

Relazione sullo stato di avanzamento del progetto



Rendicontazione attività 1° Semestre 2014

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 richiesta: 31 dicembre 2015

Coordinatore:

Dr.ssa Alessandra Trinchera (CRA-RPS)

Attività svolte dal 1 gennaio al 30 giugno 2014

Per il secondo 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 verificare i primi risultati ottenuti nel 2013. Occorre segnalare che, in questo secondo anno di attività, sono stati introdotti alcuni approfondimenti di ricerca sul dispositivo RizoSem, allo scopo di chiarire meglio quanto emerso durante le attività di indagine relative alla prima annualità.

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 ecologico (CSE) afferenti a diverse specie graminacee e la successiva coltura da reddito rappresentata dal melone. In un secondo dispositivo sperimentale viene invece studiata la consociazione (living mulch-LM) del carciofo con una coltura di copertura mista.

Nel primo dispositivo sperimentale sono state poste a confronto secondo lo schema sperimentale del blocco randomizzato le seguenti tesi che utilizzano come CSE: 1) orzo; 2) grano; 3) segale; 4) farro; 5) mix di orzo+grano+segale+farro; 6) testimone (no CSE). 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. All'interno di ogni tesi è stata ricavata un'area dove sono state operate delle scerbature manuali. Al momento della terminazione avvenuta il 29 aprile 2014 sono state verificate le biomasse epigeiche delle graminacee di copertura. Contestualmente all'allettamento è stata operata la discissura del terreno per consentire il successivo trapianto della coltura da reddito. Il melone HF1 Anish (Ditta Enza Zaden) è stato seminato in serra fredda il 5 maggio mentre il trapianto è avvenuto il 30 maggio. Sono state poste in atto le normali pratiche colturali relative alla fertilizzazione di fondo con pellettato organico e di fertilizzazione con formulati idrosolubili. L'irrigazione è avvenuta con manichetta forata posta lungo la fila. Sono stati necessari 3 trattamenti fungicidi con rame solfato tribasico e zolfo bagnabile.

Nel secondo dispositivo sperimentale una copertura vegetale di pisello, favino, trifoglio, veccia, rapa, alisso, coriandolo, facelia e grano saraceno è stata seminata all'interno di una carciofoaia bio. Sono state poste a confronto 2 fattori. Il primo fattore, relativo alla gestione agronomica, è a 4 livelli: a) LM ; b) LM con root pruning (taglio radici); c) NO LM; d) NO LM + SCERBATURA. Nelle prime tre tesi non sono stati effettuati interventi di scerbatura. Il secondo fattore, relativo alla varietà, è a due livelli: cv MazzaFerrata; b) cv Jesino. La raccolta dei capolini è avvenuta per frutto singolo nel periodo dal 18 aprile al 3 giugno 2014. Nessuna differenza è stata osservata per quanto riguarda la produzione commerciabile, numerica e ponderale, tra le diverse tesi di gestione agronomica mentre la cv MazzaFerrata si è dimostrata più produttiva della cv Jesino.

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

Nel primo dispositivo sperimentale RizoSem, l'ibrido commerciale di melone è stato coltivato sia in pieno campo sia in vaso in presenza delle diverse CSE. 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 CSE-melone. La prova ha previsto l'allestimento di 36 vasi, di cui 18 sono stati scerbati e 18 lasciati senza scerbatura. In ogni vaso l'ibrido di melone è stato coltivato in presenza delle 6 diverse CSE e ogni combinazione CSE-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.

Azione 5 - Divulgazione dei risultati agli operatori di settore

Il 24 giugno 2014 è stata organizzata presso il CRA-ORA di Monsampolo del Tronto (AP) una visita guidata ai campi sperimentali rivolta a imprenditori agricoli, tecnici, docenti universitari e consumatori, inerente ai primi risultati del progetto RizoSem.

U.O. CRA RPS – A. Trinchera, 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 2014, corrispondente al secondo anno di sperimentazione, sono stati nuovamente effettuati i rilievi sulle comunità della flora spontanea all'emergenza durante le principali fasi fenologiche delle CSE (accestimento, levata, spigatura, terminazione). Tali rilievi sono consistiti nella misura totale e specie specifica della densità delle infestanti e nella valutazione tassonomica: genere e specie, delle forme presenti nelle diverse tesi a confronto. Alla terminazione delle CSE (Maggio 2014) è stata valutata anche la biomassa della flora spontanea.

