



CONVEGNO FINALE PROGETTO ARMISTOP

Valorizzazione del microbioma del suolo per la lotta contro il marciume radicale fibroso dell'olivo

Meriem M. Aci, G. Agosteo, S. Mosca, A. Malacrinò, L. Schena

Dipartimento Agraria, Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria, Reggio Calabria

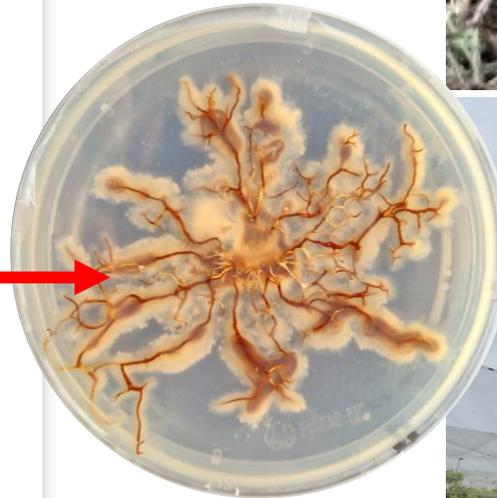


Il marciume radicale fibroso: una seria minaccia per l'olivicoltura Calabrese

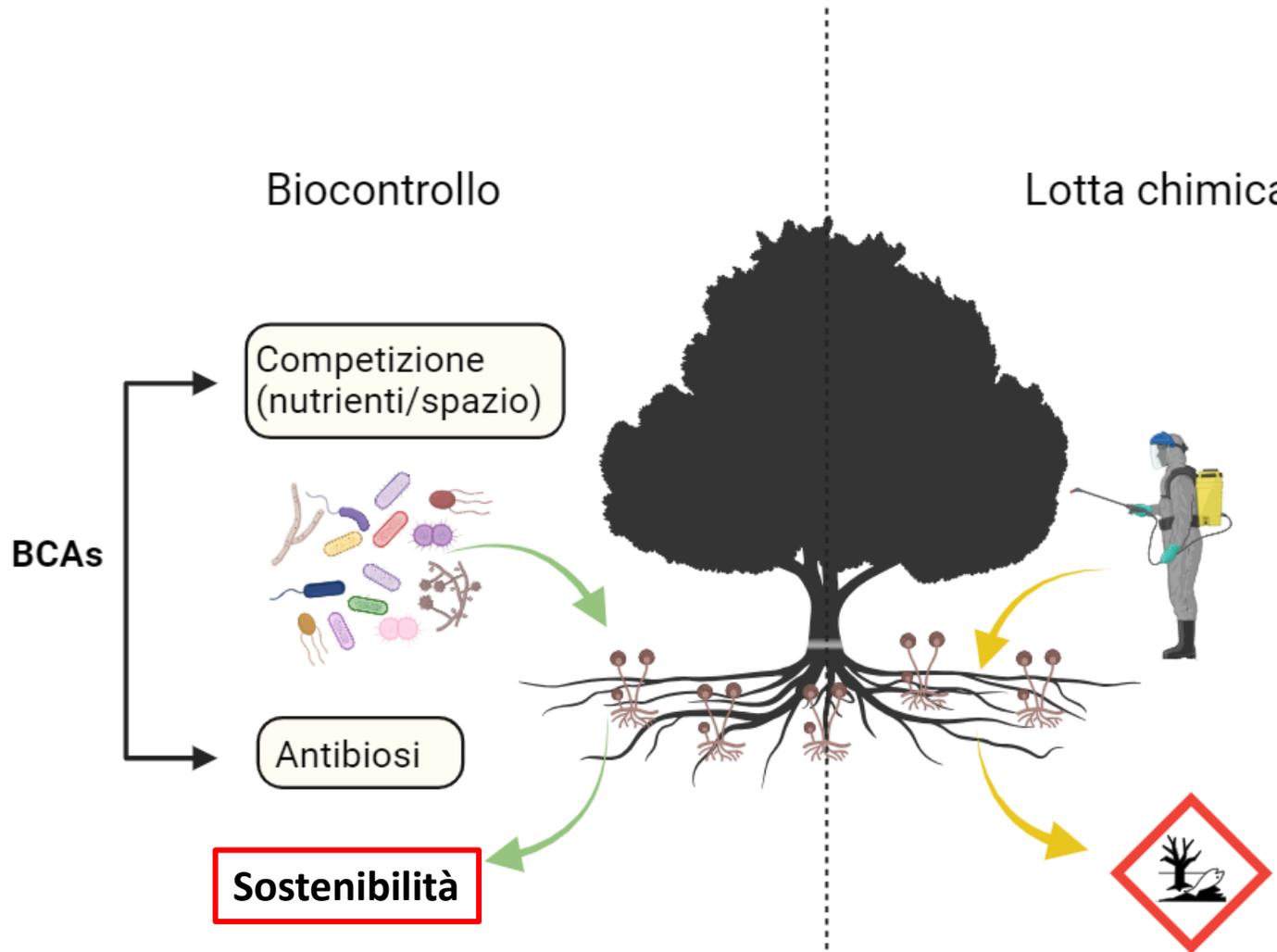
Chi? *Armillaria mellea*,

Come? Fungo patogeno saprofita e/o parassita,
Rizomorfe

Cosa? Indebolimento dell'apparato radicale
→ Sradicamento di olivi mezzo-secolari
Morte della piante d'olivo



Il Biocontrollo come soluzione alternativa?



