

## Uso di microrganismi benefici del suolo (funghi micorrizici arbuscolari e batteri rizosferici) come agenti di contenimento delle malattie delle piante

In condizioni di campo, le piante interagiscono con un gran numero di microrganismi, nocivi o benefici. Questi ultimi comprendono i funghi micorrizici arbuscolari (AM) e i batteri promotori della crescita delle piante (PGPB).

I funghi AM, tutti classificati oggi nel phylum Glomeromycota (Schüeffler e Walker, 2010), stabiliscono un'interazione mutualistica con le radici della maggior parte delle piante vascolari, dalle Pteridofite alle Angiosperme (Smith and Read, 2008). La simbiosi AM è stata ripetutamente messa in relazione con il miglioramento della salute, della crescita e della capacità di tollerare stress abiotici (come la siccità, la scarsa disponibilità di nutrienti, la salinità, la presenza di metalli pesanti, ecc. – Gamalero et al., 2010a; Lingua et al., 2008) e biotici (come i funghi patogeni delle radici e gli insetti – Trotta et al., 1996; Guerrieri et al., 2004; Berta et al., 2005) nell'ospite vegetale. Essi vengono considerati potenziali agenti di biocontrollo, e la riduzione della crescita del patogeno è generalmente ascritta a fenomeni di competizione e all'induzione di reazioni di difesa da parte della pianta (Pozo et al., 2002). Il nostro gruppo di ricerca si è occupato da tempo di questi aspetti, nell'ambito di numerosi progetti, due dei quali europei, utilizzando come sistema sperimentale il pomodoro, colonizzato o no da un fungo AM, e infettato o no con i funghi patogeni *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* o *Rhizoctonia solani*. In entrambi i casi, il fungo AM riduceva significativamente la malattia indotta dal patogeno, e l'effetto era ancora più evidente in presenza di batteri rizosferici, con una chiara azione sinergica (Trotta et al., 1996; Berta et al., 2005).

\* Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università del Piemonte Orientale

\*\* Mybasol s.r.l., Alessandria

In seguito al rilascio di essudati radicali, numerosi batteri del suolo si localizzano sulle o attorno le radici delle piante, trovando abbondanti fonti di nutrienti. In relazione al grado di intimità con la radice, i PGPB possono formare simbiosi con le piante occupando strutture specializzate (es. i noduli); legarsi alla superficie delle radici; colonizzare i tessuti interni delle radici, comportandosi come endofiti (Vessey, 2003). I PGPB, in aggiunta al miglioramento della crescita, possono esercitare attività soppressiva nei confronti delle malattie che originano dal suolo. La stimolazione diretta è mediata da diversi meccanismi, tra i quali il miglioramento della nutrizione minerale (attraverso la fissazione dell'azoto, la solubilizzazione del fosfato e la chelazione del ferro), la produzione di fitormoni (tra i quali le auxine, le citochinine e le gibberelline) e le modificazioni dell'architettura radicale (Glick, 1995; Gamalero et al., 2002). Alla base del contenimento dei microrganismi patogeni delle piante vi sono la competizione per la colonizzazione di siti o nutrienti, la produzione di antibiotici ed enzimi, e l'induzione di resistenza sistemica nei confronti dei patogeni (Raaijmakers et al., 2009). In aggiunta, anche gli stress biotici e abiotici possono essere meglio tollerati dalla pianta in presenza di batteri che esprimano l'enzima 1-aminocyclopropano-1-carbossilato (ACC) deaminasi. Questo enzima batterico scinde l'ACC di origine vegetale, che è il precursore immediato dell'etilene, prevenendo l'accumulo di livelli di etilene che potrebbero inibire la crescita (Glick, 2014).

