

RELAZIONE FINALE PROGETTO ARMISTOP

Misura 16: Intervento 16.02.01

Beneficiario Capofila: FAZARI DOMENICO, Codice ATECO: 01.26, CUUA: FZRDNC65M01H8891

Titolo del progetto: *Prevenzione e contrasto alla diffusione del marciume radicale fibroso da Armillaria in olivicoltura (ARMISTOP) - CUP: J26G20000330005*

PREMESSA

L'idea progettuale nasce dall'esigenza di contrastare la diffusione ed i danni causati dai marciumi radicali di *Armillaria mellea* (marciume radicale fibroso) all'olivicoltura calabrese. Per la sua ampia diffusione la Calabria è la regione italiana con il maggior grado di contaminazione da *A. mellea* dei terreni olivicoli, e frutticoli più in generale, di cui rappresenta da sempre la più seria minaccia a causa della sua presenza ubiquitaria, dell'elevata polifagia ed attitudine saprofitaria, della facilità di diffusione a mezzo delle rizomorfe e per la difficoltà di risanamento dei terreni contaminati, anche con lunghi turni di riposo dopo l'estirpazione delle piante infette e coltivazione di piante erbacee non suscettibili. Negli ultimi dieci anni il cambiamento climatico e l'aumento delle temperature invernali hanno causato un incremento della sua attività annuale con più intensa manifestazione di fenomeni apoplettici a carico di piante adulte.

Stante l'assenza di efficaci mezzi di contenimento chimici (fungicidi), è indispensabile definire alcuni protocolli di intervento. Il primo finalizzato a contrastare la diffusione del patogeno in campo, da pianta infetta a pianta sana, e sulla stessa pianta infetta ostacolandone la progressione sugli apparati radicali, dalle branche verso il colletto, al fine di prevenire o ritardare il collasso delle piante. Un altro finalizzato a definire metodi e applicazioni per il reimpianto su terreni contaminati di vecchia olivicoltura, condizione tipica della Piana di Gioia Tauro.

ATTIVITÀ SVOLTE

In linea con quanto previsto dal formulario di progetto e come evidenziato in premessa gli interventi realizzati hanno riguardato in particolare due aspetti chiave della tecnica colturale:

- la gestione delle piante infette;
- le modalità di reimpianto su terreni contaminati.

Il progetto è stato articolato in attività sperimentali di campo e di laboratorio. Le attività di campo, presso le aziende partner, hanno avuto riguardo delle seguenti 3 Attività :

Attività 1.1: Monitoraggio delle aree infette in campo e mappatura delle piante da sottoporre ad Intervento.

Attività 1.2: Contenimento integrato delle infezioni di *Armillaria* con metodi agronomici, biologici e chimici

Attività 1.3 Valutazione degli interventi da mettere in atto per il reimpianto di oliveti o altre colture frutticole su terreni infetti.

Le attività 1.1 e 1.2 sono state realizzate presso la Capofila, Azienda Fazari, e l'Attività 1.3 presso l'Azienda Taccone.

Le attività di laboratorio ed in serra, presso il Dipartimento di Agraria, sono state indirizzate alla selezione e valutazione *in vitro* ed *in vivo* degli agenti microbici di biocontrollo di *A. mellea*.

Un'ulteriore attività ha riguardato la divulgazione dei risultati, con attivazione di un apposito sito web curato dall'azienda capofila (<https://www.armistop.it/armistop/>).

Tutte le attività di ricerca e sperimentazione sono state svolte in stretta collaborazione tra i partner dipartimento di Agraria e aziende Fazari e Taccone. Le Aziende sono entrambe leader del settore olivicolo nella Piana di Gioia Tauro, area ove il patogeno è endemico ed ha nel tempo interessato le altre colture arboree ivi diffuse (Agrumi, Actinidia).

Per semplicità espositiva, vengono riportate di seguito le attività svolte distinte per partner.

PARTNER CAPOFILA: AZIENDA FAZARI DOMENICO

L'Azienda Fazari è stata fortemente interessata negli anni dal problema della diffusione di *A. mellea* negli impianti olivicoli e ha da tempo segnalato l'esigenza di intervenire per contrastarne la diffusione. L'indagine è stata indirizzata preliminarmente al monitoraggio della diffusione in campo del patogeno, in un oliveto adulto sito in contrada Fiolli di Cittanova. Il monitoraggio è stato realizzato mediante diagnosi sintomatologica (rilevamento dei sintomi della malattia su chioma e radici) e con la valutazione della presenza del patogeno nel terreno, nell'area della corona radicale e fra le piante, ove il patogeno si muove a mezzo delle rizomorfe. Sono state quindi applicate e messe a confronto alcune strategie di lotta su piante adulte infette, con l'intento di bloccare o ritardare la diffusione del patogeno verso il colletto, in modo da prolungare la vitalità e l'efficienza produttiva delle piante infette, prevenendo i frequenti fenomeni di morte apoplettica.

1. Monitoraggio del patogeno in campo e trattamenti al piede di piante infette

Il monitoraggio della presenza del patogeno in campo, su piante infette, è stata realizzata dal personale del dipartimento di Agraria e dell'azienda Fazari in un oliveto con giacitura inclinata e piante adulte di circa 50 anni della cv ottobratica, sito in contrada Fiolli di Cittanova (<https://www.google.com/maps/dir/?api=1&destination=38.38765635537818,16.069073975086216>). La diagnosi è stata realizzata mediante valutazione dei sintomi sulla chioma (vigoria, clorosi, filloptosi, seccumi, ecc.) e riscontri diretti della presenza del patogeno sulle branche radicali, previa sconcatura delle piante, ove i sintomi sono rilevabili sotto forma di cancretti corticali, sollevamento e necrosi della corteccia, sviluppo sottocorticale di placche miceliari e rizomorfe. La diffusione del patogeno sull'apparato radicale ha consentito inoltre una valutazione dello stato di gravità della malattia. L'osservazione diretta dei carpofori del fungo alla base delle piante è stata realizzata nel mese di novembre (Fig. 1).



Fig. 1 - Carpofori di *Armillaria mellea* alla base di piante di olivo

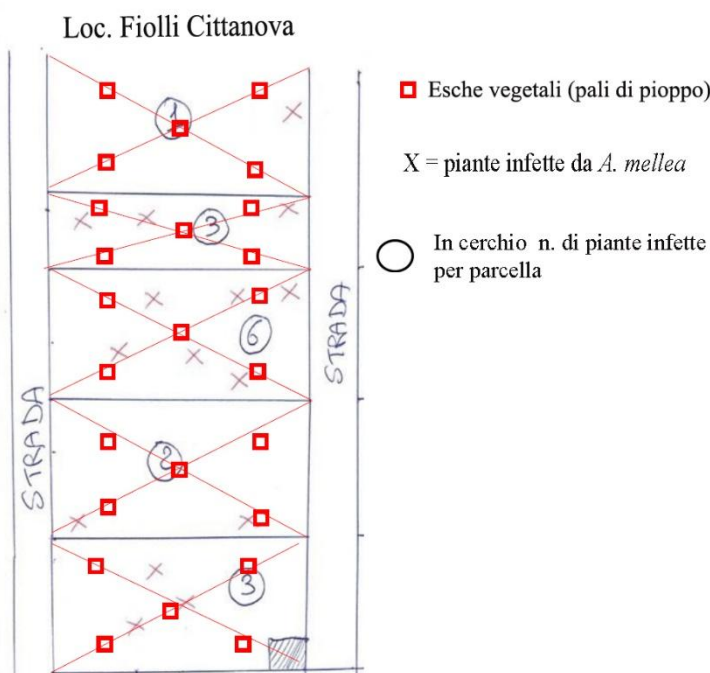


Fig. 2 - Schema di impianto dei pali di pioppo

I campioni, così come i carpofori, raccolti dal personale dell'azienda Fazari, venivano trasferiti al Dipartimento di Agraria per essere analizzati al fine di confermare l'identità del patogeno e permettere l'ottenimento di isolati in purezza del fungo su substrato culturale.

La presenza e diffusione del patogeno nel terreno è stata valutata mediante monitoraggio con la tecnica delle esche vegetali. A tal fine, il personale dell'azienda Fazari ha realizzato la messa a dimora di 25 pali di pioppo secondo uno schema a quinconce per ciascuno dei 5

settori presenti, definiti dalla presenza di dossi di terreno finalizzati a ridurre la velocità di scorrimento delle acque piovane (Fig. 2). Tale tipo di distribuzione ha portato i pali a distanze variabili dalle piante infette, alcuni direttamente sotto la proiezione della chioma nell'area delle branche radicali di ordine superiore (Fig. 3) altri a distanza maggiori.

Il pioppo è fra le essenze arboree più suscettibili agli attacchi di *A. mellea* e la parte interrata dei pali viene facilmente colonizzata da *A. mellea* con abbondante proliferazione miceliare e di rizomorfe, consentendo, in tempi contenuti, il monitoraggio della sua diffusione in campo e dei movimenti, mediante rizomorfe, da piante malate a piante sane. A partire da 2 mesi dopo il loro impianto i pali messi a dimora sono stati periodicamente estratti dal terreno e sottoposti ad osservazione per il rilevamento, sulle parti interrate, della presenza del fungo, sotto forma di micelio e/o rizomorfe (Fig. 4). I pali privi di contaminazione fungina venivano ricollocati in sede. Campioni di legno dei pali infetti venivano trasferiti in laboratorio per la confermata della contaminazione e l'ottenimento di isolati in purezza di *A. mellea* su substrato artificiale.



Fig. 3 – Pali di pioppo sotto la proiezione della chioma



Fig. 4 – Palo di pioppo con sviluppo di rizomorfe di *Armillaria mellea*

Sconcatura

La sconcatura del piede delle piante, con messa a nudo dei primi palchi radicali per un raggio di almeno 1,50 attorno al pedale e con una profondità di circa 15-25 cm, consente di individuare la presenza del fungo sugli apparati radicali e di esprimere una valutazione sulla gravità delle infezioni e sugli esiti della malattia. La sconcatura primaverile, oltre al valore diagnostico, è un classico intervento fitoiatrico da mettere in atto sulle piante infette. Operazione importante da realizzare anche sulle piante immediatamente vicine, apparentemente sane ma nel raggio di diffusione della malattia, probabilmente già interessate dalle infezioni. La sconcatura consente di creare discontinuità fra terreno e radici, che vengono esposte ad aria e sole, contrastando l'avanzamento del fungo verso la base delle branche radicali ed il colletto ed è propedeutica a tutta una serie di ulteriori interventi. Dovendosi provvedere al riempimento delle buche prima dell'inverno, al fine di perseguire benefici duraturi è necessario prima provvedere all'applicazione di specifici trattamenti, tesi a contrastare la diffusione del fungo.

La sconcatura delle piante di olivo adulte site nell'appezzamento di contrada Fiolli, è stata realizzata ad opera dei dipendenti dell'azienda nei mesi di gennaio-marzo 2022, inizialmente con l'ausilio di mezzi meccanici e quindi manualmente (Fig. 5), prestando la massima attenzione nel rimuovere il terreno senza danneggiare le radici. In tal modo si è giunti a selezionare n. 100 piante infette, coetanee, in condizioni analoghe di vigoria (dimensione e vitalità della chioma) e fitosanitarie, in termini di diffusione del patogeno sull'apparato radicale e gravità del sintomo di marciume. Le piante sono state quindi sottoposte a prova di valutazione comparativa dell'efficacia di alcuni trattamenti al piede. Sono state scartate le piante per le quali è stato valutato un eccessivo stato di avanzamento della malattia, per numero di branche radicali infette e vicinanza al colletto dei tessuti sottocorticali sintomatici (marciumi con placche miceliari e rizomorfe), per le quali si poteva prevedere una prognosi infausta, con suggerimento di estirpazione, al pari delle piante morte. Per lo stesso motivo sono state in ogni caso scartate le piante che mostravano sintomi della malattia al colletto.

Prova sperimentale

Ogni trattamento è stato ripetuto su 20 piante secondo uno schema sperimentale a randomizzazione completa. La fig. 6 rappresenta la planimetria del campo con localizzazione delle piante infette sottoposte ai diversi trattamenti. Il campo appare diviso in settori che non individuano parcelle sperimentali bensì le aree in cui il campo è suddiviso dal tracciato di dossi di terreno atti a ridurre la velocità di scorrimento delle acque superficiali, stante la giacitura in pendenza. L'Ottobratica è la cultivar tipica dell'olivicoltura della Piana di Gioia Tauro. La sua resistenza all'occhio di pavone la rende particolarmente idonea all'ambiente molto umido e facilita la valutazione della vigoria della piante in relazione allo stato sanitario delle radici, permettendo di escludere l'attività del più importante agente di defogliazione dell'olivo.