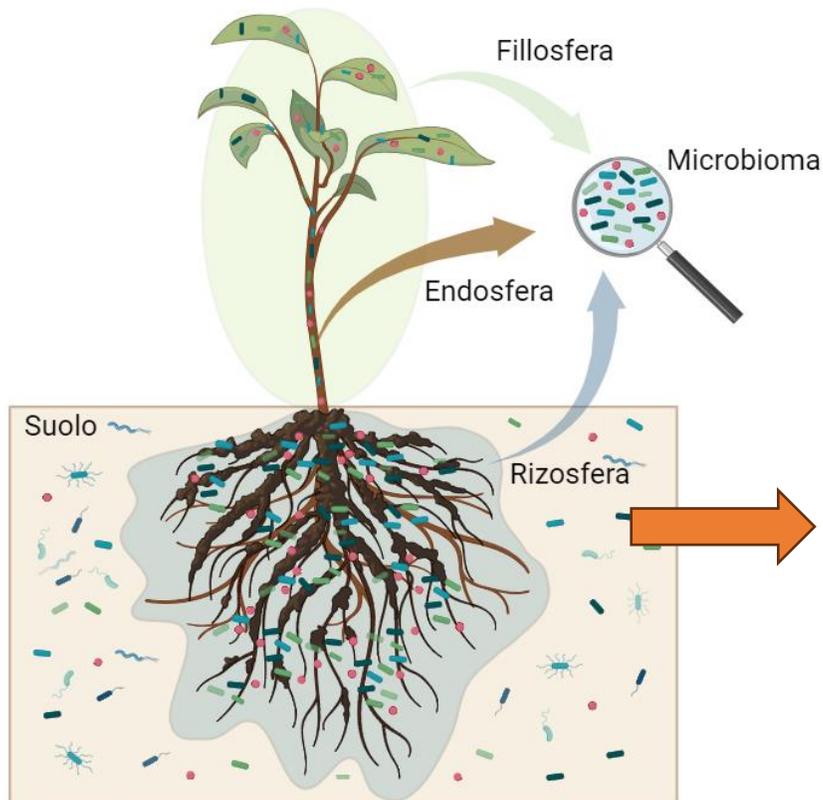
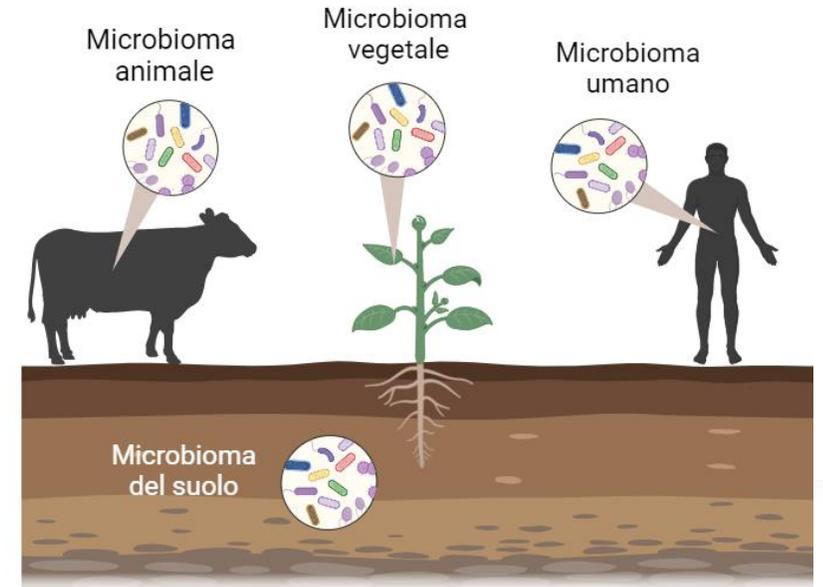
Agente di biocontrollo o biocontrol agent BCA è «un'entità biotica, antagonista o concorrente dei parassiti» (IOBC).

Dove trovarli?

Il microbioma del suolo come fonte di BCAs

Cos'è il microbioma?

- Il microbioma identifica le comunità microbiche (funghi e batteri, patogeni o non) che vivono su e negli animali, piante, suoli, oceani e nell'atmosfera, e le interazioni tra di loro e con l'ambiente. **Microbioma sano = organismo sano**



Il microbioma del suolo

è una comunità ricca e dinamica di microrganismi svolgendo numerose funzioni utili per la pianta tra cui **la biostimolazione** (promozione della crescita) e **il biocontrollo** (antagonismo contro patogeni)

Obiettivi

- Isolare dal suolo potenziali BCAs antagonisti di *A. mellea* (*attività in vitro*)
- Valutare come questi BCAs modulano la composizione delle comunità batteriche nelle radici di piante d'olivo infette da *A. mellea* (*attività in vivo*)

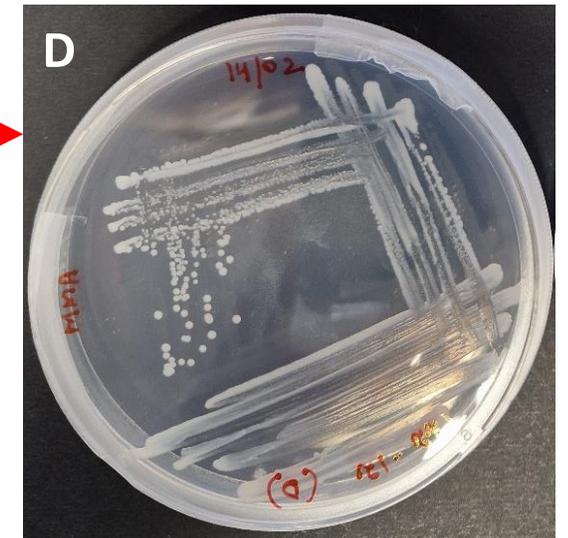
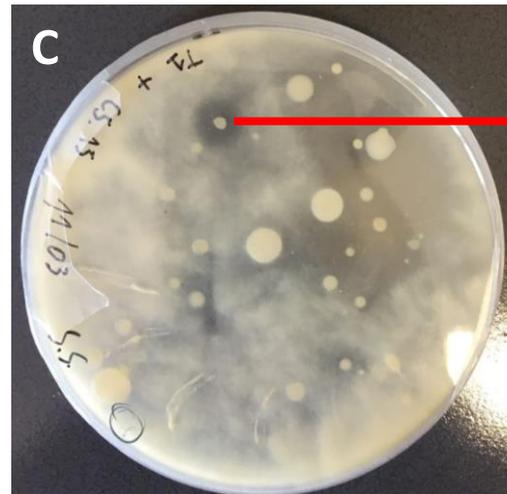
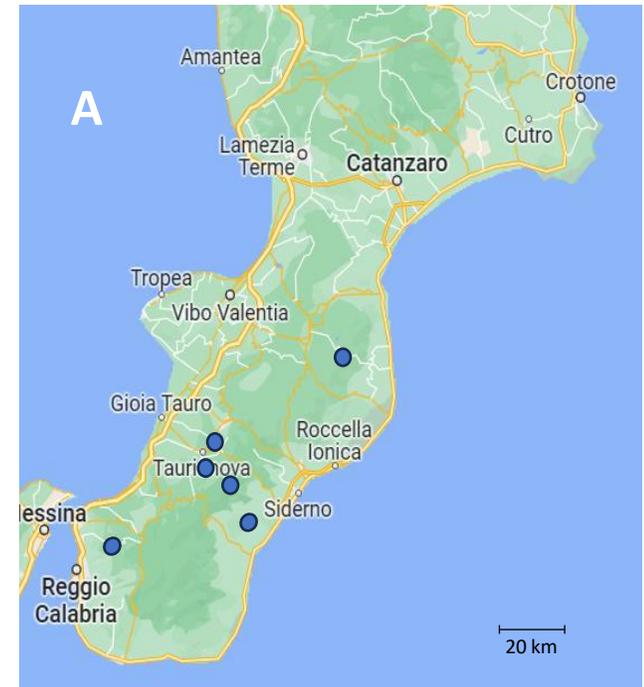
Isolamento di A. mellea

