

Analisi e trattamento delle contaminazioni batteriche durante la micropropagazione di specie ornamentali



Debora Di Silvestro¹, Alice Basile², Grazia Marino³, F. Gaggia⁴, Stefano Fedi⁵, Giovanni Romussi⁶, Marco Savona¹, Laura Pistelli² e Barbara Ruffoni¹

¹CRA - FSO Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali, Corso Inglese 508, 18038 Sanremo (IM) e-mail: b.ruffoni@istflori.it

²Università di Pisa, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, via Mariscoglio 34, 56124 Pisa

³Università di Bologna, Dipartimento di Colture Arboree, Viale Fanin 46, 40127 Bologna

⁴Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Viale Fanin 42, 40127 Bologna

⁵Università di Bologna, Dipartimento di Biologia, Via Irnerio 42, 40126 Bologna

⁶Università di Genova, Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari, Via Brigata Salerno 13, 16147 Genova

INTRODUZIONE

La moltiplicazione *in vitro* ha come obiettivo la produzione di piante sane. L'ottenimento di tale traguardo dipende dal tipo di espianto considerato, dal sistema di sterilizzazione del tessuto e dalla presenza o no negli espianti di batteri endogeni che rimangono latenti per tempi non quantificabili e che poi appaiono nel terreno di coltura, spesso legati a condizioni colturali non ottimali.

A volte la presenza di una contaminazione batterica latente non pregiudica il risultato produttivo, a volte invece il saprofita prende il sopravvento producendo gravi danni economici. Al fine di mantenere "sotto controllo" le infezioni, si utilizzano antibiotici (ad es. cefotaxime) o antibatterici a diversa azione (PPM) che però non garantiscono un risultato stabile. A questo proposito sarebbe importante trovare nuove soste capaci di contrastare gli inquinamenti. Prove preliminari hanno mostrato un efficace effetto battericida di estratto acquoso di foglia di *Melia azedarach* L. rispetto a isolati batterici di *Bacillus circulans* (Bc) e *Spingomonas paucimobilis* (Sp) identificati mediante API test e su altri ceppi fitopatogeni e anche nel caso di Bc e Sp presenti come contaminanti di germogli di susino *in vitro* (Gaggia *et al.*, 2008; Marino *et al.*, 2009). Estratti di Salvia di diverse specie si sono pure rivelati in grado di contenere la crescita batterica di alcuni isolati da colture *in vitro* di Ranuncolo, *Zantheschia* e Peonia.

Questo lavoro vuole dare una prima informazione sulla possibilità di contenere *in vitro* le infezioni batteriche mediante estratti naturali.

