

IMPIEGATI ATTRAVERSO IL *FILM COATING* E IL *PRIMING* POSSONO FAVORIRE LO SVILUPPO DELLE RADICI CON RIPERCUSSIONI POSITIVE SULLA CRESCITA DELLE PLANTULE E, QUINDI, SULLA CAPACITÀ DI ESPLORAZIONE DEL SUOLO E DI ASSORBIMENTO DI ELEMENTI NUTRITIVI E ACQUA

I MICRORGANISMI APPLICATI AL SEME MIGLIORANO LA RISPOSTA AGRONOMICA

di Federico Di Loreto¹,
Giuseppe Colla¹, Paolo Bonini²,
Francesca Luziatelli³, Maurizio
Ruzzi³, Veronica Cirino⁴, Mariateresa
Cardarelli^{1*}

¹Dipartimento di Scienze agrarie e forestali, Università della Tuscia

*email: tcardare@unitus.it

²oloBion S.L., Barcellona, Spagna

³Dipartimento per la Innovazione nei sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali, Università della Tuscia

⁴Atens Agrotecnologies Naturales, Tarragona, Spagna



Contributo realizzato a cura della sezione Ortoflorovivaismo della Soi

La coltivazione delle specie orticole può prevedere la semina diretta oppure il trapianto. La semina diretta, in pieno campo o su suolo all'interno di apprestamenti protettivi, viene generalmente utilizzata per le specie a elevata densità d'impianto (lattuga, rucola, valeriana, spinacio) ed è obbligata per specie da radice come la carota. In molti casi si semina invece in vivaio, dove le condizioni colturali sono più fa-

cilmente controllabili ed è quindi possibile ottimizzare le condizioni di germinazione (riducendo la necessità di seme), ampliare i calendari di produzione e ridurre la competizione con le infestanti grazie al trapianto. In questo modo è inoltre possibile aumentare l'uniformità di sviluppo della coltura in campo.

Obiettivo partenza ottimale

Un parametro importante in vivaio è la qualità agronomica delle piantine, che deve garantire un'elevata percentuale di attecchimento e rapido accrescimento

in campo. Nelle prime fasi del ciclo colturale è fondamentale promuovere uno sviluppo ottimale delle radici in modo da favorire la capacità di esplorazione del suolo e quindi migliorare l'assorbimento di nutrienti e acqua, aumentando la competizione con le infestanti e la tolleranza agli stress ambientali.

Le caratteristiche genetiche del seme contribuiscono in maniera sostanziale alla qualità agronomica delle piantine. Ma si sa che anche i trattamenti al seme di *film coating* o *priming* possono migliorare la velocità di germinazione e il vigo-



1 - Particolare della prova condotta sui semi di finocchio trattati per *biopriming* con *Leucobacter iarius* e incubati in serra con nebulizzazione

2 - Piantina di finocchio al momento del campionamento (18 giorni dopo la semina): le radici sono ben sviluppate e hanno raggiunto il fondo dell'alveolo nel contenitore

3 - Piantine di cetriolo sette giorni dopo la semina dei semi, trattati con *film coating* alla dose di 10^4 spore di *B. megaterium* per seme



re delle piantine, favorendo lo sviluppo delle radici e l'accumulo di biomassa.

Film coating e priming

Il *film coating* consiste nell'applicare esternamente al seme uno strato di materiale senza modificare il volume e la forma del seme ed è un metodo ampiamente utilizzato per la concia delle sementi con agrofarmaci mentre il *priming*, nella sua forma più diffusa, consi-

ste nell'idratazione controllata del seme in sola acqua (*hydropriming*). Altri tipi di *priming* prevedono ad esempio l'idratazione in soluzioni osmotiche contenenti polietilenglicole (PEG), mannitolo o sali inorganici (KNO_3) (*osmopriming*), l'utilizzo di matrici solide idratate come la vermiculite e la leonardite (*matric-priming*), di soluzioni acquose arricchite con fitoregolatori (generalmente acido gibberellico) (*hormopriming*) o con microrganismi e sostanze naturali (*biopriming*). Con il priming il seme innesca il processo di germinazione senza portarlo a termine. L'idratazione determina quindi la rottura della dormienza, con l'idrolisi e la mobilitazione degli inibitori di germinazione, oltre che la sintesi di acidi nucleici e proteine, la produzione di ATP, l'accumulo di steroli e fosfolipidi. Prima che avvenga la protrusione della radichetta, il seme viene poi nuovamente disidratato fino al raggiungimento dello stesso contenuto idrico che il seme aveva prima del *priming*.

Il trattamento con microrganismi

Un approccio recente prevede come

trattamento al seme l'applicazione di microrganismi benefici, come i batteri promotori della crescita (noti come PGPB, *Plant Growth-Promoting Bacteria*), in modo da favorire in una fase precoce di sviluppo della piantina l'insediamento precoce dei microrganismi nella rizosfera. L'effetto misurabile sulla piantina è la modificazione della crescita, con maggior accumulo di biomassa e con un apparato radicale più sviluppato (per lunghezza totale e per numero di ramificazioni). Applicando i batteri direttamente al seme mediante il *film coating* o *priming* è inoltre possibile ridurre la quantità di inoculo necessario e i costi di applicazione.

Prove sperimentali

Il gruppo di Orticoltura e Floricoltura del Dafne, in collaborazione con il gruppo di Chimica delle fermentazioni del dipartimento Dibaf, entrambi dell'Università degli Studi della Tuscia, insieme a OloBion (Barcellona, Spagna), ha condotto prove sperimentali su specie orticole differenti utilizzando i batteri *Bacillus megaterium* (MHBM77 - Atens, Agrotecnologias Naturales) e

Leucobacter iarius. *B. megaterium* è un batterio Gram-positivo, sporigeno, già utilizzato come biostimolante e caratterizzato per la capacità di fissare l'azoto, solubilizzare il fosforo, produrre auxine e siderofori (chelanti del ferro) mentre *L. iarius* è un batterio Gram-positivo non sporigeno isolato e caratterizzato per la capacità di produrre elevate quantità di acido 3-indolo acetico. Le prove sono state condotte su semi di cetriolo, finocchio e peperone.

La prova di *film coating* è stata realizzata applicando proprio le spore di *B. megaterium* (ceppo B27) a dei semi di cetriolo (*Cucumis sativus* L.), in particolare della cultivar "Marketmore" (La Semiorto Sementi srl, Sarno).

Il trattamento è stato effettuato spruzzando sulla superficie dei semi una soluzione acquosa in modo da ottenere una carica di inoculo pari a 1×10^4 oppure 1×10^6 spore/semi. Per il controllo è stata applicata la stessa quantità di acqua in assenza di spore. Dopo il trattamento i semi sono stati fatti asciugare con una leggera ventilazione per evitare l'assorbimento dell'acqua nel seme.

Il *biopriming* è stato invece effettuato su finocchio (*Foeniculum vulgare* var. *azoricum* Miller) (var. 'Di Sarno' sel. Precoce) e peperone (*Capsicum annum*

Tabella 1 - Effetto del coating sulle radici di cetriolo a 12 giorni dalla semina

Dose di microrganismo (numero di spore/semi)	Lunghezza radice (cm)	Area superficiale (cm ²)	Diametro medio (mm)	Apici radicali/pianta
Controllo	192,70 b	22,78 b	0,371	369,74 b
10 ⁴	235,78 a	28,28 a	0,382	515,30 a
10 ⁶	182,24 b	22,10 b	0,384	382,50 b
Significatività	***	***	ns	***

Lettere differenti corrispondono a valori significativamente diversi per p = 0,05 secondo il test di Tukey
ns: non significativo; ***: significativo per P ≤ 0,001

L.) (ibrido 'Rosso duemila'), entrambi dell'azienda La Semiorto Sementi srl di Sarno. In questo caso il trattamento di idratazione controllata ha previsto l'immersione dei semi in soluzioni contenenti cellule e metaboliti di *L. iarius*: a tre diverse concentrazioni: 1×10^2 , 1×10^4 e 1×10^6 cellule/mL di soluzione. Il controllo ha previsto l'immersione dei semi in sola acqua (*hydropriming*). L'imbibizione è stata realizzata in agitazione (al fine di garantire l'ossigenazione del seme) per un tempo ottimale di 24 ore per il finocchio e di 20 ore per il peperone, entrambi alla temperatura di 20 °C. La semina è stata effettuata in contenitori alveolati su un substrato preparato miscelando torba e sabbia in rapporto

volumetrico 1:1. Durante la germinazione è stata mantenuta una temperatura di 22-24 °C di giorno e 18-20 °C di notte e un fotoperiodo di 16/8 ore (luce/buio). L'apporto di acqua al substrato è stato garantito per imbibizione dal basso per il cetriolo e il peperone, mentre nel caso del finocchio è stato applicato un sistema automatico di nebulizzazione (mist) (fig. 1). La prova è stata conclusa 12 giorni dopo la semina (Gds) per il cetriolo, 18 Gds per il finocchio e 21 Gds per il peperone, quando le radici avevano raggiunto la parte più bassa dell'alveolo del contenitore (es. finocchio, in fig. 2), e sono stati raccolti i parametri morfologici relativi allo sviluppo dell'apparato radicale (lunghezza totale, superficie assorbente, diametro medio, numero di apici radicali) e all'accumulo di sostanza secca epigea e ipogea.

Effetti su cetriolo

I trattamenti al seme con entrambi i microrganismi hanno modificato lo sviluppo delle radici nelle prime fasi dopo la germinazione. Nel cetriolo (fig. 3), il trattamento di *film coating* con *B. megaterium* è risultato efficace nel migliorare l'accrescimento radicale, ma solo alla dose di 1×10^4 spore/semi, con un aumento di oltre il 20% della lunghezza



4 - Piantine di peperone nei germinatoi durante la prova di *priming* del seme con cellule di *Leucobacter iarius*

Tabella 2 - Effetto del biopriming sulle radici di finocchio a 18 giorni dalla semina

Dose di microrganismo (numero di cellule/ml)	Lunghezza radice (cm)	Area superficiale (cm ²)	Diametro medio (mm)	Apici radicali/pianta
Controllo	38,70 bc	7,22	0,338	91,41 c
10 ²	52,45 a	7,82	0,340	124,58 ab
10 ⁴	49,92 ab	7,81	0,340	141,37 a
10 ⁶	36,73 c	6,94	0,341	97,14 bc
Significatività	*	ns	ns	***

Lettere differenti corrispondono a valori significativamente diversi per p = 0,05 secondo il test di Tukey
ns: non significativo; *: significativo per P ≤ 0,05; ***: significativo per P ≤ 0,001

Tabella 3 - Effetto del biopriming sulle radici di peperone a 21 giorni dalla semina

Dose di microrganismo (numero di cellule/ml)	Lunghezza radice (cm)	Area superficiale (cm ²)	Diametro medio (mm)	Apici radicali/pianta
Controllo	182,11 b	20,01 b	0,350	365,94
10 ²	212,72 a	24,24 a	0,358	446,44
10 ⁴	180,43 b	20,19 b	0,356	370,00
10 ⁶	180,18 b	19,95 b	0,351	372,25
Significatività	*	*	ns	ns

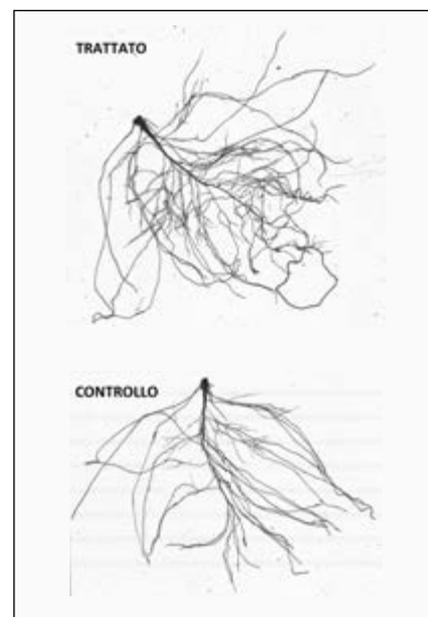
Lettere differenti corrispondono a valori significativamente diversi per p = 0,05 secondo il test di Tukey
ns: non significativo; *: significativo per P ≤ 0,05



5 - Piantine di cetriolo 12 giorni dopo la semina in seguito a trattamento di *film coating* con *B. megaterium*: a sinistra la piantina trattata alla dose di 10⁴ spore/semme; a destra la piantina non trattata

totale delle radici rispetto al controllo (tab. 1). Alla stessa dose anche l'area radicale e il numero di apici radicali (espressione del grado di ramificazione dell'apparato radicale) sono aumentati rispetto al controllo rispettivamente del 27 e del 39%. L'accumulo di biomassa totale non è stato influenzato dal trattamento di *film coating*, con valori medi di 45 mg di peso secco della piantina di cetriolo (di cui circa 20 mg rappresentano il peso delle radici).