Fig. 5 - Scalzatura della base di piante di olivo affette da marciume radicale fibroso

Nel mese di marzo 2022 le piante scalzate sono state sottoposte ai seguenti trattamenti, con 5 tesi a confronto:

TESI 1: Piante non sottoposte ad alcun trattamento (controllo)

TESI 2: Piante trattate con calce viva. Dopo il trattamento con calce la base delle piante è stata ricoperta con foglie di felce.

TESI 3: Digestato, fornito dall'azienda Fattoria della Piana di Gioia Tauro, ottenuto dalla digestione anaerobica di prodotti secondari del settore agroalimentare, quali: letame, sansa di olive, pastazzo di agrumi, scarti della produzione ortofrutticola. La sua somministrazione al terreno determina l'apporto di sostanza organica, micro e macroelementi (in Allegato 1 la scheda analitica).

TESI 4: Fungicida Tellus WP - Syngenta

TESI 5: *Trichoderma* spp., isolato nativo rinvenuto associato a tessuti infetti e a rizomorfe di *A. mellea* ottenuto nelle aziende partner. La stretta associazione con il patogeno ha suggerito un potenziale ruolo come agente naturale di biocontrollo caratterizzato da elevata adattabilità all'ambiente. Preliminarmente è stata verificata l'attività antagonistica in prove duali in piastra.

I trattamenti sono stati realizzati irrorando i palchi radicali di ciascuna pianta con un volume di 5 litri di digestato e di sospensione di biofungicidi.

Tesi a confronto

Tesi 2 - L'applicazione di calce viva alle radici sconcate è la prescrizione fitoiatrica più nota e di antica applicazione per piante infette. Oltre a svolgere un'azione disinfettante sui tessuti, rende la reazione del terreno inadatta all'avanzamento del fungo. A tal fine viene consigliata anche in applicazione nelle buche vuote dopo l'estirpazione delle piante morte. Applicata sulle branche radicali sconcate previene inoltre possibili scottature dovute all'improvvisa esposizione al sole. L'olivo è inoltre una pianta calciofila per la quale la disponibilità dell'elemento migliora la risposta agli stress sia di tipo biotico che abiotico, oltre a migliorare, almeno inizialmente, la risposta produttiva per la liberazione di micro e macroelementi.

Tesi 3 - Il digestato è il residuo del processo di digestione anaerobica di effluenti zootecnici, biomasse vegetali e sottoprodotti di origine animale e vegetale. Il suo impiego in agricoltura è consolidato. Oltre a migliorare lo stato nutritivo delle piante, per l'apporto di micro e macroelementi, grazie alla sostanza organica migliora le caratteristiche fisiche del suolo: struttura, porosità, capacità drenante e di ritenzione idrica; stimola l'attività biologica della rizosfera e i consorzi microbici che, tra gli altri effetti, conferiscono maggiore tolleranza ai patogeni terricoli e agli stress ambientali; svolge un'azione corroborante sulla vegetazione inducendo, anche per il contenuto in elementi nutritivi, una maggiore capacità di rizogenesi che è una delle risposte più efficaci che la pianta possa mettere in atto contro i patogeni radicali come *A. mellea*. Inoltre, il pH del digestato utilizzato è lievemente basico, quindi non favorevole allo sviluppo del patogeno.

Tesi 4 e 5 – In entrambi casi si è fatto ricorso all'applicazione di biofungicidi. Il più recente e studiato approccio alla difesa contro *A. mellea* è rappresentato dal controllo biologico mediante impiego di microrganismi antagonisti, fra i quali, prevalentemente, i funghi del genere *Trichoderma*, specie fra le più diffuse colonizzatrici dei suoli. I meccanismi d'azione messi in atto nei confronti dei patogeni fanno riferimento a tre componenti: l'antibiosi e lisi, la competizione per lo spazio ed il nutrimento, l'iperparassitismo. Negli ultimi anni sono state inoltre messe in evidenza una serie di attività di *Trichoderma* spp. direttamente sulle piante, con promozione dello sviluppo radicale e della capacità di assimilazione dei nutrienti, con incremento della fotosintesi e dell'efficienza fotosintetica. Inoltre è stata evidenziata la capacità di alcuni ceppi di colonizzare simbioticamente, come endofiti, lo strato corticale più esterno delle radici, con un comportamento assimilabile a quello delle micorrize e benefici per le piante riferibili fra gli altri a fenomeni di induzione di resistenza nei confronti di stress biotici ed abiotici, una maggiore capacità di assimilazione dell'azoto e altri nutrienti ed un'azione di contrasto all'invasione del patogeno.

Tesi 4, TELLUS WP è un preparato biologico commerciale a base di due ceppi di *Trichoderma* (*T. asperellum* e *T. gamsii*) in formulazione polvere bagnabile (WP), con specifica indicazione d'etichetta contro *Armillaria*. La selezione dei due ceppi di *Trichoderma* assicura una rapida colonizzazione delle radici e del terreno sottraendo spazio e nutrimento ai funghi patogeni e attaccandone per via enzimatica le loro pareti cellulari. La sospensione di TELLUS WP è stata

preparata 24-36 ore prima del trattamento miscelando 500 g di prodotto con 5 litri di acqua al fine di favorire la germinazione delle spore.

Tesi 5 è stato utilizzato un isolato nativo di *Trichoderma* spp. ottenuto in coltura pura nel laboratorio del Dipartimento di Agraria a partire da campioni radicali di piante di olivo infette delle aziende partner. Preliminarmente l'isolato è stato valutato positivamente in prove duali in piastra per l'attività antagonistica nei confronti di *A. mellea*. La disponibilità di un isolato nativo con capacità antagonistiche su radici colonizzate dal patogeno garantisce una maggiore facilità di adattamento e diffusione in loco. Le sospensioni conidiche sono state preparate 18 ore prima dell'applicazione con una concentrazione di 5×10^7 CFU/ml. 500 ml di sospensione venivano diluiti in 5 litri d'acqua.

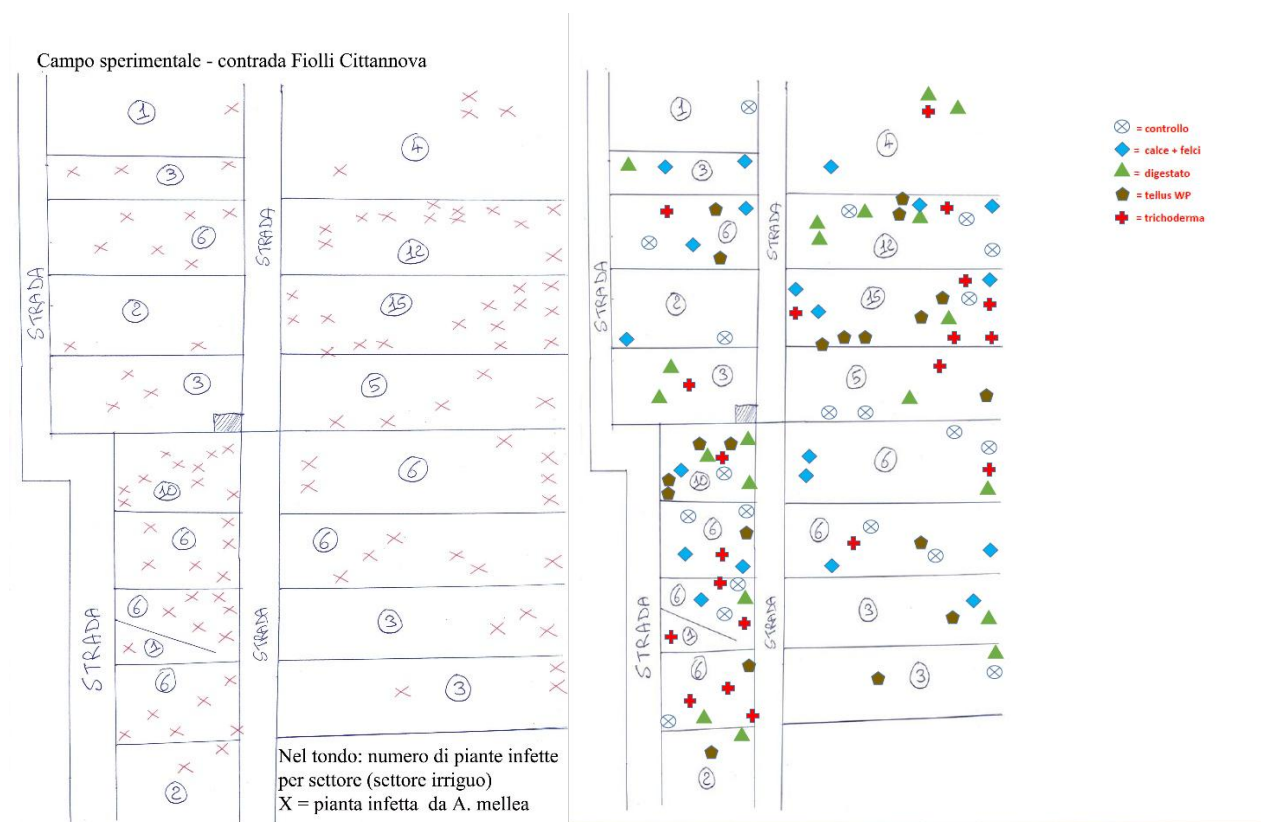


Fig. 6 - A sinistra campo sperimentale con piante infette. A destra il medesimo campo con indicazione dei trattamenti al piede delle piante (5 tesi). Le linee individuano aree del terreno, delimitate da dossi per la riduzione della velocità di scorrimento delle acque.

Risultati Azienda Fazari

Monitoraggio

Nel complesso i dati raccolti confermano l'ampia diffusione del patogeno nei terreni oggetto di indagine. La sua diffusione si può definire ubiquitaria sulle piante adulte ed è nota nella Piana di Gioia Tauro la sua coesistenza sulle piante secolari. Diverso il caso delle piante giovani, portate rapidamente a morte, e delle piante adulte (40-50 anni) dove la malattia può dare corso a morte improvvisa (apoplessia), fenomeno particolarmente aumentato nell'ultimo decennio. L'utilizzo delle esche (pali di pioppo) poste nell'oliveto secondo lo schema di Fig. 2 ha evidenziato la colonizzazione da parte del patogeno delle porzioni interrate, a partire da 4-6 mesi dopo il loro collocamento a dimora, con tempi minori per i pali più vicini al piede delle piante. A circa un anno e mezzo di distanza dalla loro collocazione si è registrato una percentuale di infezione pari al 72%. Ciò evidenzia la capacità di movimento del patogeno da pianta a pianta tramite le rizomorfe e la tipica colonizzazione a macchia d'olio negli impianti arborei. Tale indicazione evidenzia come a livello profilattico non sia indicato il tradizionale uso dei pali di castagno (anche essa un'essenza suscettibile) come tutori delle piante all'impianto, potendo agire, in terreni infetti, da esca per una prima colonizzazione di tipo saprofitario, aumentando la carica di inoculo per gli attacchi parassitari alle radici.

Valutazione della malattia in campo e della gravità dei sintomi

La gravità dei sintomi osservati sulla chioma in termini di vitalità, non sembra, entro certi limiti, essere associata alla presenza del patogeno sugli apparati radicali ed alla gravità stimata in relazione al numero e quantità di tessuti infetti delle branche radicali. Piuttosto sembra essere importante la capacità di reazione delle singole piante infette in termini di emissione di nuove radici, mettendo in atto un processo di sostituzione di quelle attaccate da *A. mellea*, condizione che rende possibile entro certi limiti convivere con la presenza del patogeno, contenendo gli effetti dannosi quanto meno fino a quando l'infezione non arrivi ad interessare il colletto. Tale risposta, oltre che alla cultivar, è da mettere in relazione alla vigoria delle piante, carattere a sua volta dipendente dalle caratteristiche del terreno, in termini di costituzione e struttura, quindi della sua permeabilità ed assenza di ristagni di acqua (la capacità di rigenerare radici si riduce notevolmente se il terreno è saturo d'acqua), nonché dalla disponibilità di elementi nutritivi e stato nutrizionale e, più in generale, da adeguate pratiche agronomiche (potatura, concimazioni, lavorazioni del terreno, ecc.) oltre che da eventuali specifici trattamenti. In linea con quanto appena detto è stata osservata una generale maggiore gravità dei sintomi nelle aree dove si registravano ristagni d'acqua e sulle piante che all'atto della sconcatura mostravano una maggiore profondità del colletto rispetto al piano di campagna. Condizione che pone le radici in condizioni asfittiche e quindi di maggiore suscettibilità ad *A. mellea* e le piante in condizioni di sofferenza e minore capacità di emettere nuove radici. Errori nella fase di impianto della coltura, quali il posizionamento delle piante troppo in profondità nella buca o l'innalzamento di cumuli di terreno al piede delle piante, al fine di dare maggiore stabilità, rendono tale condizione assai frequente.

