

Relazione sullo stato di avanzamento del progetto



Rendicontazione attività 1° Semestre 2015

Progetti di ricerca applicata in agricoltura Biologica - Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

Ente finanziatore: Mipaaf – Ufficio PQA 05 – Agricoltura biologica
Affidamento diretto [Comma 1, lett. a),
art.3 della legge 7/03/2001 n. 38, e DM 11/04/1997 n. 9790609 “Criteri e modalità di concessione contributi di programmi nazionali di interventi di sostegno e sviluppo in agricoltura biologica”]
Decreto di finanziamento: DM 4456 del 6/06/2013

Durata: 24 mesi
Data inizio: 23 maggio 2013
Proroga ottenuta: 31 dicembre 2015

Coordinatore:
Dr.ssa Alessandra Trinchera (CRA-RPS)

Attività svolte dal 1 gennaio al 30 giugno 2015

Per il terzo anno di attività, il Progetto RizoSem ha previsto l'allestimento di un nuovo campo sperimentale, analogo al precedente, presso il CRA-ORA di Monsampolo del Tronto (AP), allo scopo di confermare ulteriormente i risultati ottenuti nel 2013 e 2014. Anche quest'anno, sono stati mantenuti alcuni approfondimenti di ricerca sul dispositivo RizoSem, allo scopo di chiarire quanto già evidenziato durante le attività di indagine del primo biennio.

Si sottolinea che lo scopo del Progetto RizoSem è quello di verificare l'effetto dell'utilizzo di differenti colture per servizio agro-ecologico (CSA, ossia segale, farro, orzo, frumento ed il loro mix) sul contenimento delle infestanti, in fase precedente alla terminazione conservativa (allettamento mediante roller crimper) e dopo la terminazione, sulla coltura da reddito primaverile-estiva (melone), attraverso lo studio delle interazioni rizosferiche. Le rese produttive, la qualità del melone, gli effetti sulla comunità delle infestanti e la loro densità totale, l'influenza della scerbatura, la disponibilità e l'espressione genica del metabolismo dell'azoto nel suolo, l'identificazione dell'allelopatia sviluppata dalle CSA, il riconoscimento degli allelochimici coinvolti, nonché le interazioni rizosferiche a livello di infezione e successivo sviluppo della micorrizzazione, sono gli aspetti analitici seguiti durante le attività progettuali.

U.O. CRA ORA - G. Campanelli, S. Sestili, F. Leteo

Azione 1 - Progettazione e realizzazione di sistemi orticoli in bio, a bassi input esterni

Il CRA ORA di Monsampolo del Tronto ha il compito di fornire il supporto operativo alle altre UUOO coltivando all'interno del proprio dispositivo sperimentale di lungo termine (certificato dal 2001 ai sensi della vigente normativa sull'agricoltura biologica) le colture di servizio agro-ecologico (CSA) afferenti a diverse specie graminacee e la successiva coltura da reddito rappresentata dal melone.

Nel dispositivo sperimentale sono state poste a confronto secondo lo schema sperimentale del blocco randomizzato le seguenti tesi che utilizzano come CSA: 1) orzo; 2) grano; 3) segale; 4) farro; 5) mix di orzo+grano+segale+farro; 6) testimone (no CSA). Quest'ultima tesi è stata divisa in due parti: una (6a) non trattata ai fini del contenimento delle infestanti, mentre l'altra (6b) è stata lavorata in concomitanza della terminazione conservativa. Le erbe infestanti sono state contenute con 2 interventi di falciatura incrociati (verticali e orizzontali) su tutte le tesi. In aggiunta a tale trattamento all'interno di ogni tesi è stata ricavata un'area dove sono state operate delle scerbature manuali. Il melone HF1 Anish (Ditta Enza Zaden) è stato allevato secondo un sesto di 1m tra le file x 1 m sulla fila. Nel periodo luglio - agosto sono state poste in atto le normali pratiche colturali relative a fertilizzazione con formulati idrosolubili (n. 5 interventi). L'irrigazione è avvenuta con manichetta forata posta lungo la fila per un volume complessivo di 1200 m³. Sono stati necessari 3 trattamenti fungicidi con rame solfato tribasico e zolfo bagnabile.