A) Estratto da *Melia azedarach*

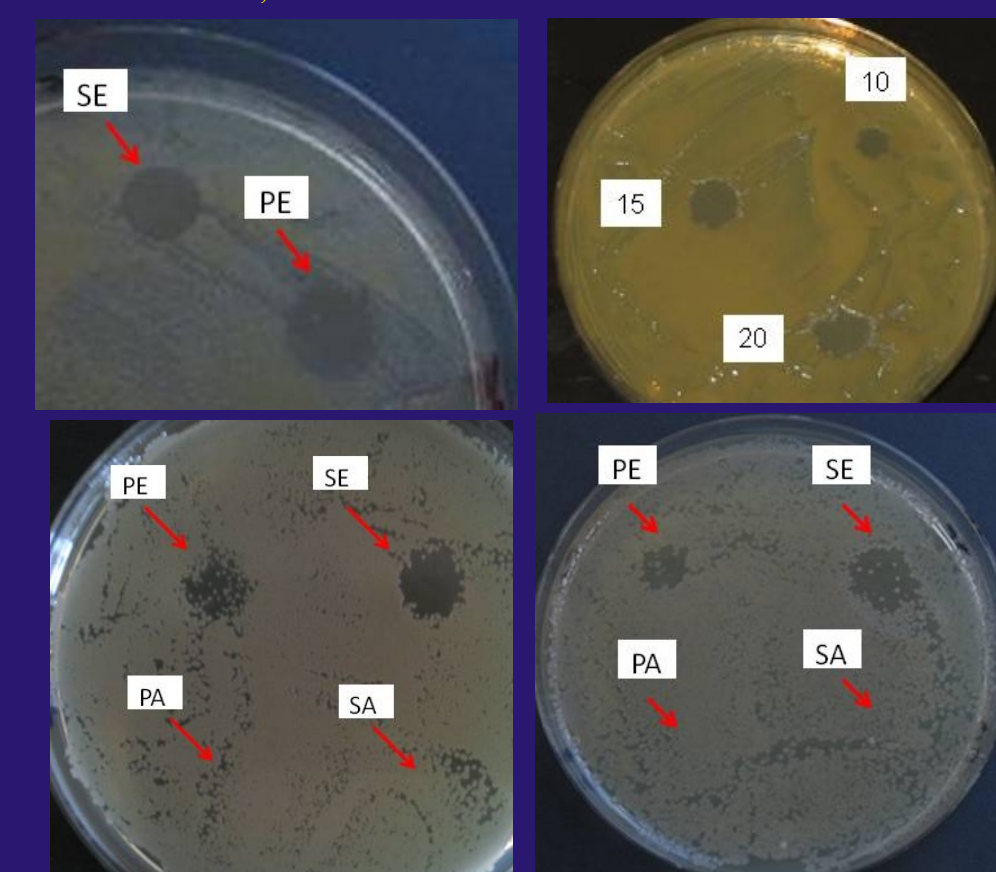
Gli estratti di *Melia azedarach* erano rappresentati da: foglie apicali in fase acquosa (FA, 40 g tessuto/100 mL, pH 4,5), polpa di frutto in fase acquosa (PA, pH 6) ed etanolica (PE, ET-OH 50%, pH 5,5) e semi (SA e SE, rispettivamente in acqua e Et-OH 50% e con pH intorno a 6,0).

B) Test di attività dell'estratto di *M. azedarach* in piastra

Tabella 1. Effetto di estratti etanolici e acquosi di seme (rispettivamente SE e SA) e di polpa di frutto (PE e PA) di *M. azedarach* su differenti isolati batterici

Ceppi batterici	estratto			
	SE	PE	SA	PA
<i>K. kristinae</i>	+	+	-	-
<i>S. paucimobilis</i>	+	-	-	-
<i>B. circulans</i>	+	+/-	-	-
A1	-	-	-	-
A10	-	-	-	-
A12	-	-	-	-
A17	+	+/-	-	+/-