- **Condizioni di coltura**
- Piaste Petri (Ø 9 cm)
- Potato Dextrose Agar (PDA)
- 25° C in assenza di luce



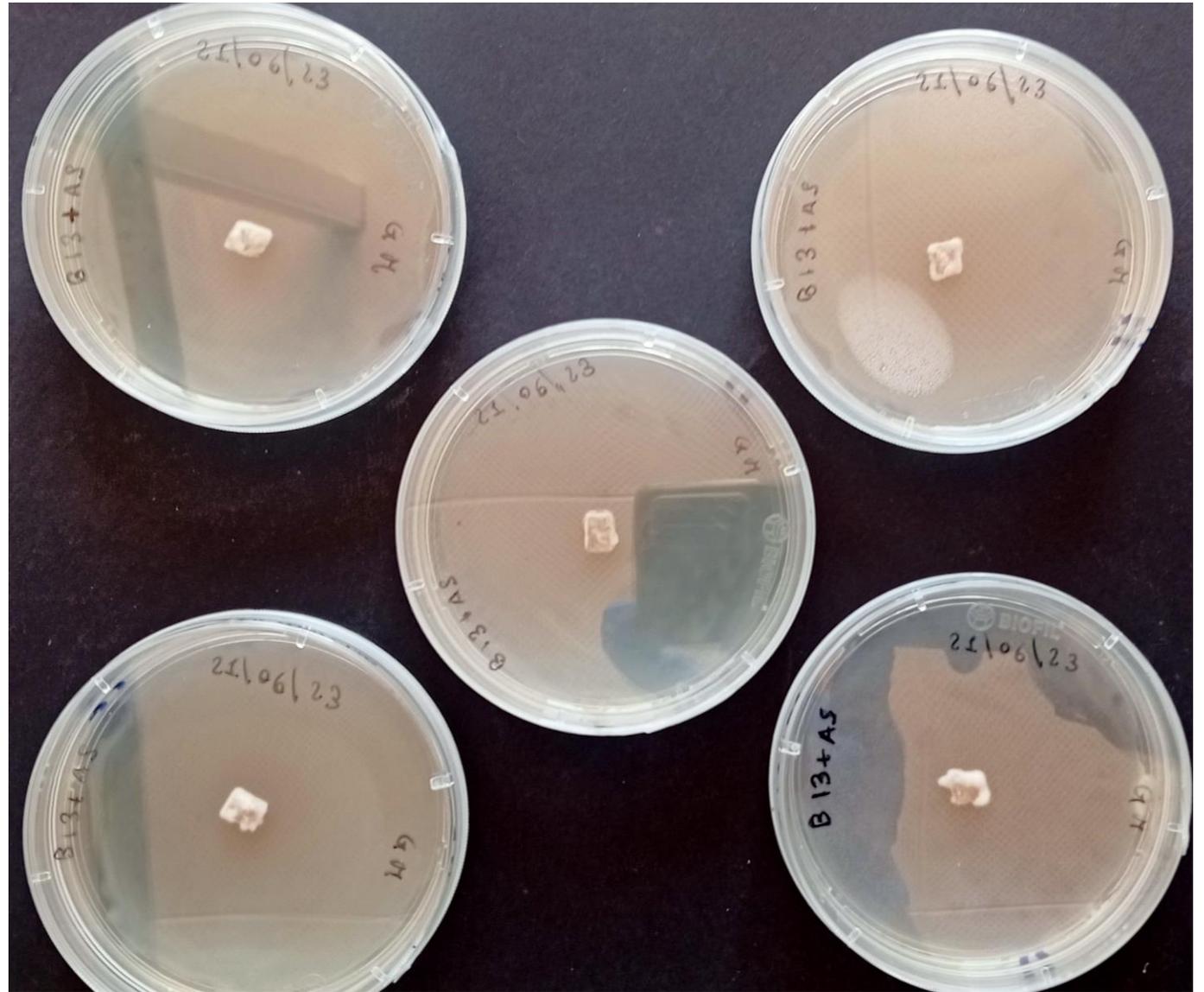
Isolamento dei BCAs

- Suoli forestali/incolti in diverse località in Calabria (A)
- Messi in sospensione, diluiti (B), e in co-coltura con il fungo modello *Rosellinia necatrix* su piastre di PDA (C)
- 9 batteri mostrando evidenti aloni di inibizione sono stati isolati (D)



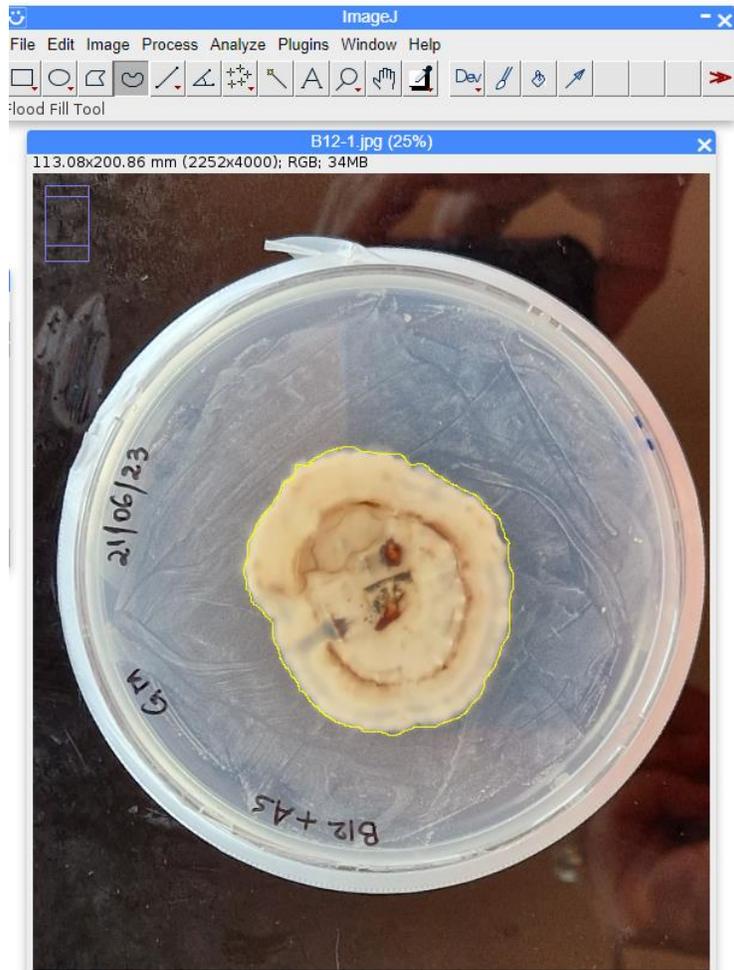
Saggi di coltura duale con *Armillaria mellea*