Non si sono registrate differenze produttive significative tra le diverse tesi non scerbate (solo falciatura), né per la quantità né per la qualità (Grafico 1). Il farro sembra però favorire la produzione commerciabile, soprattutto rispetto all'orzo e al testimone privo copertura con una resa quasi doppia.

A tal proposito nel testimone con un elevato livello (visivo) di malerbe questo è facilmente spiegabile (elevata competizione delle infestanti); al contrario nella tesi con l'orzo il livello delle malerbe era visivamente più basso e allora la minore resa potrebbe essere riconducibile ad un

effetto allelopatico dell'orzo sul melone oppure ad un maggior depauperamento o asportazione di azoto dal terreno.

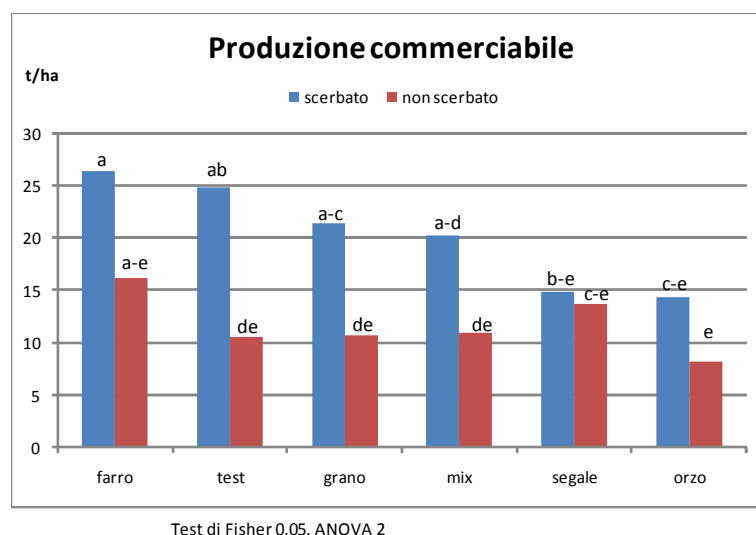
Al momento non siamo in grado di dire quanto le asportazioni di azoto e la produzione di allelopatici da parte delle cover possano aver influito sulle produzioni. Di certo l'eliminazione delle infestanti con la scerbatura manuale ha consentito produzioni significativamente più elevate. Tale risultato indica che la tecnica della terminazione va integrata, nelle nostre condizioni sperimentali, con interventi di contenimento delle infestanti (falcature + scerbature).

Nelle condizioni di non scerbatura (solo falcatura) le singole cover non hanno dato produttivi statisticamente diversi tra loro; il contrario è avvenuto nella condizione di scerbatura (falcatura + scerbatura manuale) dove il Farro si è distinto, al pari del testimone, dalla segale e dall'orzo. La maggiore produzione del testimone è giustificata dal fatto che non c'è stata una coltura depauperatrice in precessione e non vi sono specie vegetali in consociazione che possano averne condizionato l'accrescimento. E' sorprendente che la presenza del solo farro, senza infestanti, non riduca affatto la produzione del melone. Il Farro molto probabilmente non ha effetti allelopatici negativi verso il melone.

Situazione intermedia per il grano che una volta liberato dalle infestanti (falcatura + scerbatura) ha permesso una produzione di melone doppia rispetto alla tesi non scerbata (20,2 vs 10,7 t/ha) (solo falcatura). Questo risultato potrebbe essere interpretato come una scarsa attitudine del frumento a produrre allelopatici efficaci nei confronti delle infestanti e della coltura da reddito.

La segale è la specie che si è distinta in negativo in quanto la produzione di melone è rimasta la stessa (intorno a 15 t/ha) sia senza scerbatura che con la scerbatura. La produzione dopo segale non sembra quindi essere stata condizionata dalla presenza delle infestanti. L'ipotesi è che come fattore limitante nella tesi con la segale ci sia la produzione di allelopatici condizionanti il melone. Per l'orzo la produzione del melone sembra essere condizionata in negativo sia dalla presenza delle infestanti (8 non scerbato vs 15 scerbato) sia dalla produzione di allelopatici (15 dopo la scerbatura vs 26 del farro dopo la scerbatura).