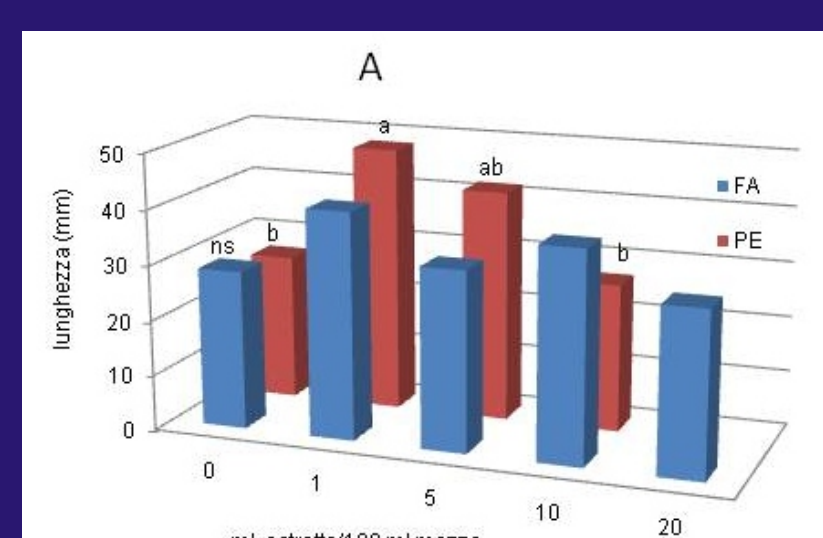
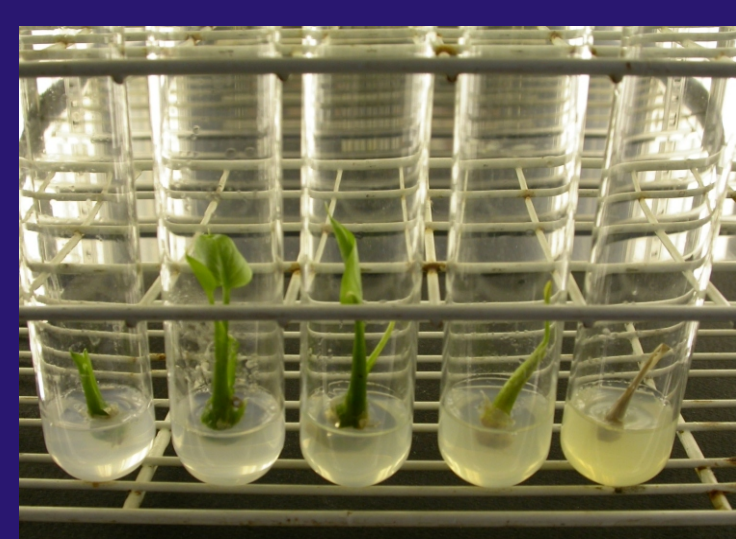
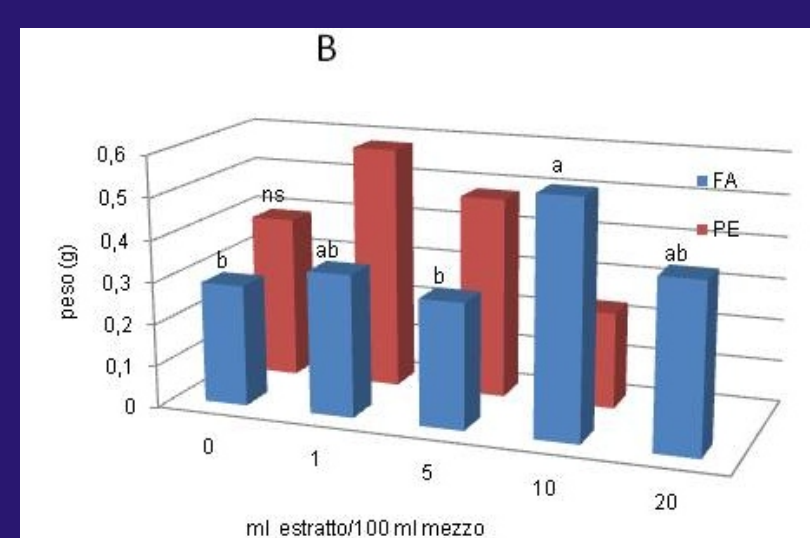
+ effetto battericida; +/- effetto batteriostatico; -: nessun effetto;



La loro attività è stata testata in piastra in duplicato mediante il 'well diffusion assay' (Marino *et al.*, 2009) e una variante dello 'spot agar test' (Fleming *et al.*, 1985) sui seguenti ceppi batterici: Bc, Sp, *Kocuria kristinae* (Kk), A1, A10, A12 e A17. Acqua distillata a pH 4,5 ed Et-OH al 50% sono stati usati come controllo. Gli estratti acquosi da foglia di *M. azedarach* non hanno avuto effetto, ad eccezione di una lieve attività batteriostatica rispetto a Bc (non mostrata). Il metodo dello 'spot' è risultato più efficace per evidenziare l'attività degli estratti. L'estratto SE ha mostrato una forte attività battericida su 4 ceppi batterici su 7; PE si è mostrato attivo solo contro Kk e Bc (Fig.1-4). Inoltre una leggera attività batteriostatica è stata registrata per PA nei confronti del ceppo A17 (Tab.1). La soluzione di Et-OH e l'acqua (controlli) non hanno avuto alcun effetto.