Prova sperimentale

I risultati conseguiti dai rilievi realizzati a circa un anno e mezzo di distanza dall'applicazione dei trattamenti devono essere considerati parziali. Notoriamente, i preparati biologici (tesi 4 e 5) hanno necessità di tempi più lunghi, rispetto ai trattamenti di tipo chimico, per poter svolgere la

loro attività antagonista strettamente legata ad un'adeguata colonizzazione del substrato. A tal fine le aziende ed il dipartimento proseguiranno ad effettuare le osservazioni ben oltre la fine del programma di ricerca. È stato però già possibile trarre delle indicazioni importanti sia di carattere generale sia, più specificamente, con riferimento agli interventi realizzati al piede delle piante. Più in generale le piante sconcate, comprese quelle testimoni della Tesi n.1, hanno mostrato, rispetto alle piante non sconcate, un miglior vigore vegetativo in termini di nuovi germogli emessi durante la ripresa vegetativa del 2023 e del 2024.

Ai fini della valutazione dell'efficacia dei trattamenti è stata considerato come parametro di riferimento l'espressione vegetativa, in termini di numero di foglie nuove formate in primavera, che per facilità di rilievo è stata valutata in termini di numero di nuovi germogli formati e loro espansione vegetativa. A tal fine è stata adottata una scala empirica visiva, con attribuzione delle piante a 4 classi di valore crescente. Ai fini della comparazione i rilievi sono stati realizzati sempre dallo stesso personale.

In merito ai trattamenti realizzati è stato possibile registrare indicazioni positive sulle piante di olivo trattate con digestato poiché hanno mostrato un più elevato livello di vegetazione rispetto alle altre tesi ed in particolare al testimone. Il meccanismo di azione dei digestati non è definito con chiarezza, anche in relazione alla variabilità nella loro composizione, ma in generale sembra potersi riferire al miglioramento delle condizioni nutritive e strutturali del terreno che favoriscono l'emissione di nuove radichette e la resistenza delle piante alle infezioni radicali. Inoltre, il digestato può favorire l'arricchimento del microbioma della rizosfera con attività antagonista nei confronti di *A. mellea*, oltre ad una possibile attività sulla pianta come induttore di resistenza. Come evidenziato in precedenza sarà fondamentale proseguire le osservazioni e le analisi per confermare queste ipotesi e valutare l'efficacia degli altri trattamenti.

PARTNER: AZIENDA PIERLUIGI TACCONE

L'obiettivo principale delle attività svolte presso l'azienda Pierluigi Taccone è stata la valutazione degli interventi da mettere in atto per il reimpianto di oliveti (indicazioni valide anche per altre colture frutticole) su terreni infetti. Il tema del reimpianto/sostituzione dei vecchi oliveti nella Piana di Gioia Tauro, per la riconversione varietale anche con modelli innovativi (impianti superintensivi), oppure per la sostituzione e modifica degli ordinamenti colturali con impianto di altre colture arboree, è centrale per lo sviluppo agricolo ed economico dell'intera area. La diffusione ubiquitaria di *A. mellea* si pone come uno dei principali nodi tecnici da risolvere, con la messa a punto di protocolli di profilassi a salvaguardia dei nuovi impianti.

Nell'azienda Taccone è stata selezionata un'area di circa 1 ettaro, nel comune di Rizziconi (Foglio 42 part. 68), all'interno di un oliveto tradizionale, con piante vetuste e modello d'impianto con sesto 20x20. Area particolarmente soggetta a morie e schianti, con piante in parte abbattute dai forti venti del 2022, a causa dell'elevato livello di infestazione delle radici ad opera di *A. mellea*. In sostituzione si è provveduto a realizzare un nuovo impianto olivicolo secondo il modello superintensivo, con cultivar idonee a tale scopo, verificando nel tempo la risposta alle infezioni radicali.

Il primo intervento è consistito nell'asportazione delle piante malate con l'ausilio di un estirpatore coadiuvato da operazioni manuali finalizzate all'eliminazione quanto più accurata possibile degli apparati radicali (Fig. 7). Questa operazione, fondamentale per ridurre il livello di inoculo nel terreno prima del nuovo impianto, è stata realizzata nella primavera del 2022. Successivamente il terreno è stato lasciato libero fino alle operazioni di preparazione del terreno per l'impianto. Le operazioni di

impianto hanno tenuto conto della necessità di evitare il compattamento del terreno e prevenire i ristagni d'acqua, favorendo condizioni strutturali inidonee allo sviluppo del patogeno. Il terreno è stato dissodato ad una profondità di 90 cm per una fascia corrispondente al filare d'impianto e successivamente livellato mediante fresatura e ripassato con il ripper. Si è adottato un modello di coltivazione ad inerbimento parziale, lasciando tra le file un corridoio di circa 2 m totalmente inerbito, in modo da preservare la porosità del terreno e ridurre il compattamento a seguito del passaggio dei mezzi meccanici e consentire, in età adulta, uno sviluppo superficiale delle radici, più rispondente a sostenere la pianta in presenza di infezioni radicali. L'impianto è stato realizzato nell'aprile 2023, con un certo ritardo rispetto a quanto preventivato a causa inizialmente delle difficoltà di approvvigionamento delle varietà di olivo con le specifiche caratteristiche vegeto-produttive adatte agli impianti superintensivi e successivamente per le avverse condizioni meteorologiche. Durante tale prolungato periodo di riposo il terreno è stato esposto agli agenti atmosferici, con azione positiva per l'abbattimento della carica di inoculo, soprattutto negli strati più superficiali.

Si è quindi proceduto alla messa in opera della palificazione con pali zincati di mt 2 ad intervalli di mt 31.25, con ancoraggi all'estremità delle file e si sono passati tra i pali due serie di fili di ferro a cui legare le piante con bobine di filo biodegradabile. Sul primo filo in basso si è posizionato un tubo da 20 in PE con gocciolatoi distanziati di 50 cm. Tubi collegati con un preesistente impianto irriguo. Sono state impiantate n. 1458 piantine autoradicate, fornite dalla soc. Agromillora di Barcellona, delle varietà Lecciana (n. 486), Oliana (n. 486), Arbosana (n.486), fra le più adatte al sistema di produzione superintensivo (Fig. 9). Le piante per questo tipo di impianto sono molto piccole, quasi filiformi, vengono fornite in vassoi da 54 piantine, con un'altezza di cm 25 e messe a dimora con un sesto di m. 1,33 x 5.

All'atto dell'impianto sono state poste nella buca 3 g di un formulato biologico in polvere bagnabile ad azione antagonista a base di *Trichoderma asperellum* e *Trichoderma gamsii* (Remedier della Gowan). Dopo l'impianto sono state distribuite per due volte in fertirrigazione 5 l/ha di una miscela di micorrize (*Glomus* spp.), batteri della rizosfera (*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*), funghi antagonisti (*Trichoderma harzianum*), enzimi e sali minerali (VHERA® Biochim).

Esiti dell'impianto: valutazione delle fallanze

Sono stati rilevati i seguenti dati in termini di piante attecchite e fallanze:

Arbosana: totale piante n. 486, piante morte n. 65 di cui 35 con presenza di marciumi delle radici.
Mortalità totale del 13,4%

Oliana: totale piante n.486, piante morte n. 88 di cui 60 con presenza di marciumi delle radici
Mortalità totale del 18,1%

Lecciana: totale piante n 486, piante morte n. 103 di cui 69 con presenza di marciumi delle radici
Mortalità totale del 21,2%

Analisi di laboratorio sui campioni di radici marce hanno consentito di individuare la presenza di *A. mellea* e, talora anche in modo concomitante, di *Phytophthora* spp. La percentuale di fallanze è risultata essere consistentemente superiore a quella normalmente attesa che si attesta su valori medi del 5%. Ciò da attribuire in prevalenza, nonostante l'accurata preparazione della sede di impianto, alle infezioni degli agenti di marciumi radicale, in particolare su terreni freschi e ricchi di

sostanza organica come quelli tipici dell'area e in presenza dei ridotti apparati radicali delle piantine. Ad essa si deve aggiungere una significativa mortalità causata dagli insetti (oziorrinco e margaronia) il cui contenimento si è dimostrato particolarmente difficile, nonostante 3 trattamenti fogliari con *Bacillus thuringiensis* e deltametrina, a causa delle ridotte dimensioni delle piante. Per lo stesso motivo è risultata inefficace l'applicazione di fasce trappola al fusto per impedire la risalita dell'oziorrinco.



Fig. 7 - Particolare di ceppaia di olivo secolare estirpato con apparato radicale completamente compromesso da infezioni di *Armillaria mellea*



Fig. 8 - Placche miceliari di *Armillaria mellea* sulla faccia cambiale corticale di branca radicale di olivo

Fig. 9 - Impianto di olivo
superintensivo realizzato presso
l'azienda Pierluigi Taccone



PARTNER: DIPARTIMENTO DI AGRARIA

Le seguenti attività, sono state svolte presso il Dipartimento di Agraria

Isolamento del patogeno

Campioni di radici e corteccia, oltre che carpofori di *A. mellea* prelevati presso le aziende Fazari e Taccone, da piante con differenti livelli di gravità di sintomi, sono stati analizzati presso il dipartimento di Agraria per confermare la presenza e l'identità specifica. A tale scopo è stato effettuato l'isolamento del patogeno sul substrato agar patata destrosio (PDA) addizionato con antibiotici per prevenire la proliferazione di batteri (Fig. 10). Un isolato rappresentativo di *A. mellea* ottenuto da olivo, unitamente ad altri due isolati ottenuti da eucalipto e mandorlo sono stati conservati per le successive prove di inoculazione e sono attualmente mantenuti nella collezione micologica del Dipartimento.

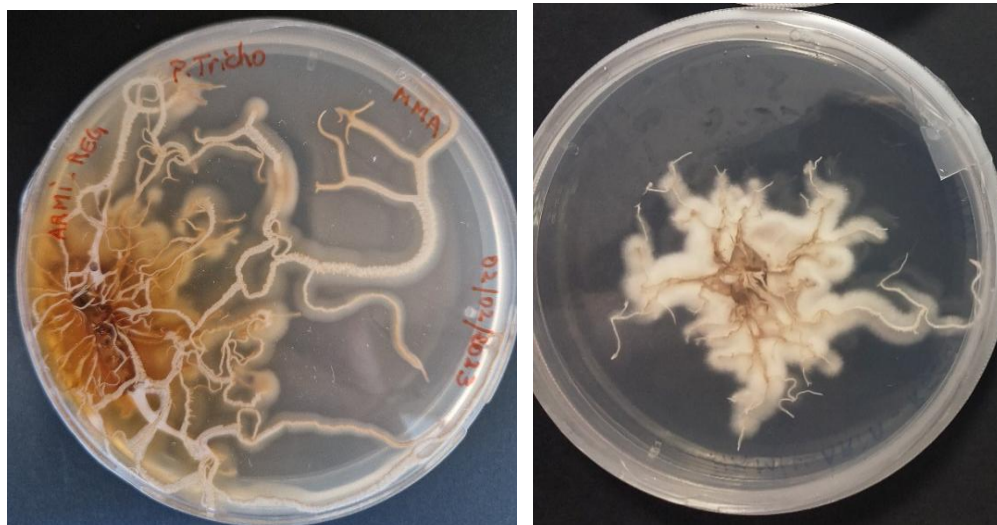


Fig. 10 - Isolati di *Armillaria mellea* allevati su PDA a 25°C al buio

Isolamento e selezione di potenziali agenti di biocontrollo

Isolamento di batteri antagonisti dal terreno

Per l'isolamento di nuovi agenti di lotta biologica da utilizzare contro *A. mellea* sono stati prelevati ed analizzati terreni forestali e agrari caratterizzati da limitata attività antropica, poiché potenzialmente contenenti una più elevata diversità microbica. L'obiettivo delle indagini è stato quello di isolare microrganismi produttori di sostanze antifungine. Tutti i campioni di terreno sono stati prelevati a circa 10 cm di profondità dopo aver allontanato lo strato di lettiera presente. Una volta in laboratorio i campioni sono stati conservati a 10°C ed analizzati entro 24-48 h. I terreni sono stati setacciati, sospesi in acqua sterile e diluiti serialmente con acqua sterile (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000). Dieci µl di ciascuna sospensione sono stati successivamente distribuiti uniformemente su PDA unitamente ad un'elevata concentrazione di frammenti di micelio di *Rosellinia necatrix*, utilizzato come patogeno modello. Le piastre di PDA sono state incubate a 24± 2°C per 7 giorni fino a quando sono apparse ricoperte da uniforme manto di micelio bianco di *R. necatrix*, di tanto in tanto intervallato da aree rotondeggianti prive di micelio con al centro una colonia batterica (aloni di inibizione). È stato, pertanto, possibile selezionare singole colonie di batteri produttori di sostanze antifungine che impedivano la crescita del fungo nelle immediate vicinanze (Fig. 11). La scelta di utilizzare *R. necatrix*, altro importante agente di marciume radicale su olivo, per molti caratteri analogo ad *A. mellea*, come patogeno modello per la selezione dei batteri antagonisti, è stata dettata dall'impossibilità di utilizzare direttamente quest'ultimo in considerazione della sua crescita irregolare in piastra (Fig. 10) che lo rende inadatto per saggi *in vitro* con la tecnica descritta.