- **Condizioni di coltura**
- Piaste Petri (ø 9 cm)
- Soluzione batterica 10^8 cfu/mL
- Tassello di micelio di *A. mellea*
- 25° C in assenza di luce
- 4 settimane



Analisi morfometrica

software ImageJ



1. Area di crescita del micelio (mm²)

File	Edit	Font	Results	
	Area	Mean	Min	Max
1	2724.824	154.805	10	207
2	2516.811	153.940	16	208
3	3265.207	155.718	14	216
4	82.634	152.973	34	251
5	141.038	189.447	82	247
6	82.673	156.122	42	244
7	1626.594	172.803	49	219

2. Attività antifungina dei BCAs (%)

$$AA (\%) = \frac{AC - AT}{AC} \times 100$$

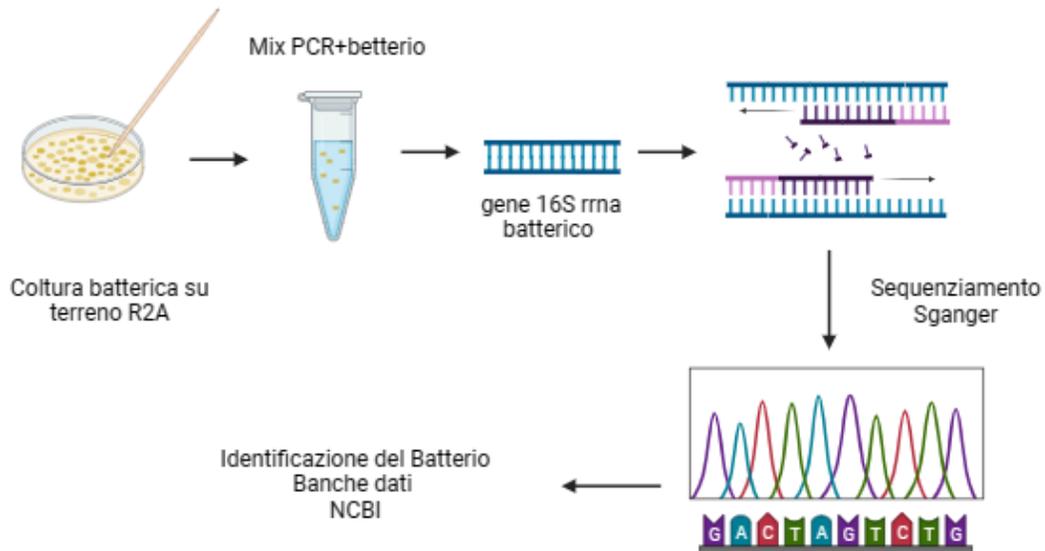
AA, Attività Antifungina;

AC, area del micelio in condizione controllo;

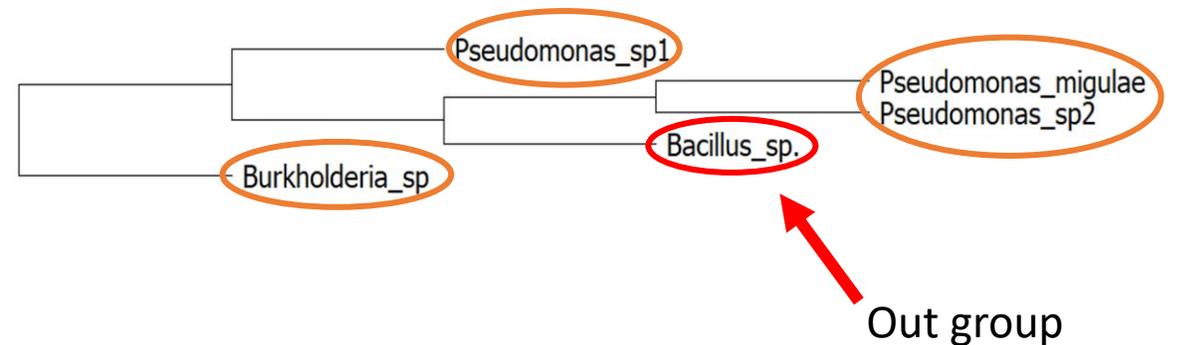
AT, area del micelio in condizione co-coltura con BCA

