

Relazione tecnico-scientifica finale

Progetto pilota Codice C

“Sistemi di lotta ecocompatibile contro il CoDiRO – SILECC”

D'AMICO Margherita¹, GIOFFREDA Ivano², MARESCOTTI Daniele³, PANDOLFI Saverio⁴, MARIOTTI Roberto⁴ e BALDONI Luciana⁴

¹Responsabile scientifico - Biologa e patologa vegetale; ²Associazione “Spazi Popolari”; ³Euthink ARL; ⁴CNR - Istituto di Bioscienze e Biorisorse, Via Madonna Alta, 130, 06128, Perugia.

Soggetto Promotore: MERICO SRL

Soggetti attuatori: - CNR - Istituto di Bioscienze e Biorisorse (CNR-IBBR), Sede di Perugia

- EUTHINK A.R.L.

- Masseria Lo Prieno

Introduzione

Negli ultimi anni il Complesso del Disseccamento Rapido dell'Olivo (Co.Di.RO) ha interessato l'intero Salento. Dal 2013 è stata evidenziata la presenza, negli alberi affetti da CoDiRO, del batterio da quarantena *Xylella fastidiosa* (Saponari et al., 2013), di diversi patogeni fungini, tra cui *Phaeoacremonium parasiticum* (Nigro et al., 2013), e dell'insetto *Zeuzera pyrina*.

All'interno del sito sperimentale del Progetto SILECC, localizzato in agro di Galatone, Masseria Lo Prieno, le piante di olivo all'inizio delle prove risultavano gravemente colpite dal Co.Di.RO e si presentavano quasi completamente disseccate e defogliate (Figura 1).



Figura 1. A sinistra: pianta di olivo gravemente disseccata e defogliata. A destra: parte dell'oliveto sperimentale (Blocco I) del Progetto SILECC. Foto scattate a febbraio 2017 prima dell'inizio della sperimentazione.

Per far fronte a questa grave e complessa patologia, in questo Progetto, si è deciso di utilizzare un approccio agroecologico applicando tecniche di agricoltura organico-rigenerativa (AOR) per la gestione del suolo e della pianta (Garbeva et al., 2004). L'agricoltura organico-rigenerativa è un sistema di gestione della produzione tesa a promuovere e potenziare la biodiversità, i cicli biologici di insetti e microrganismi utili e le attività biologica e biochimica del suolo. Questo tipo di agricoltura si basa sull'utilizzo minimo di input chimici e su pratiche di gestione del suolo (minima lavorazione del terreno, concimazione organica e sovescio di leguminose) che ripristinano, mantengono e migliorano le interazioni fra pianta-suolo-microrganismi all'interno di un determinato agro-ecosistema (Restrepo Rivera, 2007).

Negli ultimi anni in Europa e negli USA si è osservato un aumento del numero di imprese agricole che adottano questo tipo di agricoltura (AOR) (Skrodzka, 2017), per rispondere alla sempre più pressante esigenza di una agricoltura più sostenibile, dal punto di vista ambientale, e alla crescente domanda, da parte dei consumatori, di prodotti più salutari e ricchi di sostanze nutraceutiche. Inoltre è ormai consolidato il fatto che una pianta reagisce più energicamente e prontamente all'attacco dei patogeni soprattutto se è inserita in un ambiente con un alto tasso di biodiversità e un suolo con un buon contenuto di sostanza organica e con un equilibrio microbiologico spostato verso microrganismi saprofiti, responsabili della degradazione della sostanza organica, e antagonisti (Elmholt, 1996).

La gestione del suolo adottata nel Progetto, quindi, ha previsto il sovescio e/o la concimazione con un biofertilizzante liquido, basato sul protocollo di Restrepo Rivera (2007), ottenuto dalla fermentazione anaerobica (per circa un paio di mesi) di letame bovino fresco con l'aggiunta di cenere, siero di latte, saccarosio, lieviti e acqua.

Per il sovescio sono state utilizzate una leguminosa (il favino) e una brassicacea (cavolo broccolo varietà locale "Mugnulu"). È stata scelta questa varietà salentina di cavolo broccolo per sfruttare, mediante il sovescio, il suo potenziale biofumigante dovuto ad un elevato contenuto di glucosinolati (Argentieri et al., 2011). I glucosinolati sono molecole ad elevata attività biologica nei confronti di funghi, batteri, nematodi e insetti, che si liberano e si attivano al momento della trinciatura e interrimento delle brassicacee (Tookey et al., 1980). Diverse ricerche hanno dimostrato che il sovescio di brassicacee esercita un contenimento di diverse malattie causate da patogeni terricoli e sposta l'equilibrio della biocenosi microbica tellurica verso microrganismi saprofiti e antagonisti (D'Amico, 2001). Il favino è stato scelto per la sua capacità di fissare l'azoto atmosferico e per le caratteristiche del suo apparato radicale, fittonante, ramificato e con discreto sviluppo in profondità.

Obiettivi e impatti

L'obiettivo del progetto è stato quello di definire un sistema di lotta ecocompatibile contro il Co.Di.RO da poter applicare soprattutto all'interno degli oliveti secolari che caratterizzano l'intero territorio salentino. Si è cercato di raggiungere questo obiettivo attraverso il miglioramento, oltre che dello stato fitosanitario della pianta, anche delle caratteristiche fisico-chimiche e microbiologiche del terreno, promuovendo l'aumento della sostanza organica e lo spostamento dell'equilibrio della biocenosi microbica tellurica verso i microrganismi utili e antagonisti. Con questo tipo di approccio si è inteso recuperare e valorizzare le qualità dell'olivicoltura salentina.