C) Test di tossicità su colture di *Zantheschia*

L'attività di FA e PE è stata inoltre valutata su germogli di *Zantheschia* in terreno MS (BA 3 mg/L) agarizzato, per evidenziarne una possibile tossicità. Dopo 28 gg di coltura, misurando lunghezza e peso dei germogli di *Zantheschia*, si è notato un certo effetto biostimolante di FA, alla concentrazione di 10 mL/100 mL e di PE a 1 mL/100 mL (Fig. 5a,b; Fig.6). Con PE a 10 mL/100 mL si è avuto ingiallimento dei germogli; mentre la morte di questi con PE 20 mL/100 mL era dovuta anche all'elevata concentrazione di Et-OH.



Accrescimento di germogli di *Zantheschia* in coltura su MS (BA 3 mg/L) con PE a concentrazione crescente da sinistra a destra: 0, 1, 5 10 e 20 ml/ 100 ml mezzo.

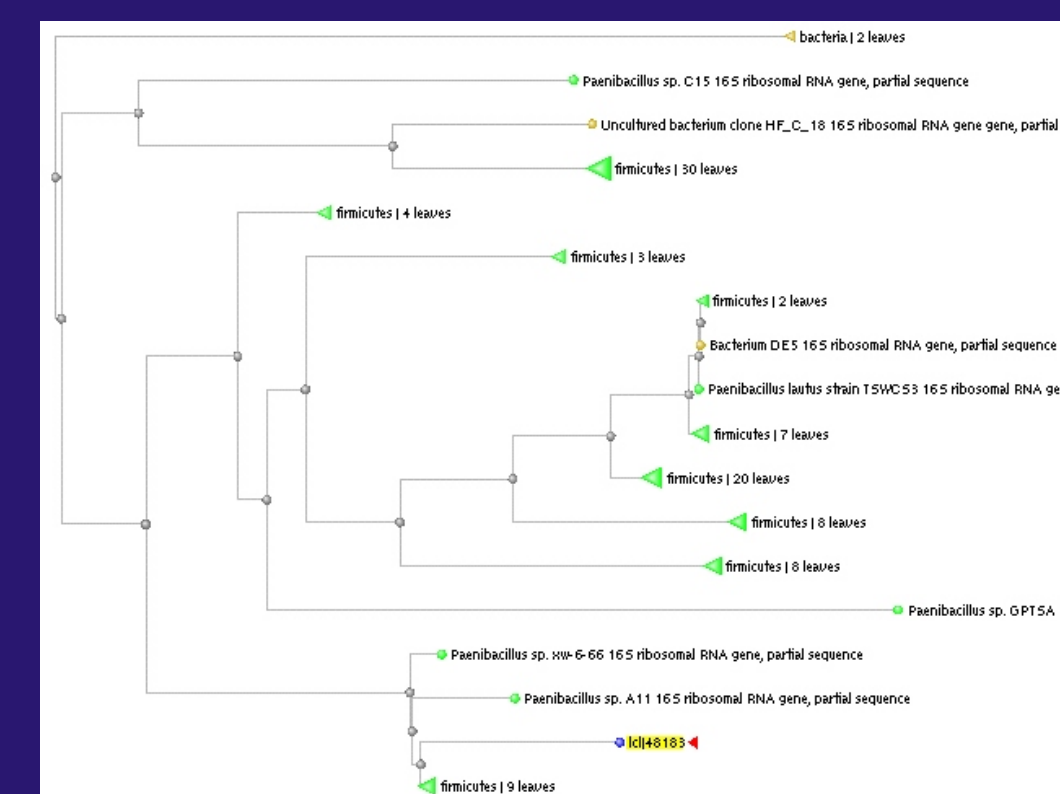
CONCLUSIONI

Sono stati isolati e riconosciuti alcuni ceppi batterici contaminanti le colture *in vitro*. Gli estratti di *Melia* SE e PE e di *Salvia* hanno mostrato risultati incoraggianti relativamente all'attività antimicrobica. A dosi elevate gli estratti hanno però anche mostrato una certa attività tossica nei confronti delle specie in micropropagazione. Le indagini sono pertanto in corso per stabilire un range di concentrazioni utili per eliminare le contaminazioni dalle colture vegetali, senza alterarne la crescita.