Caratterizzazione molecolare dei BCAs

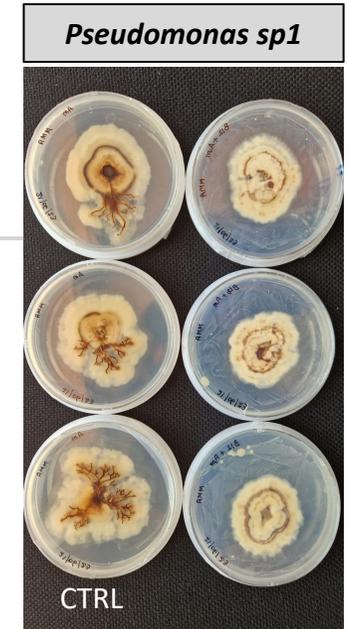
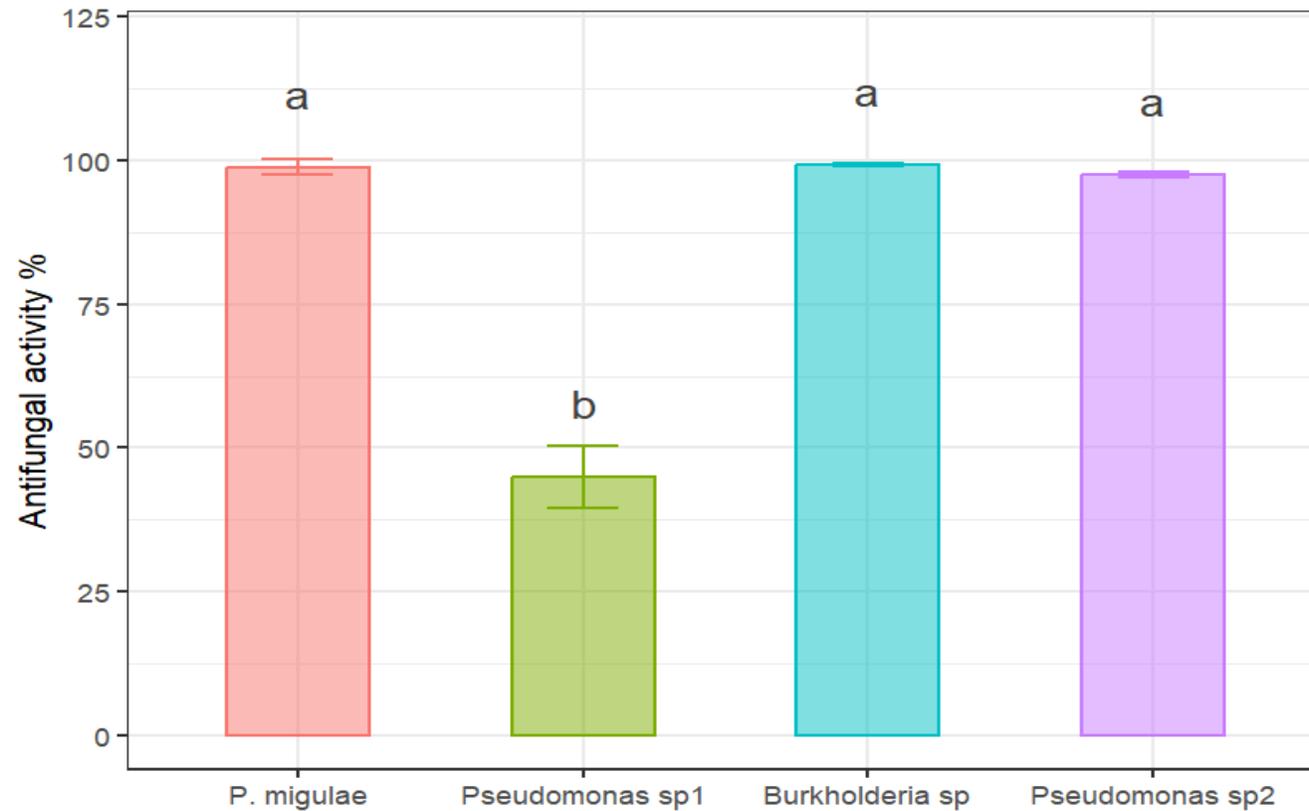
Sequenziamento del gene 16S RNA ribosomiale batterico



Pulizia delle sequenze e allineamento



Quattro BCAs hanno avuto un effetto marcata su *A. mellea*

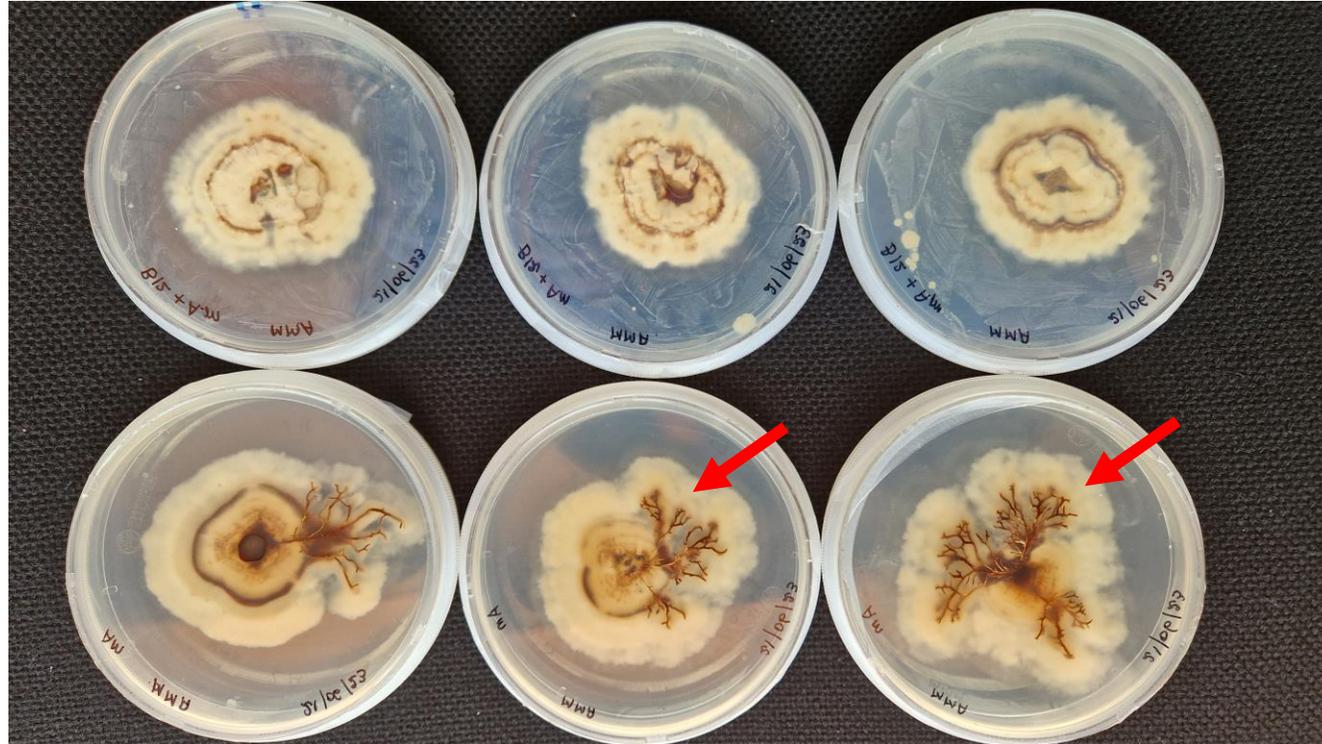


Inibizione dello sviluppo delle rizomorfe

Pseudomonas sp1

A. Mellea + BCA

CTRL



Questo effetto suggerisce un potenziale uso del batterio nei trattamenti post-infezione

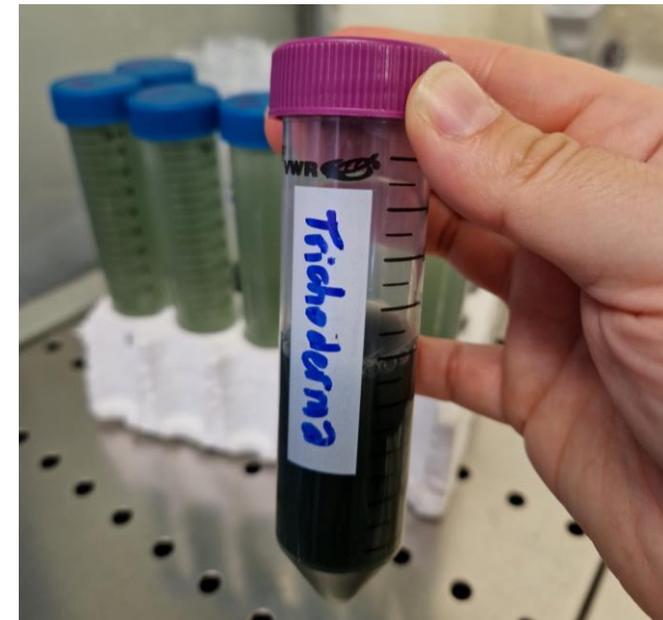
Inoculi per la prova in vivo



Preparazione degli inoculi batterici (10^8 CFU/ml)



Inoculo di *A. mellea* su rametti di olivo



Preparazione del inoculi fungino (10^7 conidi/ml)



Somministrazione dei BCAs



Inoculazione di *A. mellea*

*Inoculazione delle
piantine d'olivo (var.
Leccino)*

Aprile, 2023

Disegno sperimentale

5 BCA
1 Trichoderma
3 Pseudomonas sp
1 Burkholderia sp

4 Tesi



B11 + A1 B12 + A1 B13 + A1 B17 + A1 T1 + A1

Antagonisti vivi
Patogeno vivo

B11 + A1 B12 + A1 B13 + A1 B17 + A1 T1 + A1

Antagonisti vivi
patogeno devitalizzato

B11 + A1 B12 + A1 B13 + A1 B17 + A1 T1 + A1

Antagonisti devitalizzati
Patogeno vivo

B11 + A1 B12 + A1 B13 + A1 B17 + A1 T1 + A1

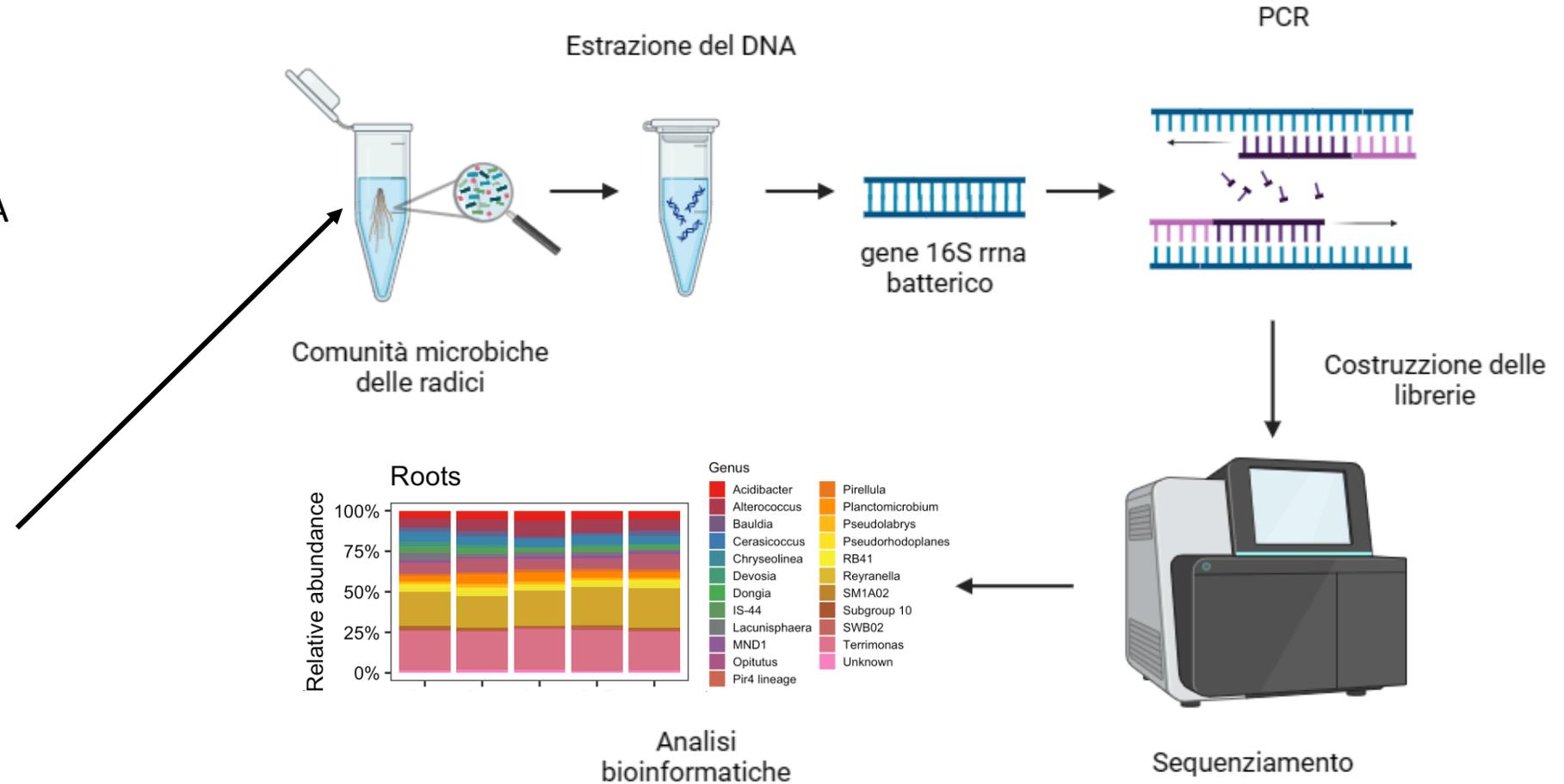
Antagonisti devitalizzati
Patogeno devitalizzato

□ Piante controllo
(non inoculate)