Dati produttivi del melone - anno 2014



Azione 3 – Identificazione dell'espressione genica dei fenomeni di interferenza in specie ortive e loro relativa regolazione genica

L'ibrido commerciale di melone è stato coltivato sia in pieno campo sia in vaso in presenza delle diverse CSA. La scelta di riprodurre la prova di campo in vaso è stata dettata dal fatto che in un "sistema aperto" come il campo è difficile poter studiare la modulazione di singoli geni in relazione

ad un unico fattore come il contenuto di azoto. Per questo motivo e sulla base dei dati ottenuti nel corso del primo anno di attività è stata avviata una prova in vaso che, essendo un "sistema chiuso", ha permesso di controllare meglio l'influenza della disponibilità di azoto sull'espressione dei geni legati al suo metabolismo e studiare quindi l'interferenza CSA-melone. La prova ha previsto l'allestimento di 36 vasi, di cui 18 sono stati scerbati e 18 sono stati lasciati senza scerbatura. In ogni vaso l'ibrido di melone è stato coltivato in presenza delle 5 diverse CSA, oltre al testimone privo di CSA, e ogni combinazione CSA-melone è stata ripetuta 3 volte. Da ogni pianta di melone cresciuta in vaso sono state prelevate sia le foglie sia le radici per le analisi di espressione genica mediante Real-time PCR. Sono stati effettuati 2 prelievi: il primo a 28 giorni dal trapianto (pieno sviluppo vegetativo) prelevando sia le foglie sia le radici, e il secondo a 70 giorni dal trapianto (fase di senescenza) prelevando solo le radici. Durante entrambi i prelievi, da ogni vaso, sono state campionate aliquote del terreno per successive analisi biochimiche del contenuto di azoto disponibile per la pianta. L'espressione dei geni *rbcS*, *rbcL* e *GS2* è stata valutata nei campioni fogliari mentre il gene *GS1* è stato analizzato solo nelle radici in quanto la sua espressione avviene in modo preferenziale e in quantità più elevata nelle radici rispetto agli altri tessuti della pianta. Le analisi molecolari sono state condotte anche sulle foglie delle piante di melone coltivate in campo.

Dalla prova in campo è emersa una maggiore espressione dei geni analizzati nel melone coltivato in presenza del mix e del farro indicando una minore perdita di azoto in queste due combinazioni e quindi una maggiore "disponibilità" di tale elemento per la pianta coltivata.

La prova in vaso ha evidenziato nelle tesi non scerbate una repressione di tutti i geni statisticamente significativa nelle foglie di melone coltivato in presenza della CSA orzo, indicando la presenza di una interferenza tra CSA e piante infestanti che limitano la disponibilità dell'azoto per la pianta coltivata.

Nelle tesi scerbate è stata osservata l'attivazione di tutti i geni, statisticamente significativa, nel melone coltivato insieme al grano. Una maggiore espressione dei geni rispetto al controllo è stata riscontrata anche in presenza del mix e della segale, ma non statisticamente significativa.

Tali risultati rappresentano un importante punto di partenza nello studio delle interferenze CSA-melone in quanto permettono di comprendere come la pianta coltivata si adatti alla presenza delle diverse CSA modulando l'espressione di geni coinvolti nella assimilazione, trasporto e metabolismo dell'azoto.