Un numero rappresentativo di colonie batteriche (155) mostranti aloni di inibizione particolarmente evidenti è stato trasferito axenicamente su nuove capsule e sottoposto alla tecnica dello striscio in modo di ottenere colonie unicellulari (Figura 11). Le colonie sono state successivamente caratterizzate morfologicamente e conservate in glicerolo a -80°C per la caratterizzazione molecolare e futuri esperimenti.

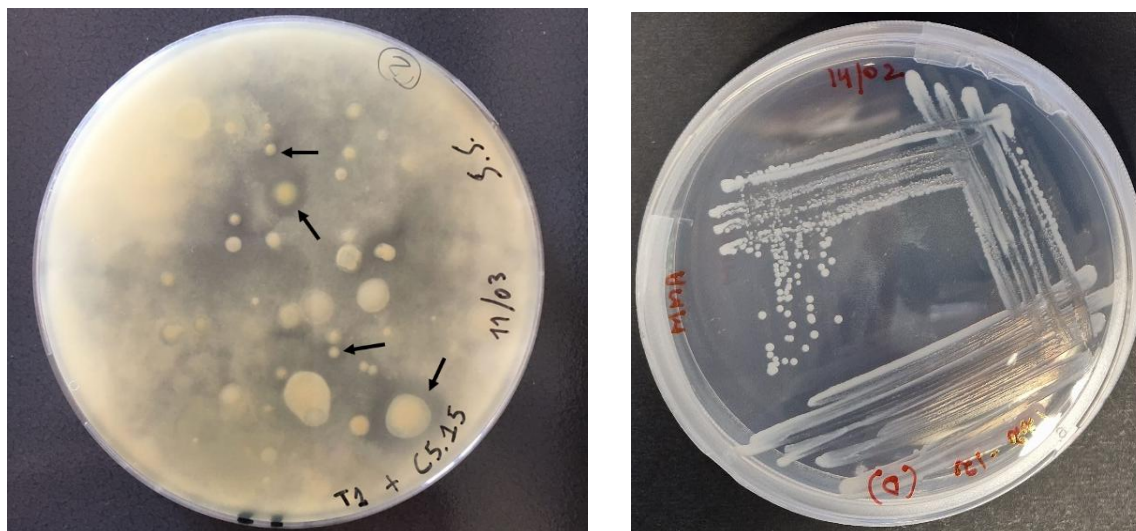


Fig. 11. Esempi di aloni di inibizione intorno a colonie batteriche produttrici di sostanze antifungine che hanno impedito la crescita del micelio di *Rosellinia necatrix* nelle immediate vicinanze (sinistra) e isolato batterico sottoposto alla tecnica dello striscio su terreno R2A per ottenere colonie da singole cellule (destra).

Valutazione *in vitro* dell'attività antagonistica di batteri contro *Armillaria mellea*

L'attività antifungina di 25 isolati selezionati tra quelli che mostravano aloni di inibizione contro *R. necatrix* è stata saggiata in prove di coltura duale contro *A. mellea* seguendo la procedura descritta da Librizzi *et al.*, 2022 (<https://www.mdpi.com/2223-7747/11/3/436>) leggermente modificata. In breve, capsule Petri contenenti PDA sono state inoculate da un lato con un tassello di agar con micelio di *A. mellea* in attiva crescita e, nella parte equatoriale, con singole colonie batteriche distribuite in modo da ottenere una fascia di batteri perpendicolare al punto di inoculazione di *A. mellea* (Fig. 12). Piastre inoculate solo con *A. mellea* sono state utilizzate come controllo. Le piastre sono state randomizzate, incubate a 24 °C al buio e monitorate per 4 settimane. L'inibizione della crescita fungina è stata quindi stimata come riduzione percentuale della crescita del micelio rispetto alle piastre di controllo.



Fig. 12. Esempio di piastre PDA utilizzate in prove di coltura duale per valutare l'attività antifungina di isolati batterici contro *Armillaria mellea*. L'isolato B16 (a sinistra) non ha inibito la crescita del micelio, mentre l'isolato B17 (a destra) ha mostrato una forte attività antifungina.

Nove dei 25 batteri preliminarmente selezionati hanno determinato una significativa riduzione della crescita miceliale di *A. mellea* (Tabella 1). Tra questi, i ceppi B11, B13 e B17 sono stati i più efficaci mentre un livello di inibizione inferiore è stato registrato per gli isolati B7, B8, B20, B12, B21 e B10. Il ceppo B12, pur non essendo tra i più efficaci nel ridurre la crescita miceliare, ha inibito completamente la formazione di rizomorfe (dati non mostrati).

Tabella 1. Efficacia di 25 isolati batterici nella riduzione della superficie del micelio di *Armillaria mellea* (mm²). Le medie sono state calcolate da tre repliche e i valori *p* sono derivati da confronti a coppie tra l'area miceliale (mm²) per ciascun batterio e il controllo (CTRL). In neretto gli isolati selezionati per le sperimentazioni successive.

BCA	mean±sd (mm ²)	p	BCA	mean±sd	p
CTRL	2746.691±238.889	-	B14	1797.432±387.342	0,1324
B1	2719.762±317.647	1	B15	1848.212±268.661	0,2003
B2	2689.527±314.154	1	B16	1766.952±154.792	0,1014
B4	1974.428±424.821	0,4641	B17	65.458±11.509	<.0001
B5	2114.575±313.409	0,8124	B18	2069.404±283.065	0,7096
B6	2419.727±193.975	0,9999	B19	2352.856±330.337	0,999
B7	1447.407±655.333	0,0034	B20	1501.692±96.394	0,0065
B8	1498.163±244.391	0,0062	B21	1549.032±359.277	0,0111
B9	2378.107±624.742	0,9996	B22	1760.762±245.894	0,096
B10	1588.055±35.471	0,017	B23	2111.605±125.365	0,8063
B11	28.860±34.280	<.0001	B24	2416.352±677.730	0,9999
B12	1503.439±38.045	0,0066	B25	2158.471±263.371	0,8911
B13	20.084±5.408	<.0001	B26	1645.077±492.061	0,0312

Una seconda serie di prove per valutare *in vitro* l'attività antimicotica nei confronti di *A. mellea* è stata effettuata con i 4 isolati più promettenti (B11, B12, B13 e B17) modificando leggermente le condizioni sperimentali: ciascuna coltura batterica è stata uniformemente distribuita su piastre contenenti PDA ed un tassello di agar con micelio di *A. mellea* in attiva crescita è stato posto al centro della piastra. Le piastre sono state incubate come descritto in precedenza e l'area di crescita delle colonie di *A. mellea* è stata stimata attraverso immagini ad alta risoluzione e il software ImageJ (Fig. 13).

In questa seconda serie di prove in coltura duale, gli isolati B11, B13 e B17 hanno confermato una forte attività antifungina inibendo quasi completamente la crescita del micelio di *A. mellea* (F4, 10 = 62,48, *p* < 0,001) (Fig. 13A, B). L'isolato B12 ha confermato una scarsa attività nei confronti della crescita miceliare, ma anche in queste prove ha completamente inibito lo sviluppo delle rizomorfe (Fig. 13A).

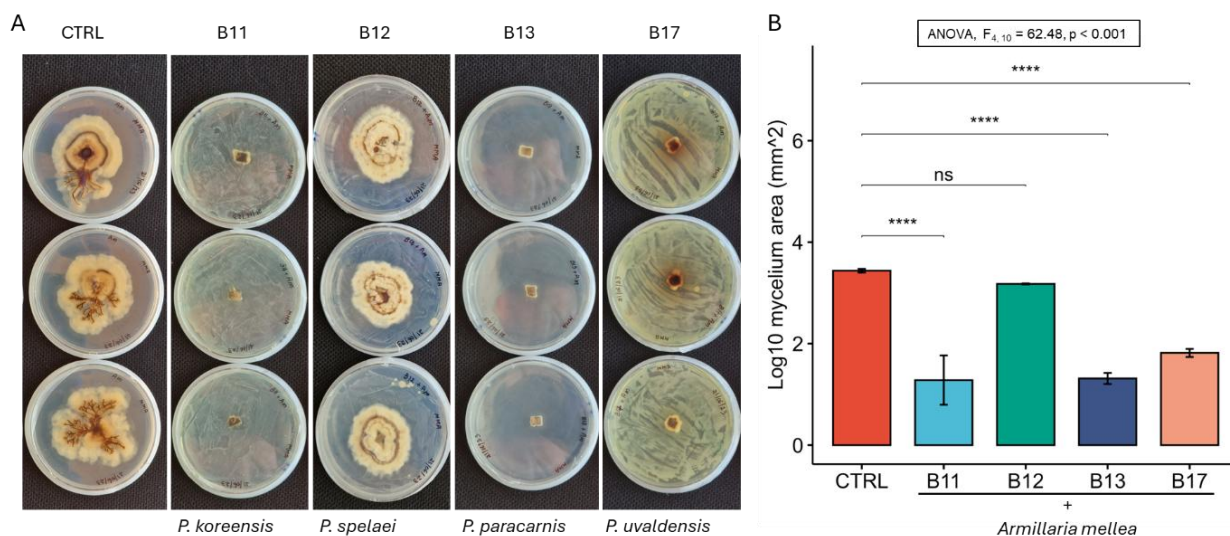


Fig. 13 - Attività *in vitro* contro *Armillaria mellea* di quattro isolati batterici (B11, B12, B13 e B17). A) Capsule Petri rappresentative contenenti solo *A. mellea* (CTRL) o *A. mellea* unitamente agli isolati batterici B11, B12, B13 e B17; B) Efficacia dei quattro isolati batterici nel ridurre la superficie delle colonie. I dati sono riportati in scala logaritmica: gli asterischi sulla parte superiore di ogni coppia di barre indica differenze statisticamente significative (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ns $p > 0.05$).

Sequenziamento del genoma dei batteri

Il genoma completo dei quattro ceppi batterici selezionati è stato sequenziato. Ogni isolato è stato coltivato in brodo LB per 12 ore a 37 °C in condizioni di agitazione continua (180 rpm). Il DNA è stato estratto utilizzando il kit *ISOLATE II Genomic DNA* (BIOLINE, Meridian Life Science, USA) e la sua qualità ed integrità è stata valutata mediante elettroforesi e utilizzando uno spettrofotometro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Le librerie di sequenziamento sono state costruite utilizzando il *Native Barcoding Kit 96 V 14* (Oxford Nanopore Technologies, UK) e sequenziate su uno strumento GridION dotato di una cella di flusso FLO-MIN-114 R10.4.1 (Oxford Nanopore Technologies, UK).

I dati grezzi sono stati elaborati utilizzando il flusso *Nextflow pipeline* wf-batterico-genomi (<https://github.com/epi2me-labs/wf-bacterial-genomes>). In breve, i genomi sono stati assemblati utilizzando *Flye* v2.9.2 e rifiniti utilizzando *medaka* 1.11.3 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>). La qualità dei genomi e dell'assemblaggio sono state valutate sulla piattaforma online *KBase* utilizzando *CheckM* v.1.0.18 e *Quast* v.4.4. L'identità dei nostri isolati è stata assegnata utilizzando *TYSG* e l'identità nucleotidica media (ANI) è stata calcolata utilizzando *FastANI* v1.3.3. I genomi sono stati annotati utilizzando *Prokka*. I cluster biosintetici dei metaboliti secondari sono stati identificati utilizzando gli *antiSMASH* v7.0.