L'uso di funghi AM e di PGPB è stato proposto per contrastare le fitoplasmosi. Il primo lavoro in assoluto sull'argomento riguardava il pomodoro colonizzato dal fungo *Glomus mosseae* BEG12 e infettato con un fitoplasma del gruppo Stolbur. Questo studio, condotto dal nostro gruppo di ricerca, dimostrò che le piante micorrizate e infettate dal fitoplasma presentano sintomi meno severi e, soprattutto, che le cellule batteriche mostrano segni di degenerazione, quali l'agglutinazione, il confinamento del citoplasma alla periferia della cellula e un ridotto numero di ribosomi (Lingua et al., 2002). L'effetto positivo dei funghi AM fu successivamente confermato da Garcia-Chapa et al. (2004) in portainnesto di pero e da Kamińska et al. (2010) in pervinca.

Risultati simili sono stati ottenuti, ancora una volta nel nostro laboratorio, inoculando piante di *Chrysanthemum carinatum*, infettate o meno con il fitoplasma del giallume del crisantemo "Candidatus Phytoplasma asteris" strain CYP, con *Pseudomonas putida* S1Pf1Rif. Questo ceppo appartiene alle pseudomonadali fluorescenti ed è stato isolato nel suolo adiacente a una vite asintomatica, circondata da piante con chiari sintomi di infezione da fitoplasma (Gamalero et al., 2010b; Sampò et al., 2012). Rimaneva tuttavia da

determinare quale fosse il meccanismo o i meccanismi alla base del fenomeno osservato.

Un ulteriore passo fu compiuto con la simultanea inoculazione di funghi AM e PGPB. Piante di *C. carinatum* sottoposte a doppia inoculazione con *G. mosseae* e *P. putida* S1PflRif, sono state messe in contatto con le cicaline vettore del “*Ca. P. asteris*”. Sebbene i due simbionti non abbiano influenzato la moltiplicazione dei fitoplasmi, e solo in parte la loro vitalità, come dimostrato con nuovi metodi molecolari, essi fornirono alcune forme di resistenza al fitoplasma: le piante trattate con entrambi i simbionti esposte alle cicaline vettore che risultavano sintomatiche erano meno di un terzo rispetto a quelle non trattate (7% contro il 26%). Inoltre, l’inoculazione simultanea dava luogo a un ritardo nella comparsa dei sintomi nelle piante non resistenti, al miglioramento della crescita della porzione aerea delle piante infette e a modificazioni dell’architettura dell’apparato radicale che suggerivano lo sviluppo di un sistema vegetativo più efficiente e attivo (D’Amelio et al., 2011).

Visti i risultati incoraggianti e tenendo presente che il nostro obiettivo era il miglioramento delle condizioni di salute di viti affette da flavescenza dorata, è stato ritenuto opportuno ricorrere a un sistema sperimentale diverso, la pervinca, pianta ornamentale in grado di ospitare il fitoplasma della flavescenza dorata (FDP). In questo caso, il batterio inoculato sulle piante era *Pseudomonas migulae* 8R6 un endofita in grado di colonizzare i tessuti interni delle pianta stabilendo quindi una relazione intima con essa, e capace di sintetizzare l’enzima ACC deaminasi. Grazie alla collaborazione con il professor Bernard Glick dell’Università di Waterloo (Canada) abbiamo avuto l’opportunità di disporre di un mutante del ceppo batterico, deficiente nella sintesi dell’enzima. In questo modo è stato possibile verificare l’ipotesi che un batterio produttore di ACC deaminasi potesse indurre una migliore resistenza o tolleranza nella pianta infestata dal fitoplasma della flavescenza dorata. L’effetto più rilevante dell’inoculo delle piante con questo ceppo batterico è stato osservato, come ci si attendeva, a livello dell’espressione dei sintomi. Infatti, il 93% delle piante infettate da FDP ma non inoculate con il ceppo batterico erano sintomatiche. Questo valore si riduceva al 53% nelle piante inoculate con *P. migulae* 8R6 produttore di ACC deaminasi. Al contrario, l’inoculo con il mutante difettivo nella sintesi di ACC deaminasi riduceva in modo non significativo la frequenza di piante sintomatiche. Oltre all’espressione dei sintomi, di sicuro interesse era anche la valutazione della quantità di cellule di fitoplasma all’interno delle foglie della pianta ospite. Grazie a tecniche molecolari abbiamo potuto riscontrare che l’inoculo con il ceppo batterico produttore di ACC deaminasi riduceva in modo non significativo il titolo del fitoplasma. Tuttavia, la non significatività del risultato

era legata al fatto che nel 40% delle piante il quantitativo di DNA del fitoplasma era al di sotto del limite soglia del metodo (Gamalero et al., accettato per pubblicazione).