Azione 5 - Divulgazione dei risultati agli operatori di settore

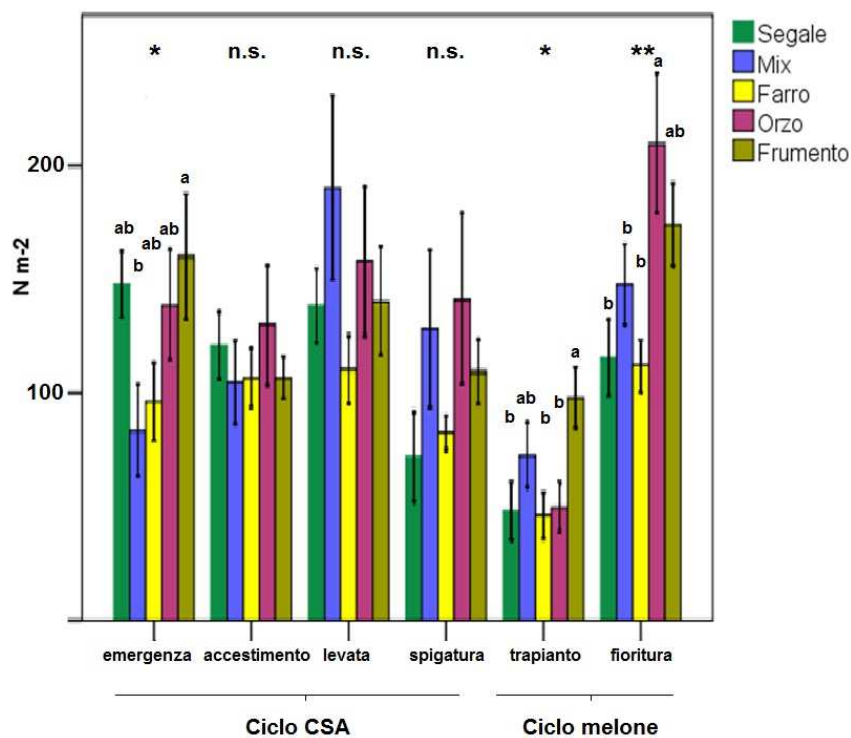
Il 23 giugno 2015 è stata organizzata presso il CRA-ORA di Monsampolo del Tronto (AP) una Giornata divulgativa "Il CRA per la ricerca in orticoltura biologica", con visita guidata ai campi sperimentali rivolta a imprenditori agricoli, tecnici, docenti universitari e consumatori, mirata a presentare in maniera efficace ed immediata i risultati ottenuti nell'ambito di diversi progetti del settore del bio, tra i quali anche il progetto RizoSem (locandina, Allegato 1) .

U.O. CRA RPS – A. Trincherà, C. Ciaccia, E. Testani, F. Tittarelli, S. Canali

Azione 2 - Valutazione dei rapporti di interferenza nel sistema coltura di servizio ecologico/coltura da reddito/infestanti

Nel corso del primo semestre 2015, corrispondente al terzo anno di sperimentazione, sono stati nuovamente effettuati i rilievi sulle comunità della flora spontanea durante le principali fasi fenologiche delle CSA (emergenza, accestimento, levata, spigatura, terminazione) e durante il ciclo del melone dopo la terminazione delle stesse (trapianto, fioritura e raccolta). In particolare sono stati effettuati per tutte le tesi a confronto: il riconoscimento tassonomico, la densità totale e specie-specifica e l'indice di copertura (Braun-Blanquet) delle infestanti e delle CSA (durante il ciclo vegetativo delle CSA, tranne alla terminazione) e delle infestanti e del melone (trapianto e fioritura). Nelle fasi di fioritura delle CSA (terminazione delle stesse) e alla fine del ciclo del melone (fine della raccolta) sono state effettuate misure di copertura e biomassa epigea di infestanti, CSA e melone. Durante il ciclo vegetativo del melone (trapianto, fioritura, allegagione e raccolta) è stato inoltre determinato il contenuto di azoto minerale (N-min) nel suolo.

I dati della densità totale hanno mostrato differenze in funzione della specie di CSA, sia ante che post terminazione. Segale e farro hanno determinato un maggiore effetto contenitivo delle infestanti, in particolare nelle cruciali fasi iniziali di sviluppo della coltura di melone.



Tutte le tesi con CSA hanno determinato una significativa riduzione della biomassa delle infestanti rispetto al controllo non scerbato. Nei trattamenti con segale e farro è stata inoltre rilevata una minore produzione di biomassa delle infestanti alla raccolta del melone.