I risultati di questi primi rilievi hanno confermato il trend osservato nel primo anno con valori medi di densità delle infestanti (n° di piante per m²) più basso nei trattamenti con segale e farro (72 e 83) rispetto alle altre CSE (109, 128, e 141 piante per m² per frumento, mix e orzo rispettivamente) nella fase di terminazione (differenze non statisticamente significative ai test ANOVA applicati).

Per l'analisi qualitativa dello sviluppo della comunità infestante, sono stati osservati effetti specie-specifici da parte delle CSE. Ad esempio, la segale ha comportato un evidente effetto di contenimento sulla specie *Anagallis arvensis* L. nelle fasi centrali del suo sviluppo vegetativo (levata e spigatura) con valori medi di densità specifica dell'infestante più bassi rispetto agli altri trattamenti (differenze non statisticamente significative). Allo stesso modo il farro ha mostrato effetti di inibizione specifici sulla specie *Polygonum aviculare* L., con valori medi di densità della specie minori rispetto agli altri trattamenti nelle fasi levata, spigatura e terminazione (differenze non statisticamente significative). Questo particolare risultato da parte del farro nel ritardare lo sviluppo di una specie con portamento prostrato (strisciante) quale il poligono, potrebbe spiegare l'effetto

del farro osservato in campo durante la prova sperimentale del primo anno nel contenere lo sviluppo della biomassa infestante dopo l'allettamento, durante lo sviluppo della coltura da reddito, quando la particolare gestione della terminazione è apparsa favorire lo sviluppo di specie striscianti, quali lo stesso poligono.

Per la valutazione delle potenzialità allelopatiche delle CSE sulla crescita di specie infestanti, sono stati effettuati test di bioassay valutando l'inibizione da parte di estratti vegetali della componente epigea delle stesse CSE (materiale prelevato in campo in fase di levata) a diverse concentrazioni sulla germinazione e allungamento radicale di semi di una pianta target, il romice (*Rumex Crispus* L.), raccolti direttamente dal campo sperimentale. I test hanno evidenziato un effetto significativo sulla germinazione del romice da parte degli estratti più concentrati con una riduzione fino al 100% di semi non germinati per il trattamento segale rispetto al controllo in acqua. L'applicazione degli estratti ha inoltre determinato un significativo decremento nell'allungamento radicale a tutte le concentrazioni rispetto al controllo. I test confermano pertanto le potenzialità allelopatiche delle cultivar utilizzate in campo.

Per quanto riguarda l'identificazione dei composti allelopativamente attivi verificati in laboratorio e, nel primo anno di prova, in campo, la ricerca si è concentrata sulla determinazione, dell'alcaloide indolico gramina (riconosciuto in letteratura come il principale responsabile dell'attività allelopatica di alcune cultivar di *Hordeum vulgare* L.) e dei tre benzoxazinoni: DIBOA (2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-one), DIMBOA (2,4-dihydroxy-7methoxy-1,4-benzoxazin-3-one) e BOA (2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-one) comuni ad alcune cultivar dei cereali impiegati nella prova come CSE.

Il materiale vegetale (5g di foglie da biomassa prelevata in campo in levata) è stato estratto per sonicazione in metanolo, per la determinazione della gramina nell'orzo, e in acqua a pH=3 per i benzoxazinoni per consentire l'idrolisi del DIBOA-glicoside in DIBOA. Le fasi metanolica e acquosa così determinate, sono state estratte, dopo filtrazione, in cloroformio e acetato di etile rispettivamente, evaporati a secco e ripresi in 1 mL di metanolo per la successiva analisi in HPLC-DAD (recupero dei composti standard di circa il 70% per ogni composto), dopo ottimizzazione del metodo separativo. Come standard interno è stato utilizzato l'alcaloide teofillina. L'analisi cromatografica del materiale vegetale così trattato non ha evidenziato la presenza della gramina nell'orzo (concentrazioni < LOD metodo). D'altra parte l'analisi dei tre benzoxazinoni ha invece mostrato la presenza del composto DIBOA nella segale (dati quantitativi non ancora disponibili). Quest'ultimo risultato potrebbe pertanto confermare l'ipotesi di un'azione allelopatica della segale alla base degli effetti di inibizione della flora infestante osservati in campo (primo anno e prima parte del secondo) e nei test effettuati in laboratorio.