Alla luce di questi risultati, e di altri presenti in letteratura (Masoero et al., 2015) si è quindi passati alla sperimentazione su vite (cv. Barbera), sia su barbatelle sia su piante adulte, in condizioni di pieno campo e con un programma di monitoraggio a medio termine.

Risultati preliminari ottenuti in vigneti diversi, mostrano che le piante inoculate con funghi AM e batteri PGPB sembrano mantenere stabile la loro condizione sintomatologica, in una situazione in cui il trattamento di controllo presenta un inasprimento dei sintomi da FD; i batteri endofiti hanno un effetto maggiormente benefico nel miglioramento dei sintomi rispetto all'inoculo misto di funghi AM e batteri PGPB: il trattamento con batteri endofiti sembra alleviare la sintomatologia delle piante. Comunque, in entrambi i trattamenti con microrganismi sono stati osservati miglioramenti nella sintomatologia da flavescenza dorata.

È inoltre in corso uno studio metagenomico per identificare i microrganismi presenti nell'apparato radicale e nella porzione epigea delle piante sane e di quelle infettate da fitoplasmi, per valutare le differenze nel microbioma delle piante nelle due condizioni e individuare così microrganismi potenzialmente utili per interventi terapeutici o preventivi.

Questo progetto è stato presentato presso il servizio fitosanitario della Regione Piemonte durante un tavolo tecnico sulla lotta alla flavescenza dorata (11 giugno 2015) e rientra tra quelli esposti nel tavolo regionale per la ricerca sui fitoplasmi presso l'Istituto Penna di Asti il 1 luglio 2015. Inoltre, il presente studio rientra nel lavoro di tesi di Dottorato di Ricerca "Chemistry and Biology", del dottor Gabriele Daglio, dal titolo: "Uso di elicitori biotici di resistenza nella lotta alla flavescenza dorata della vite e metodi innovativi di rilevamento dei sintomi".

#### RIASSUNTO

Sono qui descritti alcuni dei più importanti risultati ottenuti dagli Autori sugli effetti indotti da funghi micorrizici arbuscolari e batteri promotori della crescita, da soli o in combinazione, in piante sottoposte a stress biotici (funghi patogeni e fitoplasmi). Vengono inoltre descritti i possibili meccanismi coinvolti nelle risposte di difesa della pianta nei confronti di patogeni. I risultati presentati suggeriscono e confermano il possibile uso di microrganismi benefici del suolo come agenti di biocontrollo delle malattie delle piante.

## ABSTRACT

The paper presents the most relevant results obtained by the Authors on the effects induced by arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria, alone or in combination, in plants subjected to biotic stresses (pathogenic fungi and phytoplasmas). The mechanisms involved in the plant defense responses are tentatively explained. The results here described confirm and suggest the possible use of soil beneficial microorganisms as biocontrol agents of plant diseases.