La comparazione dei genomi dei nostri isolati con batteri di riferimento ha evidenziato che tutti gli isolati appartengono al genere *Pseudomonas* ed in particolare alle specie *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas spelaei*, *Pseudomonas paracarnis* e *Pseudomonas uvaldensis* con valori ANI di 91.35, 98.05, 99.06 e 88.99% rispettivamente. L'analisi dei cluster di geni di biosintesi di composti bioattivi ha evidenziato che i quattro isolati comprendono cluster associati alla produzione di diverse

molecole tra cui: 1) molecole con attività antifungina (*fengycin*, *fragin*, *hydrogen cyanide*, *lokisin*, *putisolvin*, *pyrrolnitrin*, e *viscosinamide A/pseudodesmin A*; 2) siderofri (*pyoverdine*, *EDHA*, *histicorrugatin*, e *pseudomonine*); iii) l'antibiotico *lankacidin C*, e 4) il fattore di patogenicità *syringomycin*. I cluster per la produzione di *Fengycin*, *pyoverdine*, e *lankacidin C* sono stati trovati in tutti i ceppi, mentre gli altri gruppi sono stati trovati in uno o due ceppi.

Valutazione dei batteri agenti di biocontrollo (BCA) *in vivo* con piantine di olivo allevate in vaso

Allo scopo di valutare l'efficacia antagonistica e l'impatto sul microbioma dei 4 batteri risultati più efficaci nelle prove *in vitro* si è proceduto con l'inoculazione artificiale di *A. mellea* su piantine di olivo in vaso e successivamente all'introduzione nel terreno degli antagonisti.

Preparazione dell'inoculo di *A. mellea*

Diverse sperimentazioni sono state condotte per individuare un metodo che consentisse di ottenere grosse quantità di inoculo di *A. mellea* da usare nelle prove di inoculazione artificiale di piantine di olivo. Inizialmente è stata valutata la possibilità di far crescere il fungo su cariossidi di grano e/o orzo sterilizzati. Tuttavia, i risultati ottenuti sono stati insoddisfacenti poiché il fungo cresce molto lentamente e non colonizza l'intera superficie delle cariossidi (Figura 15a). L'accrescimento del fungo è migliorato quando le cariossidi sterili sono state depositate su uno strato di PDA; tuttavia, anche in questo caso non è stato possibile ottenere colonizzazione uniforme delle cariossidi (Fig. 15b).

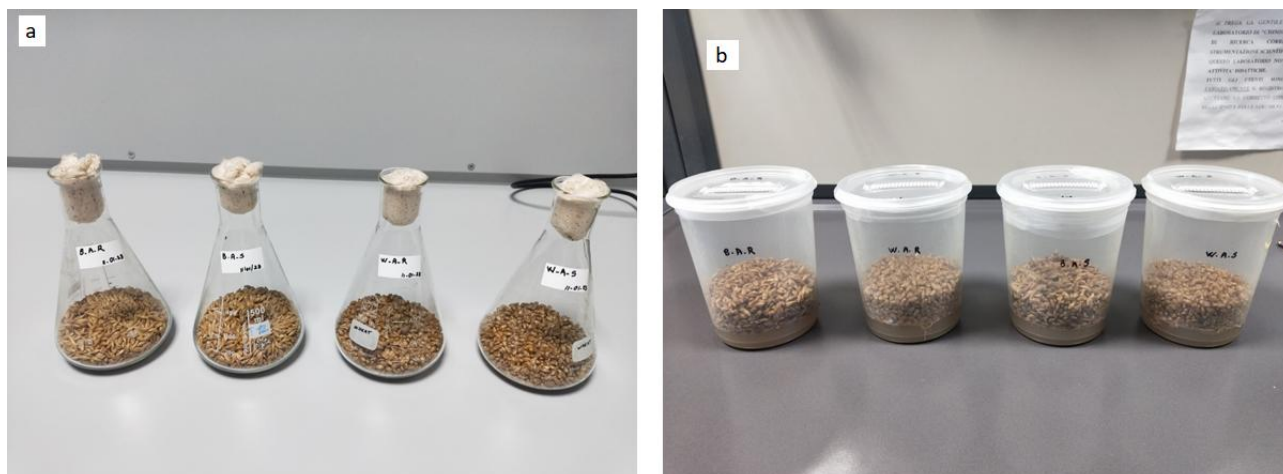


Fig. 15 - Prova di preparazione di inoculo di *Armillaria* su cariossidi di grano e orzo

Risultati molto positivi sono stati ottenuti quando il fungo è stato fatto crescere su rametti di olivo sterilizzati in autoclave a 120° C per 20 min. I rametti, lunghi circa 12 cm e con diametro di 10-12 mm sono stati mantenuti in contenitori sterili inseriti in uno strato di PDA di circa 20 mm (Fig. 16). Il patogeno è stato inoculato con tassellini di agar contenenti micelio in attiva crescita. Dopo due settimane di incubazione a 25°C al buio *A. mellea* ha colonizzato abbondantemente i rametti per tutta la lunghezza (Fig. 16). Il protocollo è stato successivamente semplificato utilizzando rametti di circa 2 cm semplicemente poggiati sullo strato di PDA (Fig. 17). Dopo un paio di settimane di incubazione tutti i rametti risultavano ampiamente ed uniformemente colonizzati dal patogeno (Fig. 17).

Fig. 16 - Rametti di olivo
inseriti in uno strato di agar
colonizzati da *Armillaria mellea*



Fig. 17 – Rametti di olivo di 2 cm
poggiati su uno strato di PDA
ampiamente colonizzati da
Armillaria mellea



Saggi *in vivo* con batteri antagonisti

Per l'inoculazione del patogeno è stato utilizzato un isolato di *A. mellea* (A1) ottenuto da piante di olivo dell'azienda Fazari. Sono state utilizzate piantine autoradicate della varietà Leccino di circa 60 cm fornite a titolo gratuito dai vivai Milone. Pochi giorni prima dell'inizio della sperimentazione tutte le piante sono state trapiantate in vasi con volume di 0.36 L e capitozzate ad un'altezza di circa 15 cm .

Lo schema sperimentale ha previsto l'utilizzo di 170 piantine suddivise in 17 gruppi di 10 piante ciascuno (Fig. 18), ciascun gruppo riceva uno degli antagonisti (vivo o morto) e ciascuno di essi è stato inoculato con il patogeno (vivo o morto) per un totale di 17 gruppi. Antagonisti e patogeno sono stati devitalizzati a 121°C per 20 min. L'ultimo gruppo di piante non ha ricevuto alcuna inoculazione.

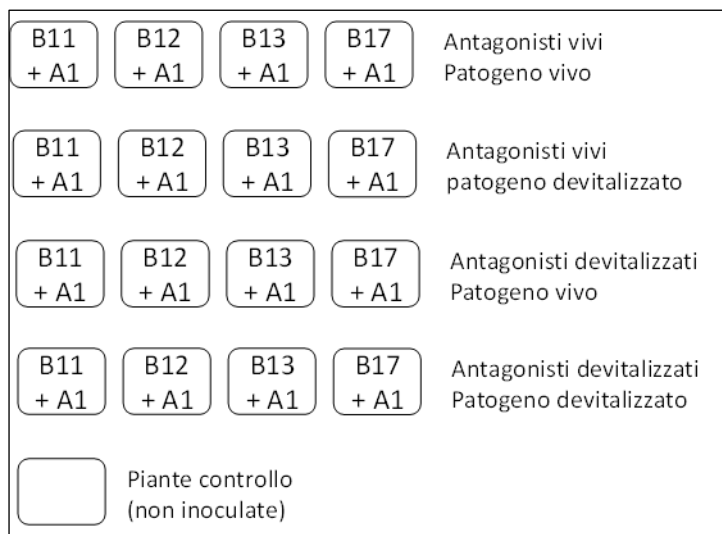


Fig. 18 - Disegno sperimentale della prova in vivo svolta in serra su piante d'olivo (var. Leccino). Ciascun gruppo è costituito da 10 piantine di olivo.

L'inoculo dei batteri è stato preparato su terreno di coltura liquido LB (Luria Bertani Broth, Difco) in beute di 1 L mantenute in agitazione per 48 h a 25°C (Fig. 19a). I batteri sono stati raccolti mediante centrifugazione e risospesi in un pari volume di tampone fosfato salino (PBS). La concentrazione delle cellule batteriche in ciascuna sospensione è stata determinata attraverso la costruzione di specifiche curve di taratura che hanno messo in relazione Colonie Formanti Unità e densità ottica misurata a 600 nm (OD_{600}) di ciascun batterio. Tutti i batteri al termine del periodo di incubazione hanno raggiunto una concentrazione di circa 8×10^8 cellule/ml. Queste sospensioni sono state successivamente diluite con PBS per ottenere una concentrazione standard di 10^8 cellule/ml (Fig. 19b). Ogni sospensione è stata divisa in due parti identiche ed una di esse è stata autoclavata per devitalizzare i batteri.

L'inoculo di *A. mellea* è stato preparato su rametti di olivo di 3-4 cm, come descritto in precedenza.

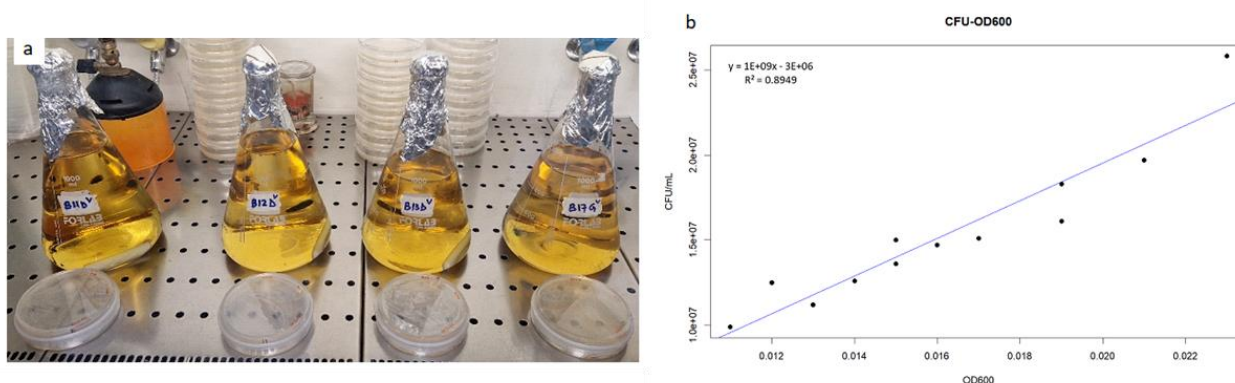


Fig. 19 – Beute utilizzate per la crescita dei batteri (a) e retta di taratura utilizzata per il calcolo della concentrazione (b)

L'inoculazione degli antagonisti è stata realizzata somministrando a ciascun vaso 50 ml di sospensione batterica/fungina (viva o morta). In prove preliminari era stato verificato che tale volume era sufficiente per consentire l'uniforme bagnatura del terreno contenuto in un vaso e la conseguente uniforme distribuzione degli antagonisti nel pane di terra (Fig. 20a). L'inoculazione di *A. mellea* (Fig. 20b) è stata fatta a distanza di 24h dall'inoculazione degli antagonisti realizzando due fori larghi 1 cm e profondi 5 cm alla base di ciascuna pianta. In ciascun foro è stato inserito un rametto di olivo colonizzato da *A. mellea* (vivo o morto). Le piante sono state disposte secondo lo schema sperimentale del blocco randomizzato (Fig. 20c) e sono state monitorate settimanalmente per verificarne l'accrescimento dei germogli e rilevare la comparsa di eventuali sintomi.



Fig. 20 - Prove di lotta biologica contro *Armillaria mellea* su piantine di olivo inoculate artificialmente. Somministrazione degli antagonisti (a), inoculazione di *armillaria mellea* (b) e vista d'insieme delle piante trattate (c)

Purtroppo, le tempistiche del progetto non hanno permesso di attendere la comparsa di sintomi di marciume radicale sulle piante inoculate con *A. mellea* in considerazione del ciclo biologico del patogeno che tipicamente prevede una lenta colonizzazione delle radici. Per tale motivo a distanza di 4 mesi dall'inoculazione si è deciso di “smontare” la prova per valutare l'impatto dei batteri antagonisti sulle piantine di olivo e sul microbioma delle radici e del terreno intorno ad esse (rizosfera) indipendentemente dalla presenza/assenza di micelio vivo di *A. mellea*.