I risultati preliminari sulla composizione della comunità delle infestanti sembrano infine indicare una maggiore incidenza di specie rizomatose/perenni nelle tesi con CSA rispetto al controllo. Questo risultato potrebbe essere una conseguenza della minima lavorazione del suolo associata alla terminazione per allettamento delle CSA, rispetto al controllo normalmente lavorato per il trapianto del melone. La determinazione dell'N-min ha mostrato valori significativamente superiori per segale e farro rispetto ai trattamenti con orzo e frumento al trapianto del melone. Questo dato permette di escludere che la minore densità delle infestanti nelle fasi iniziali della coltura di melone possa essere legata ad una minore disponibilità di nutrienti, avvalorando invece l'ipotesi di un effetto allelopatico di queste CSA su germinazione e sviluppo delle infestanti. I test di *bioassay*, effettuati per la valutazione della fitotossicità di estratti della componente epigea delle CSA a diverse concentrazioni sulla germinazione e sviluppo radicale di una infestante target (*Rumex*

crispus L.), sembrerebbero ulteriormente confermare questa ipotesi per la segale. In effetti, gli estratti concentrati hanno mostrato assenza di germinazione per la segale, rispetto alla sola riduzione del 50% registrata per gli estratti delle altre CSA. L'indagine dei composti allelopatici mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) ha infatti mostrato la presenza del composto DIBOA (2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one) negli estratti di segale.

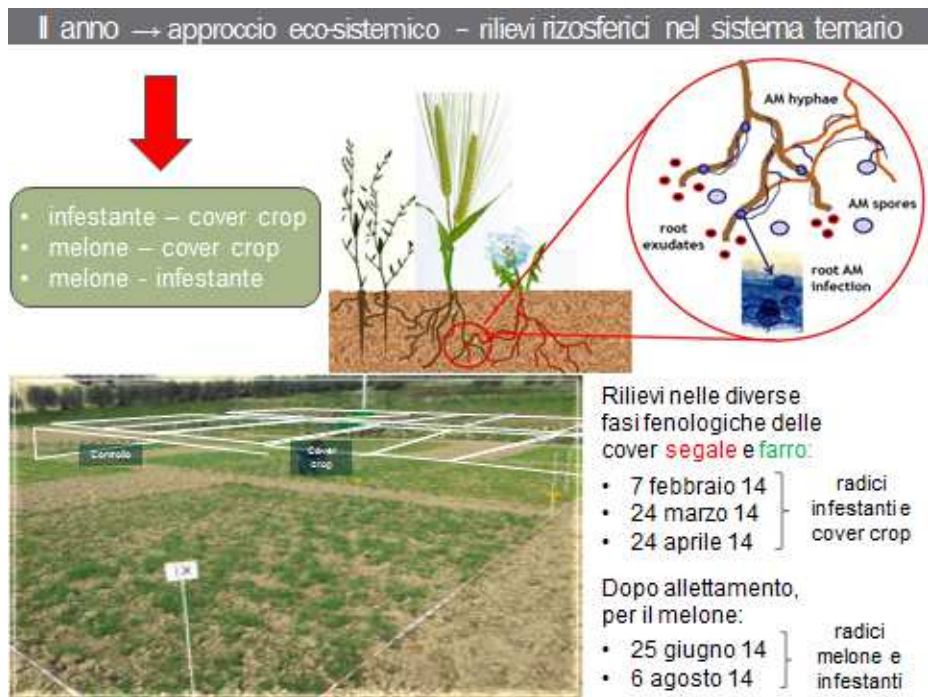
Azione 4 - Studio degli effetti indotti dalla pacciamatura verde sulle interazioni abiotiche e biotiche in ambiente rizosferico mediante tecniche di microscopia ottica ed elettronica

In merito a tale azione, si riportano i risultati ottenuti alla fine del secondo ciclo colturale del melone (annata 2014), in quanto le analisi degli apparati radicali del melone alla raccolta per il terzo anno (annata 2015) non sono evidentemente ancora disponibili.

L'approccio utilizzato è quello agro-ecosistemico, ossia basato sulla considerazione che il sistema produttivo, costituito dal sistema ternario CSA-infestanti-melone, sia un sistema dinamico che vede, in tempi successivi:

- durante il ciclo fenologico delle CSA, la coesistenza tra CSA e infestanti;
- dopo la terminazione conservativa delle CSA (allettamento con roller crimper), la coesistenza tra infestanti e coltura da reddito.

