., Pappelis A. J., 1979. Effect on germination and post-germination development of *Colletotrichum dematium* var *circinans* due to light and dark incubation and coverslip placement. *Mycopathologia*, vol. 67, n° 3, pag. 165-168

- Russo V. M., Pappelis A. J., 1981. Observations of *Colletotrichum dematium* f. *circinans* on *Allium cepa*: halo formation and penetration of epidermal walls. *Physiological Plant Pathology*, vol. 19, pag. 127-136
- Salotti I., Ji T., Rossi V., 2022. Temperature requirements of *Colletotrichum* spp. belonging to different clades. *Frontiers in Plant Science*, vol. 13, 953760.
- Salotti I., Ji T., Liang Y. J., Rossi V., 2023. Development of a model for *Colletotrichum* diseases with calibration for phylogenetic clades on different host plants. *Frontiers in Plant Sciences*, vol., 14, 1069092.
- Sanglier J. J., Fehr T., Haag H., Huck T. A., 1993. Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, vol. 144, n°3, pag. 633-642
- Savary S., Esker P., McRoberts N., Nelson A., Pethybridge S. J., Willocquet L., 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, vol. 3, n° 3, pag. 430-439
- Shumway C., Russo V. M., Pappelis A. J., 1983. Germination and post-germination development of *Colletotrichum dematium* f. *circinans* on *Allium cepa*. *Mycopathologia*, vol. 82, n° 2 pag. 125-127
- Slimestad R., Fossen T., Vågen I. M., 2007. Onions: A Source of Unique Dietary Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, n° 25, pag. 10067-80
- Somwanshi S. D., Nikam P. S., Bhujbal V. B., Suryawanshi A. P., 2016. Bioefficacy of bioagents and botanicals against *Colletotrichum dematium* causing anthracnose of spinach. *Indian Phytopath*, vol. 69, n°4s, pag. 525-528
- Sonawane R. B., Birade R. M., Patil H. M., Dhemre J., 2022. Survey, Occurrence of Major Onion Diseases and Management of Twister Disease of Onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Environment and Climate Change*, vol. 12, n°11, pag. 3676-3682
- Song L., Jiang N., Wei S., Lan Z., Pan L., 2020. Isolation, Screening, and Identification of Actinomycetes with Antifungal and Enzyme Activity Assays against *Colletotrichum dematium* of *Sarcandra glabra*. *Mycobiology*, vol. 48, n° 1, pag. 37-43
- Sudirga S. K., Parwanayoni N. M. S., 2022. Use of *Ficus septica* leaf extract for biological control of anthracnose disease in *Carica papaya* caused by *Colletotrichum*

spp. First Asian PGPR Indonesian Chapter International e-Conference 2021, KnE Life Sciences, pag. 469–478

- Talhinhos P., Baroncelli R., 2021. *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, vol. 110, pag. 109–198
- Talhinhos P., Baroncelli R., 2023. Hosts of *Colletotrichum*. *Mycosphere*, vol. 14, n°2, pag. 158–261
- Teshika J. D., Fawzi M. M., Pandian S. K., Rengasamy K. R. R., Zakariyyah A. M., Zaynab T., Zengin G., 2018. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 59, n° 27
- Trębicki P., Finlay K., 2018. Pests and Diseases under Climate Change; Its Threat to Food Security. *Food Security and Climate Change*, pag. 229-249
- Walker J. C., 1925. Studies on Disease Resistance in the Onion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 11, n° 3, pag. 183-189
- Wijesekara H. T. R., Agarwal D. K., 2006. Taxonomic studies on five species of the genus *Colletotrichum*. *Indian Phytopathology*, vol. 59, n° 2, pag. 203-209
- Winder R. S., Watson A. K., 1994. A potential microbial control for fireweed (*Epilobium angustifolium*). *Phytoprotection*, vol. 75, n° 1, pag. 19-33
- Zaki M. A., Ahsan M., Anjum M. R., Din N. U., Narejo S., Zai S., 2021. Image-based Onion Disease (Purple Blotch) Detection using Deep Convolutional Neural Network. (IJACSA) *International Journal of Advanced Computer Science and Applications*, vol. 12, n° 5
- Zhao R., Chen X., Na M., Wang Z., 2022. First report of *Colletotrichum circinans* causing anthracnose on *Polygonatum sibiricum* in Liaoning Province, China. *Plant Disease*, vol. 107, n° 4

Libri:

- Ali F., Atiq M., Rehman A., Hameed A., Rajput N. A., Sarfraz S., 2024. Climate Change Impact on Plant Pathogen Emergence: Artificial Intelligence (AI) Approach. *Plant Quarantine Challenges under Climate Change Anxiety*, cap. 9. Springer Cham

- Dickman, M.B. 2000. Fungal Pathology. Kronstad, J.W. (eds) Springer. Dordrecht. 404 pag.
- IPPC Secretariat, AA. VV., 2021. Scientific review of the impact of climate change on plant pests – A global challenge to prevent and mitigate plant pest risks in agriculture, forestry and ecosystems. Rome. 72 pag.
- Vannacci G., Bianco P.A., Bonanomi G., Brunelli A., Gonthier P., Lorito M., Polizzi G., Rossi V., Sarrocco S., Scortichini A., 2021. Patologia vegetale. Edises Università. 478 pag.

Sitografia:

- EPPO <https://gd.eppo.int/taxon/COLLCI> Visitato in data 8/9/2024
- FAOSTAT <https://www.fao.org/faostat/en/#home> Visitato in data 15/9/2024
- theplantlist.org Visitato in data 8/9/2024
- PlantwisePlus Knowledge Bank
<https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/full/10.1079/pwkb.species.14897#tabular-1> Visitato in data 8/9/2024

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare i miei genitori, Mamma e Papà, che hanno sostenuto le mie scelte in ogni momento e aiutata a prendere decisioni importanti. Li ringrazio perché mi hanno sempre spronata a fare del mio meglio.

Ringrazio le mie Sorelle, Barbara e Martina, sempre pronte ad aiutarmi e dare i consigli giusti, ma, soprattutto, per esserci state sempre per me.

Ringrazio Matteo, per aver condiviso questo spettacolare viaggio con me e per l'aiuto che mi ha dato nella revisione della tesi.

Un ringraziamento anche ai miei Amici, a quelli che conoscevo prima di questa salita, a quelli che ho incontrato lungo il percorso.

Infine, vorrei ringraziare il prof. Marco Saracchi, per la disponibilità e la pazienza che ha mostrato in tutte le fasi del percorso, dalla scelta del tirocinio alla stesura della tesi e la dottoressa Daniela Bulgari, per il fondamentale aiuto durante lo svolgimento del tirocinio e nella correzione di queste pagine.