Materiali e Metodi

Il sito sperimentale è localizzato in agro di Galatone, presso l'azienda agrituristica "Lo Prieno", in cui l'oliveto è a conduzione biologica da oltre 15 anni.



Figura 2. Mappa del sito sperimentale con relativo schema sperimentale a blocchi randomizzati. Le tesi sperimentali sono descritte nel testo (immagine da Google Maps).

Sono stati eseguiti i seguenti trattamenti suddivisi in sette tesi:

- A) Terreno arato non trattato, pianta non trattata;
- B) Terreno arato non trattato, pianta trattata con solfato di rame e solfato di ferro;
- C) Terreno arato trattato con biofertilizzante, pianta trattata con solfato di rame e solfato di ferro;
- D) Terreno arato e sovesciato con favino, pianta trattata con solfato di rame e solfato di ferro;
- E) Terreno arato e sovesciato con mugnuli, pianta trattata con biofertilizzante, solfato di rame e solfato di ferro;
- F) Terreno arato e trattato con biofertilizzante in combinazione con sovescio con mugnuli, pianta trattata con solfato di rame e solfato di ferro;
- G) Terreno non arato non trattato, pianta trattata con biofertilizzante, solfato di rame e solfato di ferro.

E' stato utilizzato uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni, dove ciascuna ripetizione è costituita da 4 piante di olivo, per un totale di 84 piante oggetto della sperimentazione (Figura 2).

Calendario e modalità di intervento

Le attività svolte nell'ambito del progetto SILECC hanno avuto inizio a Marzo 2017.

La prima attività svolta nel campo sperimentale è stata l'eliminazione delle erbe spontanee presenti nell'oliveto mediante una aratura superficiale su tutta la superficie, ad eccezione della tesi G in cui è stato effettuato lo sfalcio dell'erba.

Tutte le piante sono state sottoposte agli stessi interventi di potatura (Marzo 2017), tesi ad allontanare le parti della chioma con sintomi da CoDiRO e a stimolare una vigorosa ripresa vegetativa. In molti casi la potatura ha interessato anche le branche principali che presentavano importanti alterazione del

legno, quali spaccature, carie, numerose gallerie scavate da larve di rodilegno ed estesi imbrunimenti vascolari.

Subito dopo la potatura le piante delle tesi B-C-D-E-F-G sono state trattate con poltiglia bordolese e le sezioni di taglio più grandi di 5 cm sono state spennellate con una pasta a base di solfato di rame.

Nel mese di Giugno 2017 il tronco e le branche di tutte le piante di olivo, ad eccezione di quelle presenti nella tesi testimone (A), sono state trattate con una soluzione di solfato di ferro al 15%, per ridurre la clorosi ferrica e favorire un riequilibrio fra i microrganismi epifitici presenti sulla corteccia, aumentando la presenza di quelli che sono competitori e antagonisti dei patogeni.

Nel mese di Settembre 2017 e Marzo 2018 sono stati effettuati altri due diserbi meccanici.

Nel mese di Ottobre 2017 è stata effettuata la semina delle piante da sovescio (cavolo broccolo varietà locale “mugnulu” e favino).

Nel periodo Gennaio-Febbraio 2018 è stata effettuata una seconda potatura, durante la quale si sono eliminati i rami più alti, lasciati durante la prima potatura, allo scopo di abbassare l'altezza delle piante e iniziare a impostare la forma della futura chioma della pianta. Inoltre le piante, ad eccezione di quelle presenti nella tesi A, sono state trattate con poltiglia bordolese.

A marzo 2018 è stato effettuato, in epoca di fioritura, il sovescio delle piante di favino e di mugnuli seminate a ottobre dell'anno precedente e cresciute durante l'inverno 2017-2018 (Figura 3), e il trattamento al terreno e alla pianta con il biofertilizzante.



Figura 3. Sovescio del favino (a sinistra) e dei mugnuli (a destra).

Nel periodo giugno-luglio 2018 le piante sono state trattate con solfato di rame ed è stato effettuato il secondo trattamento al terreno e alla pianta con il biofertilizzante.

Rilievo della gravità dei sintomi

La gravità del disseccamento è stata valutata secondo una scala di gravità di sintomi sulla chioma in cui: 0=assenza di disseccamento; 1=leggero disseccamento pari all'1-9 % dei rami presenti; 2=moderato disseccamento pari al 10-25 % dei rami; 3=grave disseccamento pari al 26-50 % dei rami; 4=gravissimo disseccamento pari al 51-100 % dei rami. Sono stati effettuati due rilievi fitopatologici, settembre 2017 e settembre 2018. Solo nel rilievo fitopatologico sono state incluse anche le piante presenti nel campo sperimentale che non hanno ricevuto alcun tipo di trattamento compresa la potatura.

Identificazione varietale mediante analisi molecolare

La raccolta dei campioni fogliari e l'estrazione del DNA sono stati svolti a cura del CNR-IPSP di Bari.

Le analisi molecolari (a cura del CNR-IBBR di Perugia) sono state effettuate su 14 campioni di DNA estratto da 7 piante (pollone e chioma) presenti nel campo sperimentale (1 per trattamento).

È stato estratto il DNA da ogni campione fogliare utilizzando il Kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Il DNA di ciascun campione in esame è stato analizzato insieme a campioni di DNA della varietà di riferimento Leccino, proveniente dalla collezione del CNR-IBBR di Perugia.

Per l'analisi molecolare sono stati impiegati 9 marcatori microsatellite (SSR, Simple Sequence Repeats), (DCA3, DCA5, DCA9, DCA16, DCA18, GAPU71, GAPU101, GAPU103, UDO43), mediante amplificazione PCR ed elettroforesi capillare su sequenziatore ABI 3130 Genetic Analyzer.