Identificazione dei batteri contaminanti



Campioni di substrato apparentemente contaminati da batteri sono stati prelevati da colture di *Zantheschia*, Ranuncolo e Peonia. Le colture batteriche presenti sono state purificate e portate a coltura pura. Per la loro identificazione sono stati adottati metodi fenotipici e/o genotipici. Complessivamente sono stati selezionati 10 ceppi batterici. Sono stati utilizzati tutti i test per il riconoscimento batterico: colorazione di Gram, test dell'ossidasi, fingerprinting metabolico e analisi molecolare.

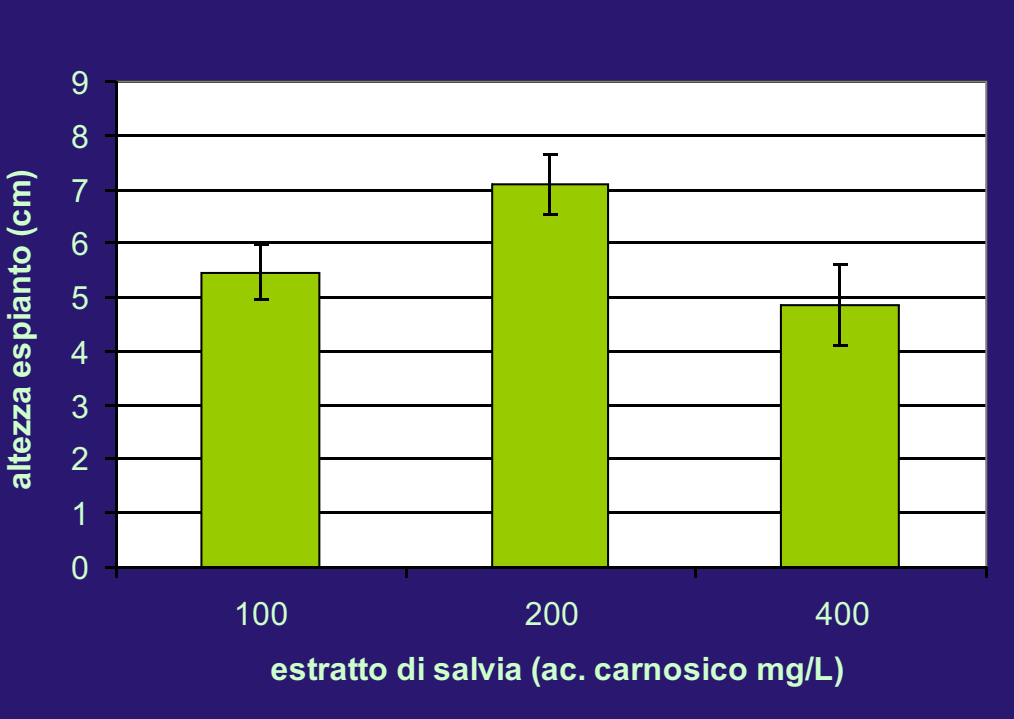
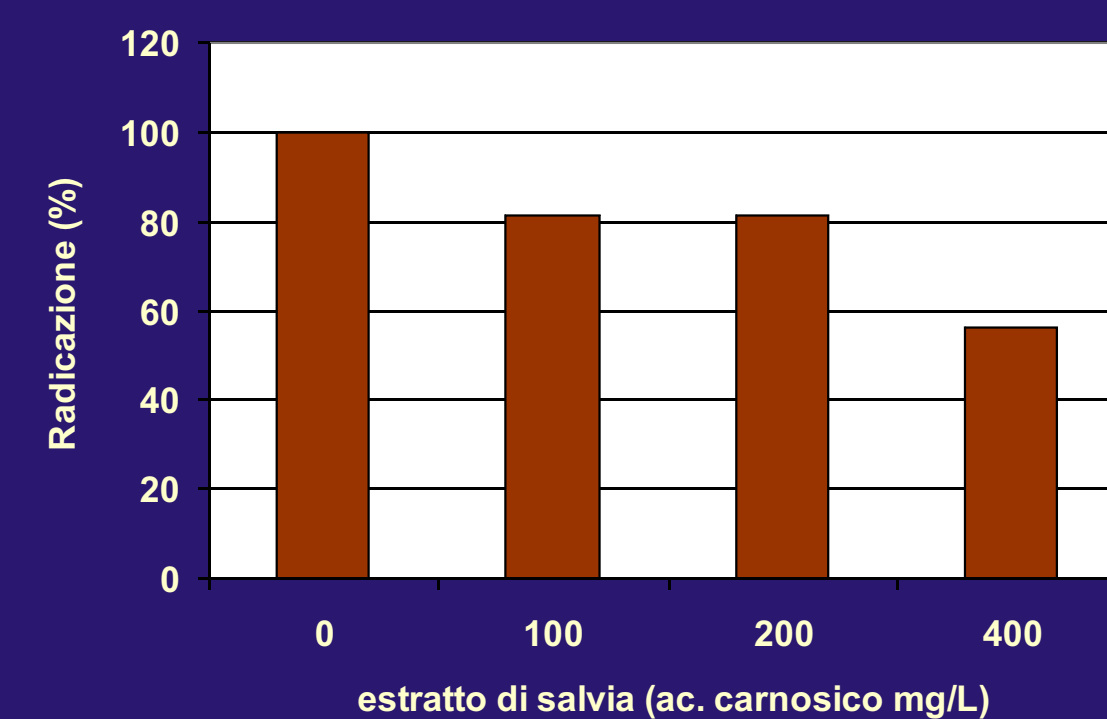
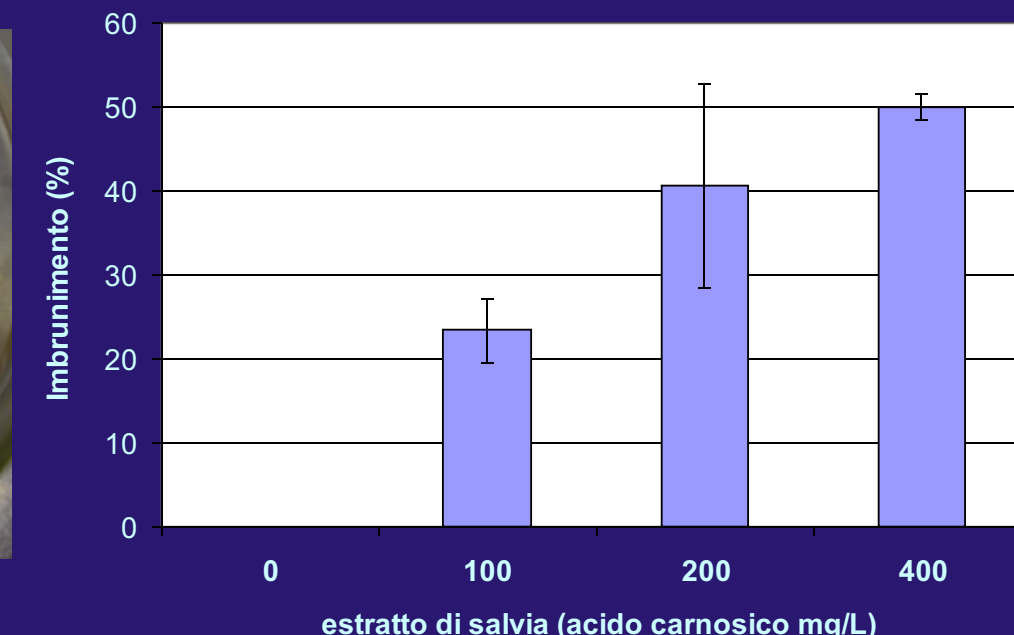