Per l'estrazione degli acidi nucleici sono stati utilizzati circa 50 mg di radici e terreno. Le radici sono state lavate con acqua di rubinetto, sterilizzate in superficie mediante immersione per 30 secondi in ipoclorito di sodio al 2%, risciacquate due volte con acqua distillata sterile e asciugate all'aria su carta assorbente. I campioni di radici e di terreno sono stati conservati a -80 °C in attesa delle analisi. La parte restante delle piante è stata separata in germogli e radici tagliando il fusticino al livello del suolo. Entrambe le parti sono state essiccate in forno a 60°C per una settimana per determinarne il peso secco.

Analisi del microbioma

L'estrazione del DNA, la preparazione delle librerie ed il sequenziamento da terreno e radici sono stati realizzati come riportato in Malacrino et al., 2021 (10.1094/PBIOMES-02-21-0011-R). Dopo i controlli di qualità e l'eliminazione degli adattatori con TrimGalore le sequenze sono state elaborate in R v4.4.0 (R Core Team, 2020) utilizzando la pipeline DADA2 v1.22 per identificare le “*amplicon sequence variant*” (ASV) e rimuovere chimere e sequenze di bassa qualità. Le ASV sono state allineate utilizzando DECIPHER, annotate tassonomicamente utilizzando il database SILVA v138. Gli ASV identificati come “cloroplasti” o “mitocondri” e i potenziali contaminanti sono stati scartati.

L'impatto degli agenti di lotta biologica (BCA) sul microbioma batterico delle piante di olivo è stato valutato determinando la diversità e sulla struttura delle comunità microbiche analizzando separatamente il terreno e le radici. La diversità all'interno delle comunità batteriche è stata valutata calcolando il “*Faith's phylogenetic diversity index*” con il *package picante* e le differenze nella diversità microbica sono state saggiate adattando un modello lineare utilizzando il *package lme4* dove lo stato dei BCA (attivo o inattivo), l'identità dei BCA (B11, 12, 13 e 17) e la loro interazione sono stati utilizzati come fattori fissi. La distanza multivariata non ponderata UniFrac tra coppie di campioni è stata calcolata utilizzando il *package vegan* e visualizzata con una scala multidimensionale non metrica (NMDS). Le differenze nella struttura compositiva delle comunità batteriche del terreno e delle radici sono state saggiate utilizzando PERMANOVA (999 permutazioni) considerando lo stato dei BCA, la loro identità e la loro interazione come fattori fissi.

Il sequenziamento degli ampliconi ha prodotto 615.187 sequenze di elevata qualità (in media 2.192,72 sequenze/campione con un minimo di 1.096 ed un massimo di 22.892). Sono stati identificati in totale 4218 ASV, di cui 1721 nelle radici e 2466 nella rizosfera. L'analisi delle diversità filogenetica microbica nelle comunità di radici e rizosfera ha evidenziato un impatto significativo sia dello stato dei BCA (vivi o morti) che della loro identità BCA ($F_{3, 46} = 4,59$, $p = 0,0067$ e $F_{3, 38} = 2,95$, $p = 0,045$, rispettivamente). Le comparazioni a coppia hanno indicato un aumento della diversità

batterica nelle radici ($p = 0,012$) e nel terreno ($p = 0,016$) delle piante inoculate con gli isolati vivi B12 e B17, rispettivamente (Fig. 21).

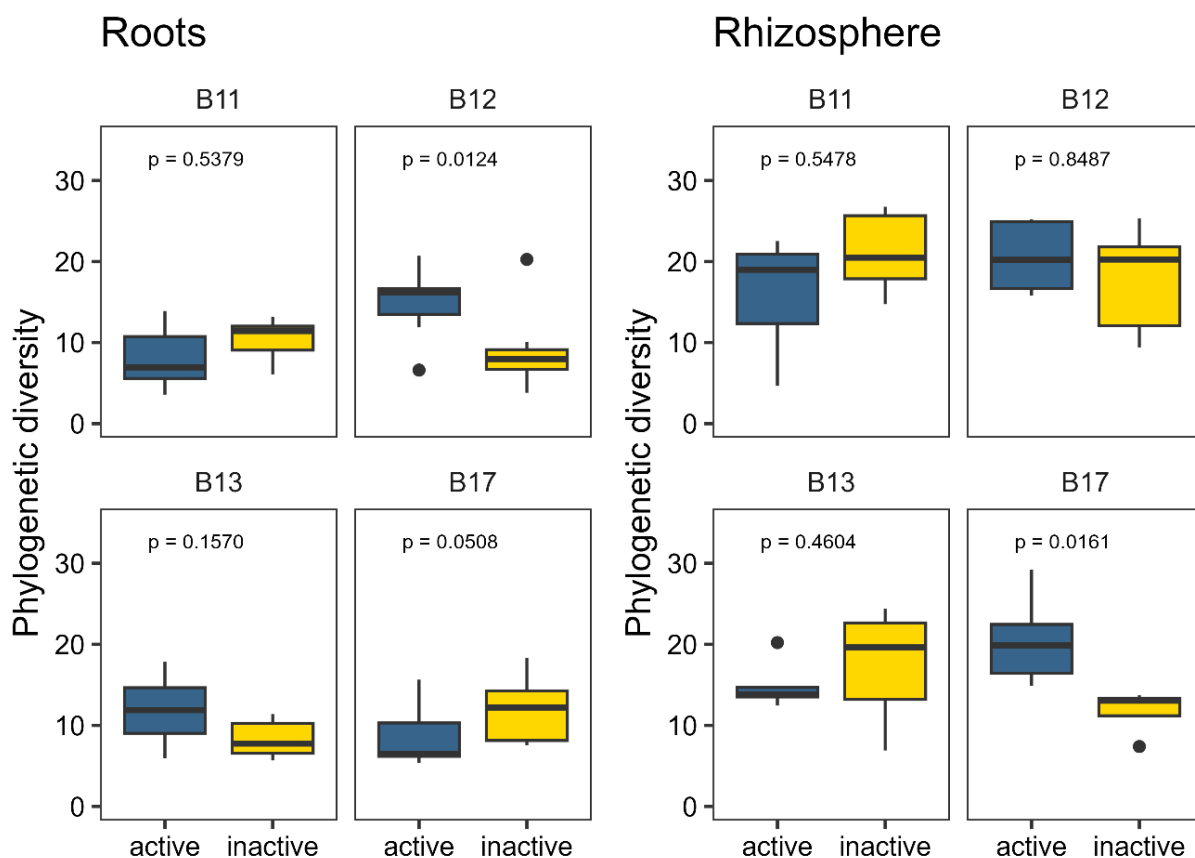


Fig. 21 - Impatto dello stato degli agenti di biocontrollo (BCA) (attivo e inattivo) sulla diversità filogenetica delle comunità batteriche di radici di piantine di olivo (sinistra) e terreno della rizosfera (destra).

La struttura delle popolazioni batteriche non sembra essere stata influenzata dallo stato dei BCA (vivi o morti) e dalla loro identità (Fig. 22). Tuttavia, sebbene entrambi i fattori, singolarmente, non abbiano influenzato la struttura microbica, la loro interazione lo ha fatto, sia nelle radici che nella rizosfera (Tab. 2; Fig. 23).

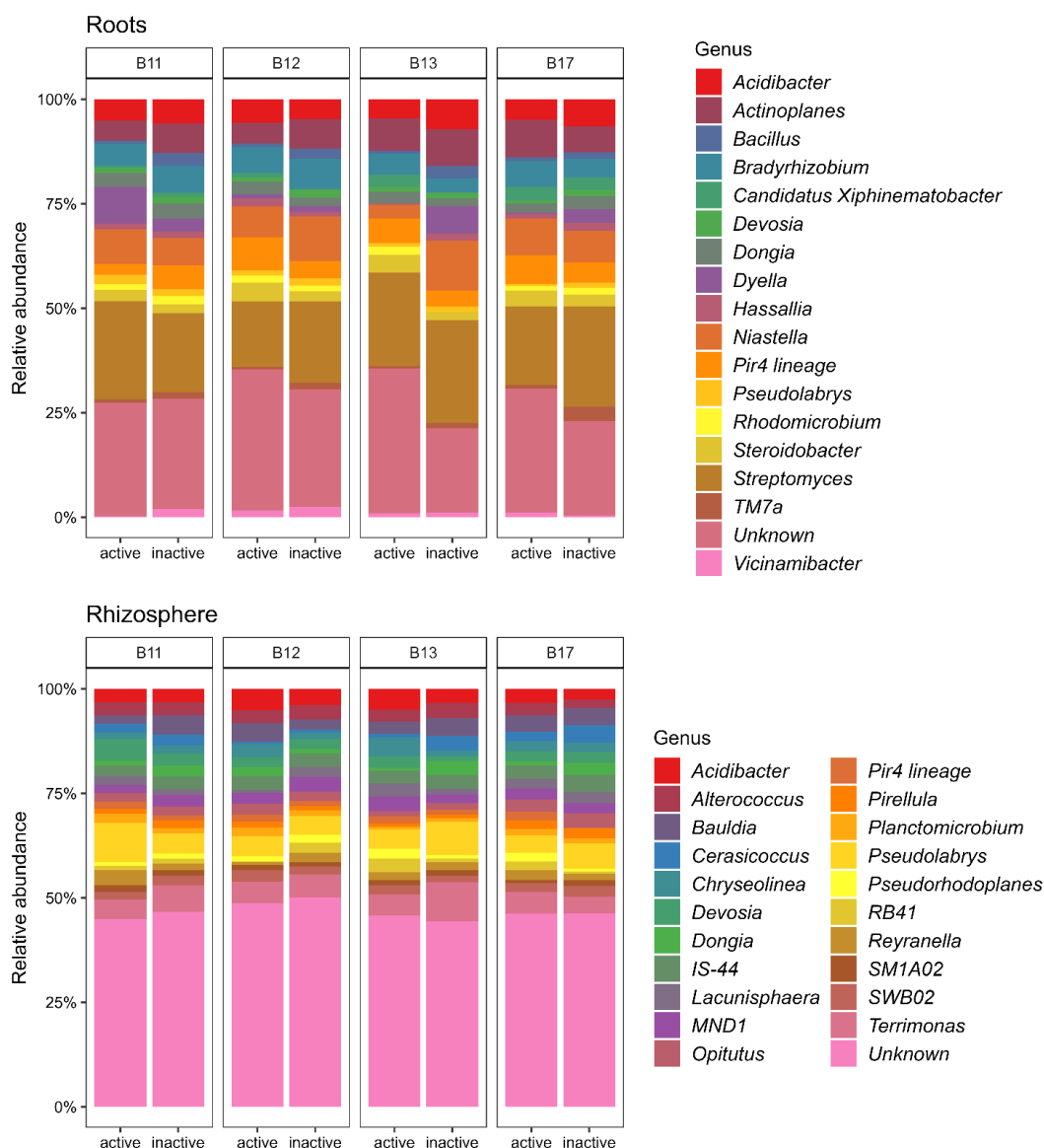


Fig. 22 - Struttura delle popolazioni batteriche nelle radici (sopra) e nella rizosfera (sotto) di piantine di olivo trattate con quattro differenti BCA (B11, B12, B13, B17) vivi (active) o devitalizzati (inactive).

Tabella 2. Analisi PERMANOVA dello stato dei BCA (attivo, inattivo), della loro identità (B11, B12, B13, B17) e della loro interazione sulla struttura delle comunità batteriche delle radici e del terreno della rizosfera di piantine di olivo

Factors	df	Roots			Rhizosphere		
		R2	F	p	R2	F	p
BCA_status	1	0.013410	0.706514	0.876	0.024581	1.123501	0.208
BCA	3	0.049014	0.860763	0.788	0.061950	0.943817	0.605
BCA_status:BCA	3	0.083423	1.465031	0.022	0.103935	1.583464	0.002

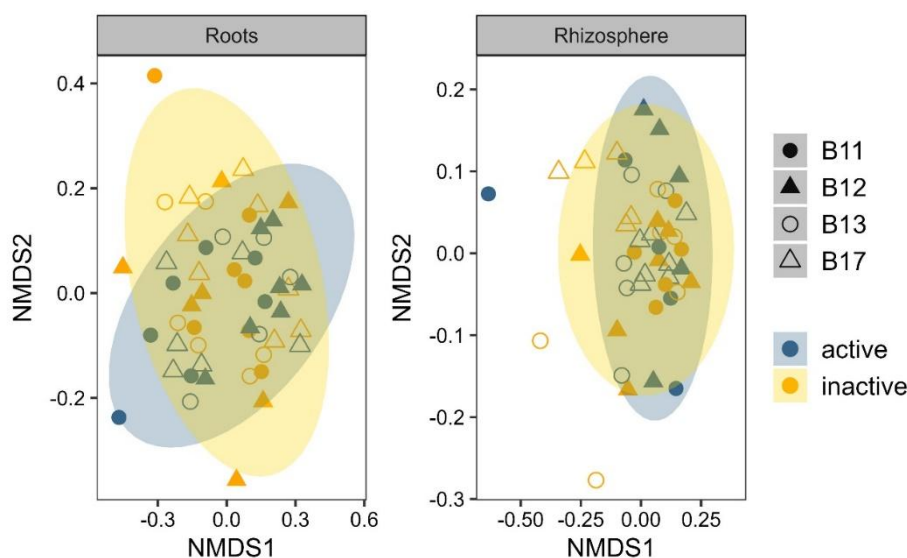
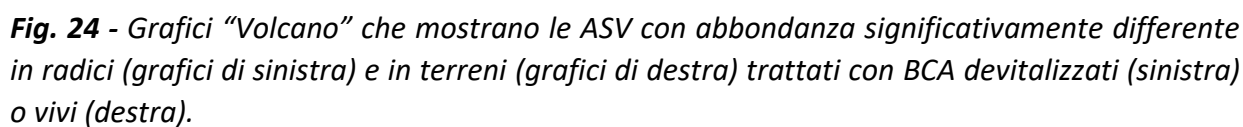


Fig. 23 - Grafici NMDS che mostra l'influenza dello stato BCA e dell'identità dei BCA sulla struttura delle comunità batteriche.