Ciò vuol dire che anche gli apparati radicali condivideranno spazi comuni, tali da favorire o meno l'interazione a livello radicale in termini di allelopatia, competizione ed interazione biotica, quale la micorrizzazione. Per questo, nel secondo anno lo studio è stato mirato a osservare i processi di simbiosi micorrizica interattiva tra CSA e le infestanti prevalenti nel sistema, nonché dopo terminazione delle CSA, la micorrizzazione del melone sotto le diverse cover crop. Lo studio è stato effettuato mediante microscopia a scansione elettronica ed ottica, prelevando dal campo le radici delle infestanti considerate quali target, delle CSA segale e farro e del melone alla raccolta (agosto 2014). La valutazione dell'entità della micorrizzazione è stato effettuato mediante valutazione visiva, applicando un indice crescente di intensità di micorrizzazione da 0 a 3. Tutti i rilievi sono stati effettuati anche sul controllo infestato, senza CSA, sulle medesime specie infestanti.

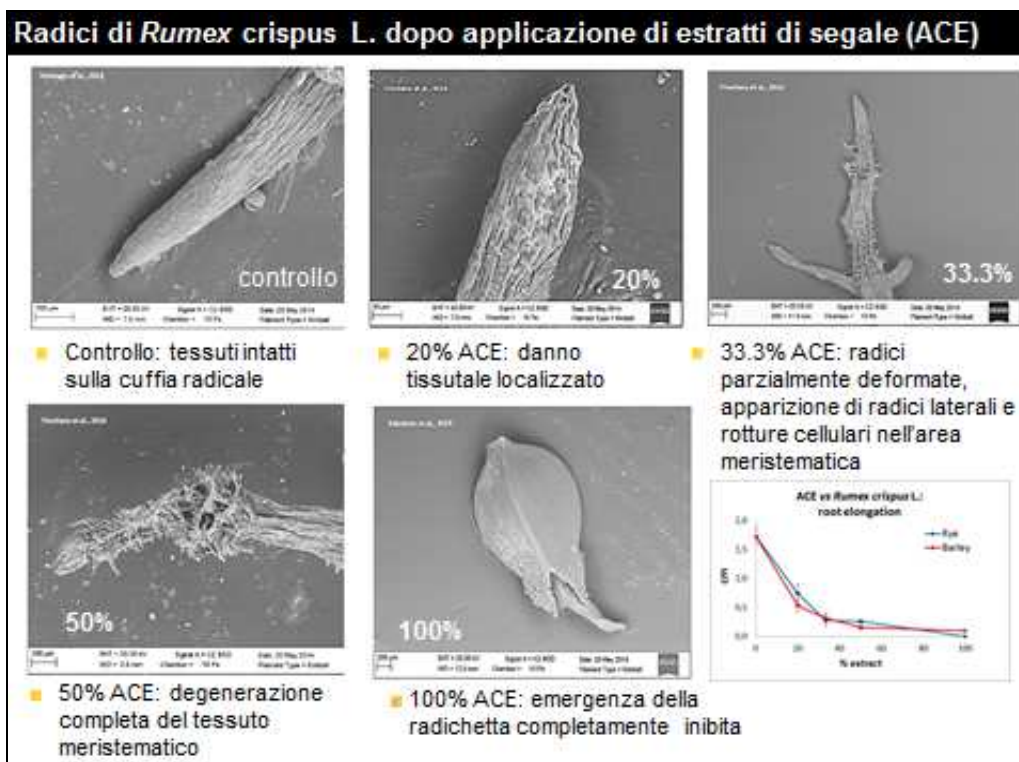


Prima dell'allettamento delle CSA - I risultati ottenuti sul dispositivo sperimentale RizoSem descritto nel secondo anno in merito alle infestanti considerate (veronica, stellaria, poligono, romice) in relazione alle diverse fasi fenologiche del farro e segale (CSA) hanno mostrato come la presenza di una specifica CSA sia in grado di promuovere o meno la presenza di una infestante rispetto ad un'altra, effetto che sembrerebbe essere legato, tra gli altri, anche alla capacità di trasmettere l'infezione micorrizica dalla CSA all'infestante, in maniera selettiva.