Blast tree del campione A12. Allineamento e confronto con circa 930 bp della subunità ribosomiale 16S ottenuta utilizzando i primers universali 27F e 926R

A) Estratto da *Salvia spp.*

Da diverse specie di Salvia (*S. corrugata*, *S. Somalensis*) sono stati estratti principi attivi: l'acido carnosico è stato isolato secondo la metodologia di Richeimer *et al.*, 1966 (Antioxidant Activity of Lipid-Soluble Phenolic Diterpenes from Rosemary) JAOCS, 73, 507-514

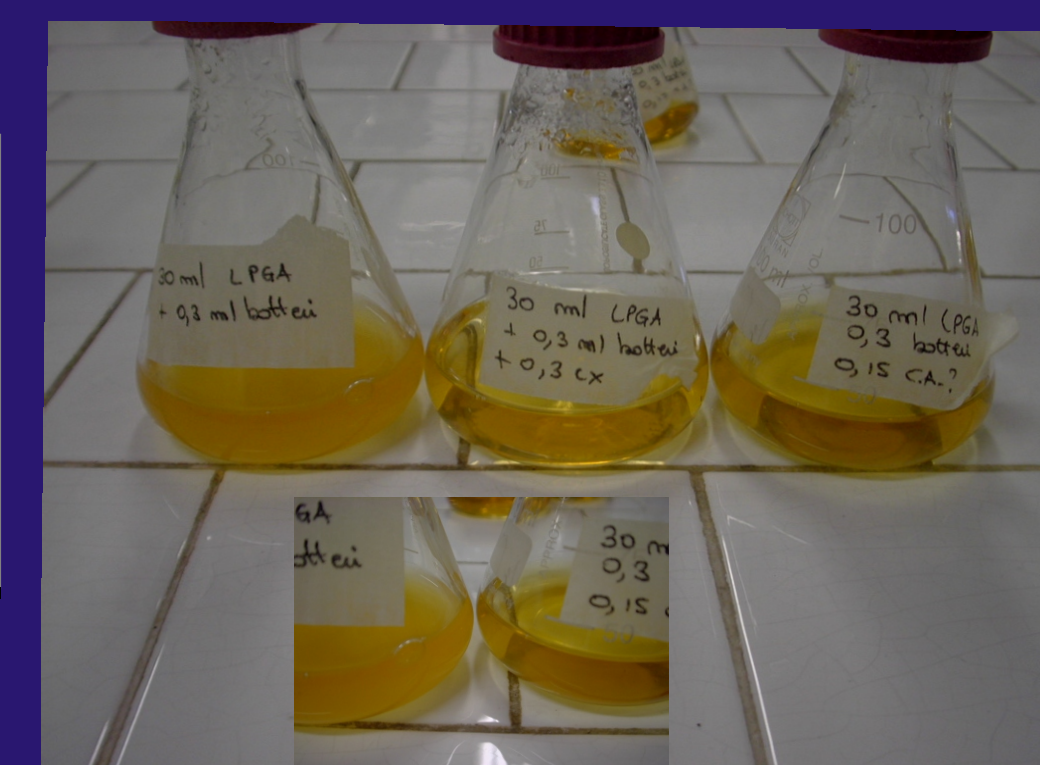
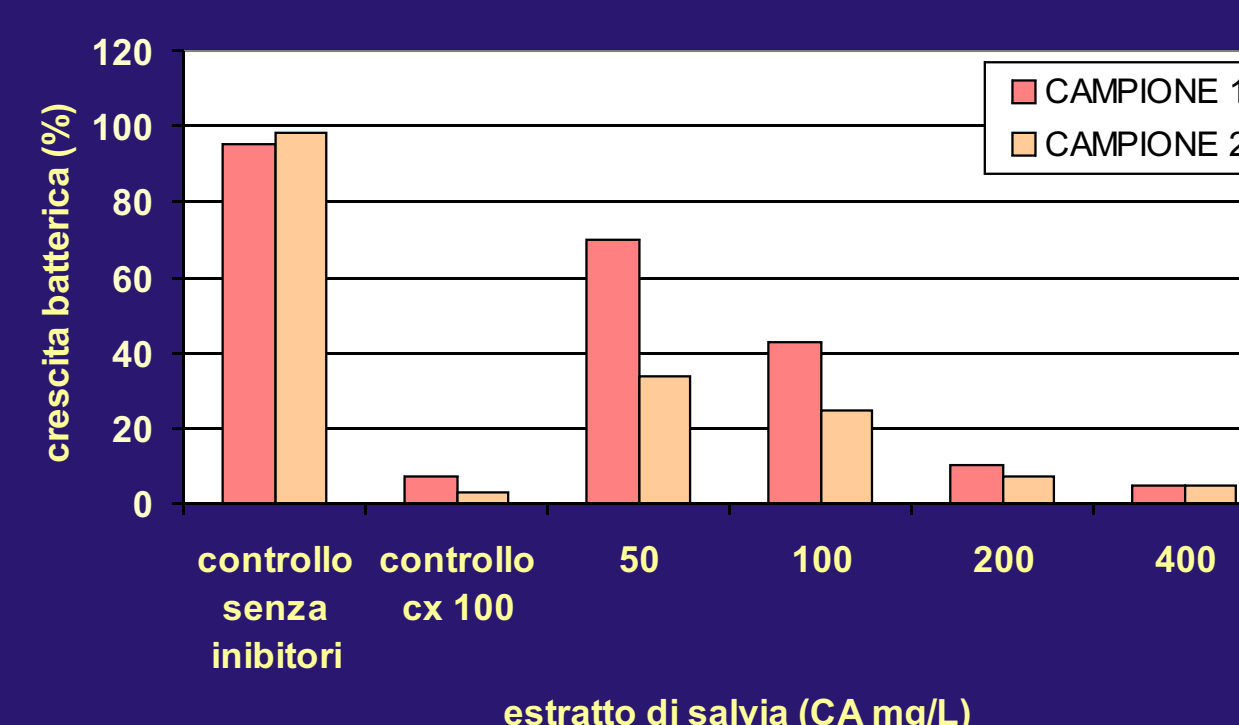
B) Test di tossicità di estratto di *Salvia* su colture *in vitro*