I marcatori SSR impiegati rappresentano i marcatori più affidabili e discriminanti disponibili in questo momento per le cultivar di olivo, così come dimostrato dalla letteratura scientifica del settore (Baldoni et al., 2009; Hosseini-Mazinani et al., 2014; Mousavi et al., 2017).

I profili molecolari, espressi in lunghezza degli alleli (paia di basi) dei campioni analizzati, sono stati confrontati con quelli presenti nella banca dati del CNR-IBBR (2.725 genotipi di olivo).

Le medesime piante sottoposte a genotipizzazione sono state analizzate presso il CNR-IPSP di Bari per verificare la presenza di *Xylella fastidiosa*, mediante Real Time PCR.

Rilievi agronomici

Le osservazioni si riferiscono alla valutazione dello stato vegetativo delle piante facenti parte della prova, su olivi affetti dalla sindrome CoDiRO, allevati in condizioni di agricoltura biologica e sottoposti a diversi trattamenti agronomici di cui al punto precedente.

Tutte le piante sono state fotografate in 3 fasi successive:

- all'inizio dei trattamenti (13/09/2017),
- alla stasi vegetativa (19/01/2018),
- alla fine della stagione di accrescimento (29/09/2018).

Le misurazioni sono state eseguite sulla base di riferimenti metrici posti all'interno di ogni immagine.

In data 25 settembre 2018 è stato eseguito anche un rilievo visivo in campo tenendo in considerazione i seguenti parametri: stato vegetativo degli alberi, allungamento dei rami, quantità di frutti, colore delle foglie.

Le piante sono state valutate per l'aspetto della chioma, in rapporto alla quantità di rami sofferenti, per una stima sintetica della risposta delle piante ai trattamenti.

Per ogni valutazione è stata usata una scala di valori da 1 a 5 (peggiore - migliore) e considerando tutte e quattro le piante facenti parte di ogni tesi per blocco.

Analisi del contenuto relativo di acqua nelle foglie (Relative Water Content - RWC)

Per verificare l'effetto del disseccamento rapido degli olivi sul contenuto relativo di acqua nelle foglie si è proceduto alla verifica dell'RWC.

Da ogni tesi e per ogni pianta dei tre blocchi sono state prelevate 4 foglie adulte. Il peso fresco è stato immediatamente misurato con bilancia di precisione. Le stesse foglie sono state messe in 15 ml di acqua deionizzata per 24 ore. Dopo le 24 ore in immersione è stato misurato il peso delle foglie (peso turgido). Successivamente sono state messe in stufa a 85°C per 24 ore ed il peso secco è stato quindi misurato secondo il metodo di Bianco et al. (2017).

Per ottenere il valore di RWC è stata utilizzata la seguente formula:

$$RWC = 100 [(FW-DW)/(TW-DW)]$$

dove: FW=peso fresco; DW=peso secco; TW=peso turgido

Analisi microbiologiche del terreno

Per verificare la presenza e la concentrazione di diversi microrganismi del suolo sia fungini che batterici in funzione dei diversi trattamenti sono stati amplificati selettivamente alcuni microrganismi attraverso estrazione del DNA totale dal terreno e analisi in PCR Quantitativa.

I primer sono stati selezionati tenendo presente la possibilità di amplificare regioni barcoding di generi e/o specie.

Bacillus spp.

I batteri del genere *Bacillus* sono onnipresenti nei suoli, generalmente aerobi e comprendono anche alcune specie patogene.

Alcune specie di questo genere contengono composti antimicrobici che inibiscono i patogeni delle piante, come i funghi *Rhizoctonia solani* e *Botrytis cinerea*, e promuovono la crescita delle piante mediante l'emissione di composti volatili. In condizioni ambientali stressanti, i batteri possono rimanere in uno stato dormiente per periodi molto lunghi.

Trichoderma spp.

Molte specie del genere *Trichoderma* sono considerate simbiotici delle piante e possono formare relazioni endofitiche mutualistiche con diverse specie di piante.

Streptomyces spp.

Streptomyces è un genere di Attinomiceti, batteri aerobi che si trovano soprattutto nel suolo, dove utilizzano diversi substrati organici come fonte di energia. Dai loro metaboliti secondari si possono ricavare antibiotici come la streptomicina.

Pseudomonas fluorescens

Pseudomonas fluorescens vive nel suolo e nelle acque superficiali. È un aerobio obbligato, anche se alcuni ceppi possono adattarsi a usare nitrati al posto dell'ossigeno atmosferico. Alcuni ceppi di *P. fluorescens* presentano proprietà di biocontrollo, proteggendo le radici di alcune specie vegetali da funghi parassiti come *Fusarium* o *Pythium*. *P. fluorescens* può promuovere la crescita delle piante.

Sono stati impiegati marcatori barcoding per i seguenti generi:

- *Streptomyces* spp. (Dickson et al., 2014);
- *Trichoderma* spp. (Hofstadler et al., 2005);
- *Bacillus* spp. (Meincke et al., 2010);
- *Pseudomonas fluorescens* (Watkins et al., 2016).

