

RELAZIONE FINALE PROGETTO ARMISTOP

Partner DIPARTIMENTO DI AGRARIA

Misura 16: Intervento 16.02.01

Beneficiario Capofila: FAZARI DOMENICO, Codice ATECO: 01.26, CUUA: FZRDNC65M01H889I

Titolo del progetto: *Prevenzione e contrasto alla diffusione del marciume radicale fibroso da Armillaria in olivicoltura (ARMISTOP)* - CUP: J26G20000330005



Introduzione

Armillaria mellea, agente del marciume radicale fibroso, rappresenta da sempre un pericolo per l'arboricoltura calabrese in generale e per l'olivicoltura in particolare. Il fungo è un basidiomicete che si comporta sia da saprofita che da parassita causando in tale caso la morte prematura di piante giovani e adulte, o nel migliore dei casi infezioni croniche di piante secolari indebolendo esse su tutti i punti di vista agronomici (vigore, produzione e stabilità). Negli ultimi anni, la piana di Gioia Tauro è stata luogo di importanti devastazioni di piante d'olivo mezzo-secolari a causa del marciume radicale fibroso, e tale fenomeno è in continua diffusione sul territorio regionale. Oltre alla difficoltà di contenimento della diffusione della patologia, il potenziale patogenico considerevole di *A. mellea*, la sua elevata polifagia, nonché l'impossibilità di eradicarlo dai terreni infetti ne fanno il patogeno più temibile in Calabria, in quanto capace di condizionare drasticamente l'intera filiera olivicola Calabrese. La maggior parte delle strategie adottate per controllare la diffusione del fungo furono preventive in quanto quelle curative si sono rivelate inefficienti con un impatto non trascurabile sull'ambiente. Per tali motivi, l'obiettivo del presente progetto è la messa a punto di metodi di contrasto agronomici, biologici, fisici e chimici garantendo la sopravvivenza e la produttività delle piante con un impatto ambientale minimo, nonché la pianificazione di nuove strategie da adottare all'livello preventivo.

Materiale e metodi

Isolamento del patogeno

Campioni di radici e corteccia, oltre che carpofori di *A. mellea* prelevati presso le aziende Fazari e Taccone, da piante con differenti livelli di gravità di sintomi, sono stati analizzati presso il dipartimento di Agraria per confermare la presenza e l'identità specifica. A tale scopo è stato effettuato l'isolamento del patogeno sul substrato agar patata destrosio (PDA) addizionato con antibiotici per prevenire la proliferazione di batteri (Fig. 10). Un isolato rappresentativo di *A. mellea* ottenuto da olivo, unitamente ad altri due isolati ottenuti da eucalipto e mandorlo sono stati conservati per le successive prove di inoculazione e sono attualmente mantenuti nella collezione micologica del Dipartimento.

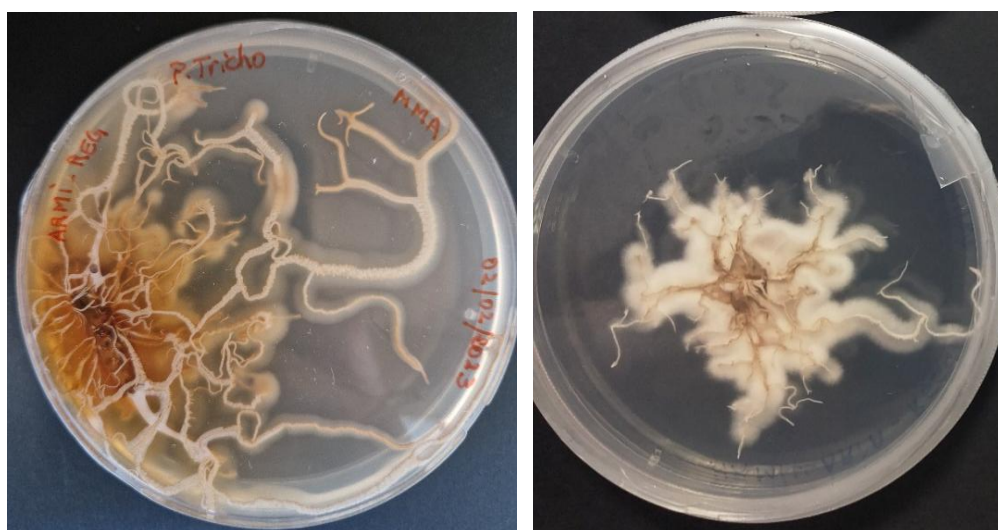


Fig. 10 - Isolati di *Armillaria mellea* allevati su PDA a 25°C al buio

Isolamento e selezione di potenziali agenti di biocontrollo

Isolamento di batteri antagonisti dal terreno

Per l'isolamento di nuovi agenti di lotta biologica da utilizzare contro *A. mellea* sono stati prelevati ed analizzati terreni forestali e agrari caratterizzati da limitata attività antropica, poiché potenzialmente contenenti una più elevata diversità microbica. L'obiettivo delle indagini è stato quello di isolare microrganismi produttori di sostanze antifungine. Tutti i campioni di terreno sono stati prelevati a circa 10 cm di profondità dopo aver allontanato lo strato di lettiera presente. Una volta in laboratorio i campioni sono stati conservati a 10°C ed analizzati entro 24-48 h. I terreni sono stati setacciati, sospesi in acqua sterile e diluiti serialmente con acqua sterile (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000). Dieci µl di ciascuna sospensione sono stati successivamente distribuiti uniformemente su PDA unitamente ad un'elevata concentrazione di frammenti di micelio di *Rosellinia necatrix*, utilizzato come patogeno modello. Le piastre di PDA sono state incubate a 24± 2°C per 7 giorni fino a quando sono apparse ricoperte da uniforme manto di micelio bianco di *R. necatrix*, di tanto in tanto intervallato da aree rotondeggianti prive di micelio con al centro una colonia batterica (aloni di inibizione). È stato, pertanto, possibile selezionare singole colonie di batteri produttori di sostanze antifungine che impedivano la crescita del fungo nelle immediate vicinanze (Fig. 11). La scelta di utilizzare *R. necatrix*, altro importante agente di marciume radicale su olivo, per molti caratteri analogo ad *A. mellea*, come patogeno modello per la selezione dei batteri antagonisti, è stata dettata dall'impossibilità di utilizzare direttamente quest'ultimo in considerazione della sua crescita irregolare in piastra (Fig. 10) che lo rende inadatto per saggi *in vitro* con la tecnica descritta.

Un numero rappresentativo di colonie batteriche (155) mostranti aloni di inibizione particolarmente evidenti è stato trasferito axenicamente su nuove capsule e sottoposto alla tecnica dello striscio in modo di ottenere colonie unicellulari (Figura 11). Le colonie sono state successivamente caratterizzate morfologicamente e conservate in glicerolo a -80°C per la caratterizzazione molecolare e futuri esperimenti.



Fig. 11. Esempi di aloni di inibizione intorno a colonie batteriche produttrici di sostanze antifungine che hanno impedito la crescita del micelio di *Rosellinia necatrix* nelle immediate vicinanze (sinistra) e isolato batterico sottoposto alla tecnica dello striscio su terreno R2A per ottenere colonie da singole cellule (destra).