## BIBLIOGRAFIA

- BERTA G., SAMPÒ S., GAMALERO E., MASSA N., LEMANCEAU P. (2005): *Suppression of Rhizoctonia root-rot of tomato by Glomus mosseae BEG12 and Pseudomonas fluorescens A6RI is associated with their effect on the pathogen growth and on root morphogenesis*, «European Journal of Plant Pathology», 111, pp. 279-288.
- D'AMELIO R., BERTA G., GAMALERO E., MASSA N., AVIDANO L., CANTAMESSA S., D'AGOSTINO G., BOSCO D., MARZACHÌ C. (2011): *Increased plant tolerance against chrysanthemum yellows phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris') following double inoculation with Glomus mosseae BEG12 and Pseudomonas putida SIPf1Rif*, «Plant Pathology», 60, pp. 1014-1022.
- GAMALERO E., MARTINOTTI M.G., TROTTA A., LEMANCEAU P., BERTA G. (2002): *Morphogenetic modifications induced by Pseudomonas fluorescens A6RI and Glomus mosseae BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions*, «New Phytologist», 155, pp. 293-300.
- GAMALERO E., BERTA G., MASSA N., GLICK B.R., LINGUA G. (2010a): *Interactions between Pseudomonas putida UW4 and Gigaspora rosea BEG9 and their consequences on the growth of cucumber under salt stress conditions*, «Journal of Applied Microbiology», 108, pp. 236-245.
- GAMALERO E., D'AMELIO R., MUSSO C., CANTAMESSA S., PIVATO B., D'AGOSTINO G., DUAN J., BOSCO D., MARZACHÌ C., BERTA G. (2010b): *Effects of Pseudomonas putida SIPf1Rif against chrysanthemum yellows phytoplasma infection*, «Phytopathology», 100, pp. 805-813.
- GARCIA-CHAPA M., BATLLE A., REKAB D., ROSQUETE M.R., FIRRAO G. (2004): *PCR-mediated whole genome amplification of phytoplasmas*, «Journal of Microbiological Methods», 56, pp. 231-242.
- GLICK B.R. (1995): *The enhancement of plant-growth by free-living bacteria*, «Canadian Journal of Microbiology», 41, pp. 109-117.
- GLICK B.R. (2014): *Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world*, «Microbiology Research», 169, pp. 30-39.
- GUERRIERI E., LINGUA G., DIGILIO M.C., MASSA N., BERTA G. (2004): *Do interactions between plant roots and the rhizosphere affect parasitoid behaviour?* «Ecological Entomology», 29, pp. 753-756.
- KAMIŃSKA M., KLAMKOWSKI K., BERNIAK H., SOWIK I. (2010): *Response of mycorrhizal periwinkle plants to aster yellows phytoplasma infection*, «Mycorrhiza», 20, pp. 161-166.
- LINGUA G., D'AGOSTINO G., MASSA N., ANTOSIANO M., BERTA G. (2002): *Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato*, «Mycorrhiza», 12, pp. 191-198.

- LINGUA G., FRANCHIN C., TODESCHINI V., CASTIGLIONE S., BIONDI S., BURLANDO B., PARRAVICINI V., TORRIGIANI P., BERTA G. (2008): *Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones*, «Environmental Pollution», 153, pp. 137-147.
- MASOERO G., GIOVANNETTI G., BERTERO E., CUGNETTO A. (2015): *Il pH della vite e della flavescenza dorata*, «OICCE TIMES», 62, pp. 19-22.
- POZO M.J., SLEZACK-DESCHAUMES S., DUMAS-GAUDOT E., GIANINAZZI S. AND AZCON-AGUILAR C. (2002): *Plant defence responses induced by arbuscular mycorrhizal fungi*, in: *Mycorrhizal Technology in Agriculture: from Genes to Bioproducts* editors: S. Gianinazzi, H. Schüepp, J.M. Barea, K. Haselwagner, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 103-112.
- RAAIJMAKERS J.M., PAULITZ T.C., STEINBERG C., ALABOUVETTE C., MOËNNE-LOCOCOZ Y. (2009): *The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms*, «Plant Soil», 321, pp. 341-361.
- SAMPÒ S., MASSA N., CANTAMESSA S., D'AGOSTINO U., BOSCO D., MARZACHI C., BERTA G. (2012): *Effects of two AM fungi on phytoplasma infection in the model plant Chrysanthemum carinatum*, «Agricultural and Food Science», 21, pp. 39-51.
- SCHÜSSLER A., WALKER C. (2010): *The Glomeromycota: a species list with new families and genera*, Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University, pp. 1-58.
- SMITH S.E., READ D.J. (2008): *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 3. Academic Press, New York
- TROTTA A., VARESE G.C., GNAVI E., FUSCONI A., SAMPÒ S., BERTA G. (1996): *Interactions between the soilborne root pathogen Phytophthora nicotianae var parasitica and the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae in tomato plants*, «Plant Soil», 185, pp. 199-209.
- VESSEY J.K. (2003): *Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers*, «Plant Soil», 255, pp. 571-586.