Microorganismi e primer utilizzati:

Microorganismi	Primer
<i>Streptomyces</i> spp.	
StrepB	5'-ACAAGCCCTGGAAACGGGGT-3'
StrepF	5'-ACGTGTGCAGCCCAAGACA-3'
<i>Trichoderma</i> spp.	
Forward-PF28	5'-CGGTATTTTCATAGGGCCTCA-3'
Reverse-PR41	5'-TATCCAGTGCTGACCAAACG-3'
<i>Bacillus</i> spp.	
16s-F	5'-TCCTACGGGAGGCAGT-3'
16s-R	5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
16S_F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
16S_R	5'-CTACGGCTACCTGTTACGA-3'

E' stato effettuato un campionamento randomizzato da tre repliche di terreno per ogni tesi di ciascun blocco. Le 3 repliche per trattamento e per blocco sono state miscelate prima dell'estrazione del DNA. Sono quindi stati estratti 21 campioni totali, più un altro come confronto esterno, prelevato dal terreno della Collezione presso il CNR-IBBR di Perugia.

Il DNA del suolo è stato estratto con il kit PowerSoil (MO BIO, Qiagen) e misurato attraverso Nanodrop. Il DNA di ciascun campione in esame è stato analizzato insieme al campione di DNA di confronto denominato 'PG' proveniente da Perugia, quindi fuori dall'area CoDiRO.

Analisi chimiche del terreno

L'analisi chimica è stata effettuata sugli stessi campioni di terreno su cui è stata effettuata l'analisi microbiologica. Sono stati analizzati i seguenti parametri: tessitura, pH, conducibilità elettrica (EC), calcare attivo, carbonio organico, sostanza organica totale, azoto totale, capacità di scambio cationico (CSC), rapporto Carbonio/Azoto, manganese estraibile, arsenico estraibile, alluminio estraibile, zinco disponibile e cadmio disponibile. Le analisi chimiche sono state eseguite presso il laboratorio "Studio Chimico Associato, De Giorgio" di Cavallino (LE).

Analisi statistiche

E' stata eseguita l'analisi della varianza dei dati ottenuti dai rilievi e dalle analisi microbiologiche e chimiche, per valutare la significatività delle differenze tra i trattamenti. Per questa analisi statistica è stata utilizzata la procedura ANOVA. La significatività delle differenze tra i trattamenti è stata stimata attraverso il metodo del confronto multiplo delle medie (test di Tukey).

Risultati

Rilievo della gravità dei sintomi

All'inizio della sperimentazione tutte le piante presentavano una gravità del disseccamento pari a 4.

Durante l'estate 2017, dopo 4 mesi dalla potatura, tutte le piante potate hanno reagito con l'emissione di numerose gemme, anche dal tronco principale, che sono state diradate mediante potatura verde a fine estate.

Il rilievo fitopatologico, effettuato a fine estate 2017, ha mostrato un complessivo e generale miglioramento dello stato vegetativo delle piante che non mostravano alcun sintomo di disseccamento e non si sono evidenziate differenze significative fra le tesi (dati non mostrati). Fino a maggio 2018 complessivamente le piante oggetto della sperimentazione erano in buone condizioni vegetative e presentavano rari casi di disseccamento rispetto alle piante dello stesso oliveto, non potate e non trattate, che circondavano il campo sperimentale.

I disseccamenti sono diventati più evidenti a giugno 2018 subito dopo la fioritura, la quale è stata discreta sulle piante che mostravano una buona vegetazione.

La figura 4 mostra la gravità del disseccamento, rilevata a settembre 2018, in ciascuna tesi/trattamento e sulle piante non potate non trattate che circondano il campo sperimentale. Le piante presenti nelle parcelle con i trattamenti B,C,D,E e G mostrano una riduzione statisticamente significativa del disseccamento rispetto alle piante non potate e non trattate (H). Il trattamento E (terreno arato e sovesciato con mugnuli, piante trattate con biofertilizzante, solfato di rame e solfato di ferro) è quello che ha ridotto maggiormente il disseccamento. Le piante presenti nelle tesi A e F hanno mostrato una riduzione dei sintomi della malattia che però non è significativa rispetto a quella rilevata su piante non potate e non trattate (H).

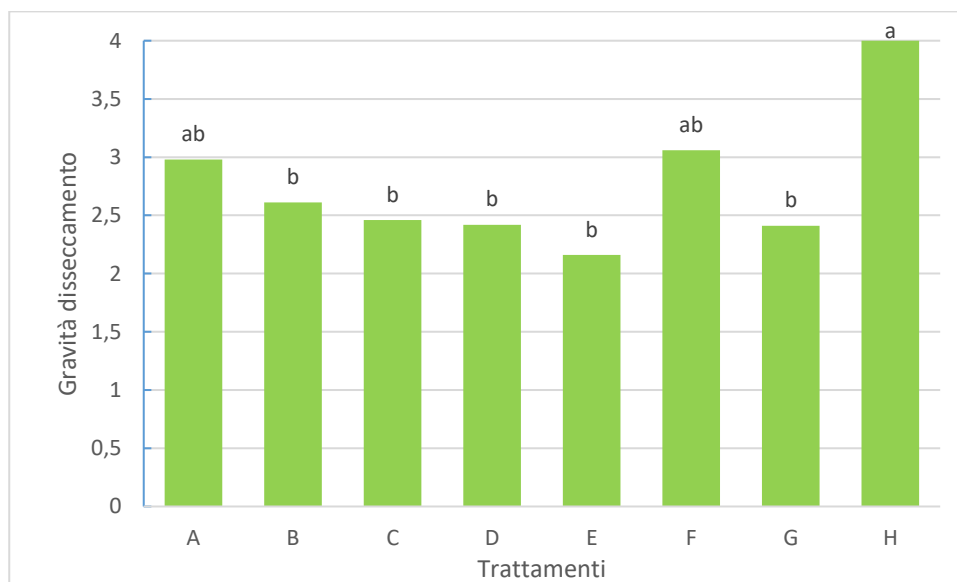


Figura 4. Effetti dei trattamenti sui sintomi del disseccamento delle piante di olivo. Colonne con la stessa lettera non sono significativamente differenti ($P < 0,01$).