Valutazione *in vitro* dell'attività antagonistica di batteri contro *Armillaria mellea*

L'attività antifungina di 25 isolati selezionati tra quelli che mostravano aloni di inibizione contro *R. necatrix* è stata saggiata in prove di coltura duale contro *A. mellea* seguendo la procedura descritta da Librizzi *et al.*, 2022 (<https://www.mdpi.com/2223-7747/11/3/436>) leggermente modificata. In breve, capsule Petri contenenti PDA sono state inoculate da un lato con un tassello di agar con micelio di *A. mellea* in attiva crescita e, nella parte equatoriale, con singole colonie batteriche distribuite in modo da ottenere una fascia di batteri perpendicolare al punto di inoculazione di *A. mellea* (Fig. 12). Piastre inoculate solo con *A. mellea* sono state utilizzate come controllo. Le piastre sono state randomizzate, incubate a 24 °C al buio e monitorate per 4 settimane. L'inibizione della crescita fungina è stata quindi stimata come riduzione percentuale della crescita del micelio rispetto alle piastre di controllo.



Fig. 12. Esempio di piastre PDA utilizzate in prove di coltura duale per valutare l'attività antifungina di isolati batterici contro *Armillaria mellea*. L'isolato B16 (a sinistra) non ha inibito la crescita del micelio, mentre l'isolato B17 (a destra) ha mostrato una forte attività antifungina.

Nove dei 25 batteri preliminarmente selezionati hanno determinato una significativa riduzione della crescita miceliale di *A. mellea* (Tabella 1). Tra questi, i ceppi B11, B13 e B17 sono stati i più efficaci mentre un livello di inibizione inferiore è stato registrato per gli isolati B7, B8, B20, B12, B21 e B10. Il ceppo B12, pur non essendo tra i più efficaci nel ridurre la crescita miceliare, ha inibito completamente la formazione di rizomorfe (dati non mostrati).

Tabella 1. Efficacia di 25 isolati batterici nella riduzione della superficie del micelio di *Armillaria mellea* (mm²). Le medie sono state calcolate da tre repliche e i valori *p* sono derivati da confronti a coppie tra l'area miceliale (mm²) per ciascun batterio e il controllo (CTRL). In neretto gli isolati selezionati per le sperimentazioni successive.

BCA	mean±sd (mm ²)	p	BCA	mean±sd	p
CTRL	2746.691±238.889	-	B14	1797.432±387.342	0,1324
B1	2719.762±317.647	1	B15	1848.212±268.661	0,2003
B2	2689.527±314.154	1	B16	1766.952±154.792	0,1014
B4	1974.428±424.821	0,4641	B17	65.458±11.509	<.0001
B5	2114.575±313.409	0,8124	B18	2069.404±283.065	0,7096
B6	2419.727±193.975	0,9999	B19	2352.856±330.337	0,999
B7	1447.407±655.333	0,0034	B20	1501.692±96.394	0,0065

B8	1498.163±244.391	0,0062	B21	1549.032±359.277	0,0111
B9	2378.107±624.742	0,9996	B22	1760.762±245.894	0,096
B10	1588.055±35.471	0,017	B23	2111.605±125.365	0,8063
B11	28.860±34.280	<.0001	B24	2416.352±677.730	0,9999
B12	1503.439±38.045	0,0066	B25	2158.471±263.371	0,8911
B13	20.084±5.408	<.0001	B26	1645.077±492.061	0,0312

Una seconda serie di prove per valutare *in vitro* l'attività antimicotica nei confronti di *A. mellea* è stata effettuata con i 4 isolati più promettenti (B11, B12, B13 e B17) modificando leggermente le condizioni sperimentali: ciascuna coltura batterica è stata uniformemente distribuita su piastre contenenti PDA ed un tassello di agar con micelio di *A. mellea* in attiva crescita è stato posto al centro della piastra. Le piastre sono state incubate come descritto in precedenza e l'area di crescita delle colonie di *A. mellea* è stata stimata attraverso immagini ad alta risoluzione e il software ImageJ (Fig. 13).

In questa seconda serie di prove in coltura duale, gli isolati B11, B13 e B17 hanno confermato una forte attività antifungina inibendo quasi completamente la crescita del micelio di *A. mellea* ($F_{4,10} = 62,48$, $p < 0,001$) (Fig. 13A, B). L'isolato B12 ha confermato una scarsa attività nei confronti della crescita miceliare, ma anche in queste prove ha completamente inibito lo sviluppo delle rizomorfe (Fig. 13A).

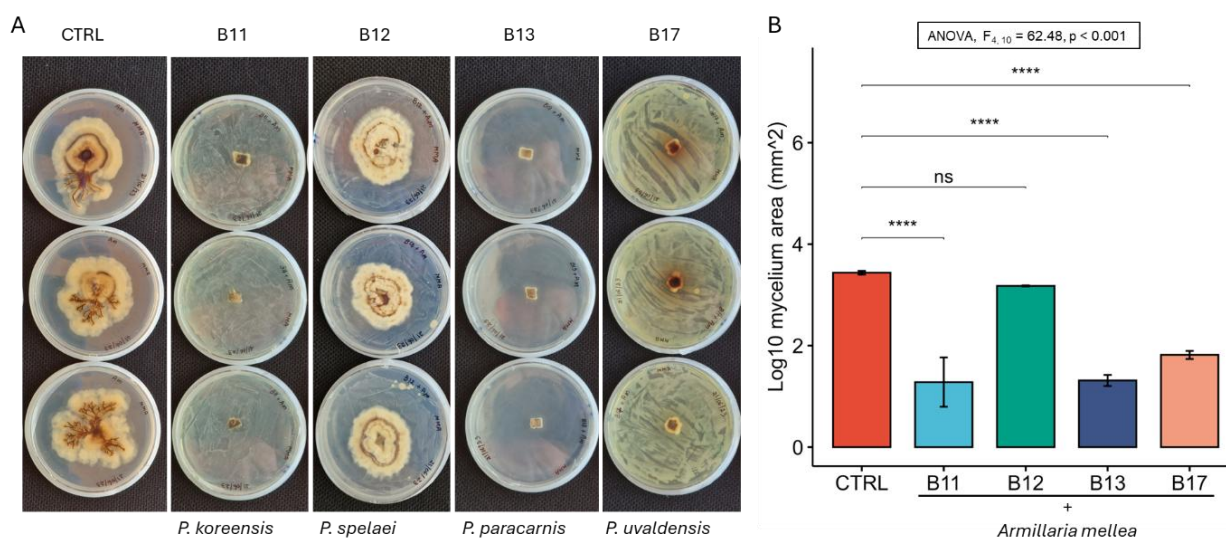


Fig. 13 - Attività *in vitro* contro *Armillaria mellea* di quattro isolati batterici (B11, B12, B13 e B17). A) Capsule Petri rappresentative contenenti solo *A. mellea* (CTRL) o *A. mellea* unitamente agli isolati batterici B11, B12, B13 e B17; B) Efficacia dei quattro isolati batterici nel ridurre la superficie delle colonie. I dati sono riportati in scala logaritmica: gli asterischi sulla parte superiore di ogni coppia di barre indica differenze statisticamente significative (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ns $p > 0.05$).