Circa le CSA, tutte risultano micorrizzate durante il loro ciclo fenologico, secondo l'ordine: frumento > farro > segale >> orzo.

Circa invece le infestanti, è stato verificato che l'infestante romice (*Rumex crispus* L.), presente sotto segale, mostra un'abbondante micorrizzazione dei suoi apparati radicali, cosa che non avviene sotto farro. Al contrario, sotto il farro, CSA intensamente micorrizzata negli apparati radicali, il poligono (*Poligonum cuspidatum* L.) è risultato particolarmente sviluppato, nonché colonizzato abbondantemente dai funghi simbionti.

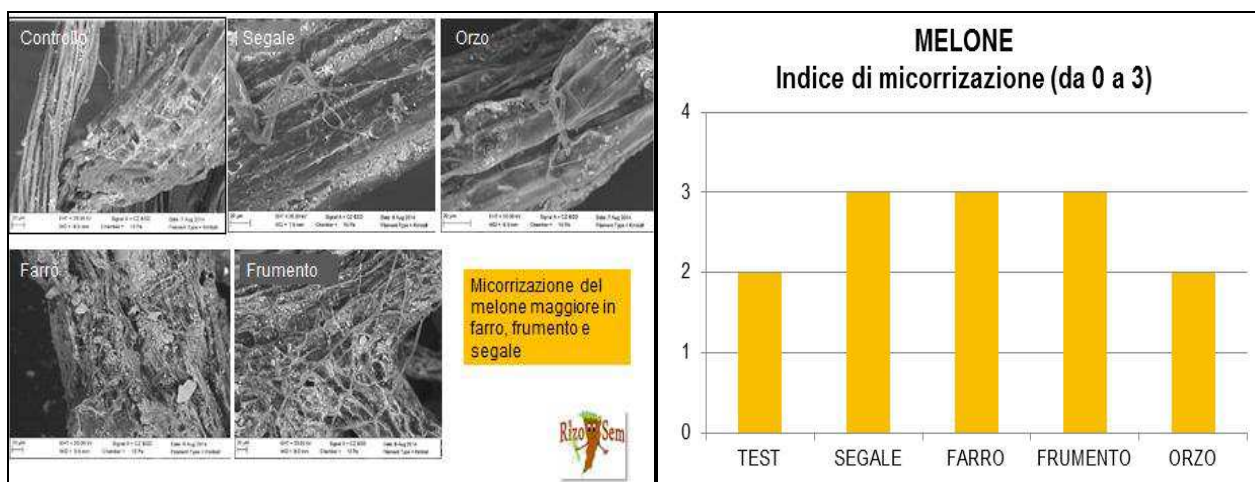
Parallelamente, uno studio in microscopia elettronica realizzato sulle prove *in vitro* dopo trattamento di semi dell'infestante target (*Rumex crispus* L.) con gli estratti di segale a concentrazioni crescenti (ACE), ha mostrato gli effetti determinanti della presenza di sostanze allelopatiche sulla crescita e sviluppo della radichetta dell'infestante target, confermando che tali estratti da segale sono in grado di indurre un graduale danneggiamento tissutale sul cortex radicale, fino a bloccare completamente l'emergenza della nuova radice in funzione della concentrazione (immagine sottostante).



Ciò sembrerebbe testimoniare che, a fronte dell'effetto allelopatico prodotto dalla segale, l'infestante può rispondere attraverso la promozione della micorrizzazione che le permette di superare lo stress legato agli effetti di interferenza con la CSA.

Dopo l'allettamento delle CSA - Al termine del ciclo del melone, a fronte dei risultati ottenuti circa le interazioni radicali indotti sulle infestanti da parte delle CSA, si sottolinea l'importanza degli effetti delle stesse CSA sulla coltura da reddito (melone). In particolare, gli studi in microscopia

elettronica ed ottica effettuati su radici di melone alla raccolta (dati 2014) hanno messo in evidenza come il melone abbia sviluppato un'infezione micorrizica in misura crescente in funzione delle differenti CSA allestite, secondo la sequenza: **frumento = farro > segale = orzo > controllo (test)**.