Il trattamento con la sospensione cellulare e i metaboliti di *Leucobacter iarius*, quando applicato alla dose più bassa, ha determinato nelle piantine di finocchio un incremento della lunghezza delle radici (+35%) e della quantità di



6 - Sviluppo dell'apparato radicale di peperone 21 giorni dopo la semina in seguito a trattamento di *biopriming* con *Leucobacter iarius*: in alto quello di una piantina con la dose di 10² cellule per ml di soluzione; in basso l'apparato radicale di una piantina non trattata

apici radicali (+36%) rispetto al controllo (tab. 2).

La dose 1 × 10⁴ cellule/mL si è caratterizzata per aver indotto un ulteriore incremento del grado di ramificazione dell'apparato radicale (+55%) rispetto ai semi idratati con sola acqua. Nessun aumento della sostanza secca ipogea o epigea del finocchio è stato rilevato per i trattamenti rispetto al controllo (peso medio della piantina = 27 mg).

Effetti su peperone

Nel peperone il trattamento con la sospensione batterica al dosaggio più basso (1 × 10² cellule/mL), ha favorito l'allungamento delle radici (+16,8%) e la superficie assorbente (+21,0%) rispetto all'*hydropiming* (tab. 3). Ha inoltre fatto incrementare l'accumulo di biomassa epigea con 64 mg vs i 51 mg del controllo (tessuti più acquosi),

Bibliografia

Colla G., Roupael Y., Di Mattia E., El-Nakhel C., Cardarelli M. (2015). *Co-inoculation of Glomus intraradices and Trichoderma atroviride acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95 (8): 1706-1715.

López-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E, Velásquez-Becerra C, Farias-Rodríguez R, Macías-Rodríguez LI, Valencia-Cantero E. (2007). *Bacillus megaterium rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant Microb. Interact., 20: 207-217

Paparella, S.; Araujo, S.S.; Rossi, G.; Wijayasinghe, M.; Carbonera, D.; Balestrazzi, A. (2015) *Seed priming: State of the art and new perspectives*. Plant Cell Rep., 34: 1281–1293.

Toklikishvili, N., Dandurishvili, N., Vainstein, A., Tediashvili, M., Giorgobiani, N., Lurie, S., Szegedi, E., Glick, B. R., & Chernin, L. (2010). *Inhibitory effect of ACC deaminase producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by Agrobacterium tumefaciens or A. vitis*. Plant Pathology, 59(6): 1023–1030.

mentre nessuna differenza di peso secco delle radici è stata rilevata rispetto ai trattamenti.

Efficacia a bassa dose

I risultati evidenziano in generale una buona efficacia dei trattamenti al seme con *B. megaterium* e *L. iarius* nel migliorare la qualità delle piantine, favorendo lo sviluppo delle radici per un effetto riconducibile in buona parte alla capacità dei batteri di produrre sostanze auxino-simili. Radici più lunghe, più ramificate e/o con maggiore superficie assorbente hanno una migliore capacità di esplorare il suolo e quindi possono più facilmente assorbire acqua e nutrienti. Tale comportamento si manifesta con una più rapida capacità di insediamento delle piante nelle prime fasi del ciclo colturale. Dalle prove è inoltre emerso che l'efficacia del trat-

La ricerca è stata condotta in parte nell'ambito del Centro Nazionale Agritech, finanziato dall'Unione Europea – NextGenerationEU (Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza (Pnrr) – Missione 4 Componente 2, Investimento 1.4 – D.D. 1032 17/06/2022, CN00000022)

tamento al seme dipende dalla dose di applicazione, ossia dal numero di spore per seme o dal numero di cellule per unità di volume della soluzione di imbibizione e tendenzialmente le dosi inferiori sono maggiormente favorevoli. Ulteriori approfondimenti sono in fase di realizzazione per determinare la persistenza dei microrganismi nella rizosfera durante il ciclo colturale, anche in funzione dell'ambiente di coltivazione e del genotipo. ●