Sequenziamento del genoma dei batteri

Il genoma completo dei quattro ceppi batterici selezionati è stato sequenziato. Ogni isolato è stato coltivato in brodo LB per 12 ore a 37 °C in condizioni di agitazione continua (180 rpm). Il DNA è stato

estratto utilizzando il kit *ISOLATE II Genomic DNA* (BIOLINE, Meridian Life Science, USA) e la sua qualità ed integrità è stata valutata mediante elettroforesi e utilizzando uno spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Le librerie di sequenziamento sono state costruite utilizzando il *Native Barcoding Kit 96 V 14* (Oxford Nanopore Technologies, UK) e sequenziate su uno strumento GridION dotato di una cella di flusso FLO-MIN-114 R10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, UK).

I dati grezzi sono stati elaborati utilizzando il flusso *Nextflow pipeline* wf-batterico-genomi (<https://github.com/epi2me-labs/wf-bacterial-genomes>). In breve, i genomi sono stati assemblati utilizzando *Flye* v2.9.2 e rifiniti utilizzando *medaka* 1.11.3 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>). La qualità dei genomi e dell'assemblaggio sono state valutate sulla piattaforma online *KBase* utilizzando *CheckM* v.1.0.18 e *Quast* v.4.4. L'identità dei nostri isolati è stata assegnata utilizzando *TYSG* e l'identità nucleotidica media (ANI) è stata calcolata utilizzando *FastANI* v1.3.3. I genomi sono stati annotati utilizzando *Prokka*. I cluster biosintetici dei metaboliti secondari sono stati identificati utilizzando gli *antiSMASH* v7.0.

La comparazione dei genomi dei nostri isolati con batteri di riferimento ha evidenziato che tutti gli isolati appartengono al genere *Pseudomonas* ed in particolare alle specie *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas spelaei*, *Pseudomonas paracarnis* e *Pseudomonas uvaldensis* con valori ANI di 91.35, 98.05, 99.06 e 88.99% rispettivamente. L'analisi dei cluster di geni di biosintesi di composti bioattivi ha evidenziato che i quattro isolati comprendono cluster associati alla produzione di diverse molecole tra cui: 1) molecole con attività antifungina (*fengycin*, *fragin*, *hydrogen cyanide*, *lokisin*, *putisolvin*, *pyrrolnitrin*, e *viscosinamide A/pseudodesmin A*; 2) siderofri (*pyoverdine*, *EDHA*, *histicorrugatin*, e *pseudomonine*); iii) l'antibiotico *lankacidin C*, e 4) il fattore di patogenicità *syringomycin*. I cluster per la produzione di *Fengycin*, *pyoverdine*, e *lankacidin C* sono stati trovati in tutti i ceppi, mentre gli altri gruppi sono stati trovati in uno o due ceppi.

Valutazione dei batteri agenti di biocontrollo (BCA) *in vivo* con piantine di olivo allevate in vaso

Allo scopo di valutare l'efficacia antagonistica e l'impatto sul microbioma dei 4 batteri risultati più efficaci nelle prove *in vitro* si è proceduto con l'inoculazione artificiale di *A. mellea* su piantine di olivo in vaso e successivamente all'introduzione nel terreno degli antagonisti.

Preparazione dell'inoculo di *A. mellea*

Diverse sperimentazioni sono state condotte per individuare un metodo che consentisse di ottenere grosse quantità di inoculo di *A. mellea* da usare nelle prove di inoculazione artificiale di piantine di olivo. Inizialmente è stata valutata la possibilità di far crescere il fungo su cariossidi di grano e/o orzo sterilizzati. Tuttavia, i risultati ottenuti sono stati insoddisfacenti poiché il fungo cresce molto lentamente e non colonizza l'intera superficie delle cariossidi (Figura 15a). L'accrescimento del fungo è migliorato quando le cariossidi sterili sono state depositate su uno strato di PDA; tuttavia, anche in questo caso non è stato possibile ottenere colonizzazione uniforme delle cariossidi (Fig. 15b).



Fig. 15 - Prova di preparazione di inoculo di *Armillaria* su cariossidi di grano e orzo

Risultati molto positivi sono stati ottenuti quando il fungo è stato fatto crescere su rametti di olivo sterilizzati in autoclave a 120° C per 20 min. I rametti, lunghi circa 12 cm e con diametro di 10-12 mm sono stati mantenuti in contenitori sterili inseriti in uno strato di PDA di circa 20 mm (Fig. 16). Il patogeno è stato inoculato con tassellini di agar contenenti micelio in attiva crescita. Dopo due settimane di incubazione a 25°C al buio *A. mellea* ha colonizzato abbondantemente i rametti per tutta la lunghezza (Fig. 16). Il protocollo è stato successivamente semplificato utilizzando rametti di circa 2 cm semplicemente poggiati sullo strato di PDA (Fig. 17). Dopo un paio di settimane di incubazione tutti i rametti risultavano ampiamente ed uniformemente colonizzati dal patogeno (Fig. 17).

Fig. 16 - Rametti di olivo
inseriti in uno strato di agar
colonizzati da *Armillaria mellea*



Fig. 17 – Rametti di olivo di 2 cm poggiati su uno strato di PDA ampiamente colonizzati da *Armillaria mellea*



Saggi *in vivo* con batteri antagonisti

Per l'inoculazione del patogeno è stato utilizzato un isolato di *A. mellea* (A1) ottenuto da piante di olivo dell'azienda Fazari. Sono state utilizzate piantine autoradicate della varietà Leccino di circa 60 cm fornite a titolo gratuito dai vivai Milone. Pochi giorni prima dell'inizio della sperimentazione tutte le piante sono state trapiantate in vasi con volume di 0.36 L e capitozzate ad un'altezza di circa 15 cm.

Lo schema sperimentale ha previsto l'utilizzo di 170 piantine suddivise in 17 gruppi di 10 piante ciascuno (Fig. 18), ciascun gruppo riceva uno degli antagonisti (vivo o morto) e ciascuno di essi è stato inoculato con il patogeno (vivo o morto) per un totale di 17 gruppi. Antagonisti e patogeno sono stati devitalizzati a 121°C per 20 min. L'ultimo gruppo di piante non ha ricevuto alcuna inoculazione.

B11 + A1	B12 + A1	B13 + A1	B17 + A1	Antagonisti vivi Patogeno vivo
B11 + A1	B12 + A1	B13 + A1	B17 + A1	Antagonisti vivi patogeno devitalizzato
B11 + A1	B12 + A1	B13 + A1	B17 + A1	Antagonisti devitalizzati Patogeno vivo
B11 + A1	B12 + A1	B13 + A1	B17 + A1	Antagonisti devitalizzati Patogeno devitalizzato
☐	Piante controllo (non inoculate)			

Fig. 18 - Disegno sperimentale della prova *in vivo* svolta in serra su piante d'olivo (var. Leccino). Ciascun gruppo è costituito da 10 piantine di olivo.

L'inoculo dei batteri è stato preparato su terreno di coltura liquido LB (Luria Bertani Broth, Difco) in beute di 1 L mantenute in agitazione per 48 h a 25°C (Fig. 19a). I batteri sono stati raccolti mediate

centrifugazione e risospesi in un pari volume di tampone fosfato salino (PBS). La concentrazione delle cellule batteriche in ciascuna sospensione è stata determinata attraverso la costruzione di specifiche curve di taratura che hanno messo in relazione Colonie Formanti Unità e densità ottica misurata a 600 nm (OD_{600}) di ciascun batterio. Tutti i batteri al termine del periodo di incubazione hanno raggiunto una concentrazione di circa 8×10^8 cellule/ml. Queste sospensioni sono state successivamente diluite con PBS per ottenere una concentrazione standard di 10^8 cellule/ml (Fig. 19b). Ogni sospensione è stata divisa in due parti identiche ed una di esse è stata autoclavata per devitalizzare i batteri.

L'inoculo di *A. mellea* è stato preparato su rametti di olivo di 3-4 cm, come descritto in precedenza.

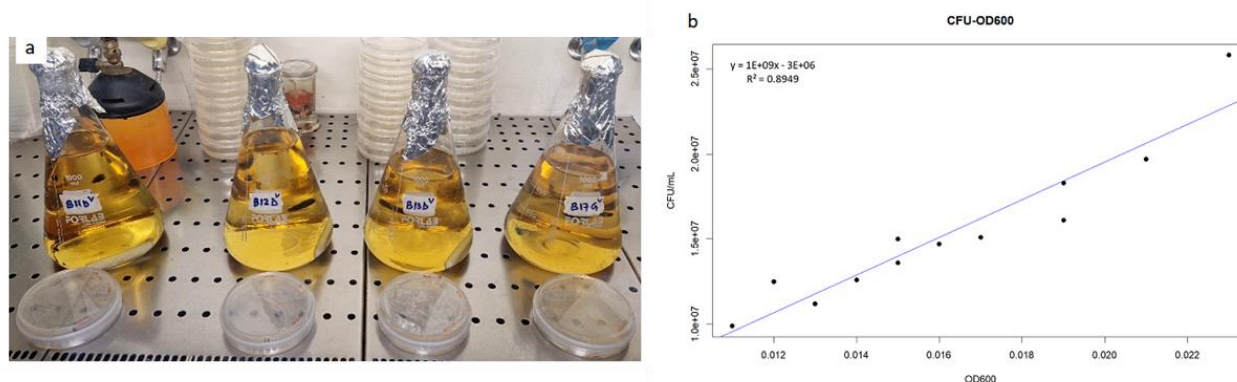


Fig. 19 – Beute utilizzate per la crescita dei batteri (a) e retta di taratura utilizzata per il calcolo della concentrazione (b)

L'inoculazione degli antagonisti è stata realizzata somministrando a ciascun vaso 50 ml di sospensione batterica/fungina (viva o morta). In prove preliminari era stato verificato che tale volume era sufficiente per consentire l'uniforme bagnatura del terreno contenuto in un vaso e la conseguente uniforme distribuzione degli antagonisti nel pane di terra (Fig. 20a). L'inoculazione di *A. mellea* (Fig. 20b) è stata fatta a distanza di 24h dall'inoculazione degli antagonisti realizzando due fori larghi 1 cm e profondi 5 cm alla base di ciascuna pianta. In ciascun foro è stato inserito un rametto di olivo colonizzato da *A. mellea* (vivo o morto). Le piante sono state disposte secondo lo schema sperimentale del blocco randomizzato (Fig. 20c) e sono state monitorate settimanalmente per verificarne l'accrescimento dei germogli e rilevare la comparsa di eventuali sintomi.

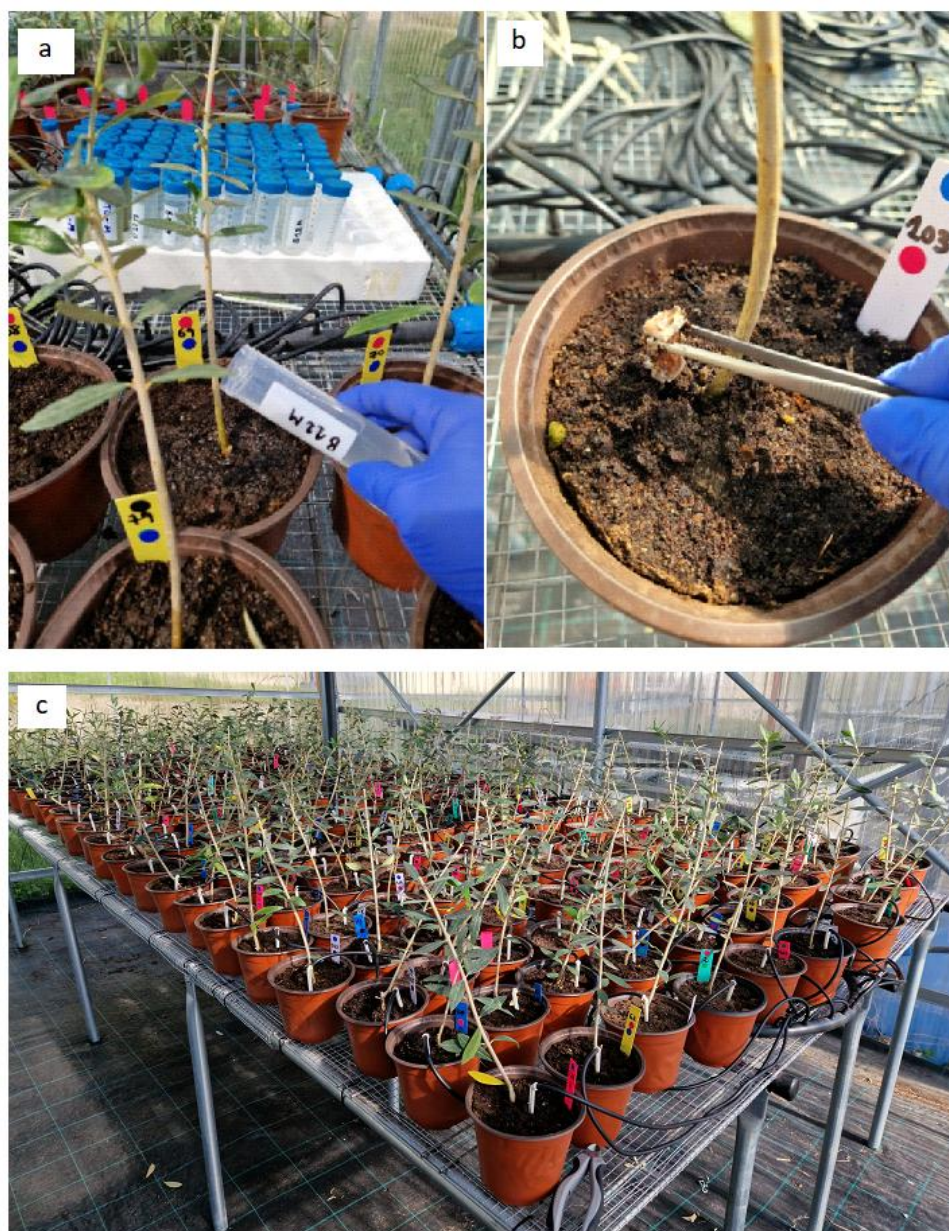


Fig. 20 - Prove di lotta biologica contro *Armillaria mellea* su piantine di olivo inoculate artificialmente. Somministrazione degli antagonisti (a), inoculazione di *armillaria mellea* (b) e vista d'insieme delle piante trattate (c)