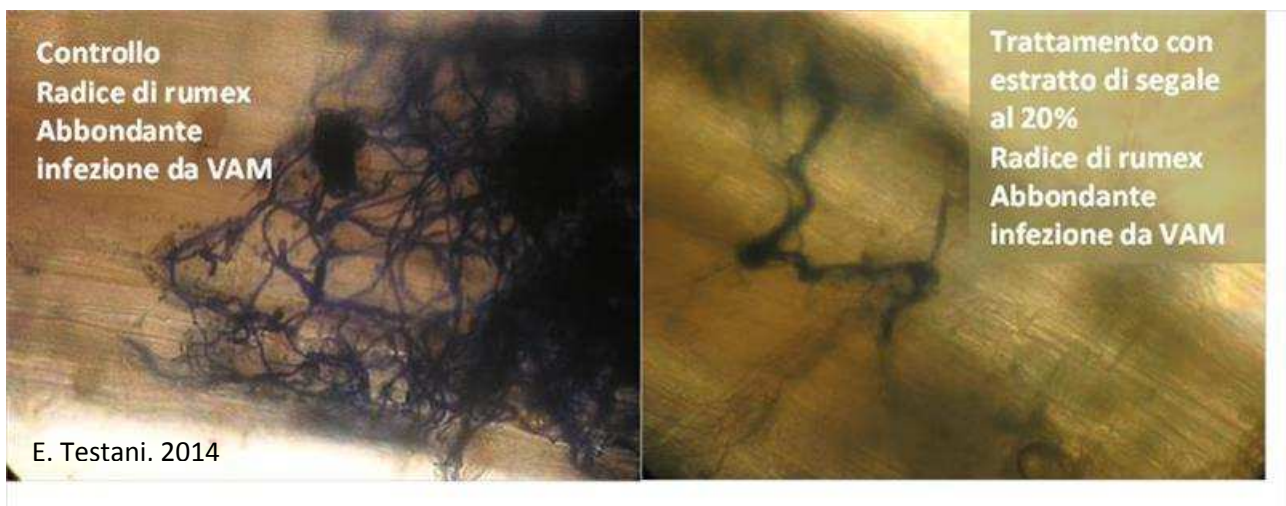
Azione 4 - Studio degli effetti indotti dalla pacciamatura verde sulle interazioni abiotiche e biotiche in ambiente rizosferico mediante tecniche di microscopia ottica ed elettronica

Sulla base dei risultati ottenuti l'anno precedente nel primo dispositivo, secondo i quali la micorrizzazione radicale della coltura da reddito (melone) veniva soppressa dalla presenza delle colture per servizio agro-ecologico (CSE) terminate con allettamento, nel primo semestre 2014 sul dispositivo sperimentale RizoSem descritto si è voluto verificare se tale effetto fosse o meno collegato ad effetti allelopatici indotti dalle CSE (terminate per allettamento) sul melone, oppure alla ridotta (o selettiva) presenza di infestanti nelle tesi con le CSE, essendo queste ultime potenziali specie "ospiti" per l'infezione micorrizica. A tale scopo, dopo aver ottimizzato le modalità di campionamento delle infestanti, sono stati effettuati campionamenti periodici degli apparati radicali di n. 3 specie di erbe spontanee (tra le quali anche il *Rumex Crispus* L.) risultate maggiormente rappresentative dell'agro-ecosistema, in riferimento a due colture per servizio agro-ecologico (CSE), il farro e la segale, confrontandole con il controllo (senza CSE). Al momento dei prelievi, sono stati campionati anche gli apparati radicali delle CSE presenti, nei principali stadi

fenologici, al fine di comprendere se e quali CSE si comportino da specie “ospiti” per le micorrize, promuovendo o ostacolando l’infezione fungina tra le specie coesistenti (interazione CSE-infestante). I rilevamenti sono stati effettuati tramite microscopia ottica ed elettronica (SEM).



