IMPIEGO DI UNA SPECIFICA MATRICE ORGANICA PER LA DISINFESTAZIONE DEL TERRENO MEDIANTE ANAEROBIOSI

A. MINUTO[1], F. FIORENTINI[2], E. LADURNER[2], E. GUIDO[1], C. BRUZZONE[1], A. RONCA[1], A. LANTERI[1], M. BENUZZI[2]
[1]Centro Di Sperimentazione ed Assistenza Agricola (Ce.R.S.A.A. – C.C.I.A.A. SV), Regione Rollo, 98, 17031 Albenga (SV)
[2]CBC Biogard - Grassobbio (BG)
andrea.minuto@rivlig.camcom.it

RIASSUNTO

Il lavoro, riassume due anni di attività sperimentale condotta in condizioni di semi-campo con un formulato a base di una specifica matrice organica (Never) che, opportunamente applicato al terreno, è in grado di garantire condizioni repentine e durature di anaerobiosi in terreni agrari permettendone, dopo almeno due settimane di copertura con film impermeabile all'ossigeno, la disinfestazione. Le attività sono state condotte valutando l'effetto della esposizione a diverse condizioni di anaerobiosi, differenziate sulla base di dose di applicazione della matrice organica, tempo di copertura del terreno, temperatura raggiunta durante la fase di copertura, di isolati selezionati di *Verticillium dahliae*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, e *Sclerotinia sclerotiorum* opportunamente preparati. I risultati ottenuti confermano l'elevata potenzialità di tale tecnica di disinfezione anaerobica del terreno [Anaerobic Soil Disinfestation (ASD)] che, se adeguatamente adottata, garantisce una buona e ripetibile efficacia fitoiatrica.
Parole chiave: disinfezione, suolo, patogeni fungini, Never

SUMMARY

ANAEROBIC SOIL DISINFESTATION WITH A FORMULATION BASED ON A SPECIFIC ORGANIC MATRIX: PERSPECTIVES AND LIMITS OF APPLICATION

This paper summarizes two years of experimental activity conducted in semi-field conditions with a formulation based on a specific organic matrix (Never) which, if properly applied to the soil, guarantees sudden and lasting anaerobic conditions allowing disinfestation after at least two weeks of mulching with oxygen barrier film. Studies were conducted in order to investigate the effect of various conditions of anaerobiosis, obtained by applying different rates of the product and by varying the time of soil covering, on selected isolates of *Verticillium dahliae*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, and *Sclerotinia sclerotiorum*. Isolates were specially prepared for the study and soil temperatures reached during the soil covering period were measured. The results of the study confirm the high potential of Anaerobic Soil Disinfestation (ASD): this technique, when properly applied, represents a highly effective crop protection tool, which provides consistent results.
Keywords: disinfection, soil, fungal pathogens, Never

INTRODUZIONE

La disinfezione dei terreni mediante anaerobiosi è una tecnica nota da tempo e comunemente indicata come *Anaerobic Soil Disinfestation* (ASD) (Strauss e Kluepfel, 2015). La disinfestazione del suolo anaerobica prevede l'applicazione di una fonte di carbonio, l'irrigazione a capacità di campo e la copertura del suolo con un film plastico in grado di fungere da barriera alla diffusione di ossigeno: il risultato è un radicale cambiamento nella composizione della comunità microbica del suolo, la produzione di composti organici volatili e la generazione

di condizioni anaerobiche letali. Numerose e differenti sono le possibilità con cui la disinfezione anaerobica è messa in atto e comprendono una grande varietà di fonti di carbonio, diverse condizioni di temperatura del suolo, diversi tipologie dei film di plastici di copertura. Mentre la solarizzazione non è un componente essenziale della ASD, essa può migliorane comunque in modo significativo l'efficacia (Strauss e Kluepfel, 2015).
Numerose sono le matrici organiche che possono essere utilizzate per questo scopo potendo essere costituite da materiale vegetale fresco, disidratato o già parzialmente compostato. Il principale limite della tecnica è legato soprattutto al quantitativo di matrice organica da utilizzare che può variare da poche tonnellate per ettaro sino ad oltre 100 tonnellate/ha. Sino ad oggi, però, decisamente poche sono state le esperienze di applicazione della tecnica di ASD utilizzando matrici organiche specificatamente approntate per tale uso e pertanto caratterizzate da una potenziale elevata ripetibilità nei risultati.

Di seguito si descrivono sinteticamente i risultati di attività sperimentali che sono state condotte valutando l'effetto della esposizione a diverse condizioni di anaerobiosi, differenziate sulla base della dose di applicazione di una matrice organica appositamente preparata [prodotto formulato: Never fornito da CBC (Europe) - Biogard Division, Grassobbio, Italia - Sostanza organica 80%, C organico > 40%, proteine > 30%, umidità massima 10%], del tempo di copertura del terreno, della temperatura raggiunta durante la fase di copertura, nei confronti di isolati selezionati di *Verticillium dahliae*, *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*, *Rhizoctonia solani*, e *Sclerotinia sclerotiorum* opportunamente preparati.