Identificazione varietale mediante analisi molecolare

Nella tabella 1 sono mostrati i risultati della genotipizzazione di 7 piante, una per ogni tesi. I campioni prelevati dalla parte aerea sono risultati appartenere alle due varietà locali principali: 5 esemplari della varietà Cellina di Nardò e 2 di Ogliarola Salentina.

Dall'analisi dei portinnesti invece è risultato che 5 di essi corrispondono alle varietà di cui sopra (piante autoradicate) mentre due (1G e 2F) sono risultati ignoti e verosimilmente semenzali o piante selvatiche usati come portinnesti.

Tabella 2. Identità varietale dei campioni analizzati

Campione	Identità varietale
1D-Chioma	CELLINA DI NARDO'
1D-Pollone	CELLINA DI NARDO'
1G-Chioma	CELLINA DI NARDO'
1G-Pollone	SEMENZALE
2B-Chioma	OGLIAROLA SALENTINA
2B-Pollone	OGLIAROLA SALENTINA
2C-Chioma	CELLINA DI NARDO'
2C-Pollone	CELLINA DI NARDO'
2F-Chioma	OGLIAROLA SALENTINA
2F-Pollone	SEMENZALE
3A-Chioma	CELLINA DI NARDO'
3A-Pollone	CELLINA DI NARDO'
3E-Chioma	CELLINA DI NARDO'
3E-Pollone	CELLINA DI NARDO'

Il numero indica il blocco; la lettera il trattamento. Chioma: foglie della parte aerea, presunto nesto nel caso di innesto; pollone: foglie dai polloni della base, per identificare eventuali portinnesti, nel caso di innesto.

Le medesime piante sottoposte a genotipizzazione sono state analizzate presso il CNR-IPSP di Bari per verificare la presenza di *Xylella fastidiosa*. Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi alla presenza del batterio.

Rilievi agronomici

Le piante sono state valutate per l'aspetto della chioma, in rapporto alla quantità di rami sofferenti, per una stima sintetica della risposta delle piante ai trattamenti (Tabella 2). Da questa stima è emerso che il trattamento E (terreno arato e sovesciato con mughuli, piante trattate con biofertilizzante, solfato di rame e solfato di ferro) ha fornito la migliore risposta per i parametri considerati, mentre il trattamento F è risultato il peggiore. Le tesi A, B, C e G hanno dato lo stesso risultato. In tutte le tesi erano presenti piante di olivo che presentavano evidenti marciumi del colletto e delle radici superficiali in corrispondenza dei quali si è evidenziata la presenza di funghi appartenenti al genere *Omphalotus* sp. (Figura 5). E' stata quindi calcolata la percentuale di piante con marciumi radicali all'interno di ciascuna tesi. La tesi E presentava la percentuale più bassa di piante (3/12) con problemi di marciumi radicali, mentre la tesi F presentava la percentuale più alta.

Tabella 2. Stima della risposta vegetativa degli alberi ai diversi trattamenti e percentuale di piante con marciumi radicali all'interno di ciascuna tesi.

Trattamento	Media per trattamento	Piante con marciumi (%)
A	2,33	42
B	2,33	58
C	2,67	50
D	3,00	42
E	3,33	25
F	2,00	75
G	2,33	50



Figura 5. Sintomi di marciume in corrispondenza del colletto e delle radici superficiali di alcune piante del campo sperimentale.

L'analisi delle immagini di ciascuna pianta ha messo in evidenza che all'interno della tesi E (T5 nella figura) (terreno arato e sovesciato con mugnuli, piante trattate con biofertilizzante, solfato di rame e solfato di ferro) le piante di olivo mostravano una maggiore densità della chioma e un maggiore allungamento dei germogli, rispetto a tutte le altre tesi (Figura 6).

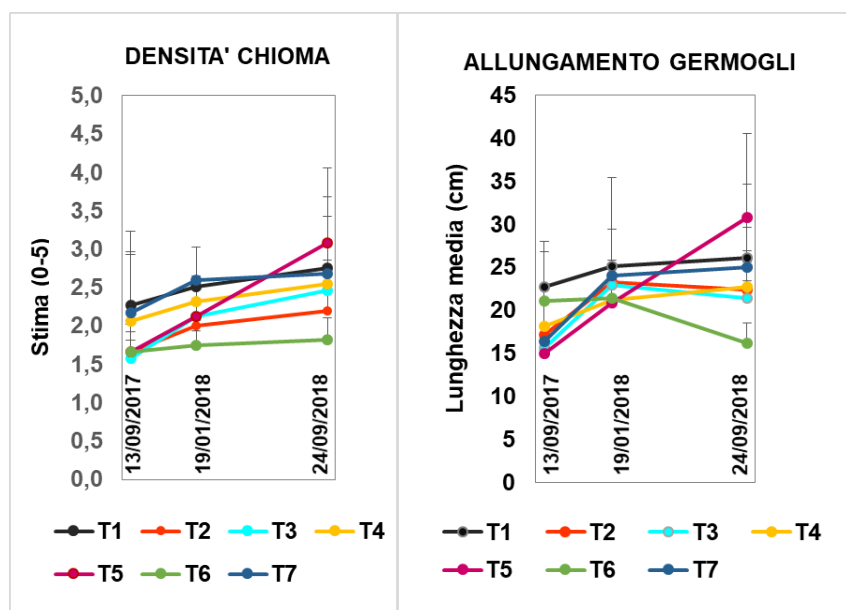


Figura 6. Esito dei trattamenti sull'accrescimento degli alberi (T1-T7 corrispondono alle tesi A-G).