Purtroppo, le tempistiche del progetto non hanno permesso di attendere la comparsa di sintomi di marciume radicale sulle piante inoculate con *A. mellea* in considerazione del ciclo biologico del patogeno che tipicamente prevede una lenta colonizzazione delle radici. Per tale motivo a distanza di 4 mesi dall'inoculazione si è deciso di “smontare” la prova per valutare l'impatto dei batteri antagonisti sulle piantine di olivo e sul microbioma delle radici e del terreno intorno ad esse (rizosfera) indipendentemente dalla presenza/assenza di micelio vivo di *A. mellea*.

Per l'estrazione degli acidi nucleici sono stati utilizzati circa 50 mg di radici e terreno. Le radici sono state lavate con acqua di rubinetto, sterilizzate in superficie mediante immersione per 30 secondi in ipoclorito di sodio al 2%, risciacquate due volte con acqua distillata sterile e asciugate all'aria su carta assorbente. I campioni di radici e di terreno sono stati conservati a -80 °C in attesa delle analisi. La parte restante delle piante è stata separata in germogli e radici tagliando il fusticino al livello del

suolo. Entrambe le parti sono state essiccate in forno a 60°C per una settimana per determinarne il peso secco.

Analisi del microbioma

L'estrazione del DNA, la preparazione delle librerie ed il sequenziamento da terreno e radici sono stati realizzati come riportato in Malacrino et al., 2021 (10.1094/PBIOMES-02-21-0011-R). Dopo i controlli di qualità e l'eliminazione degli adattatori con TrimGalore le sequenze sono state elaborate in R v4.4.0 (R Core Team, 2020) utilizzando la pipeline DADA2 v1.22 per identificare le “*amplicon sequence variant*” (ASV) e rimuovere chimere e sequenze di bassa qualità. Le ASV sono state allineate utilizzando DECIPHER, annotate tassonomicamente utilizzando il database SILVA v138. Gli ASV identificati come “cloroplasti” o “mitocondri” e i potenziali contaminanti sono stati scartati.

L'impatto degli agenti di lotta biologica (BCA) sul microbioma batterico delle piante di olivo è stato valutato determinando la diversità e sulla struttura delle comunità microbiche analizzando separatamente il terreno e le radici. La diversità all'interno delle comunità batteriche è stata valutata calcolando il “*Faith's phylogenetic diversity index*” con il *package* *picante* e le differenze nella diversità microbica sono state saggiate adattando un modello lineare utilizzando il *package* *lme4* dove lo stato dei BCA (attivo o inattivo), l'identità dei BCA (B11, 12, 13 e 17) e la loro interazione sono stati utilizzati come fattori fissi. La distanza multivariata non ponderata UniFrac tra coppie di campioni è stata calcolata utilizzando il *package* *vegan* e visualizzata con una scala multidimensionale non metrica (NMDS). Le differenze nella struttura compositiva delle comunità batteriche del terreno e delle radici sono state saggiate utilizzando PERMANOVA (999 permutazioni) considerando lo stato dei BCA, la loro identità e la loro interazione come fattori fissi.

Il sequenziamento degli ampliconi ha prodotto 615.187 sequenze di elevata qualità (in media 2.192,72 sequenze/campione con un minimo di 1.096 ed un massimo di 22.892). Sono stati identificati in totale 4218 ASV, di cui 1721 nelle radici e 2466 nella rizosfera. L'analisi delle diversità filogenetica microbica nelle comunità di radici e rizosfera ha evidenziato un impatto significativo sia dello stato dei BCA (vivi o morti) che della loro identità BCA ($F_{3, 46} = 4,59$, $p = 0,0067$ e $F_{3, 38} = 2,95$, $p = 0,045$, rispettivamente). Le comparazioni a coppia hanno indicato un aumento della diversità batterica nelle radici ($p = 0,012$) e nel terreno ($p = 0,016$) delle piante inoculate con gli isolati vivi B12 e B17, rispettivamente (Fig. 21).