Lo studio in microscopia è stato anche realizzato su prove *in vitro*, dopo trattamento di semi di un’infestante target (*Rumex crispus* L.) con estratti di segale a concentrazioni crescenti, in modo da osservare i potenziali effetti allelopatici della CSE tramite valutazione quali-quantitativa della micorrizzazione nella fase di emergenza dell’infestante. I risultati hanno mostrato che gli estratti di segale sono in grado di inibire la micorrizzazione in maniera proporzionale alla loro concentrazione.



In merito al secondo dispositivo che prevedeva quale specie da reddito il carciofo (in due varietà locali), coltivato in presenza o in assenza di *living mulch*, nel 2014 è stato nuovamente effettuato un campionamento radicale per la valutazione dell’entità della micorrizzazione per i diversi trattamenti e le diverse varietà, confermando sostanzialmente i risultati dell’anno precedente, ossia:

- Tra le due varietà di carciofo considerate, la cv. Jesino mostra una maggiore attitudine alla micorrizzazione;
- nelle tesi ove era presente il *living mulch*, il carciofo ha mostrato una maggiore micorrizzazione negli apparati radicali, informazione che sembra confermare l’ipotesi secondo

la quale la coesistenza in spazi ristretti di specie vegetali differenti, induce un incremento dell'infezione radicale da parte dei funghi micorrizici vescicolo-arbuscolari.

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 PQAV "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".

In riferimento alle attività di divulgazione, in occasione della Giornata di campo "Agro - ecologia e orticoltura, ricercatori ed agricoltori, insieme per innovare" del 24 giugno 2014, è stato predisposto un *leaflet* divulgativo riportante i risultati ottenuti nel primo anno di sperimentazione (Allegato 1). Durante la Giornata, sono stati presentati ai partecipanti n. 2 poster allo scopo di rendere fruibile agli operatori del biologico quanto finora rilevato in ambito progettuale (Allegato 2 e Allegato 3).

In occasione della "Giornata di Riflessione sui Partenariati Europei di Innovazione e la Ricerca in Agricoltura Biologica. Primi progetti e pianificazione 2014", tenutasi a Roma il 20 febbraio 2014, sono stati presentati i primi risultati del Progetto RizoSem (Allegato 4).

Infine, in occasione del II Congresso Nazionale RIRAB dell'11-13 giugno 2014, sono stati presentati i seguenti lavori:

"Effetto delle colture di servizio ecologico sui fenomeni di competizione e d'interazione allelopatica nei sistemi orticoli biologici" di Ciaccia C., Testani E., Campanelli G., Sestili S., Leteo F., Tittarelli F., Riva F., Canali S., Trinchera A. (relazione orale RIRAB, diapositive presentate allegate)

"Effetti indotti dalla pacciamatura verde sulle interazioni biotiche ed abiotiche in ambiente rizosferico" di Trinchera, A., Ciaccia, C., Campanelli, G., Testani, E., Leteo, F., Sestili, S., Tittarelli, F., Riva, F., Canali, S. (poster RIRAB, allegato).

Attività future

In base ai risultati finora ottenuti, ed al fine di verificare i dati del primo e del secondo anno, al momento già disponibili, il medesimo schema sperimentale è stato riproposto per la produzione 2015, utilizzando nuovamente il melone quale specie orticola di riferimento.

Poiché i primi rilievi effettuati nel primo semestre del 2014 hanno permesso di identificare alcune associazioni "infestante-CSE" particolarmente efficaci nel promuovere le simbiosi micorriziche, mentre altre sembrano sfavorire tali interazioni positive, l'intento è quello di verificare, per l'anno produttivo successivo, se quanto osservato si riproponga nuovamente o se tali interazioni "virtuose" siano influenzate da differenti andamenti climatici e stagionali.

A tale scopo, è stata già formalmente richiesta all'Ufficio PQAV del Mipaaf una proroga amministrativa del Progetto RizoSem dal 24 maggio 2015 fino al 31 dicembre 2015 (ns. Prot. n. 46432 del 21/07/2014).

Roma, 19 dicembre 2014

Il Coordinatore del progetto RizoSem

Alessandra Trinchera