Analisi del contenuto relativo di acqua nelle foglie (Relative Water Content - RWC)

L'analisi ha evidenziato che l'RWC maggiore era quello della tesi G in cui il terreno non è stato arato, mentre valori significativamente più bassi sono stati ottenuti nelle tesi E e F (Figura 7).

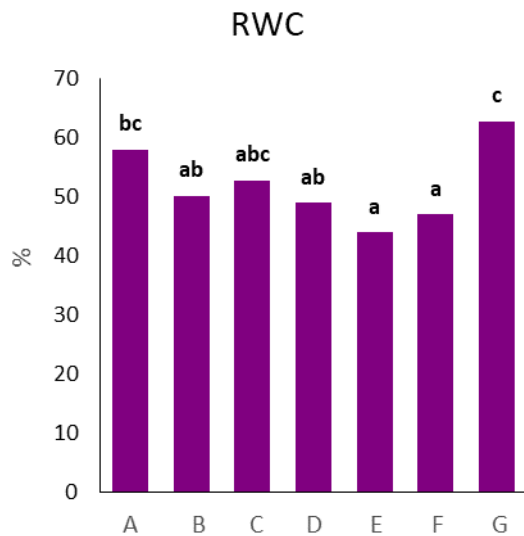


Figura 7. Contenuto relativo di acqua nelle foglie. Colonne con la stessa lettera non sono significativamente differenti ($P < 0.01$).

Analisi microbiologiche del terreno

I risultati dell'analisi ANOVA dei diversi trattamenti per ogni singolo blocco e il relativo confronto multiplo delle medie (metodo Tukey HSD) sulle 3 repliche tecniche hanno fornito i risultati relativi a *Bacillus* sp. mostrati nella Figura 8.

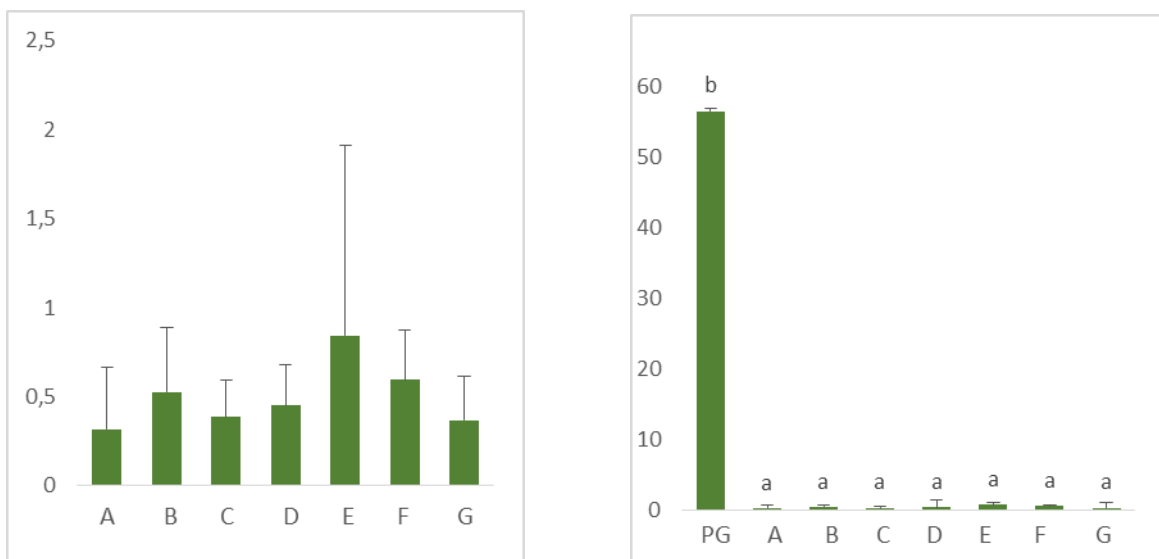


Figura 8. A sinistra: effetti dei trattamenti (A-G) sulla quantità di *Bacillus* sp. nelle tesi sperimentali. A destra: quantità di *Bacillus* sp. nelle tesi sperimentali confrontate con il campione di suolo di Perugia.

L'analisi statistica non ha evidenziato alcuna differenza significativa della quantità di *Bacillus* spp. tra i diversi trattamenti. Nel campione di suolo di Perugia (PG) invece la quantità di *Bacillus* spp. è

risultata notevolmente superiore a confronto con tutti i trattamenti eseguiti presso la Masseria Lo Prieno su olivi affetti da CoDiRO.

La presenza di tutti gli altri microrganismi nel terreno PG è risultata limitata o assente (dati non mostrati).

Funghi del genere *Trichoderma* spp. sono risultati presenti in tutti i trattamenti ma in quantità non significativamente diverse (Figura 9). Nel terreno non arato non trattato (G) la quantità di *Trichoderma* spp. è risultata più bassa.