Le “*amplicon sequence variant*” (ASV), con abbondanza significativamente differente nelle radici e nella rizosfera inoculate con cellula vive o morte, sono state identificate separatamente per ogni isolato batterico utilizzando il *package DESeq2*. Complessivamente sono state identificate 46 ASV (Fig. 24). Sulle radici, 4, 1 e 4 ASV sono risultate più abbondanti nelle piante inoculate con ceppi inattivi di B11, B12 e B13, rispettivamente. Per contro, 2 e 12 ASV erano più abbondanti nelle piante inoculate con i ceppi attivi di B11 e B12, rispettivamente. Nessun ASV è stato significativamente influenzato dall'isolato B17 (Fig. 24). Nella rizosfera, 1 e 6 taxa erano più abbondanti quando le piante venivano inoculate con ceppi inattivi di B11 e B12 mentre l'inoculazione dell'isolato attivo B17 aumentava significativamente l'abbondanza di 16 ASV. Nessun ASV è stato influenzato in modo significativo dall'isolato B13.

I dati sulla biomassa secca di radici e germogli sono stati adattati a un modello lineare utilizzando il *package lmer* considerando lo stato dei BCA e la loro identità BCA come fattori fissi e le differenze tra le coppie di stato dei BCA sono state valutate con il *package emmeans*. Le prove sono state effettuate su radici e germogli separatamente. Uno *Structural Equation Model* (SEM) è stato costruito utilizzando il *package piecewise SEM* per valutare l'influenza dello stato dei BCAs (vivo o inattivato) sulla diversità microbica e sulla composizione del microbioma di terreno e radici e le loro influenze dirette e indirette sulla biomassa di radici e germogli.

Lo stato dei BCA (attivo/inattivo) è risultato il fattore principale nel determinare le variazioni di biomassa sia nelle radici che nei germogli ($F_{1, 52} = 53,45$; $p < 0,0001$ e $F_{1, 52} = 23,15$; $p < 0,0001$, rispettivamente). Le analisi hanno evidenziato un aumento significativo della biomassa in tutte le piantine di olivo inoculate con BCA vivi (attivi) rispetto a quelle inoculate con BCA inattivi (devitalizzati) (Fig. 25). Una sola eccezione, in cui non sono state rilevate differenze significative è rappresentata dalla parte aerea di piantine di olivo inoculate con l'isolato B17 (Fig. 25).



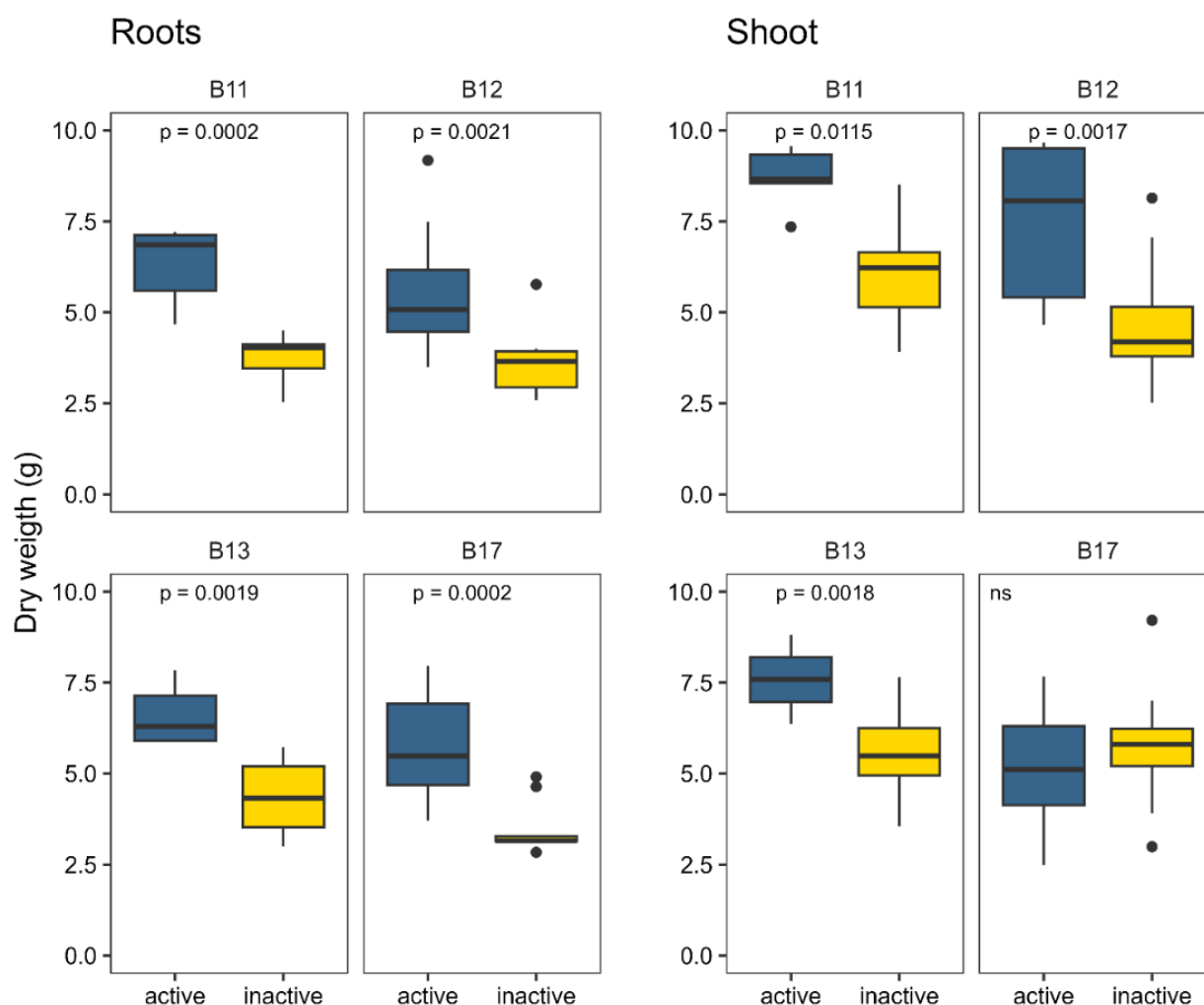


Fig. 25 - Influenza dei BCA vivi (active) e devitalizzati (inactive) sulla biomassa secca di radici (sinistra) e parte aerea (destra) di piantine di olivo inoculate con 4 differenti BCA (B11, B12, B13, B17)

Uno "Structural Equation Model (SEM)" è stato costruito utilizzando il *package piecewiseSEM* per valutare l'influenza dello stato dei BCAs (vivo o inattivato) sulla diversità microbica e sulla composizione del microbioma batterico in radici e rizosfera e la loro influenza diretta e indiretta sulla biomassa di radici e parti aeree. Queste analisi hanno confermato che la presenza di BCA vivi influenza la biomassa e modifica significativamente la diversità e struttura delle comunità microbiche di radici e parti aeree (Fig. 26). È interessante notare che i cambiamenti a livello di struttura e diversità microbica delle radici sono a loro volta significativamente correlate con l'aumento della biomassa delle radici. Analogamente, la biomassa radicale è risultata significativamente correlata con diversità filogenetica del terreno della rizosfera (Fig. 26).

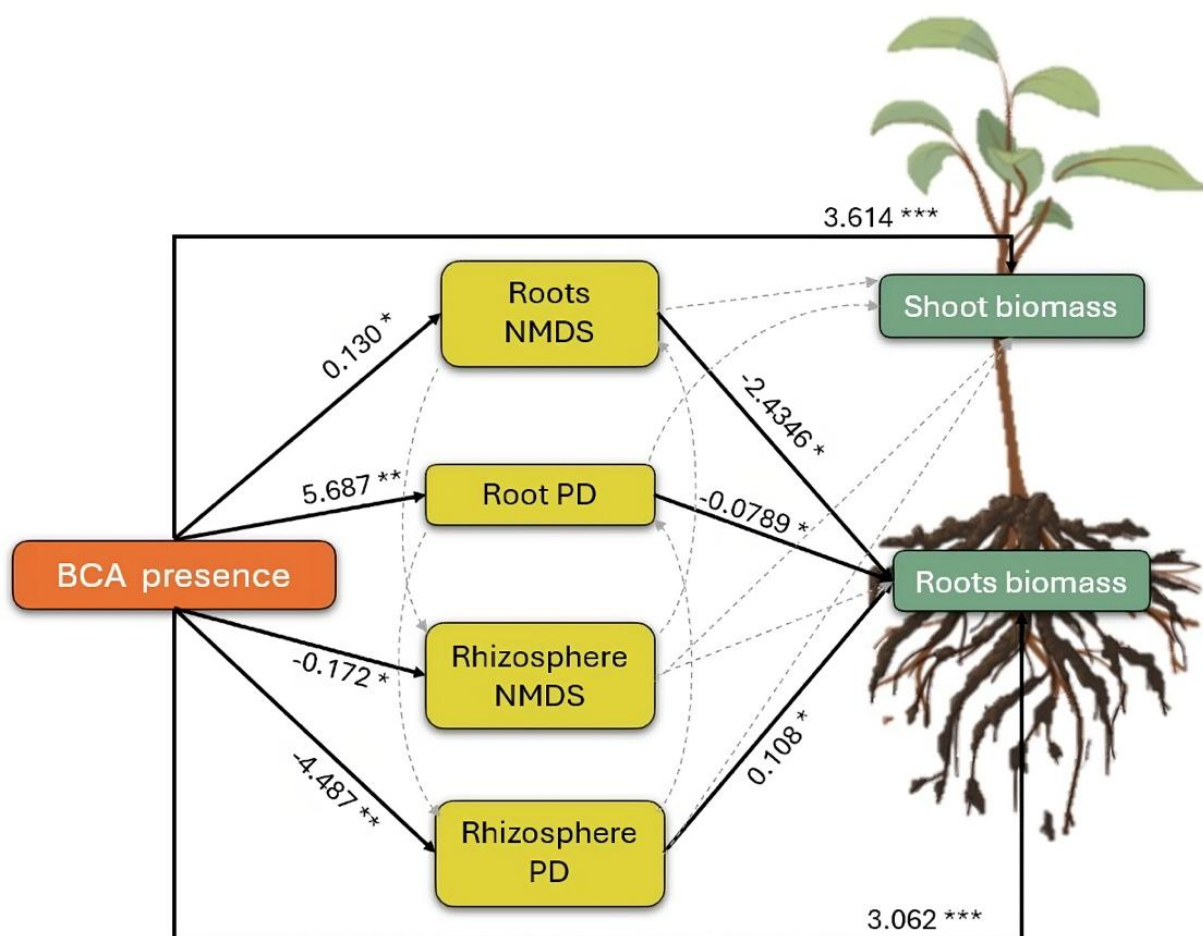


Fig. 26 - Impatto dei trattamenti con BCA attivi sulla struttura (NMDS) e la diversità filogenetica (PD) delle comunità batteriche e sulla biomassa radici e germogli delle piante di olivo. Le linee continue rappresentano relazioni significative ($***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$). Le linee tratteggiate rappresentano le relazioni non significative.

Conclusioni attività UNIRC

L'integrazione di dati genomici, microbiologici ed ecologici in questo studio ha fornito una comprensione completa del potenziale di isolati di *Pseudomonas* da terreno per la lotta contro *A. mellea*. I risultati evidenziano, accanto all'attività antagonista nei confronti di *A. mellea*, i meccanismi complessi attraverso cui gli agenti di biocontrollo (BCA) contrastano gli agenti patogeni radicali e promuovono la crescita radicale e delle piante in generale. L'effetto disturbante minimo sulle comunità microbiche native osservato nel presente studio evidenzia la compatibilità ecologica dei BCA selezionati. Studi futuri dovranno essere orientati a sfruttare i meccanismi antifungini complementari tra diversi isolati al fine di combinare più microrganismi in consorzi microbici per ottenere un controllo più ampio e più robusto. Inoltre, lo studio dei meccanismi molecolari alla base delle attività antifungine e di promozione della crescita delle piante dei BCA contribuirà

notevolmente a ottimizzarne l'applicazione. Infine sarà fondamentale confermare l'efficacia contro il marciume radicale lanoso di questi agenti di lotta biologica *in vivo* in condizioni pratiche di campo.

Conclusioni di progetto

La presenza ubiquitaria di *A. mellea* nei vecchi impianti di olivo della Piana di Gioia Tauro è stata confermata dal monitoraggio e dalla diagnosi delle infezioni in campo. La sua capacità di colonizzare il terreno, muovendosi da pianta a pianta, è notevole, come confermato dall'impiego delle esche vegetali. Ai fini della gestione della malattia è necessario definire due tipi di protocolli, il primo finalizzato a consentire la convivenza con il patogeno negli impianti adulti, ove la presenza è ubiquitaria, prevenendo o ritardando il collasso delle piante. Il secondo relativo alla riconversione della vecchia olivicoltura della Piana, con nuovi modelli produttivi (intensivi o superintensivi) e reimpianto degli oliveti su terreni contaminati. A tal fine, l'analisi dei risultati conseguiti consente di evidenziare le seguenti condizioni operative:

1. E' prioritario prevenire e contrastare la comparsa e diffusione degli agenti di marciume radicale nei nuovi impianti, con un'adeguata preparazione del terreno, tesa a conferire struttura e porosità ed evitando i ristagni d'acqua e gli impianti profondi (interramento in profondità del colletto delle piante), aspetti che si ripercuotono negativamente sulla vigoria e capacità di reazione delle piante agli attacchi parassitari, limitando l'emissione di nuove radici che, allo stato delle osservazioni condotte, appare essere il principale meccanismo di difesa messo in atto dalle piante infette, che consente loro di continuare a vegetare e produrre. In tal senso assume anche importanza garantire alle piante buone condizioni nutritive. L'utilizzo di pali tutori in legno è da evitare, giacché in breve tempo fungono da esca e trasferiscono l'infezione alla pianta, salvo poterne garantire la completa bruciatura della punta per tutta la profondità di interramento.
2. In presenza di piante infette la sconcatura dei palchi radicali è operazione fondamentale. I rilievi sperimentali hanno evidenziato come la sconcatura faciliti le emissioni di nuove radici, che controbilanciano in parte la perdita di funzionalità dell'apparato radicale causato dai marciumi radicali, consentendo alle piante di continuare a vegetare e produrre. Nella prova sperimentale in campo la somministrazione di digestato sui palchi radicali sconcati ha dimostrato di stimolare più significativamente l'emissione di nuove radici ed il vigore vegetativo delle piante, per il probabile apporto di elementi nutritivi e il miglioramento della struttura del terreno. La somministrazione di agenti di biocontrollo (BCA), sia batterici che fungini, con particolare riferimento a quelli selezionati nel corso del progetto (successivo punto 3), meglio se formulati come associazione di specie, in ragione della loro attività, sembra poter garantire in prospettiva maggiore efficacia e persistenza.
3. Le attività di laboratorio ed i saggi *in vitro* che *in vivo* hanno consentito di selezionare in loco ed identificare batteri del genere *Pseudomonas* risultati efficaci agenti di biocontrollo (BCA) di *A. mellea* ed altri agenti di marciumi radicali, con azione positiva anche sul microbioma radicale e sulla biomassa della rizosfera e della parte aerea. Questi risultati pongono le basi per lo sviluppo di efficaci strategie di contenimento biologico nell'ambito di un sistema integrato di difesa. È possibile prendere in considerazione due differenti strategie: 1) una di tipo preventivo, con impiego di ceppi batterici singoli o nella forma di consorzi microbici, all'atto dell'impianto o sui palchi radicali delle piante sane poste in prossimità di quelle infette, con l'obiettivo di incrementare la resistenza delle piante e prevenire nuove infezioni; 2) una seconda di tipo

curativo, post-infezionale, che prevede l'uso degli agenti di biocontrollo nell'area della corona radicale di piante già infette, per ridurre lo sviluppo del patogeno, rallentare la formazione delle rizomorfe, limitarne la diffusione verso il colletto, aumentare la capacità di difesa delle piante con l'emissione di nuove radici, fattore fondamentale al fine di garantire la sopravvivenza e la produttività delle piante infette. In questa strategia è ipotizzabile l'integrazione di più agenti di biocontrollo tra cui anche microrganismi già disponibili commercialmente come ad es. *Trichoderma* spp. L'utilizzo di BCA in strategie preventive e, ancora di più, in strategie curative, deve essere associato a strategie agronomiche (punti 1 e 2).

4. Per quanto riguarda la realizzazione di nuovi impianti su terreni contaminati, è stata rilevata un'elevata mortalità delle piantine utilizzate per il modello superintensivo, esili e di piccole dimensioni, con apparati radicali che facilmente sono preda di attacchi parassitari. A scopo preventivo, potrebbe valutarsi un'eventuale preventiva fase di consolidamento in vivaio. Oltre alla già citata necessità di un'adeguata preparazione del terreno (punto 1), è conveniente realizzare gli impianti su terreno baulato e con sistemi di microirrigazione, in modo da ridurre il rischio di ristagni idrici. È importante somministrare gli agenti di biocontrollo (punto 3) all'impianto e successivamente con fertirrigazione. Per questa tipologia di impianti è inoltre necessaria la pacciamatura con film plastici sulla fila al fine di evitare l'attacco dei fitofagi defogliatori, facilitati dalla presenza di erbe infestanti.

Divulgazione dei risultati

Le attività svolte ed i risultati conseguiti sono stati oggetto di un convegno realizzato il 23 novembre 2023 presso l'Azienda ARSAC di c.da Bettina di Gioia Tauro (Allegato 2), che ha visto la presentazione, insieme ad altre, delle relazioni dei tre componenti l'ATS: prof. Agosteo quale responsabile scientifico del progetto per il Dipartimento di Agraria, Domenico Fazari, capofila del progetto e Pierluigi Taccone, dell'omonima azienda.

Ai fini della divulgazione è stato attivato un apposito sito web dedicato al progetto e curato dall'azienda capofila (<https://www.armistop.it/armistop/>).

I risultati preliminari conseguiti sono stati oggetto delle seguenti pubblicazioni:

- M. M. Aci, G.E. Agosteo, S. Mosca, A. Malacrino, L. Schena (2023). Harnessing the soil microbiome to control *Armillaria* root rot on olive. 12th International Congress of Plant pathology. Lyon, France, 20-25 August. Abstract P1.1-146.
- M. M. Aci, G. Pelle, A. Malacrino, L. Schena, G. E. Agosteo (2024). Unraveling the impact of *Armillaria mellea* biocontrol agents on root and rhizosphere soil bacterial microbiome of olive plants. XXIX Congress of the Italian Phytopathological Society, 9-11 september 2024, Trento. Book of abstract, Abstract P56. In corso di stampa su Journal of Plant Pathology.
- M. M. Aci, G.E. Agosteo, A. Malacrino, L. Schena. Impact of *Armillaria mellea* bacterial biocontrol agents on the microbiome of roots and rhizosphere of olive plantlets. Phytobiomes Journal (in fase di revisione)

ALLEGATO 1

Digestato

SEPARATO DA DIGESTIONE ANAEROIBICA CICLO PRODUTTIVO

Il processo in linea con le direttive Ail. C Parte Quarta D.lgs. n. 152/06 comprende e 4 fasi:

1. Triturazione delle biomasse in ingresso;
2. Digestione anaerobica;
3. Raffinazione
4. Stoccaggio

Il processo di digestione anaerobica ha una durata di almeno 45 giorni, tali da consentire la produzione di Biogas avviato a recupero energetico e stabilizzare la matrice organica. Il prodotto di tale processo viene in seguito sottoposto a separazione solido-liquido per poi dare inizio allo stoccaggio. Terminati i processi di lavorazione il prodotto ottenuto viene sottoposto ad analisi in funzione del D.lgs 75/2010 allegato 2.

BIOMASSE UTILIZZATE NEL CICLO PRODUTTIVO

Le biomasse utilizzate nel nostro processo di produzione sono prodotti secondari del settore agroalimentare come:

- Letame di autoproduzione
- Sansa di olive
- Pastazzo di agrumi
- Sarti della produzione ortofrutticola

	pH	Solidi Totali	Solidi Volatili	Sostanza Organica	Carbonio Organico Totale	Azoto		Azoto ammoniacale	Fosforo		Fosforo come P2O5	Potassio		Potassio come K2O
	(-)	(g/kg)	(g/kg)	(%ST)	(g/kg)	(g/kg)	(%ST)	(mg/kg)	(g/kg)	(%ST)	(g/kg)	(g/kg)	(%ST)	(g/kg)
Digestato liquido	7.76	69.17	51.03	73.77	28.58	3.80	5.50	1112	0.72	1.03	1.64	4.58	6.62	5.52
Digestato solido separato	8.56	345.96	317.54	91.79	177.82	4.76	1.37	1232	1.07	0.31	2.46	3.20	0.92	3.85

	Zinco	Rame	Nichel	Piombo	Mercurio	Cadmio	Cromo VI
	(mg/kgST)	(mg/kgST)	(mg/kgST)	(mg/kgST)	(mg/kgST)	(mg/kgST)	(mg/kgST)
Digestato Liquido	127	80	6.4	2.6	<0,1	<1	<0,2
Digestato solido separato-Uliva	33	23	1.9	1.0	<0,1	<1	<0,2

Allegato 2



CONVEGNO FINALE PROGETTO ARMISTOP

Prevenzione e contrasto alla diffusione del marciume radicale fibroso da *Armillaria* in olivicoltura

**Giovedì 23 novembre 2023, ore 15:30 - Centro Sperimentale Dimostrativo ARSAC
C/da Bettina n. 1 Gioia Tauro (RC)**

Saluti istituzionali

- Giuseppe Zimbalatti**
 Rettore Università Mediterranea di Reggio Calabria
- Giovanni Enrico Agosteo**
 Direttore Dipartimento di Agraria, Università Mediterranea di Reggio Calabria
- Giacomo Giovinazzo**
 Direttore Generale Dipartimento Agricoltura Risorse Agroalimentari e Forestazione, Regione Calabria
- Fulvia Caligiuri**
 Commissario Straordinario dell'Azienda Regionale per lo Sviluppo dell'Agricoltura Calabrese ARSAC
- Vincenzo Cillona**
 Direttore Centro Sperimentale Dimostrativo ARSAC di Gioia Tauro
- Antonino Sgrò**
 Presidente Federazione Regionale Dottori Agronomi e Forestali della Calabria

Moderatore

Leonardo Schena
 Università Mediterranea di Reggio Calabria

Relazioni ore 15:00

- **Progetto ARMISTOP**
 Giovanni Enrico Agosteo
 Università Mediterranea di Reggio Calabria
- **Valorizzazione del microbioma del suolo per la lotta contro il marciume radicale fibroso dell'olivo**
 Meriem Miyassa Aci
 Università Mediterranea di Reggio Calabria
- **Strategie di lotta in campo contro il marciume radicale fibroso su piante adulte di olivo**
 Domenico Fazari
 Azienda agricola Fazari Domenico, Capofila progetto
- **Valutazione di un impianto superintensivo di olivo realizzato su terreno contaminato da *Armillaria mellea***
 Pierluigi Taccone
 Azienda olivicola Taccone
- **Impatto del marciume fibroso sulle produzioni olivicole della piana di Gioia Tauro**
 Lidia Viterale
 Agenzia regionale per lo sviluppo dell'Agricoltura Calabrese
- **Ruolo dei fondi strutturali nel trasferimento tecnologico: opportunità di crescita e sviluppo del comparto agricolo ed agroindustriale**
 Michele Valenzise
 Dottore Agronomo

Dibattito e Conclusioni ore 18:00

La partecipazione è gratuita. Per informazioni: 0965/43011 o al sito www.arsac.it

Segreteria Organizzativa
patologia.marrattoni@arsac.it

© 2023, tutti i diritti riservati