E' interessante notare come le CSA risultino determinanti in entrambe le fasi, ossia prima e dopo la terminazione conservativa. In particolare, durante il loro ciclo fenologico, esercitano un'interferenza con le infestanti, attraverso:

- 1) la competizione potenziale per acqua e nutrienti;
- 2) lo sviluppo di interazioni allelopatiche specifiche;
- 3) costituzione di network radicali, mediati dalla presenza delle endo-micorrize

Nella fase successiva all'allettamento, le CSA esercitano la loro influenza attraverso:

- 1) il contenimento delle infestanti
- 2) l'effetto pacciicante (mantenimento di umidità del suolo, riduzione delle patologie, ecc.)
- 3) promozione della micorrizzazione della coltura da reddito

Attività 6 - Coordinamento delle attività di ricerca, divulgazione e trasferimento normativo

Le attività di coordinamento hanno garantito in prima istanza il supporto tecnico-scientifico all'ufficio PQA "Agricoltura biologica" del Mipaaf, attraverso la predisposizione di pareri tecnici quando richiesti, nonché la partecipazione ai seguenti Gruppi di lavoro:

- "Mezzi tecnici in agricoltura biologica"
- "Corroboranti".
- "Formazione e informazione"

In riferimento alle attività di divulgazione, in occasione della Giornata divulgativa "Il CRA per la ricerca in orticoltura biologica" del 23 giugno 2015, organizzata presso il CRA-ORA di Monsampolo del Tronto (AP) (Allegato 1), sono stati predisposti due poster divulgativi allo scopo di rendere fruibile agli operatori del biologico quanto finora rilevato in ambito progettuale, riportanti:

- 1) la descrizione degli obiettivi del Progetto Rizosem, il dispositivo sperimentale e l'approccio analitico utilizzato (Allegato 2);
- 2) i risultati ottenuti nel secondo anno di sperimentazione (Allegato 3). Durante la Giornata, sono stati presentati ai partecipanti n. 2 poster (Allegato 2 e Allegato 3).

Si sottolinea come, sulla base delle attività svolte e dei risultati ottenuti dal progetto RizoSem sia stato possibile dare agli agricoltori alcuni consigli pratici, ed in particolare:

- Il farro può essere efficacemente utilizzato come CSA per contenere le infestanti e garantire una buona resa commerciale della coltura.
- Si consiglia comunque di integrare la tecnica della terminazione conservativa delle CSA con scerbature lungo la fila + falciature interfilari.

Pubblicazioni scientifiche e presentazione a Convegni - In occasione del 29th International Horticultural Congress 2014 (17-22 August 2014), Brisbane Queensland (Australia) è stato selezionato quale presentazione orale il lavoro:

- Trinchera, C. Ciaccia, E. Testani, F. Tittarelli, S. Canali (2014) *“May Allelopathic Cover Crops Inhibit Weed Seedling Root Development by Suppressing Mycorrhization?”*, *Acta Horticulturae*, in press.

Inoltre, in occasione del Symposium “INNHORT 2015 - Innovation in Integrated & Organic Horticulture”, di Avignone (Francia) l'8-12 giugno 2015, è stato selezionato quale presentazione orale il lavoro:

- Trinchera, A., Testani, E., Ciaccia, C., Campanelli, G., Leteo, F., Canali, S. (2015) *“Rhizosphere interaction via AMF in an organic horticultural cropping system - Effect of living mulch on organic artichoke mycorrhization”*. *Acta Horticulturae*, in press.

Attività future

In base ai risultati finora ottenuti, ed al fine di verificare i dati del primo e del secondo anno, sullo schema sperimentale del 2015 verranno valutati i rilievi (già effettuati) sulle radici delle CSA e delle infestanti, nonché sul melone.

Poiché nel 2014 i rilievi hanno evidenziato alcune associazioni “infestante-CSA” particolarmente efficaci nel promuovere le simbiosi micorriziche, si vuole verificare se tali interazioni siano costanti o se tali interazioni “virtuose” siano influenzate da altri fattori (andamento climatico e stagionale, rotazione del campo sperimentale, ecc.).

Roma, 3 luglio 2015

Il Coordinatore del progetto RizoSem

Alessandra Trinchera