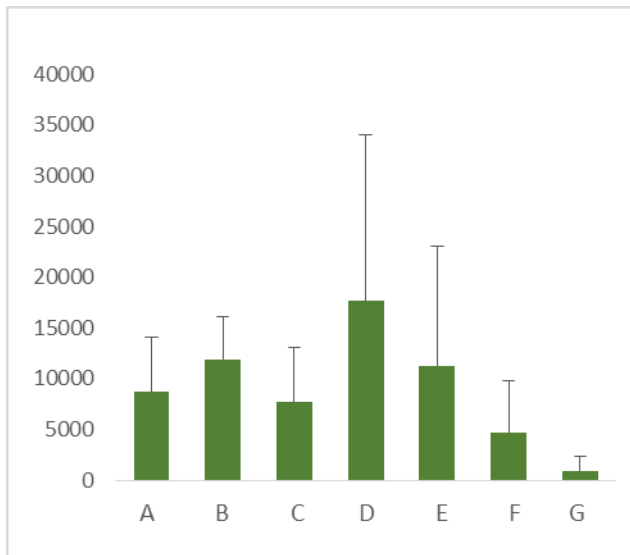


Figura 9. Effetti dei trattamenti (A-G) sulla concentrazione di *Trichoderma* spp. nel terreno.

La quantità di batteri del genere *Streptomyces* spp. manifesta differenze non significative tra i diversi trattamenti (Figura 10).

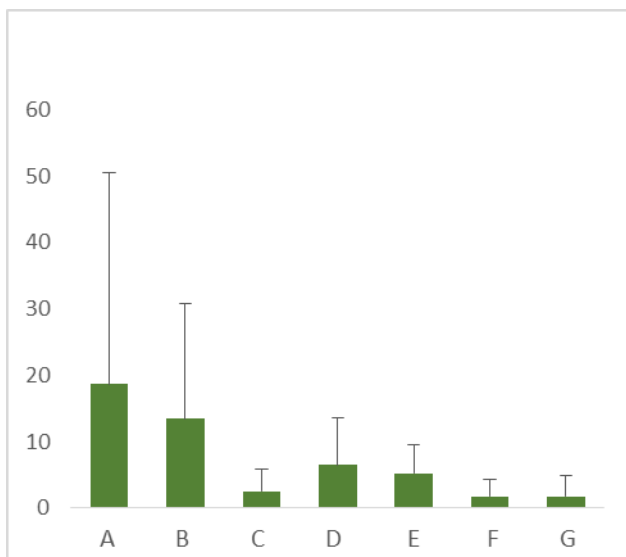


Figura 10. Effetti dei trattamenti (A-G) sulla concentrazione di *Streptomyces* spp. nel terreno.

Il batterio *Pseudomonas fluorescens* non è risultato presente in nessuno dei campioni analizzati.

Analisi chimiche del terreno

Le analisi chimiche del terreno non hanno evidenziato differenze significative dei parametri analizzati tra i trattamenti (Tabella 3). Tutti i terreni hanno un buon contenuto di sostanza organica, un pH subalcalino e un rapporto carbonio/azoto superiore a 15. I livelli di metalli pesanti analizzati rientrano nei normali valori presenti all'interno di un terreno condotto in maniera biologica.

La conducibilità elettrica è inferiore a 0,4 dS/m e quindi risulta bassa nei terreni provenienti da tutti i trattamenti.

Tabella 3. Valori dei parametri chimici presenti nei terreni provenienti dai diversi trattamenti.

Tesi	ph	EC (dS/m)	Csc (meq/100)	Sostanza organica (g/100g)	Carbonio (g/kg)	Azoto (g/kg)	C/N	Zn (mg/kg)	Mn (mg/kg)	As (mg/kg)	Al (mg/kg)	Cd (mg/kg)
A	7,4	0,224	13,2	2,9	17,0	1,0	17,4	0,75	6,03	0,02	76,93	0,07
B	7,4	0,282	14,3	3,3	19,2	1,1	16,8	0,59	7,17	0,02	73,84	0,10
C	7,7	0,283	15,3	3,3	18,9	1,1	17,1	0,63	5,93	0,02	65,59	0,07
D	7,5	0,336	16,1	3,7	21,6	1,2	17,9	0,65	5,43	0,03	73,05	0,08
E	7,5	0,267	15,7	3,0	17,6	1,0	17,0	0,61	4,90	0,02	94,56	0,07
F	7,7	0,325	16,5	3,6	20,7	1,3	15,5	0,59	5,07	0,00	91,01	0,07
G	7,6	0,218	14,1	2,9	16,9	1,1	15,0	0,68	4,97	0,00	69,96	0,07

Discussione e Conclusioni

I risultati ottenuti in questa sperimentazione dimostrano che tutte le piante, in seguito alla potatura iniziale per eliminare tutte le parti secche e disinfezione delle ferite da taglio con solfato di rame, hanno reagito energicamente attraverso la formazione di numerose gemme. Queste gemme, nei 18 mesi di sperimentazione, hanno iniziato a ricostituire una chioma che nel trattamento E (terreno arato e sovesciato con mugnuli, piante trattate con biofertilizzante, solfato di rame e solfato di ferro) mostrava una riduzione significativa del disseccamento rispetto alle piante non potate non trattate. Le stesse piante presenti nella tesi E mostravano una minore gravità della malattia seppur non statisticamente significativa, rispetto alle piante potate e non trattate (tesi A).

Dall'analisi genetica per l'identificazione varietale è emerso che il 71% delle piante appartengono alla cv. Cellina di Nardò e il 29% alla cv. Ogliarola Salentina. Dall'esame visivo degli alberi è emerso che la stessa percentuale è mantenuta in tutto il resto della prova sperimentale e non sono state rilevate differenze di risposta sulla base della varietà. Solo il 29% delle piante sono risultate innestate su semenzale o selvatico, mentre le altre piante risultano autoradicate o affrancate.

Tutti i campioni di piante sottoposte ai diversi trattamenti realizzati nel progetto sono risultati positivi al batterio *Xylella fastidiosa*.