MATERIALI E METODI

Gli isolati dei patogeni utilizzati nei saggi sono stati ottenuti direttamente dalle collezioni del Laboratorio Fitopatologico del CeRSAA, ove erano stati in precedenza identificati mediante applicazione di tecniche di microbiologia classica e diagnostica molecolare e caratterizzati per la loro patogenicità mediante verifica dei postulati di Koch (Agrios, 2005).

Ciascun isolato è stato propagato su substrato solido basato su proporzioni differenti di cariossidi di cereali (frumento) e perlite (3-7 mm di diametro) precedentemente sterilizzati e rigonfiati in autoclave. La biomassa infetta, costituita da micelio e microsclerozi per *V. dahliae*, micelio e oospore per *P. nicotianae*, micelio e clamidospore per *F. oxysporum* f.sp *lycopersici*, micelio e corpi miliari per *R. solani*, micelio e sclerozi per *S. sclerotiorum*, è stata confezionata all'interno di sacchetti costituiti da rete plastica poliolefinica (20 mesh) e conservata per non oltre 12 ore a 8-10 °C prima dell'utilizzo.

Il terreno [suolo franco sabbioso, pH 7,5-8,2, EC 0,8-1,1 mS/cm (estratto acquoso 1:1,5 acqua:suolo), sostanza organica 21-23 g/kg, C/N 9,5-10,3] ove è stata simulata la prova di applicazione, individuato in piena aria, è stato sottoposto a doppia lavorazione mediante discissione profonda e successiva vangatura e quindi irrigato sino ad ottenere uno stato di adeguata tempera. Quindi Never è stato distribuito manualmente alla dose prevista in superficie al terreno e definitivamente incorporato ad una profondità di circa 25-30 cm con un lieve compattamento superficiale del suolo stesso. Successivamente si è proceduto all'interramento dei sacchetti con la biomassa fungina che sono stati posizionati, separati gli uni dagli altri, a 20 cm di profondità realizzando 3 ripetizioni per ciascuna combinazione sperimentale (dose di applicazione di Never; presenza/assenza della copertura plastica, durata del periodo di esposizione della biomassa fungina). In seguito è stata effettuata una irrigazione mediante sistema per aspersione distribuendo circa 20 mm di acqua, necessari a portare il suolo ad oltre il 60% della capacità di campo nello strato superficiale di 25 cm. Da ultimo il terreno è stato coperto mediante impiego di un film plastico trasparente virtualmente impermeabile a basa poliamidica (VIF Ecobrom Nat 23 Agriplast – Vittoria RG), caratterizzato da elevata

impermeabilità all'ossigeno. La dimensione delle singole parcelle è stata di 7 m x 7 m e il posizionamento dei sacchetti di biomassa è avvenuto nella zona centrale delle stesse all'interno di un'area di 2 m x 2 m. La copertura del terreno è stata mantenuta da un minimo di 1 settimana sino ad un massimo di 4 settimane, in funzione del protocollo sperimentale. Alla scadenza dei differenti tempi di copertura, le parcelle sono state scoperte e, lasciando indisturbato il terreno, i sacchetti con la biomassa infetta sono stati estratti e portati in laboratorio entro un tempo massimo di 30 minuti. Qui i sacchetti sono stati singolarmente aperti in condizioni di sterilità, disponendo 20 frammenti su substrato semiselettivo (tabella 1) in piastra Petri (150 mm diametro), realizzando 5 ripetizioni per ciascun singolo sacchetto e operando come riassunto in tabella 1.

Tabella 1. Substrati semiselettivi utilizzati per la valutazione della vitalità dei patogeni inoculati, condizioni e tempi di incubazione (Albenga 2016 e 2017)

Specie vegetale	Substrato	Condizioni di mantenimento	Numero minimo di giorni di incubazione
V. dahliae	Selettivo per funghi Potato destrose agar addizionato di streptomicina solfato	18-20°C - buio	4-7
S. sclerotiorum			2-4
R. solani		25-28°C - buio	
P. nicotianae	Selettivo per funghi oomiceti (Masago et al., 1977)	20-22°C - buio	3-5
F.o, f.sp *lycopersici*	Selettivo per funghi oomiceti (Komada, 1975)	20-22°C – buio 12 h /luce 12 h	4-7

Decorso il minimo tempo di incubazione le diverse piastre sono state sottoposte a controllo verificando la presenza di crescita di micelio fungino a partire da ciascun frammento. In caso di presenza di crescita micelica, lo stesso micelio è stato ulteriormente sottoposto a prelievo e a coltura su substrato semi-selettivo al fine di permettere un successivo e più agevole riconoscimento, effettuato, se necessario, anche con l'ausilio di tecniche di biologia molecolare. I dati relativi alla crescita micelica, infine, sono stati registrati calcolando come dato finale la percentuale di frammenti infetti dall'isolato patogeno precedentemente inoculato. I dati così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (Anova) e le medie confrontate con il test di Tukey con $p \leq 0,05$.