210 piantine

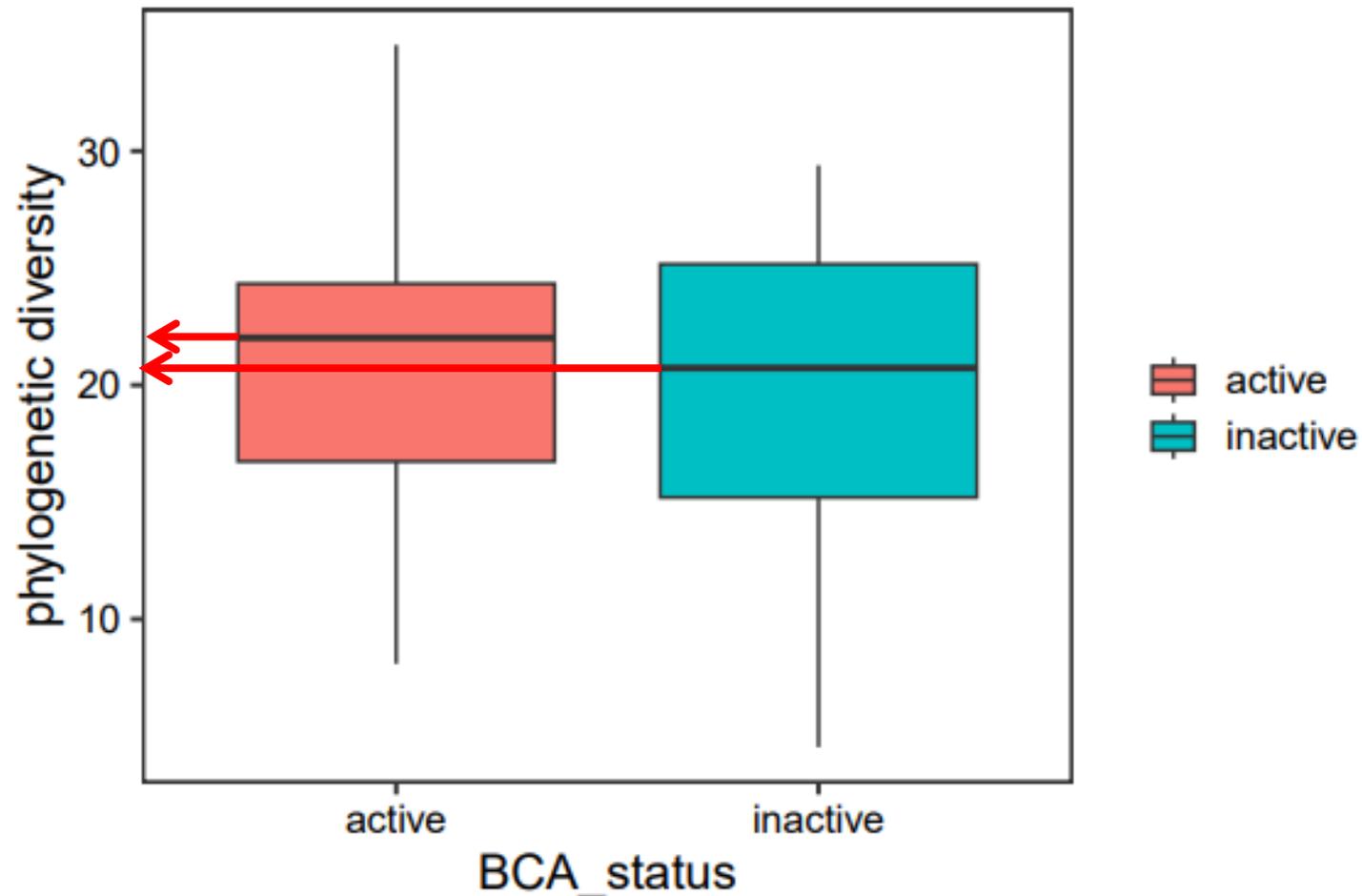
Analisi del microbioma endogeno delle radici