Sono stati effettuati rilievi sullo stato vegetativo dell'albero per tutte le piante sottoposte ai diversi trattamenti. I risultati di queste osservazioni mostrano una miglior risposta per il trattamento E, che ha anche mostrato la più bassa percentuale di RWC e il maggior contenuto in *Bacillus* spp. nel suolo (differenze non significative).

L'assenza di *Pseudomonas fluorescens*, la bassissima quantità di *Bacillus* sp., di *Streptomyces* spp. e il rapporto carbonio/azoto medio-alto rilevato in tutti i terreni analizzati nel campo sperimentale, indicano che potrebbero esserci problemi nella decomposizione della sostanza organica e nel ciclo del carbonio all'interno dei terreni. Questo si traduce in una minore disponibilità di nutrienti, come ioni ammonio e nitrati, per la pianta. Questi problemi, come indicato da diversi studi (Zaitlin et al.

2004, Ding et al. 2013, Sofo et al. 2014, Xiloyannis et al. 2015), potrebbero derivare dalle frequenti lavorazioni del terreno per effettuare il diserbo meccanico, che l'azienda Lo Prieno effettua da almeno 20 anni e che vanno da due a tre arature all'anno. Altro importante problema derivante dall'aratura è il rischio concreto di danneggiare le radici principali delle piante di olivo che, nell'azienda ospitante il campo sperimentale, si presentavano affioranti e in qualche caso già gravemente compromesse.

Riferimenti bibliografici

Argentieri M.P., Accogli R., Fanizzi F.P. e Avato P., 2011. Glucosinolates profile of "Mugnolo", a variety of *Brassica oleracea* L. native to southern Italy (Salento). *Planta Medica*, vol. 77 (3), pp. 287-292.

Baldoni, L., Cultrera, N. G., Mariotti, R., Ricciolini, C., Arcioni, S., Vendramin, G. G., et al. (2009). A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Molecular Breeding*, 24(3), 213-231.

Bianco, R.L., Scalisi, A. (2017). Water relations and carbohydrate partitioning of four greenhouse-grown olive genotypes under long-term drought. *Trees*, 31(2), 717-727.

D'Amico M., 2001. Sistemi di lotta integrata contro la "suberosi radicale" del pomodoro e la "verticilliosi" della melanzana. Ph. D. thesis. Bari, Italy.

Dickson, R.P., Huffnagle, G.B. (2015). The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathogens*, 11(7), e1004923.

Ding, G.C., Piceno, Y.M., Heuer, H., Weinert, N., Dohrmann, A.B., Carrillo, A., et al., 2013. Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semi-arid ecosystem. *PLoS One* 8, e59497.

Elmholt S., 1996. Microbial activity, fungal abundance, and distribution of *penicillium* and *fusarium* as bioindicators of a temporal development of organically cultivated soils. *Biological Agriculture and Horticulture*, vol. 13 (2), p. 123.

Garbeva P., van Veen J.A. e van Elsas J.D., 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42 pp. 243-270.

Hofstadler, S.A., Sampath, R., Blyn, L.B., Eshoo, M.W., Hall, T.A., Jiang, Y., et al. (2005). TIGER: the universal biosensor. *International Journal of Mass Spectrometry*, 242(1), 23-41.

Hosseini-Mazinani, M., Mariotti, R., Torkzaban, B., Sheikh-Hassani, M., Ataei, S., Cultrera, N.G., et al. (2014). High genetic diversity detected in olives beyond the boundaries of the Mediterranean Sea. *PloS one*, 9(4), e93146.

Meincke, R., Weinert, N., Radl, V., Schloter, M., Smalla, K., Berg, G. (2010). Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. *Journal of Microbiological Methods*, 80(1), 63-69.

Mousavi, S., Mariotti, R., Bagnoli, F., Costantini, L., Cultrera, N. G., Arzani, K., & Baldoni, L. (2017). The eastern part of the Fertile Crescent concealed an unexpected route of olive (*Olea europaea* L.) differentiation. *Annals of Botany*, 119(8), 1305-1318.

- Nigro F., Boscia D., Antelmi I e Ippolito A., 2013. Fungal species associated with a severe decline of olive in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 95 (3), pag. 668.
- Restrepo Rivera J., 2007. ABC de la Agricultura Organica y Panes de Piedra. Ed. Feriva, Colombia; pp. 106, ISBN 978-958-44-1261-4.
- Saponari M., Boscia D., Nigro F. e Martelli G., 2013. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). *Journal of Plant Pathology*, 95 (3) pag. 668.
- Skrodzka V., 2017. Organic agricultural products in Europe and USA. *Management*, vol. 21 (2), pp. 151-164.
- Sofo A, Palese AM, Casacchia T, Xiloyannis C (2014) Sustainable soil management in olive orchards: effects on telluric microorganisms. In: Parvaiz A, Rasool S, "Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Volume 2 - A Sustainable Approach". ISBN: 978-0-12-800875-1. Academic Press, San Diego, CA, USA. Pp. 471-484.
- Tookey H.L., Vanetten C.H. e Daxenbichler M.E., 1980. Glucosinolates. In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press (London), pp. 103-142.
- Watkins, A. L., Ray, A., Roberts, L. R., Caldwell, K. A., & Olson, J. B. (2016). The prevalence and distribution of neurodegenerative compound-producing soil *Streptomyces* spp. *Scientific Reports*, 6, 22566.
- Xiloyannis C, Lardo E, Sofo A, Palese AM (2015) Contro *Xylella* su olivo le buone pratiche agronomiche. *L'Informatore Agrario* 19: 49-53
- Zaitlin, B., Turkington, K., Parkinson, D., Clayton, G., 2004. Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycete communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes. *Appl. Soil Ecol.* 26, 53-62.