RISULTATI

Nelle tabelle 2 e 3 si riporta la sintesi dei risultati ottenuti durante due anni successivi di attività.

La prova condotta nel 2016 ha permesso di verificare l'elevata efficacia della applicazione del formulato Never già a 12,5 t/ha con tempi di esposizione non inferiori a 2 e 3 settimane rispettivamente su *S. sclerotiorum*, *P. nicotianae* e su *F. lycopersici*, *V. dahliae*, *R. solani*.

Nella prova condotta nel 2017 l'efficacia di Never applicato a 12,5 t/ha è stata confermata successivamente sia dopo 2 settimane (*V. dahliae*, *S. sclerotiorum*, *P. nicotianae*, *R. solani*) sia dopo 3 settimane (*F. lycopersici*) di esposizione. Sempre nel 2017, inoltre, è stato possibile confermare l'efficacia di Never anche a 8 e 4 t/ha successivamente sia a 2 settimane (*V. dahliae*, *P. nicotianae*, *R. solani*) sia a 3 settimane (*S. sclerotiorum, F. lycopersici*) di esposizione.

Tabella 2. Effetto dei trattamenti espresso come percentuale di frammenti infetti successivamente a 1, 2, 3, e 4 settimane di permanenza nel terreno coperto (Albenga, 2016)

Trattamento	Copertura con film barriera	% di frammenti infetti			
V. dahliae		1 settimana	2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 b*	100 b	100 b	100 b
Testimone	si	100 b	100 b	100 b	100 b
Never 12,5 t/ha	si	25,8 a	15,8 a	0 a	0,8 a
Never 25 t/ha	si	40,8 a	26,7 a	0 a	0 a
S. sclerotiorum		1 settimana	2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 b	100 b	100 b	100 b
Testimone	si	100 b	98,3 b	100 b	100 b
Never 12,5 t/ha	si	10,0 a	0 a	0 a	0 a
Never 25 t/ha	si	7,5 a	0 a	0 a	0 a
P. nicotianae		1 settimana	2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 b	100 b	100 c	100 b
Testimone	si	98,3 b	100 b	57,5 b	90,8 b
Never 12,5 t/ha	si	2,5 a	2,5 a	0 a	0 a
Never 25 t/ha	si	0 a	0,8 a	0 a	0 a
F. o f.sp. lycopersici		1 settimana	2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 b	100 b	100 b	100 b
Testimone	si	100 b	99,2 b	100 b	79,2 b
Never 12,5 t/ha	si	5,8 a	2,5 a	0,8 a	0 a
Never 25 t/ha	si	10,0 a	12,5 a	0 a	0 a
R. solani		1 settimana	2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 b	100 b	100 b	100 b
Testimone	si	100 b	100 b	100 b	100 b
Never 12,5 t/ha	si	33,3 a	5,8 a	1,7 a	0 a
Never 25 t/ha	si	20,0 a	10,0 a	2,5 a	0 a

* I valori della medesima colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono tra loro secondo il test di Tukey ($p \leq 0,05$)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di dimostrare che l'applicazione di Never in associazione alla copertura con film plastico impermeabile ai gas, incluso l'ossigeno, è in grado di limitare la vitalità di diversi patogeni fungini tra cui *V. dahliae*, *P. nicotianae*, *F. o.* f. sp *lycopersici*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. In particolare, le attività hanno dimostrato che la sola copertura plastica, ancorché effettuata in condizioni tali da garantire valori di temperatura a 15 cm di profondità tra 23 e 35 °C (tabella 4), non è stata in grado di permettere la medesima riduzione di vitalità dei differenti patogeni. Nel loro complesso, le prove di disinfezione del terreno mediante anaerobiosi (ASD) descritte in questo lavoro hanno permesso di dimostrare che, anche se già dopo 1 settimana di copertura con film plastico è stata ottenuta una significativa riduzione di vitalità dei diversi patogeni, la migliore efficacia della applicazione del formulato Never, a dosi di almeno 4 t/ha, è stata garantita successivamente al mantenimento della copertura per periodi non inferiori 2 o 3 settimane.

Tabella 3. Effetto dei trattamenti espresso come percentuale di frammenti infetti successivamente a 2, 3, e 4 settimane di permanenza nel terreno coperto (Albenga, 2017)

Trattamento	Copertura con film barriera	% di frammenti infetti		
V. dahliae		2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 b*	100 c	85,2 c
Testimone	si	82,2 b	55,3 b	55,8 b
Never 4 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
Never 8 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
Never 12,5 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
S. sclerotiorum		2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 c	95,3 c	65,2 c
Testimone	si	78,8 b	52,4 b	45,4 b
Never 4 t/ha	si	65,0 b	0 a	0 a
Never 8 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
Never 12,5 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
P. nicotianae		2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 c	77,3 b	45,3 b
Testimone	si	65,5 b	65,6 b	25,3
Never 4 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
Never 8 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
Never 12,5 t/ha	si	0 a	0 a	0 a
F. o f.sp. *lycopersici*		2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 a	100 b	100 b
Testimone	si	100 a	88,5 b	75,5 b
Never 4 t/ha	si	88,9 a	0 a	0 a
Never 8 t/ha	si	100 a	0 a	0 a
Never 12,5 t/ha	si	100 a	0 a	0 a
R. solani		2 settimane	3 settimane	4 settimane
Testimone	no	100 b	100 c	100 c
Testimone	si	10,0 a	58,9 b	31,1 b
Never 4 t/ha	si	0 a	0 a	13, a
Never 8 t/ha	si	0 a	0 a	3,3 a
Never 12,5 t/ha	si	1,1 a	0 a	1,1 a

* I valori della medesima colonna seguiti dalla stessa lettera non differiscono tra loro secondo il test di Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabella 4. Variazione delle temperature minime, medie e massime misurate a 15 cm di profondità nelle parcelle trattate e non trattate (Albenga, 2016 e 2017)

Anno	Copertura con film barriera	°C minima	°C media	°C massima
2016	si	28-34	31-40	35-45
	no	23-27	27-31	29-35
2017	si	25-35	29-38	34-44
	no	22-27	26-30	27-35

Come già in precedenza rammentato, la disinfezione dei terreni mediante anaerobiosi (ASD) è nota da tempo per la sua efficacia; dal punto di vista del suo utilizzo, però, volendola considerare una alternativa a soluzioni basate su mezzi tecnici di sintesi, spesso applicati da contoterzisti specializzati, risulta oggi ancora di difficile applicazione.

Tra le maggiori difficoltà ricordiamo la necessità di reperire matrici organiche costanti nella loro composizione e in grado di garantire risultati ripetibili nel tempo a parità di condizioni di impiego. I dati qui riportati dimostrano che l'impiego della matrice organica Never permette di ottenere risultati ripetibili nel tempo per la riduzione della vitalità di organismi fungini patogeni di diverse colture agrarie. Il minimo dosaggio applicato di 4 t/ha, sebbene adottato in una sola prova, ha dato risultati statisticamente paragonabili a quello di 12,5 t/ha sui 5 diversi patogeni saggiati all'interno di differenti strategie di applicazione. Questo ci consente di potere affermare che i dosaggi minimi di applicazione possono essere anche di sole 4 t/ha, che, considerati quelli indicati per altre matrici organiche, appaiono decisamente limitati.

La copertura del terreno con film impermeabili ai gas quali l'ossigeno, strettamente necessaria per garantire il mantenimento di condizioni di anaerobiosi, è un fattore non eliminabile, ma che permette già dopo 2-3 settimane di copertura di ottenere una adeguata efficacia. Contrariamente all'applicazione della sola solarizzazione, pertanto, la applicazione di Never permette di ridurre significativamente il periodo di copertura del terreno, limitando l'interruzione di coltivazione. La combinazione di Never con il trattamento di solarizzazione, però, appare determinante, visto che l'impiego di tale matrice organica con temperature del terreno inferiori a 30-35°C a 15 cm di profondità, non permette di ottenere una adeguata e sufficiente riduzione della vitalità di funghi patogeni tellurici, come dimostrato da uno specifico studio condotto sempre nelle condizioni operative sopra descritte, ma con temperature medie del terreno a 15 cm non superiori a 25°C (dati non riportati).

LAVORI CITATI

Agrios G., 2005. *Plant Pathology* 5th edition. Academic press. 952.

Masago H., Yoshikawa M., Fukada M., Nakanishi N., 1977. Selective Inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology,* 67. 425-428.

Komada H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of Fusarium oxysporum from natural soil. *Rev Plant Prot Res.,* 8.114–124.

Strauss S.L., Kluepfel D.A., 2015. Anaerobic soil disinfestation: a chemical-independent approach to pre-plant control of plant pathogens. *Journal of Integrative Agriculture*, 14 (11), 2309–2318.