Sequenziamento di nuova generazione del gene 16S rRNA

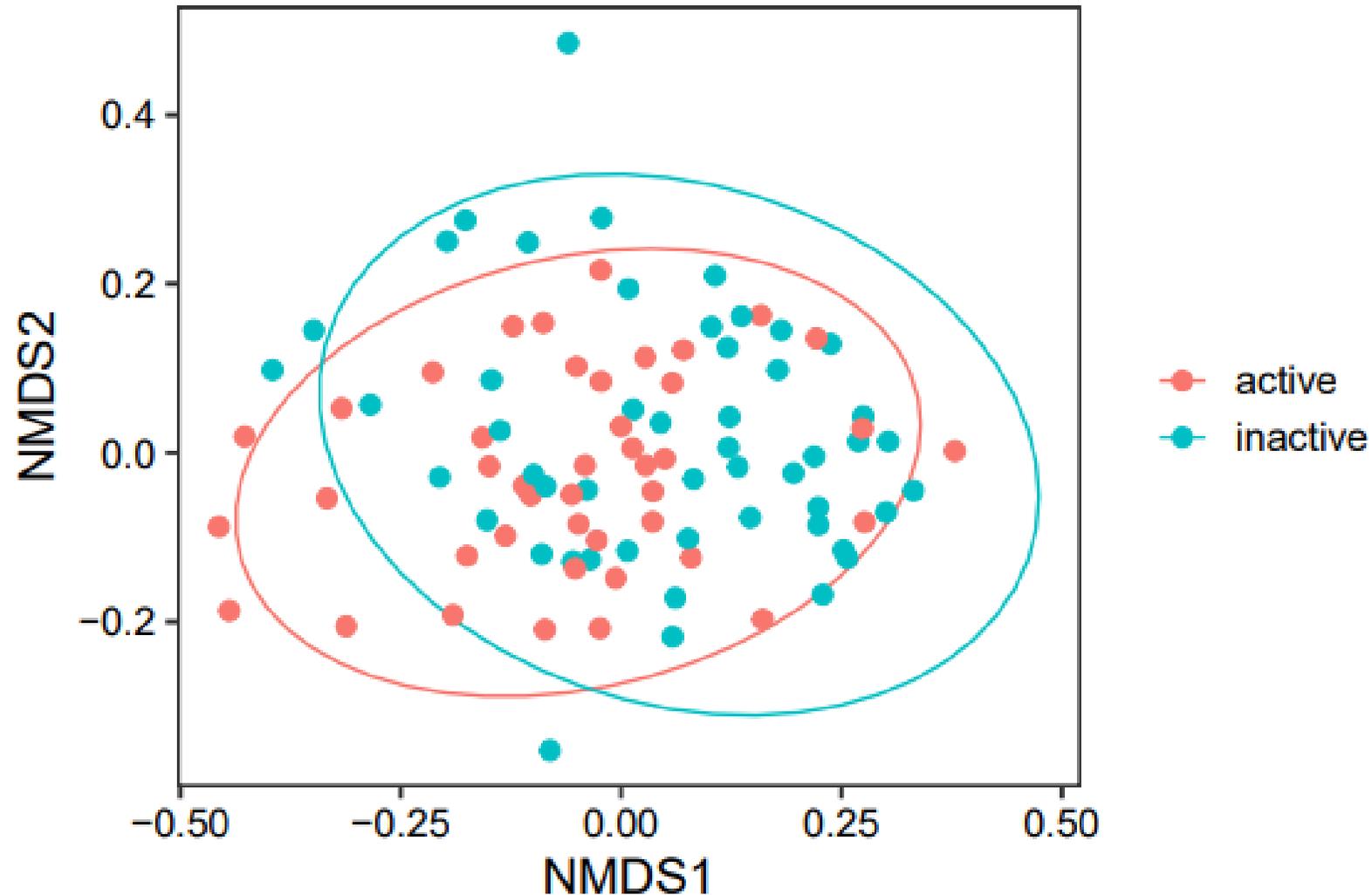


16S Amplicon Sequencing

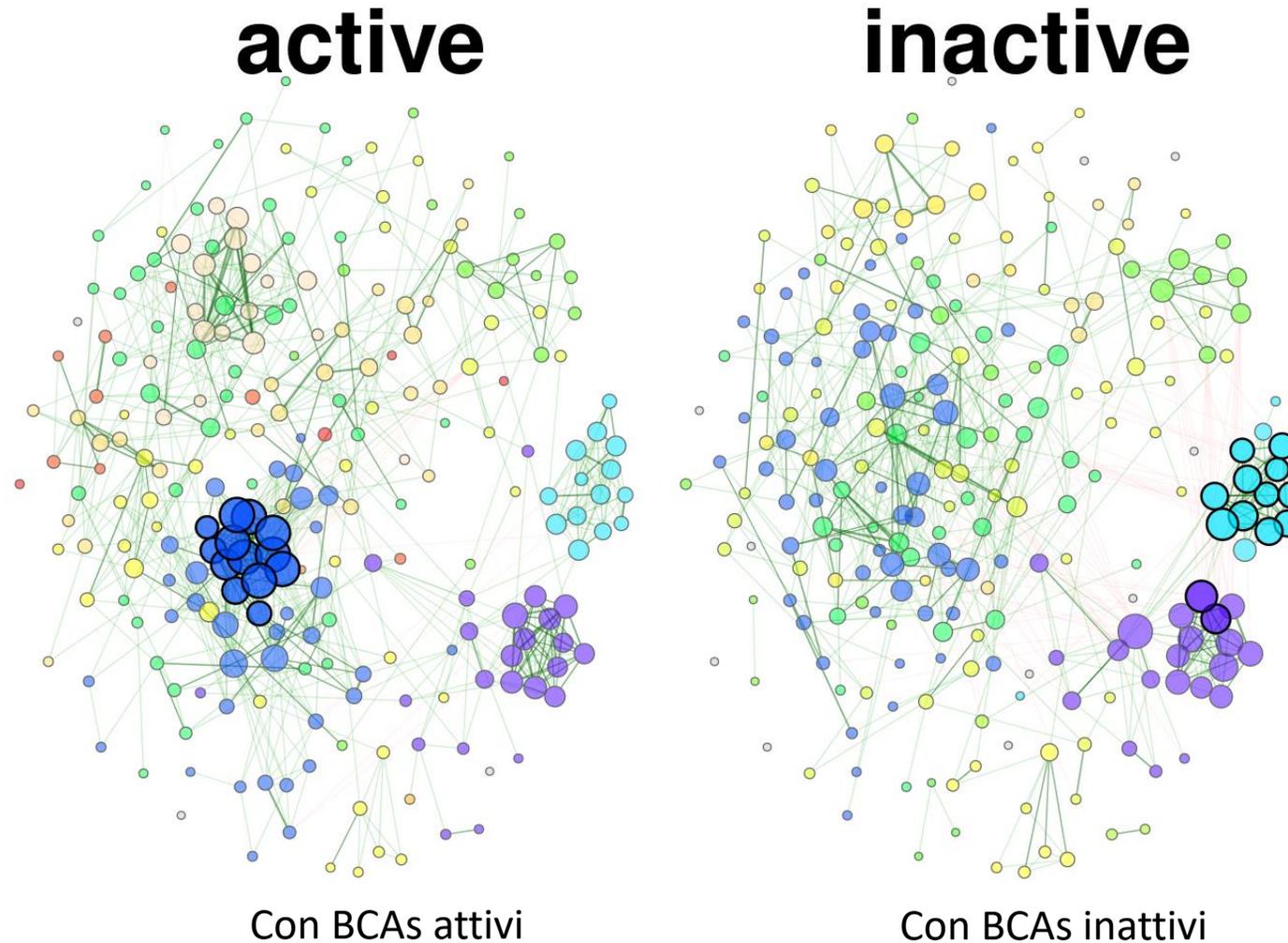
La diversità filogenetica era leggermente più elevata nelle radici piante trattate con BCAs attivi



La presenza di *A. mellea* ha avuto un leggero impatto sulla composizione del microbioma delle radici di piantine d'olivo

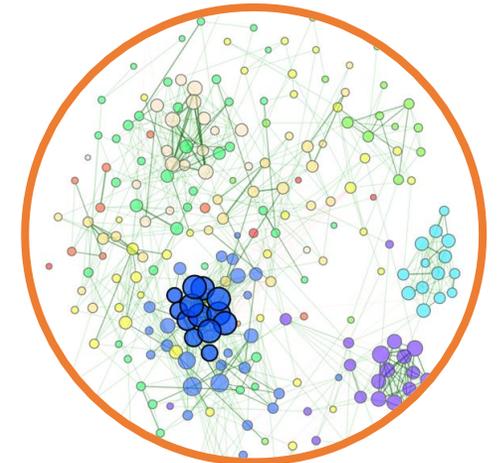
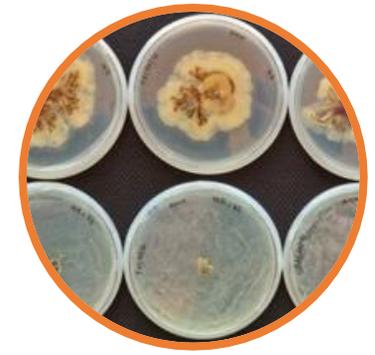


La presenza dei BCAs influenza le interazioni tra microrganismi del microbioma endogeno delle radici infette da *A. mellea*



Conclusioni e prospettive

- Isolamento di antagonisti di *A. mellea* dal microbioma del suolo :
3 Pseudomonas sp, un Burkholderia sp
- ✓ Sviluppo di strategie di lotta biologica su grande scala in modo efficace e sostenibili per l'ambiente
- Le analisi metagenomiche hanno evidenziato una riprogrammazione del microbioma radicale delle piantine dettato dalla presenza dei BCAs che potrebbero conferire alla pianta resistenza contro *Armillaria mellea*.
- il marciume radicale fibroso resta una malattia a lento andamento e il tempo ha rappresentato il maggior fattore limitante delle nostre attività.
- ✓ Esperimenti più duraturi nel tempo permetterebbero di avere un quadro più completo delle interazioni BCA/patogeno nel sistema pianta fornendo maggiori indicazioni sull'applicabilità del biocontrollo



Ringraziamenti

Laboratorio di Patologia Vegetale @UNIRC



Regione Calabria

Aziende partner

AZIENDA FAZARI DOMENICO
AZIENDA PIERLUIGI TACCONE