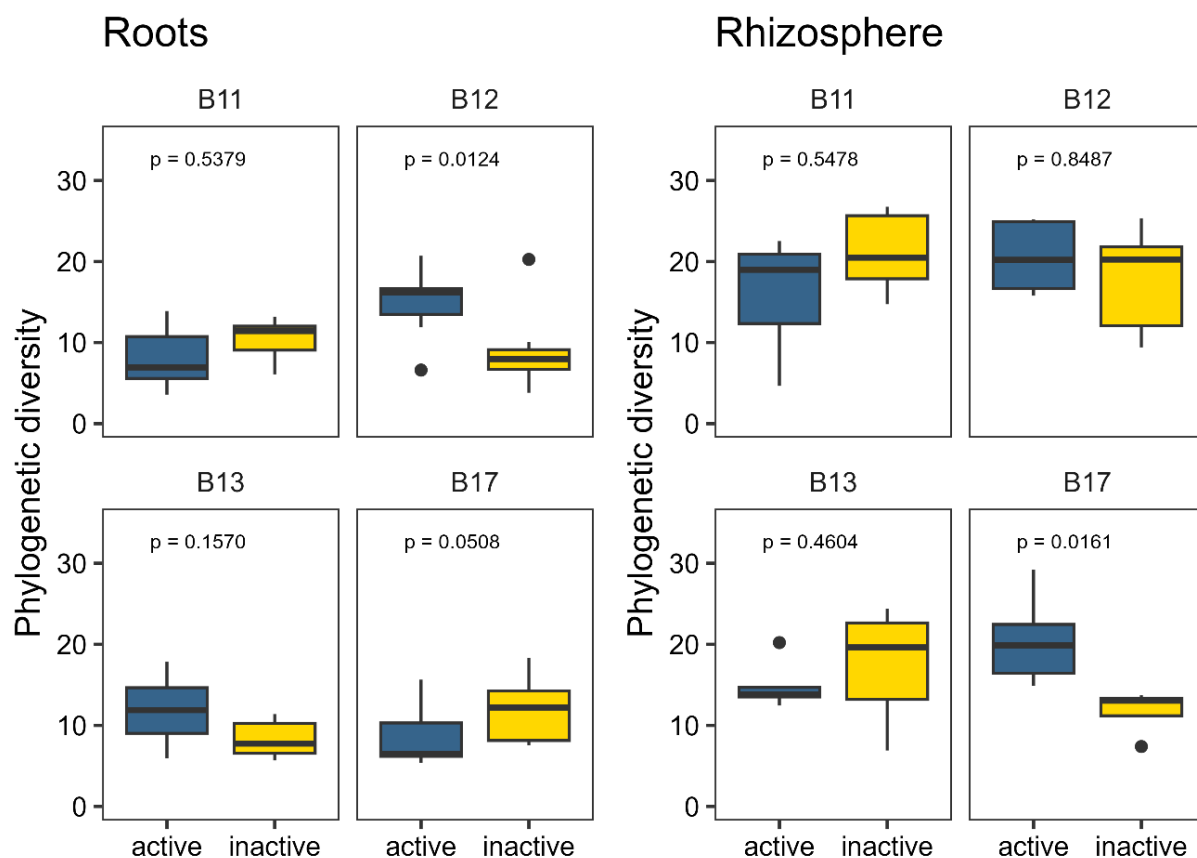


Fig. 21 - Impatto dello stato degli agenti di biocontrollo (BCA) (attivo e inattivo) sulla diversità filogenetica delle comunità batteriche di radici di piantine di olivo (sinistra) e terreno della rizosfera (destra).

La struttura delle popolazioni batteriche non sembra essere stata influenzata dallo stato dei BCA (vivi o morti) e dalla loro identità (Fig. 22). Tuttavia, sebbene entrambi i fattori, singolarmente, non abbiano influenzato la struttura microbica, la loro interazione lo ha fatto, sia nelle radici che nella rizosfera (Tab. 2; Fig. 23).

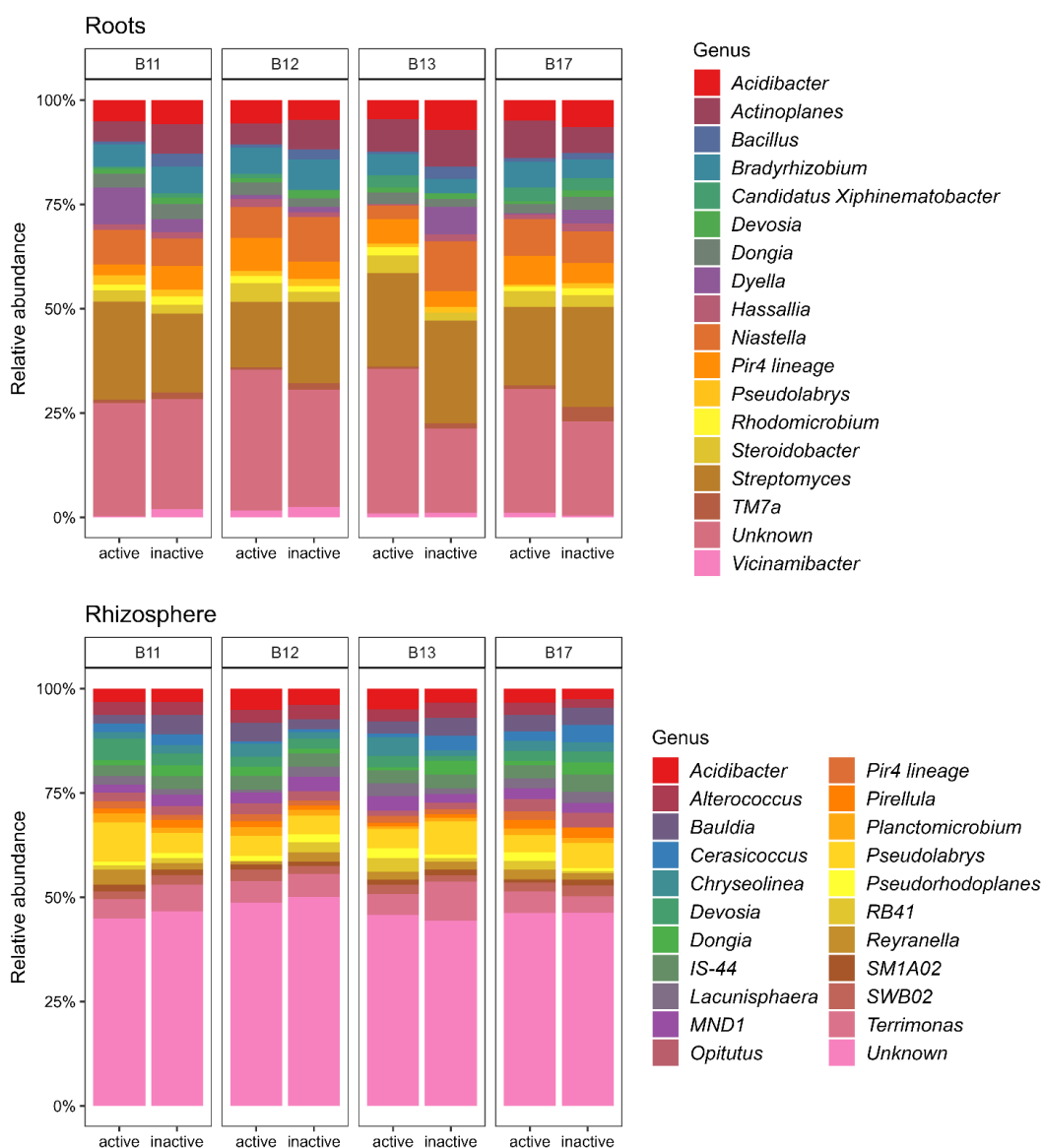


Fig. 22 - Struttura delle popolazioni batteriche nelle radici (sopra) e nella rizosfera (sotto) di piantine di olivo trattate con quattro differenti BCA (B11, B12, B13, B17) vivi (active) o devitalizzati (inactive).

Tabella 2. Analisi PERMANOVA dello stato dei BCA (attivo, inattivo), della loro identità (B11, B12, B13, B17) e della loro interazione sulla struttura delle comunità batteriche delle radici e del terreno della rizosfera di piantine di olivo

Factors	Roots					Rhizosphere		
	df	R2	F	p		R2	F	p
BCA_status	1	0.013410	0.706514	0.876		0.024581	1.123501	0.208
BCA	3	0.049014	0.860763	0.788		0.061950	0.943817	0.605
BCA_status:BCA	3	0.083423	1.465031	0.022		0.103935	1.583464	0.002

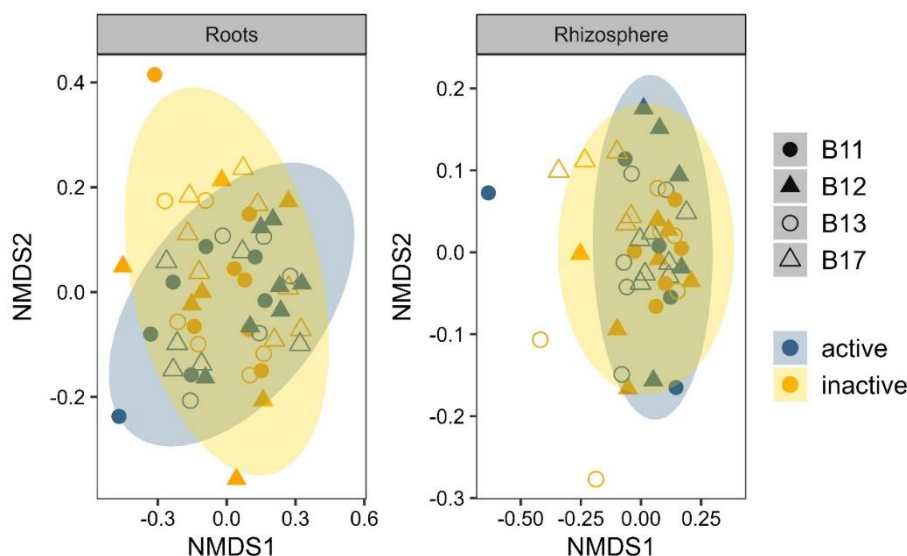
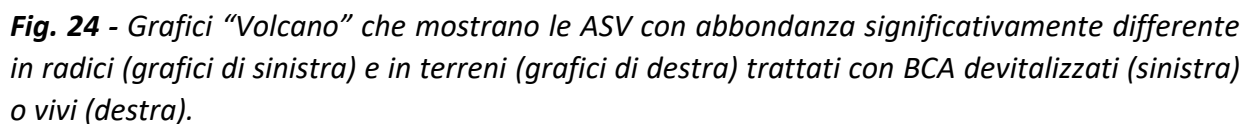


Fig. 23 - Grafici NMDS che mostra l'influenza dello stato BCA e dell'identità dei BCA sulla struttura delle comunità batteriche.

Le “amplicon sequence variant” (ASV), con abbondanza significativamente differente nelle radici e nella rizosfera inoculate con cellula vive o morte, sono state identificate separatamente per ogni isolato batterico utilizzando il *package DESeq2*. Complessivamente sono state identificate 46 ASV (Fig. 24). Sulle radici, 4, 1 e 4 ASV sono risultate più abbondanti nelle piante inoculate con ceppi inattivi di B11, B12 e B13, rispettivamente. Per contro, 2 e 12 ASV erano più abbondanti nelle piante inoculate con i ceppi attivi di B11 e B12, rispettivamente. Nessun ASV è stato significativamente influenzato dall'isolato B17 (Fig. 24). Nella rizosfera, 1 e 6 taxa erano più abbondanti quando le piante venivano inoculate con ceppi inattivi di B11 e B12 mentre l'inoculazione del l'isolato attivo B17 aumentava significativamente l'abbondanza di 16 ASV. Nessun ASV è stato influenzato in modo significativo dall'isolato B13.

I dati sulla biomassa secca di radici e germogli sono stati adattati a un modello lineare utilizzando il *package lmer* considerando lo stato dei BCA e la loro identità BCA come fattori fissi e le differenze tra le coppie di stato dei BCA sono state valutate con il *package emmeans*. Le prove sono state effettuate su radici e germogli separatamente. Uno *Structural Equation Model* (SEM) è stato costruito utilizzando il *package piecewise SEM* per valutare l'influenza dello stato dei BCAs (vivo o inattivato) sulla diversità microbica e sulla composizione del microbioma di terreno e radici e le loro influenze dirette e indirette sulla biomassa di radici e germogli.

Lo stato dei BCA (attivo/inattivo) è risultato il fattore principale nel determinare le variazioni di biomassa sia nelle radici che nei germogli ($F_{1, 52} = 53,45$; $p < 0,0001$ e $F_{1, 52} = 23,15$; $p < 0,0001$, rispettivamente). Le analisi hanno evidenziato un aumento significativo della biomassa in tutte le piantine di olivo inoculate con BCA vivi (attivi) rispetto a quelle inoculate con BCA inattivi (devitalizzati) (Fig. 25). Una sola eccezione, in cui non sono state rilevate differenze significative è rappresentata dalla parte aerea di piantine di olivo inoculate con l'isolato B17 (Fig. 25).



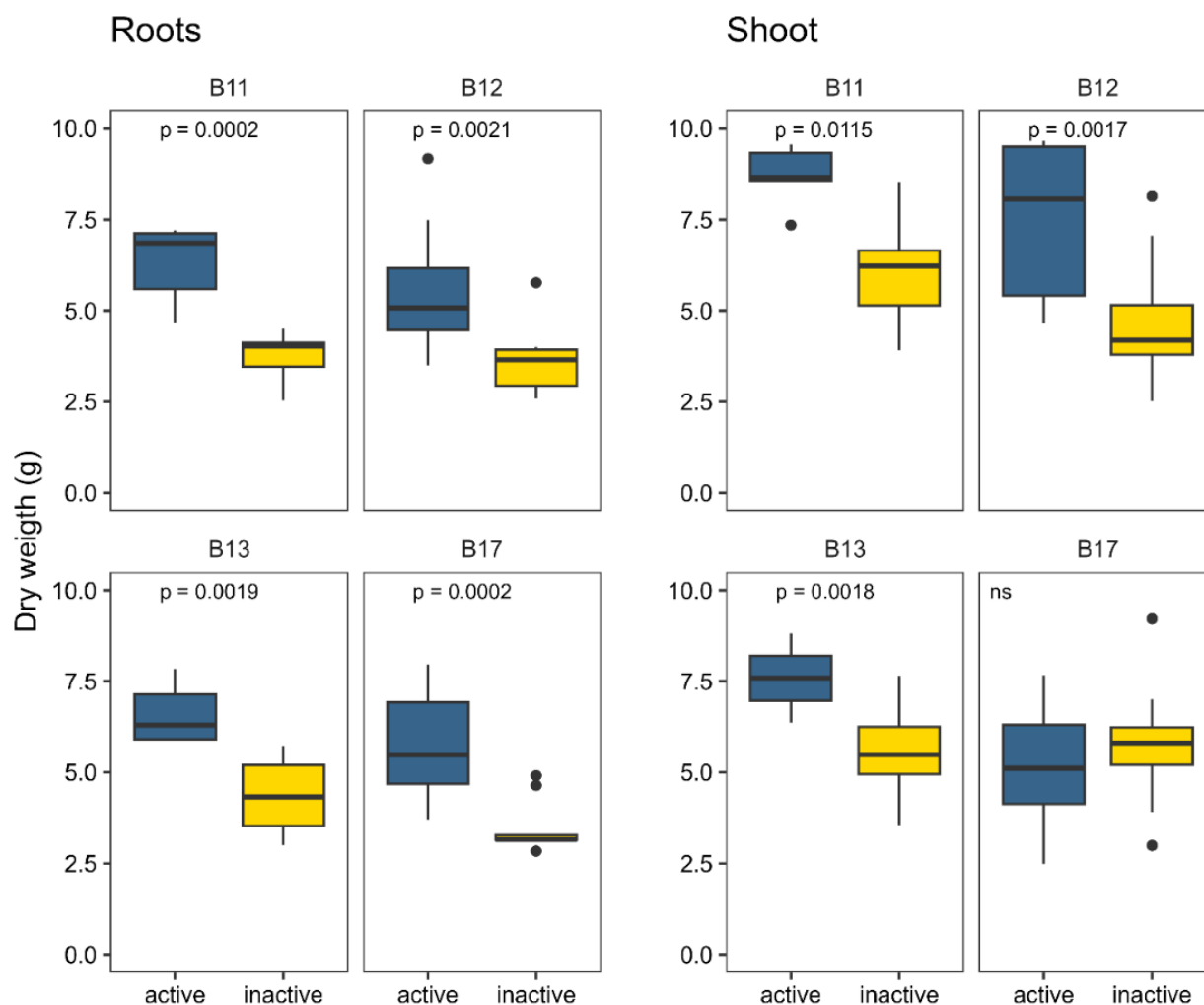


Fig. 25 - Influenza dei BCA vivi (active) e devitalizzati (inactive) sulla biomassa secca di radici (sinistra) e parte aerea (destra) di piantine di olivo inoculate con 4 differenti BCA (B11, B12, B13, B17)

Uno “*Structural Equation Model (SEM)*” è stato costruito utilizzando il *package piecewiseSEM* per valutare l'influenza dello stato dei BCAs (vivo o inattivato) sulla diversità microbica e sulla composizione del microbioma batterico in radici e rizosfera e la loro influenza diretta e indiretta sulla biomassa di radici e parti aeree. Queste analisi hanno confermato che la presenza di BCA vivi influenza la biomassa e modifica significativamente la diversità e struttura delle comunità microbiche di radici e parti aeree (Fig. 26). È interessante notare che i cambiamenti a livello di struttura e diversità microbica delle radici sono a loro volta significativamente correlate con l'aumento della biomassa delle radici. Analogamente, la biomassa radicale è risultata significativamente correlata con diversità filogenetica del terreno della rizosfera (Fig. 26).

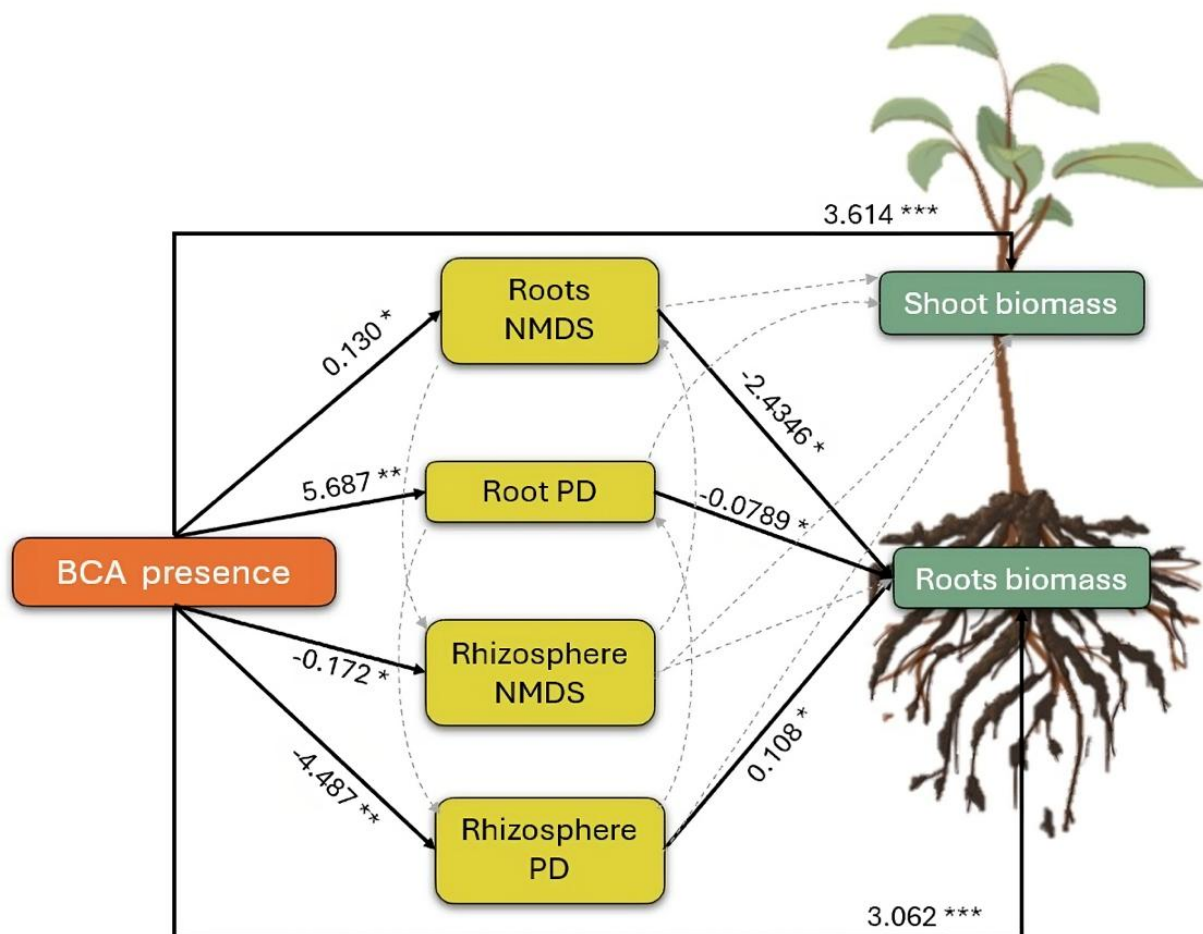


Fig. 26 - Impatto dei trattamenti con BCA attivi sulla struttura (NMDS) e la diversità filogenetica (PD) delle comunità batteriche e sulla biomassa radici e germogli delle piante di olivo. Le linee continue rappresentano relazioni significative ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$). Le linee tratteggiate rappresentano le relazioni non significative.

Conclusioni attività UNIRC

L'integrazione di dati genomici, microbiologici ed ecologici in questo studio ha fornito una comprensione completa del potenziale di isolati di *Pseudomonas* da terreno per la lotta contro *A. mellea*. I risultati evidenziano, accanto all'attività antagonista nei confronti di *A. mellea*, i meccanismi complessi attraverso cui gli agenti di biocontrollo (BCA) contrastano gli agenti patogeni radicali e promuovono la crescita radicale e delle piante in generale. L'effetto disturbante minimo sulle comunità microbiche native osservato nel presente studio evidenzia la compatibilità ecologica dei BCA selezionati. Studi futuri dovranno essere orientati a sfruttare i meccanismi antifungini complementari tra diversi isolati al fine di combinare più microrganismi in consorzi microbici per ottenere un controllo più ampio e più robusto. Inoltre, lo studio dei meccanismi molecolari alla base delle attività antifungine e di promozione della crescita delle piante dei BCA contribuirà

notevolmente a ottimizzarne l'applicazione. Infine sarà fondamentale confermare l'efficacia contro il marciume radicale lanoso di questi agenti di lotta biologica *in vivo* in condizioni pratiche di campo.