L'effetto dell'estratto di salvia è stato saggio su diverse colture *in vitro* per verificarne la eventuale tossicità sul materiale vegetale. Sono state valutate colture di Garofano, *Solidago*, *Myrtus*, *Oreopanax* (nelle immagini) e *Zantheschia* (nei grafici). In tutte le colture si nota un crescente imbrunimento all'aumentare della concentrazione di AC; a 400 mg/L vi è una significativa riduzione dell'altezza degli espianti di *Zantheschia* e contemporaneamente si nota una certa riduzione della emissione radicale.

C) Test di attività dell'estratto di *Salvia* sulla crescita batterica in L-PGA

L'attività dell'acido carnosico estratto da Salvia (AC) è stata valutata sulla base della torbidità della coltura batterica a seguito del trattamento con concentrazioni crescenti di AC (50, 100, 200, 400 mg/L) e confrontando la crescita con il controllo senza inibitori (crescita massima dei batteri) e con un controllo contenente l'antibiotico cefotaxime (CX) ad effetto conosciuto (crescita minima dei batteri). Come si può notare, nei due campioni saggati l'AC ha inibito la crescita batterica dopo 48 ore di coltura in modo soddisfacente in particolare a 200 e 400 mg/L, con effetto sovrapponibile a quello dell'antibiotico CX



Ricerche condotte nell'ambito del Progetto VITROFLOR finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali