

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"



Dipartimento di Agraria

DOTTORATO DI RICERCA IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

XXVI CICLO

INDIRIZZO: PATOLOGIA VEGETALE

---

***Fattori di controllo della Fungistasi:  
Il ruolo della Sostanza Organica e  
della Microflora Tellurica***

**TUTOR: Ch.mo Prof. Astolfo Zoina**

**CO-TUTOR: Dott. Giuliano Bonanomi**

**COORDINATORE: Ch.mo Prof. Domenico Carputo**

**DOTTORANDO  
Dott. Salvatore Agostino Gaglione**

---

2011 - 2014

## ABSTRACT

Soilborne plant pathogens are among the most important limiting factors for the productivity of agro-ecosystems. Identifying reliable and effective control methods is crucial for efficient biological control. Soil fungistasis is the capability of soils to inhibit the germination and growth of soil-borne fungi in presence of optimal abiotic conditions. The first aim of this PhD thesis was to clarify the relationships between soil amendments with plant residues spanning a wide range of biochemical quality with soil fungistasis. Microcosms experiments were performed with 42 different plant residues and the effect on soil fungistasis was assessed by using four different fungi (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Pyrenochaeta lycoperici* and *Trichoderma harzianum*). We measured soil respiration and soil enzymatic activity and compared classic litter proximate chemical analysis with  $^{13}\text{C}$ -CPMAS NMR spectroscopy to define plant residues biochemistry. Results showed that the quality of organic amendments is a major controlling factor of soil fungistasis. The dramatic relief of soil fungistasis when soil was amended with lignin poor, but labile carbon rich, substrates gives strong support to the competition-based hypothesis. The positive correlation between soil respiration and fungal growth further supports the competition hypothesis. Finally,  $^{13}\text{C}$ -CPMAS NMR results showed clear-cut relationships between soil fungistasis and the biochemical quality of plant residues, and provided a quantitative assessment of the time required for fungistasis restoration after organic materials application.

The second aim of this work was to assess the effects of different soil amendment histories, in terms of amendment types and amounts, on fungistasis. The few studies concerning the history of soil amendment pointed out its effect on basic soil functions such as respiration, enzymatic activities, carbon and nitrogen mineralization. Previous studies demonstrated that soils with a long-term (i.e. months to years) application history of organic amendments, compared with unamended

soils, have a higher and more active microbial biomass and enhanced enzymatic activities. It is not known however, because of the lack of experimental evidences, whether and how a history of organic amendments affects fungistasis. The aforementioned considerations about basic soil processes and soil amendment history drove the hypothesis to us that training a soil with organic carbon, by stimulating the activity of the resident microbial community can positively affect soil fungistasis. With this background, aim of this study was to assess the effects of different soil amendment histories on fungistasis in terms of amendment types and amounts. For this purpose microcosm experiments were performed by training a soil with different amounts and types of organic sources covering a wide range of biochemical qualities (glucose, alfalfa and wheat straw). Thereafter, the fungistasis response was assessed by using four different fungi (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Pyrenochaeta lycoperici* and *Trichoderma harzianum*). Trained soils were characterized for microbial activity (respiration) and functional diversity by the BIOLOG EcoPlates™ method. Results showed that, irrespectively of fungal species and amendment types, frequent supplies of organic C reduce fungistasis relief (i.e. increase fungistasis resistance to organic matter pulse) as well as the time required for fungistasis restoration (i.e. increase fungistasis resilience). Moreover, the frequent addition of organic carbon as a result of the continuous supply of easily decomposable organic compounds enhance soil respiration and its specific catabolic capabilities. In conclusion, organic amendment applications create a soil functionally distinct from its not amended counterpart, with greatly enhanced fungistasis resistance and resilience.

Finally, the third aim of this work was to provide the first monitor of soil fungistasis in the Campania Region. Soil quality, especially in the presence of reduced organic inputs, degrades in a few years with the following negative effects: the increased incidence of soil-borne pathogens, the traditional chemical methods loses its effectiveness for the development of strains resistant to fungicides, the

efficiency of the fertilizer use is lowered, and the soil food webs become simplified. In order to mitigate these effects is necessary to test innovative farming techniques. In both biological and conventional agriculture, to the recovery of the quality of the soils, it has been proposed to use organic amendments. In this context, the aim of this work was to assess the level of fungistasis in different soils sampled in the Campania Region, from both agro-ecosystems and natural ecosystems. In general, we wanted to assess the combined effect of soil type and a different management on fungistasis. To this end, the analysis included a wide spectrum of types of soils to better understand the relationships between physico - chemical-microbiological characteristics of soils and their fungistatic activity. Since the quality of the soil depends on multiple factors, and the same fungistasis is dependent on several processes and properties of the soil system, in order to evaluate the power fungistatic of soils sampled and to differentiate them according to their ability to induce or less fungistasis and thus inhibit or slow the development of soil-borne fungi, it is necessary to measure a variety of parameters, chemical, physical, biological and microbiological processes. In this multidisciplinary study were compared 12 different soils from different ecosystems and collected in different geographical areas of the Campania Region. Each soil has been subjected to chemical, physical, microbiological, enzymatic analysis, fungistasis assessment with three fungi (*Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Trichoderma harzianum*). The hypothesis to be tested was that soils with higher organic matter content and higher microbial activity showed higher levels of fungistasis. Contrary to the initial hypothesis there was no evidence correlation between microbial biomass and fungistasis, but for the metabolic profile of the telluric microorganisms. The monitoring showed that there are significant differences in the fungistatic power of the different soils, it allows us to classify soils on the basis of their ability to inhibit or slow the development of soil-borne fungi.

# INDICE

## Capitolo 1

### Introduzione

1.1	La fungistasi	4
1.2	I suoli soppressivi	8
1.3	Obiettivi della tesi	13
1.4	Referenze citate	14

## Capitolo 2

### Fungistasi e Sostanza Organica

2.1	<b>Introduzione</b>	20
2.2	<b>Materiali e Metodi</b>	24
2.2.1	Raccolta di lettiera, esperimento di decomposizione e analisi chimiche	24
2.2.2	Saggio per verificare le variazioni della fungistasi del suolo	26
2.2.3	Analisi dei dati	29
2.3	<b>Risultati</b>	30
2.3.1	Risposta della fungistasi in seguito ad ammendamento del suolo	30
2.3.2	Relazioni tra la perdita di fungistasi, respirazione del suolo ed attività enzimatica (FDA)	34
2.3.3	Relazioni tra rilascio di fungistasi e qualità biochimica dei substrati	36
2.4	<b>Discussione</b>	39
2.5	Referenze citate	49

## **Capitolo 3**

### **Effetto della “storia” del suolo sulla fungistasi: incremento della resilienza ed esaltazione dell’attività microbica del suolo**

<b>3.1</b>	<b>Introduzione</b>	53
<b>3.2</b>	<b>Materiali e Metodi</b>	58
3.2.1	Ammendanti organici	58
3.2.2	Generazione delle “storie – suolo”	59
3.2.3	Saggio per la valutazione della fungistasi del suolo	62
3.2.4	Analisi del suolo	64
3.2.5	Analisi dei dati	65
<b>3.3</b>	<b>Risultati</b>	65
3.3.1	L’effetto della storia del suolo sulla fungistasi	65
3.3.2	Storia del suolo, respirazione e diversità microbica funzionale	72
<b>3.4</b>	<b>Discussione</b>	78
<b>3.5</b>	<b>Conclusioni</b>	83
<b>3.6</b>	<b>Referenze citate</b>	84

## **Capitolo 4**

### **Monitoraggio della fungistasi in dodici suoli della Regione Campania**

<b>4.1</b>	<b>Introduzione</b>	89
<b>4.2</b>	<b>Materiali e Metodi</b>	92
4.2.1	Selezione, campionamento e analisi dei suoli	92
4.2.2	Analisi fisico – chimiche	94

4.2.3	Analisi microbiologiche	95
4.2.4	Biosaggio per la valutazione della fungistasi del suolo	97
4.2.5	Biosaggi con <i>Lactuca sativa</i> e <i>Beta vulgaris</i>	98
4.3	<b>Risultati</b>	99
4.3.1	Caratteristiche fisico – chimiche e microbiologiche dei suoli	99
4.3.2	Risposta della fungistasi in seguito ad ammendamento dei suoli	114
4.3.3	Crescita di <i>Lactuca sativa</i> e <i>Beta vulgaris</i>	119
4.4	<b>Discussione</b>	120
4.5	Referenze citate	122

# Capitolo 1 Introduzione

## La fungistasi

### 1.1. La fungistasi

Il termine fungistasi, spesso indicato anche come micostasi, è stato utilizzato per la prima volta da [Dobbs e Hinson](#) nel 1953 per indicare la diffusa capacità dei suoli di inibire la germinazione delle spore fungine o la crescita delle ife. In letteratura si ritrovano diverse definizioni di fungistasi, legate principalmente al tipo di struttura fungina cui si riferiscono. [Watson & Ford](#) (1972) definirono la fungistasi come il fenomeno secondo il quale, anche a condizioni favorevoli di temperatura e umidità del suolo, i propaguli vitali di un fungo non soggetti a dormienza endogena o costitutiva, non germinano oppure la crescita delle ife fungine è rallentata o bloccata.





La fungistasi è anche considerata una dormienza esogena delle spore ed è molto frequente nel terreno, ma è presente anche sulle superfici fogliari ([Blakeman, 1981](#)). La fungistasi è un fenomeno indotto dall'attività antagonistica attraverso l'antibiosi e la competizione da parte dei microrganismi. Le spore spesso non riescono a germinare negli strati superficiali del terreno, dove la popolazione microbica è elevata, mentre germinano in terreno sterilizzato o in zone sub-superficiali caratterizzate da bassa attività microbica. La germinazione può venir bloccata anche in terreno sterilizzato, qualora lo stesso sia stato ricolonizzato da microorganismi, e persino un singolo organismo, di tipo diverso a seconda dei casi, è capace di ristabilire la soppressione. Si pensa che la fungistasi sia dovuta alla competizione nutrizionale, oppure da metaboliti microbici generici, ma non da antibiotici specifici. Tuttavia le prove più evidenti indicano nella competizione nutrizionale la componente chiave della fungistasi. Secondo questa ipotesi ([Lockwood, 1977](#)), anche le spore capaci di germinare in acqua vengono inibite nel



terreno in quanto, durante il processo di idratazione, rilasciano nutrienti nell'ambiente immediatamente circostante e questi nutrienti vengono metabolizzati rapidamente ed in modo continuo da altri microorganismi. Uno dei migliori esempi documentati riguarda la competizione per il carbonio organico tra le forme patogene e quelle non patogene di *Fusarium oxysporum* (Fravel et al., 2003).

La fungistasi è stata ampiamente studiata negli anni '60 e '70 (es. Papavizas, 1968; Lewis & Papavizas, 1977) come revisionato da Lockwood (1977). Le ricerche condotte negli anni '60 e '70 erano focalizzate nello studio dei meccanismi della fungistasi e sull'effetto dell'ammendamento organico (revisione in Bonanomi et al., 2007). In seguito, la fungistasi ha ricevuto meno attenzione poiché gli studi si sono concentrati sul possibile utilizzo di microrganismi benefici per il controllo dei fitopatogeni e sullo studio dei substrati e dei suoli soppressivi (Hoitink & Boehm, 1999; Mazzola, 2002; Weller et al., 2002; Harman et al., 2004; Borneman & Becker, 2007). Comunque, poiché tali strategie di biocontrollo hanno spesso portato a risultati inconsistenti nella loro applicazione pratica (Whipps 1997), negli ultimi anni l'interesse per la fungistasi è nuovamente cresciuto (Bonanomi et al., 2010; Garbeva et al., 2011). Tale rinnovato interesse per la fungistasi è in parte legato alla crescente sensibilità verso il concetto di "sostenibilità" delle attività agricole.

In gran parte degli studi la fungistasi è stata quantificata monitorando la germinazione delle spore (Alabouvette et al., 2006). Comunemente le spore vengono incubate direttamente nel suolo o in substrati che sono stati in contatto costante o temporaneo con il suolo. Dopo un periodo di incubazione, la percentuale di spore germinate e/o la crescita ifale sono determinate microscopicamente. Questo semplice metodo è tuttora in uso (Alabouvette et al., 2006).

	Germinazione di spore	Crescita ifale
A substrato sterile senza nutrienti		
B suolo naturale con microrganismi		

**Figura 3.1** La germinazione delle spore fungine e la crescita ifale sono inibite in substrati dove la precedente presenza di microrganismi attivi ha ridotto la disponibilità di risorse trofiche e/o ha prodotto metaboliti con attività fungitossica. La fungistasi del suolo può quindi essere determinata dalla carenza di nutrienti e/o di sostanza organica o dalla produzione di sostanze fungitossiche da parte dei microrganismi (modificato da [Garbeva et al., 2011](#)).

[Dobbs & Hinson \(1953\)](#) attribuirono la fungistasi alla presenza di composti fungitossici di origine microbica, e questo concetto fu in seguito supportato da altri studi ([Garbeva et al., 2011](#)). Tali sostanze ad azione antifungina possono essere prodotte dal metabolismo secondario dei numerosi microrganismi tellurici e possono essere volatili oppure solubili, organiche e/o inorganiche ([Xu et al., 2004](#)). Il ruolo degli inibitori nell'indurre la fungistasi è stato però messo in discussione da [Lockwood e colleghi \(Lockwood & Lingappa, 1963; Lockwood, 1977; Lockwood, 1990\)](#) i quali affermarono che la competizione per i nutrienti e i composti organici è la causa principale nel determinare il fenomeno della fungistasi. [Lockwood](#) contestò la teoria degli inibitori principalmente a seguito delle seguenti osservazioni:

- i) la fungistasi si riduce temporaneamente a seguito dell'aggiunta di sostanze nutritive (sostanze organiche facilmente decomponibili) a suoli non sterili;
- ii) esiste una relazione inversa tra la grandezza dei propaguli fungini (legati alla quantità di nutrienti presenti all'interno dei propaguli) e la loro

sensibilità alla fungistasi;

iii) la sensibilità alla fungistasi aumenta quando si creano delle condizioni artificiali di sottrazione dei nutrienti.

In altre parole, il fenomeno sarebbe dipendente direttamente dalla disponibilità di carbonio organico a disposizione dei propaguli fungini (Curl, 1982). Quindi, da un lato la teoria dell'inibizione sostiene che l'attività microbica produce sostanze inibitorie che impediscono lo sviluppo fungino. Dall'altro canto la teoria della sottrazione di nutrienti afferma che la riduzione delle sostanze nutritive limita la germinazione fungina o la crescita ifale. Probabilmente, in natura il fenomeno della fungistasi è indotto da entrambi i fattori contemporaneamente, sebbene la loro relativa importanza può variare con le condizioni ecologiche e pedologiche.

Un altro fattore agronomico in grado di influenzare la fungistasi del suolo è l'applicazione di sostanza organica (Papavizas, 1968). Alcuni studi indicano che il diverso grado di decomposizione della sostanza organica può limitare la disponibilità di risorse e di conseguenza influenzare il fenomeno. Tenendo conto dei dati presenti in letteratura (revisione in Bonanomi et al., 2007), emerge che l'utilizzo di sostanza organica può essere uno strumento utile per indurre condizioni di fungistasi nei suoli. Risulta altresì necessario ricordare il duplice e contrastante effetto dell'ammendamento organico: negativo nel breve periodo e positivo nel lungo periodo. In un recente studio (Bonanomi et al., 2013) è stato rilevato che il lasso temporale entro il quale l'ammendamento del suolo con sostanza organica determina la perdita della fungistasi varia fra 3 e 10 giorni, in funzione dell'ammendante utilizzato ma soprattutto della specie di fungo considerata. In particolare, la fungistasi era rapidamente eliminata per *Botrytis cinerea*, *Mucor* sp. e *Trichoderma harzianum*. E' possibile quindi affermare, coerentemente con quanto riportato in letteratura (Papavizas, 1968; Lockwood, 1977), che l'apporto di sostanza organica nel breve periodo determina la riduzione della fungistasi. In base

a tali considerazioni, appare paradossale proporre l'utilizzo di sostanza organica per indurre soppressività nei suoli, in quanto questa tecnica ha l'effetto contrario. Analizzando però come l'ammendamento influenza la fungistasi nel medio -lungo periodo, dell'ordine di grandezza delle settimane, si rilevava un effetto opposto. Infatti, risultava chiaro che la fungistasi veniva ad essere indotta per *B. cinerea*, *Mucor* sp. e *T. harzianum* dopo 7-30 giorni dall'ammendamento. Non solo, dai dati relativi alla germinazione e alla crescita ifale nei trattamenti con aggiunta di sostanza organica la fungistasi era indotta a livelli superiori rispetto a quelli del substrato di controllo non ammendato. Questo indica la necessità di individuare parametri chimici, biochimici o microbici in grado di identificare con certezza se il suolo si trova in condizioni di fungistasi o meno, a seguito dell'ammendamento organico.

## **1.2. I suoli soppressivi**

In numerosi agro-ecosistemi è stata osservata la naturale capacità dei suoli di limitare lo sviluppo di malattie fungine indotte da patogeni tellurici di rilevante interesse agrario ([Janvier et al., 2007](#)). I suoli dotati di tali caratteristiche sono indicati come soppressivi e sono definiti come “i suoli dove il patogeno non attecchisce, non persiste, oppure attecchisce ma causa danni molto limitati” ([Baker & Cook, 1974](#)). Un'altra definizione indica come soppressivi i suoli in cui si realizza la soppressione dei patogeni grazie alla presenza di una microflora nativa caratterizzata da un'elevata biodiversità e attività biologica. Viceversa, i suoli conducivi sono quelli in cui la malattia riesce a svilupparsi velocemente producendo così elevati danni alle colture. Difatti, tutti i suoli possiedono un certo potenziale di soppressività e tale proprietà è dimostrata dalla maggiore virulenza dei patogeni a seguito della sterilizzazione del suolo rispetto ai suoli non trattati

(Weller et al., 2002; Termorshuizen & Jeger, 2008). In termini generali, la soppressività naturale è conferita dall'attività della comunità microbica residente nel suolo e da specifiche combinazioni di fattori chimici e fisici del suolo. I suoli soppressivi indubbiamente devono la loro attività ad una combinazione di fattori fisici, chimici e microbiologici. Sono stati descritti suoli soppressivi per molti patogeni terricoli come *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Aphanomyces euteiches*, *Thielaviopsis basicola*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium splendens*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Streptomyces scabies* e *Plasmodiophora brassicae* (revisione in Hoitink e Boehm, 1999; Weller et al., 2002; Bonanomi et al., 2007; Janvier et al., 2007).

In relazione ai fattori biologici coinvolti nel controllo dei patogeni, i suoli soppressivi probabilmente sono il miglior esempio in cui la microflora nativa protegge effettivamente l'organismo vegetale dall'attacco dei patogeni tellurici. La soppressività appare chiara perché l'incidenza delle malattie è nettamente inferiore a quella degli stessi suoli sottoposti a trattamenti di sterilizzazione, che ne limitano le attività biologiche intrinseche. In altre parole, la soppressività del suolo è determinata dall'attività della biomassa microbica totale e alla sua biodiversità. È quindi importante precisare che la soppressività spesso non è solitamente imputabile ad un singolo microrganismo (Baker & Cook, 1974). L'importanza della microflora tellurica nel determinare la soppressività del suolo è dimostrata attraverso varie tecniche. Ad esempio la misura dell'attività enzimatica idrolitica complessiva, che è una stima dell'attività microbica totale, viene spesso utilizzata come indice della soppressività verso *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* ed altri patogeni. Un'ulteriore strategia utilizzata per determinare le basi microbiologiche della soppressività prevede di:

- Determinare quali fattori abiotici riducono o eliminano la soppressività. Comunemente la soppressività viene eliminata dalla sterilizzazione con

raggi gamma o attraverso trattamenti termici intensi (trattamento in autoclave; +121 °C per 20 minuti). Differentemente, le fumigazioni o la pastorizzazione (+60 °C per 30 minuti) ne riducono l'intensità ma non la eliminano completamente

- Verificare il coinvolgimento della microflora nella soppressività attraverso il trasferimento di una piccola aliquota (1-10%) di suolo soppressivo in un suolo conduttivo. Il ruolo della microflora è dimostrato, quando il suolo conduttivo diviene soppressivo a seguito dell'aggiunta della nuova comunità microbica.

Diversi studi hanno analizzato la relazione tra la composizione della comunità microbica del suolo e la soppressione di malattie causate da specifici patogeni tellurici (*soppressività specifica*) (Mazzola & Gu, 2002; Borneman & Becker, 2007). Alcune specie batteriche e fungine afferenti a diversi generi quali (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Streptomyces*, e *Trichoderma*, *Penicillium*, *Gliocladium*, *Sporidesmium*, *Fusarium* spp. non patogeni) sono state identificate come antagoniste di uno o più patogeni tellurici (Berg et al., 2002; Cotxarrera et al., 2002; Garbeva et al., 2004). La soppressività specifica è stata spesso legata alla produzione di antibiotici che agiscono contro i patogeni o alla sovrapposizione delle nicchie ecologiche tra gli antagonisti e i patogeni rispetto alla preferenza di substrati o micro-habitat (es. siti d'infezione sulle radici) (Mazurier et al., 2009). Al contrario, le interazioni antagonistiche specifiche non sono considerate come una componente della fungistasi. Comunque, studi recenti indicano che potrebbero esserci delle differenze nel contributo che i differenti microrganismi apportano nel determinare la fungistasi e la soppressività dei suoli. In questa direzione esistono due linee di ricerca, cioè esperimenti di laboratorio che utilizzano le comunità microbiche e studi di campo che correlano la composizione

della comunità microbica del suolo con la fungistasi e la soppressività (Garbeva et al., 2011). Per esempio, De Boer et al. (2003) hanno indotto variazioni nella comunità microbica del suolo tramite sterilizzazione parziale e applicazione di ammendanti organici. Tali fattori hanno poi comportato una modifica dei livelli di fungistasi nei confronti di diversi funghi tellurici. Per poter indagare se la composizione della comunità microbica influisce sulla fungistasi anche in condizioni naturali è necessario selezionare situazioni di campo in cui non è attesa alcuna inibizione legata a fattori abiotici. Per esempio, la crescita ifale di *Trichoderma harzianum* in suoli di praterie di dune costiere è risultato inversamente correlato col il pH del suolo (De Boer et al., 2003) e quindi l'effetto fungistatico potrebbe essere confuso con il pH. Garbeva et al. (2004) hanno osservato una correlazione positiva tra il livello di diversità microbica e l'inibizione dello sviluppo ifale di *Rhizoctonia solani* in suoli con una differente gestione del suolo. L'impatto delle pratiche colturali è stato osservato anche sulla presenza di batteri dei generi *Bacillus* e *Pseudomonas* con una chiara correlazione negativa tra la crescita ifale di *R. solani* e la diversità di questi gruppi microbici. Una correlazione positiva tra la diversità microbica e soppressività è stata riscontrata in alcuni studi (Benitez et al. 2007; Postma et al. 2008), ma è bene ricordare che altri lavori hanno riportato correlazioni non significative tra queste due variabili (Bonanomi et al., 2011a). La correlazione tra diversità microbica e la fungistasi potrebbe dipendere da interazioni sinergiche come quelle tra popolazioni che producono metaboliti secondari tossici, oppure ad una maggiore efficienza collettiva nella rimozione dei nutrienti (Garbeva et al., 2011).

Esistono diverse evidenze empiriche a supporto del fatto che la struttura delle comunità microbiche, lo loro l'attività e la loro diversità influiscono in maniera determinante sulla soppressività e la fungistasi del suolo. Ne consegue che le attività di gestione del suolo che influenzano la composizione della comunità

microbica, come le rotazioni, le consociazioni, gli ammendamenti organici possono modificare l'intensità della fungistasi e la generale soppressione delle malattie (Bailey & Lazarovits, 2003; Termorshuizen et al., 2007; Janvier et al., 2007). Oltre alla composizione della comunità microbica, anche le interazioni all'interno della comunità possono svolgere un ruolo significativo nella fungistasi del suolo. Per esempio, de Boer et al., (2007) hanno dimostrato che isolati batterici non antagonisti quando erano coltivati insieme producevano consorzi microbici altamente soppressivi. In questo studio, una miscelanza di isolati batteri tellurici (*Brevundimonas* sp., *Luteibacter* sp., *Pedobacter* sp. e *Pseudomonas* sp.) cresciuti in consorzio in condizioni di carbonio organico limitante inibiva fortemente la crescita di due funghi patogeni come *Rhizoctonia solani* e *Fusarium culmorum* ed un fungo micoparassitico/saprofitico (*Trichoderma harzianum*). Tuttavia, questa inibizione non veniva rilevata per le monoculture degli stessi batteri. In seguito, è risultato chiaro che le interazioni competitive interspecifiche innescano la produzione di antibiotici a largo spettro con un effetto inibitorio sui funghi (Garbeva & de Boer, 2009). Questo risultato suggerisce che molti ceppi che, sulla base di saggi condotti utilizzando singoli isolati, erano creduti inefficaci nella soppressione alle malattie fungine ricoprono in realtà un ruolo potenzialmente importante. Inoltre, noti batteri produttori di antibiotici possono intensificare la loro produzione di sostanze inibitorie quando sono coinvolti in interazioni interspecifiche (Dubuis et al., 2007; Mazurier et al., 2009). La maggiore resistenza e resilienza alle perturbazioni ambientali potrebbe essere determinata dalla complementarità funzionale, fenomeno importante soprattutto nello svolgere processi complessi come la decomposizione della sostanza organica (Brenner et al., 2008)

E' necessario sottolineare che, nonostante i progressi verso la comprensione dei meccanismi su cui si basa la soppressività, notevoli sono state le difficoltà



nell'applicazione delle conoscenze acquisite. Dall'insieme di queste conoscenze si evince anche che la soppressività e la fungistasi sono fenomeni influenzati dalla composizione e dalla diversità delle comunità microbiche.

Gli esperimenti condotti in microcosmi caratterizzati da ricchezza di specie crescente è, ovviamente, solo un primo approccio allo studio delle relazioni fra biodiversità tellurica e la fungistasi. Nonostante ciò molto scarsi sono gli studi che hanno indagato esplicitamente l'effetto della diversità microbica sulla fungistasi. In particolare in letteratura è presente un solo studio che ha valutato come la fungistasi dei suoli variava lungo un gradiente di diversità microbica indotto attraverso trattamenti termici (Wu et al., 2008).

### **1.3. Obiettivi dello studio**

Lo studio aveva come obiettivo generale di indagare la relazione tra la qualità biochimica dei materiali organici impiegati come ammendanti e la fungistasi del suoli, e di comprendere meglio l'importanza del ruolo della sostanza organica e della microflora tellurica, come fattori di controllo della fungistasi nel suolo. A tale fine è stata descritta la dinamica della fungistasi, in seguito ad ammendamenti con differenti residui vegetali a diverso grado di decomposizione, a diverse dosi e tempi di somministrazione. La relazione tra la qualità biochimica dei materiali organici e la fungistasi è stata studiata utilizzando 4 specie fungine: *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, *Pyrenochaeta lycopersici* e *Botrytis cinerea*, e comparando le correlazioni tra le proprietà fisico-chimiche e microbiologiche dei suoli e la perdita di fungistasi.

Infine è stato effettuato un monitoraggio della fungistasi in diversi suoli della Regione Campania volto a identificare meglio le relazioni tra questa proprietà e le caratteristiche fisico-chimiche e biologiche dei suoli.

Il progetto di ricerca si articola in tre argomenti integrati tra loro che analizzano i seguenti aspetti ( vedi i tre capitoli).

#### 1.4. Referenze citate

- Alabouvette, C., Raaijmakers, J.M., De Boer, W., Notz, R., Defago, G., Steinberg, C., Lemanceau, P., 2006. Concept and methods to assess the phytosanitary quality of soils. In: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, Wallingford 257-269.
- Bailey, K.L., Lazarovits, G., 2003. Suppressing soil-borne diseases with residues management and organic amendments. *Soil & Tillage Research* 72: 169-180.
- Baker, K.F., Cook, R.J., 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. Freeman, San Francisco, CA, USA.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., Smalla, K., 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied & Environmental Microbiology* 68: 3328-3338.
- Blakeman, J.P., 1981. *Microbial Ecology of the Phylloplane*. Academic Press, London.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., Scala, F. 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology* 89: 311-340.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 136-144.
- Bonanomi, G., D'Ascoli, R., Antignani, V., Capodilupo, M., Cozzolino, L., Marzaioli, R., Puopolo, G., Rutigliano, F.A., Scelza, R., Scotti, R., Rao, M.A., Zoina A., 2011a. Assessing soil quality under intensive cultivation and tree orchards in Southern Italy. *Applied Soil Ecology* 47: 184-194

- Bonanomi, G., Incerti, G., Giannino, F., Mingo, A., Lanzotti, V., Mazzoleni, S., 2013. Litter quality assessed by solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy predicts decay rate better than C/N and Lignin/N ratios. *Soil Biol. Biochem.* 56, 40-48.
- Borneman, J., Becker, J.O., 2007. Identifying microorganisms involved in specific pathogen suppression in soil. *Annual Review of Phytopathology* 45: 153-172.
- Brenner, K., You, L., Arnold, F.H., 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* 26: 483-489.
- Cotxarrera, L., Trillas-Gay, M.I., Steinberg, C., Alabouvette, C., 2002. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 467-476.
- Curl, E.A., 1982 The rizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. *Plant disease* 66: 624-630.
- De Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 835-844.
- Dobbs, C.G., Gash, M.J., 1965 Microbial and residual mycostasis in soils. *Nature* 207: 1354-1356.
- Dobbs, C.G., Hinson, W.H., 1953. A widespread fungistasis in soil. *Nature* 172: 197-199.
- Dubuis C., Keel C., Haas D., 2007. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads. *European Journal of Plant Pathology* 119: 311-328.
- Fravel, D., Olivian, C., Alabouvette, C., 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157: 493-502.
- Garbeva, P., de Boer, W., 2009. Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression. *Microbial Ecology* 58: 36-46.

- Garbeva, P., Gera, W.H., Termorshuizen, A.J, Kowalchuk, G.A., de Boer, W., 2011. Fungistasis and general soil biostasis - A new synthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 469-477.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2004. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 51-64.
- Harman, E., Howell, R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review* 2: 43-56.
- Hoitink, H.A.J., Boehm M.J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37: 427-446.
- Janvier, C., Villeneuve, F., Alabouvette, C., Edel-Hermann, V., Mateille, T., Steinberg, C., 2007. Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1-23.
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C., 1977. Effect of plant residues on chlamydospore germination of *Fusarium solani* f. sp. phaseoli and on *Fusarium* root rot of beans *Phytopathology* 67: 925-929.
- Lockwood, J.L. 1977. Fungistasis in soils. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 52: 1-43.
- Lockwood, J.L., 1990. Relation of energy stress to behaviour of soilborne plant pathogens and to disease development. In D. Hornby (Ed.), *Biological Control of Soilborne Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford, U.K., pp. 197–214.
- Lockwood, J.L., Lingappa, B.T., 1963. Fungitoxicity of sterilized soil inoculated with soil microflora. *Phytopathology* 58: 917-920.

- Mazurier, S., Corberand, T., Lemanceau, P., Raaijmakers J.M., 2009. Phenazine antibiotics produced by fluorescent pseudomonads contribute to natural soil suppressiveness to Fusarium wilt. *ISME Journal* 3: 977-991.
- Mazzola, M., 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:557-564.
- Mazzola, M., Gu, Y.H., 2002. Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-5 and AG-8. *Phytopathology* 92: 1300-1307.
- Papavizas, G.C., 1968. Survival of root-infecting fungi in soil. IV. Effect of amendments on bean root rot caused by *Thielaviopsis basicola* and on inoculum density of the causal organism. *Phytopathology* 58: 421-428.
- Termorshuizen, A.J., Jeger, M.J., 2008. Strategies of soilborne plant pathogenic fungi in relation to disease suppression. *Fungal Ecology* 1: 108-114.
- Termorshuizen, A.J., van Rijn, E., van der Gaag, D.J., Alabouvette, C., Chen, Y., Lagerlöf, J., Malandrakis, A.A., Paplomatas, E.J., Rämert, B., Ryckeboer, J., Steinberg, C., Zmora-Nahum, S., 2007. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2461-2477.
- Watson, A.G., Ford, E.J., 1972. Soil fungistasis e a reappraisal. *Annual Review of Phytopathology* 10: 327.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B.M, Thomashow, L.S., 2002. Microbial population responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40: 309-349.
- Whipps, J.M., 1997. Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 1-84.
- Wu, M., Zhang, H., Li, X., Zhang, Y., Su, Z., Zhang, C., 2008. Soil fungistasis and its relations to soil microbial composition and diversity: A case study of a

series of soils with different fungistasis. *Journal of Environmental Sciences* 20: 871-877.

Xu, C.K., Mo, M.H., Zhang, L.M., Zhang, K.Q., 2004. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1997-2004.

## Capitolo 2

### Fungistasi e Sostanza Organica

#### 2.1. Introduzione

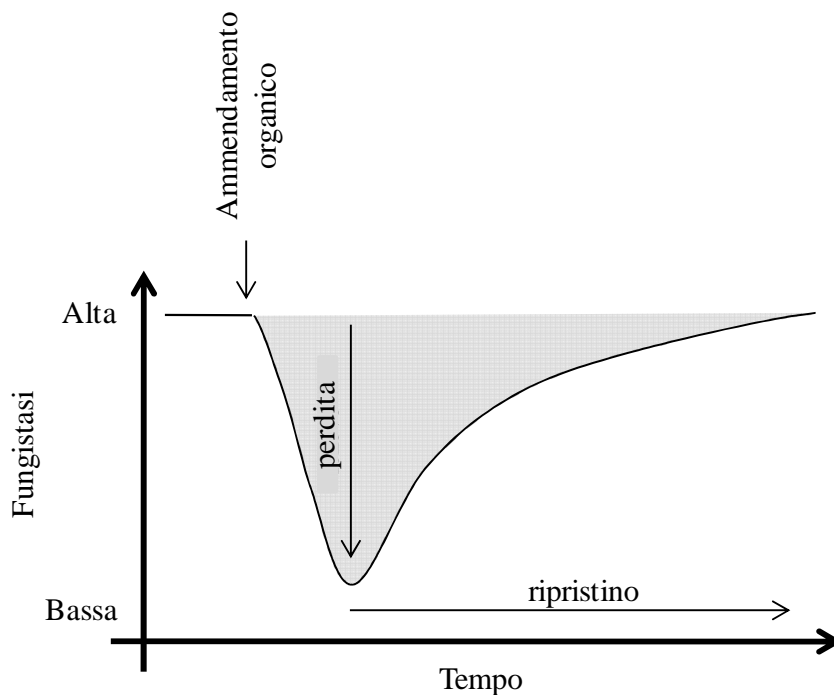
I patogeni terricoli delle piante rappresentano uno dei principali fattori limitanti la produttività degli agro-ecosistemi. Tali microbi sono spesso difficili da controllare con i metodi convenzionali come l'uso di fungicidi e di varietà di colture resistenti. Il divieto del bromuro di metile così come di altri fumiganti del suolo ([Martin, 2003](#)) ha promosso la ricerca di metodi di controllo alternativi, affidabili ed efficaci. Nell'ecosistema suolo, la comprensione dei fattori che limitano la diffusione delle specie microbiche risulta cruciale per un efficace controllo biologico dei patogeni delle piante.

La fungistasi del suolo rappresenta la capacità del suolo di inibire la germinazione e la crescita dei funghi terricoli anche in presenza di condizioni climatiche ottimali per questi ultimi (per esempio temperatura, umidità, pH, potenziale redox etc) ([Lockwood, 1977](#)). Tradizionalmente, per spiegare l'andamento della fungistasi nel suolo sono state proposte due ipotesi differenti. La perdita di fungistasi può essere indotta dalla presenza di metaboliti secondari ad attività antifungina ([Berendsen et al., 2012](#)), inclusi composti volatili. La dinamica della fungistasi del suolo è indissolubilmente legata al progressivo esaurimento di composti di carbonio organico labili e di nutrienti, dovuto all'intensa competizione tra i microrganismi del suolo ([Steiner and Lockwood, 1970](#)).

L'ammendamento del suolo con substrati organici semplici come zuccheri, amminoacidi e differenti tipi di residui vegetali, determinano la temporanea perdita della fungistasi, come ad esempio avviene per le spore di numerosi funghi, che germinano abbondantemente subito dopo l'ammendamento organico; infatti queste evidenze supportano l'ipotesi della competizione per composti di carbonio labile.



In questo contesto, molti studi suggeriscono che la manipolazione della fungistasi del suolo risulta essere un meccanismo critico nel limitare l'invasione del suolo ad opera di microrganismi patogeni e conseguentemente un potenziale strumento per il controllo biologico dei patogeni delle piante (Garbeva et al., 2011). Comunque, la maggior parte degli studi disponibili in letteratura sono focalizzati sulla sensibilità di vari funghi (Lockwood, 1977), sull'intensità della fungistasi in diversi tipi di suoli (Xu et al., 2004), sul ruolo dei composti antifungini volatili (Zou et al., 2007) e sulle relazioni tra composizione e diversità microbica del suolo e la fungistasi (de Boer et al., 2003; Wu et al., 2008). In letteratura, solo pochi studi hanno investigato l'influenza della qualità della sostanza organica sulla fungistasi. Papaviz e co – autori ad esempio, hanno riportato un effetto variabile dell'ammendamento del suolo con residui vegetali sul rapporto C/N, sul rapporto L/N così come sul contenuto in zuccheri, cellulosa e lignina (Papavizas, 1968; Lewis and Papavizas, 1977). In termini generali la qualità biochimica del carbonio organico (C), può influenzare la fungistasi del suolo sia in termini di intensità del suo rilascio, (perdita), che di tempo necessario al ripristino di tale proprietà del suolo, in seguito all'applicazione di ammendanti organici (Fig. 1).



**Fig. 1.** Illustrazione schematica delle risposte delle dinamiche di fungistasi, in seguito ad ammendamento del suolo. Subito dopo l'applicazione di materiale organico, la fungistasi viene rapidamente persa (rilascio), ma, appena la comunità microbica del suolo metabolizza i substrati organici esogeni, la fungistasi è progressivamente ripristinata.

La scarsa conoscenza di questo argomento è sorprendente dal momento che l'ammendamento del suolo con materiali organici influenza enormemente la sua capacità di controllare i patogeni delle piante (review, [Hoitink and Boehm, 1999](#); [Bonanomi et al., 2010a](#)). Una grande varietà di tipologie di composti organici sono comunemente utilizzati in agro – ecosistemi come ammendanti per il suolo incluso l'utilizzo di compost, residui di specie vegetali, torbe e rifiuti organici. Conseguentemente, il carbonio organico che raggiunge un agro – ecosistema è caratterizzato da una notevole eterogeneità delle sue qualità biochimiche. Negli

ultimi anni, nuove tecniche analitiche come la pirolisi in gascromatografia accoppiata con uno spettrometro di massa, oppure la spettroscopia all'infrarosso vicino e la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) del C<sup>13</sup>, CPMAS, sono state messe a punto per caratterizzare il materiale organico a livello molecolare. A questo riguardo la spettroscopia NMR del C<sup>13</sup>- CPMAS, ha dimostrato di essere un potente approccio sperimentale per la valutazione del livello atomico e molecolare del carbonio presente nei residui vegetali e nei materiali organici (Almendros et al., 2000). Studi precedenti hanno dimostrato che questo metodo consente una diretta e dettagliata caratterizzazione dei cambiamenti dei complessi chimici, che avvengono nei materiali organici, come ad esempio i residui vegetali, durante il processo di decomposizione (Preston et al., 2009). Inoltre, in alcuni recenti studi hanno dimostrato che, la definizione della qualità del carbonio attraverso la spettroscopia NMR, consente di predire la fitotossicità delle lettiere (residui vegetali), così come la velocità di degradazione e la stabilità della sostanza organica (Bonanomi et al., 2011a). L'obiettivo di questo studio è quello di far comprendere meglio le relazioni tra l'ammendamento del suolo con residui vegetali diversi, in modo da coprire un ampio range della qualità biochimica della sostanza organica, e la fungistasi del suolo. Per valutare l'effetto della qualità biochimica della sostanza organica sulla fungistasi del suolo, si sono allestiti dei microcosmi ( suolo + ammendanti ), con 45 diversi residui vegetali che comprendono un'ampia varietà di tipologie di sostanza organica, e la fungistasi è stata valutata mediante test di germinazione con quattro funghi bersagli: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Pyrenochaeta lycopersici* e *Trichoderma harzianum*. In conclusione, gli obiettivi specifici di questo studio sono i seguenti:

- (1) descrivere la dinamica della fungistasi del suolo in seguito ad ammendamento organico con diverse specie vegetali;
- (2) valutare la risposta di diversi funghi terricoli all'ammendamento organico;

(3) chiarire l'effetto dei residui vegetali sulla fungistasi del suolo, mediante comparazione dei metodi classici di analisi chimica con i moderni metodi di spettroscopia NMR.

## 2.2. Materiali e Metodi

### 2.2.1. Raccolta di lettiera, esperimento di decomposizione e analisi chimiche

Il presente lavoro è basato su un precedente esperimento di decomposizione di residui vegetali, mediante il metodo delle litterbag, focalizzato sullo studio degli effetti di fitotossicità e perdita di peso delle diverse lettiera, che viene qui brevemente descritto (Bonanomi et al., 2013). Sono state selezionate quattordici diverse specie vegetali, che includevano, due specie perenni (*Ampelodesmos mauritanicus*, *Festuca drymeia*), due arbusti sempre verdi (*Arbutus unedo*, *Coronilla emerus*), una vite (*Hedera helix*), tre alberi sempre verdi (*Picea excelsa*, *Pinus halepensis*, *Quercus ilex*), e sette alberi caducifolia (*Castanea sativa*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus ornus*, *Populus nigra*, *Quercus pubescens*, *Robinia pseudoacacia*, *Salix alba*), al fine di ricoprire un ampio spettro della qualità delle lettiera. Gli esperimenti di decomposizione dei suddetti residui vegetali sono stati effettuati mediante microcosmi secondo il metodo delle litterbag (Berg and McClaugherty, 2008; Bonanomi et al., 2010b). Le litterbags (sacchetti di lettiera) in terylene erano larghe (20 cm x 20 cm), con dimensione delle maglie di 2mm, sono state riempite con 6 grammi di lettiera vegetale essiccata e riposte in vassoi (100 cm x 100 cm x 30 cm). I microcosmi così costituiti erano tenuti in camera di crescita in condizioni controllate di temperatura (  $18 \pm 2$  °C di notte e  $24 \pm$  °C di giorno) e di umidità (bagnati alla capacità di campo, con acqua distillata ogni sette

giorni). Le litterbags (otto repliche), sono state campionate dopo 30 e 180 giorni di decomposizione per un totale di 224 litterbags ( 14 specie x 2 date di prelievo x 8 repliche). I sacchetti con le lettiere sono stati essiccati in laboratorio a 40 °C fino ad ottenimento di un peso costante e successivamente il materiale vegetale residuo è stato pesato. In questo modo, sono stati ottenuti 42 materiali organici (14 specie x 3 tempi di decomposizione, dopo poche ore, 30 e 180 giorni), con differenti età: residui vegetali freschi, non decomposti ( in seguito indicati come 0 giorni), e specie fogliari decomposte per 30 e 180 giorni. La qualità biochimica dei 42 materiali è stata riportata in una precedente pubblicazione (Bonanomi et al., 2013). I dati chimici dei materiali vegetali usati per gli esperimenti di decomposizione sono stati utilizzati come base per la correlazione tra la qualità biochimica delle diverse tipologie di materiali organici con la fungistasi. In pratica, i 42 materiali sono stati caratterizzati per il contenuto totale di C e N, il carbonio labile e il contenuto in cellulosa e lignina (Gessner, 2005) e i dati di spettroscopia NMR del C<sup>13</sup>- CPMAS (Bonanomi et al., 2011a). La selezione delle regioni dello spettro e l'identificazione delle tipologie di carbonio sono state effettuate in accordo ai risultati dello studio di Bonanomi et al., (2013) e di lavori precedenti (Kogel-Knabner, 2002; Mathers et al., 2007; Pane et al., 2011). Sono state considerate le seguenti sette regioni identificate per tipologia di carbonio: 0 – 45 ppm = carbonio alchilico; 46 – 60 ppm = carbonio metossilico; 61 – 90 ppm = carbonio O – alchilico; 91 – 110 ppm = di – O carbonio alchilico; 111 – 140 ppm = H – C carbonio aromatico sostituito; 141 – 160 ppm = O – carbonio aromatico sostituito (carbonio fenolico e O – arilico); 161 – 190 ppm = carbonio carbossilico. Sono stati calcolati tre indicatori dell'andamento della decomposizione della sostanza organica:

- i. Il rapporto C alchilico/ O – carbonio alchilico

- ii. Il rapporto O – carbonio alchilico/ sul carbonio metossilico e N – alchilico (Spaccini et al., 2000; Almendros et al., 2011; Mathers et al., 2007)
- iii. Il rapporto 70 – 75/52 – 57, proposto da Bonanomi et al., (2011a) che rappresenta rispettivamente il rapporto tra due regioni ristrette di carbonio O – alchilico (70 – 75 ppm) e carbonio metossilico e N – alchilico (52 – 57 ppm).

### *2.2.2. Saggio per verificare le variazioni della fungistasi del suolo*

L'effetto della tipologia di sostanza organica sulla fungistasi del suolo è stato valutato mediante microcosmi progettati per simulare l'ecosistema suolo. Le unità sperimentali consistono di contenitori Magenta con un coperchio aerato (Sigma – Aldrich, Co. LLC.) riempiti con 50 grammi di un suolo franco – sabbioso. Il suolo agricolo è stato campionato nel Maggio 2010 in un'azienda della piana del Sele (SA), setacciato a 2 mm e caratterizzato chimicamente, per maggiori dettagli vedere Bonanomi et al., (2011b). Il suolo è stato ammendato con i 42 differenti materiali organici al 2% in peso e bagnato con acqua distillata sterile fino al raggiungimento della capacità di campo. Precisamente dopo 6 ore, 1,3,5,10 e 20 giorni di incubazione a 24°C in camera di crescita, il suolo è stato campionato e congelato a -20°C fino al momento delle analisi successive. Il disegno sperimentale ha incluso 42 materiali organici, 6 date di campionamento, e 3 repliche per un totale di 756 unità sperimentali (contenitori Magenta). In aggiunta a questi altri 126 Magenta sono stati utilizzati per le analisi chimiche condotte sui microcosmi di suolo durante i 20 giorni di incubazione, per un totale di 882 contenitori. La respirazione del suolo, è stata misurata mediante incubazione di 50 grammi di suolo

asciutto in barattoli con tappo a vite, aventi capacità di 500 ml. La concentrazione di CO<sub>2</sub> nel barattolo è stata misurata col metodo alkali – trap (Alef, 1995). In pratica, 5 ml di KOH 1 N, sono stati posti all'interno di una provetta esposta per 48 ore nel microcosmo in presenza di suolo, ermeticamente chiuso, e successivamente è stata titolata con HCl 0,1 N. E' stata valutata anche l'attività microbica col metodo della fluoresceina diacetato (FDA) che misura l'attività enzimatica totale (proteasi, lipasi, esterasi - non specifiche) del suolo durante la decomposizione della sostanza organica ( Workneh et al., 1993).

Per valutare la fungistasi, sono stati preparati estratti acquosi da ogni campione dei suoli ammendati con i diversi residui vegetali; ognuno di questi campioni di estratto suolo – acqua (circa 10 gr di suolo + 10 ml di acqua sterile), è stato agitato (200 rpm), per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, le sospensioni di suolo sono state centrifugate a 2400 g per 10 minuti, ed il supernatante è stato prelevato e sterilizzato mediante microfiltrazione con filtri aventi pori di dimensioni di 0,22 µm, e successivamente conservati a -20°C per i saggi di germinazione in piastra. La fungistasi degli estratti di suolo sterili, è stata misurata valutando la crescita ifale (Alabouvette et al., 2006) di 4 funghi: *A. niger* (patogeno delle piante opportunisto e saprofita ubiquitario), *B. cinerea* (patogeno delle piante con un ampio spettro di ospiti), *P. lycopersici* (patogeno delle piante con ristretto range di ospiti) e infine *T. harzianum* (fungo ubiquitario, micoparassita e saprofita, disponibile in commercio sotto forma di formulati utilizzati per il controllo biologico in agricoltura). In esperimenti preliminari, le spore di tutti i funghi sono state saggiate per la loro capacità o meno di germinare in acqua, in modo da valutare la loro sensibilità alla fungistasi. L'incapacità di germinazione delle spore in acqua può essere considerata come un carattere positivo per lo studio dei meccanismi della fungistasi. Infatti, le spore dei funghi possono essere classificate in due gruppi: spore che germinano solo in presenza di nutrienti (es.

*Aspergillus niger*) e spore che germinano anche solo in presenza di acqua (es. *Fusarium oxysporum*), (Hsu and Lockwood, 1973; Berendsen et al., 2012).

L'inoculo fungino è stato ottenuto mediante raccolta dei propaguli vitali dei funghi (conidi) direttamente dalle piastre di germinazione, mediante aggiunta di 10 ml di acqua sterile alle colture fungine in piastra Petri cresciute su PDA (potato dextrose agar) per circa 10 giorni, e raschiando la superficie del micelio fungino con una spatola in modo da rimuovere i conidi. La sospensione acqua – spore così ottenuta è stata filtrata, centrifugata, sottoposta a doppio lavaggio con acqua sterile e portata ad una concentrazione di conidi di  $10^5 \text{ ml}^{-1}$  mediante emocitometro. La sospensione di spore utilizzate per i test di germinazione in piastra ELISA con i 4 funghi, è stata preparata in 10  $\mu\text{l}$  di acqua sterile. Gli estratti di suolo sono stati aggiunti ai 96 pozzetti della piastra ed incubati a 24°C.

Al fine di valutare se la fungistasi fosse dovuta ad una carenza di carbonio od anche alla presenza di composti ad attività antifungina, tutti gli esperimenti di crescita fungina sono stati effettuati in doppia replica con e senza aggiunta di C semplice e facilmente utilizzabile (PDB, potato dextrose broth, Oxoid) agli estratti di suolo sterili (5% in volume, nei 96 pozzetti). In questo modo è semplice comprendere che se il meccanismo della fungistasi del suolo fosse dipendente esclusivamente da una carenza di carbonio (meccanismo della competizione nutrizionale per nutrienti semplici e prontamente utilizzabili), allora l'aggiunta di una fonte nutritiva esterna come ad esempio il PDB, determinerebbe la perdita totale o parziale della fungistasi.

La crescita fungina è stata quantificata mediante spettrofotometro ( $\lambda = 590 \text{ nm}$ ) dopo 20 ore di incubazione, utilizzando il lettore Thermomax micro piastra (Molecular Devices, Wokingham, UK).



### 2.2.3. *Analisi dei dati*

Per le analisi statistiche dei risultati dei biosaggi, è stata considerata una matrice riportante la crescita di ciascun fungo sui 252 tipi di estratti di suolo (42 residui vegetali x 6 tempi di decomposizione). I dati sono stati standardizzati per soddisfare le ipotesi di normalità e di omogeneità della varianza, e sottoposti alle analisi di General Linear Models (GLM), usando il software STATISTICA 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). E' stato utilizzato un disegno a blocchi randomizzati (Gotelli and Ellison, 2004). In particolare, sono state considerate come variabili, la crescita fungina (4 differenti specie), la tipologia di residuo vegetale (14 livelli, uno per ciascuna specie vegetale), le età di decomposizione dei residui vegetali ( 3 livelli – 0, 30 e 180 giorni di decomposizione), e il tempo di incubazione (trattato come una variabile continua di fattori fissi).

Al fine di verificare l'esistenza di relazioni tra la perdita di fungistasi ( ad esempio il picco di crescita fungina registrato dopo l'ammendamento del suolo) e la qualità biochimica degli ammendanti organici ( ad esempio il contenuto di N, di C labile, di cellulosa e lignina, il rapporto C/N e L/N, le tipologie di C proveniente dalle analisi di spettroscopia NMR C<sup>13</sup>-CPMAS), sono state eseguite analisi di correlazione ( calcolo del coefficiente di Pearson). Allo stesso modo, analisi di correlazione sono state eseguite per verificare le eventuali relazioni tra la respirazione e l'attività enzimatica del suolo e il rilascio di fungistasi. In tutti i casi la significatività statistica delle correlazioni è stata valutata ai livelli,  $P < 0.05$  e 0.01.

## 2.3. Risultati

### 2.3.1. Risposta della fungistasi in seguito ad ammendamento del suolo

Si può asserire che la crescita miceliare di tutte e quattro le specie fungine studiate è risultata significativamente influenzata dalla tipologia e dall'età delle lettiera, nonché dal tempo di incubazione (Tab. 1).

In particolare, l'aggiunta di residui vegetali al suolo, determina una temporanea perdita di fungistasi (Fig. 2), che successivamente viene restaurata al massimo 20 giorni dopo. Comunque, la dinamica della fungistasi dopo l'ammendamento organico risulta altamente dipendente dalla tipologia e dalla età dei residui vegetali impiegati per l'ammendamento stesso (Fig. 2 e Tab. S1). In media, i substrati vegetali freschi e cioè non decomposti, determinano una maggiore perdita di fungistasi rispetto ai residui vegetali decomposti invece per 30 e 180 giorni (Fig. 2 e Tab. S1); questo schema, tuttavia variava tra le diverse lettiera, come indicato dal significativo effetto di interazione delle diverse tipologie di lettiera e il loro grado di invecchiamento, cioè di decomposizione (Tab. 1). Inoltre, la perdita di fungistasi si protraeva più a lungo nei suoli ammendati con i materiali indecomposti rispetto ai materiali invecchiati per 30 e 180 giorni (Fig. 2 e Tab. S1). In linea di massima, la fungistasi del suolo veniva quasi completamente ripristinata in 5 giorni dopo l'ammendamento con i materiali vegetali decomposti per 30 e 180 giorni, mentre in seguito all'applicazione dei residui vegetali freschi, non decomposti, per il totale ripristino della fungistasi erano necessari almeno 10 giorni e in alcuni casi fino a 20 giorni (Fig. 2 e Tab. S1). In alcuni casi, comunque pochi, il comportamento della crescita fungina si è scostato dallo schema generale riportato in figura 2. Ad esempio, nel caso del fungo *Aspergillus niger*, l'aggiunta al suolo di materiali vegetali non decomposti, in particolare lettiera fresca di *Fagus sylvatica* non ha condotto ad una perdita di fungistasi. D'altro canto, l'applicazione di *Castanea*

*sativa* parzialmente decomposta per 180 giorni, ha determinato un significativo rilascio della fungistasi del suolo (Tab. S1). L'andamento generale però di tutti e 42 i residui vegetali, ha mostrato che il picco di crescita fungina, e quindi di perdita di fungistasi, era più alto per i funghi *Aspergillus* e *Trichoderma*, e più basso per *Pyrenocheta* e *Botrytis*.

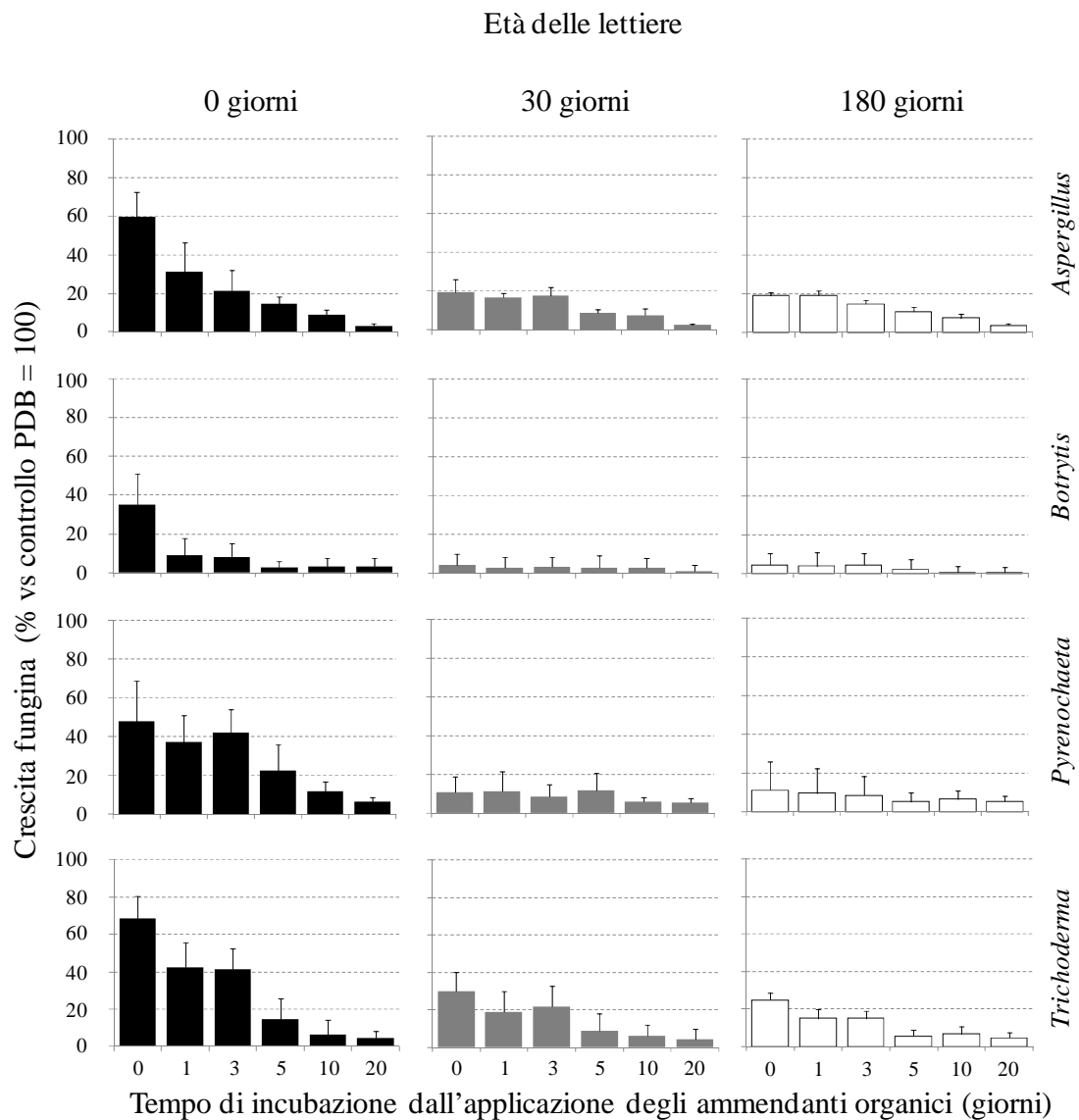
In conclusione, l'aggiunta di PDB, agli estratti di suolo sterili ha ripristinato la crescita fungina al livello dei controlli, per tutti i tipi di ammendanti e per tutti e 4 i funghi in prova.

Per quanto riguarda la respirazione del suolo, si nota come questa risulta essere particolarmente influenzata dal tempo di incubazione (Tab. 1), mostrando un elevato incremento a 6 ore dall'aggiunta di sostanza organica, e mantenendo valori relativamente elevati durante i primi 3 giorni di incubazione. Questo incremento di rilascio della CO<sub>2</sub> era particolarmente evidente quando si utilizzavano residui vegetali freschi, non decomposti (Fig. 3 e Fig. S1), con effetti strettamente dipendenti (di significatività statistica), dalla età della lettiera (Tab. 1). Successivamente, (dopo 5 – 10 giorni), la respirazione del suolo ha mostrato una progressiva riduzione, fino al livello osservato prima dell'ammendamento organico, paragonabile al tasso di respirazione basale del suolo (Fig. 3 e Fig. S1). Tali patterns sono stati consistenti per tutti i tipi di ammendanti, ma non si è avuto un effetto significativo del tipo di lettiera sulla respirazione del suolo (Tab. 1). L'attività enzimatica totale (FDA), è risultata essere estremamente influenzata dalla tipologia di sostanza organica e dall'età di decomposizione (Tab. 1), aumentando durante l'intero periodo di incubazione (20 gg), per tutti gli ammendanti organici e a tutti i livelli di decomposizione (0, 30 e 180 giorni) comparata con l'FDA del suolo di controllo non ammendato (Fig. 3).

**Tab. 1**

Rappresentazione sintetica dell'analisi della varianza, Generale Linear Modelling (GLM), relativa alla crescita fungina, all'attività enzimatica (FDA) e alla respirazione del suolo, in funzione della specie fungina in analisi, del tipo e dell'età del substrato e del tempo di incubazione.

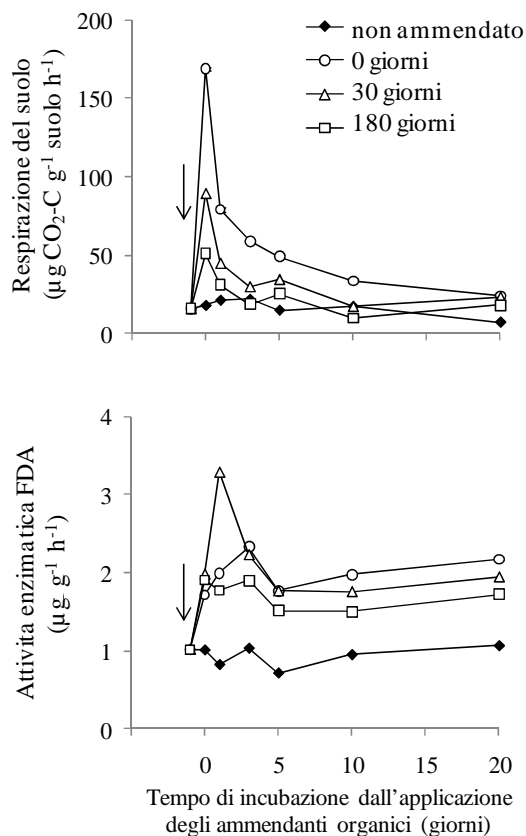
	<b>d.f.</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<i>Fungal growth</i>					
Fungal species (F)	3	49779	16593	5.10	0.0017
Litter type (L)	14	620022	44287	13.61	< 0.0001
Litter age (A)	2	1453226	726613	223.32	< 0.0001
Incubation time (T)	1	121091	121091	37.22	< 0.0001
F x L	42	80064	1906	0.59	0.9840
F x A	6	37081	6180	1.90	0.0781
L x A	28	389361	13906	4.27	< 0.0001
F x T	3	110425	36808	11.31	< 0.0001
L x T	14	159719	11408	3.51	< 0.0001
A x T	2	421001	210500	64.69	< 0.0001
Residuals	964	3136605	3254		
<i>Respiration</i>					
Litter type (L)	14	36936720	2638337	0.86	0.6012
Litter age (A)	2	273999413	136999706	44.75	< 0.0001
Incubation time (T)	1	207143873	207143873	67.67	< 0.0001
L x T	14	14709578	1050684	0.34	0.9875
A x T	2	49472453	24736226	8.08	< 0.0001
Residuals	236	722442772	3061198		
<i>Enzymatic activity (FDA)</i>					
Litter type (L)	14	3.650	0.261	2.17	0.0093
Litter age (A)	2	1.228	0.614	5.13	0.0065
Incubation time (T)	1	0.072	0.072	0.60	0.4396
L x T	14	2.070	0.148	1.23	0.2535
A x T	2	1.239	0.620	5.18	0.0062
Residuals	252	30.136	0.120		



**Fig. 2.** Sviluppo delle quattro specie fungine (espresso come percentuale rispetto ai controlli su PPB = 100) coltivate negli estratti acquosi di suolo durante il periodo di incubazione di 20 giorni a seguito di una singola applicazione di residui vegetali. I valori sono medie  $\pm$  SD di tutti i 14 tipi di residui vegetali a tre diverse età di decomposizione (0, 30 e 180 giorni).

### 2.3.2. Relazioni tra la perdita di fungistasi, respirazione del suolo ed attività enzimatica (FDA)

Considerando nell'insieme il pool di dati delle 4 specie, il rilascio di fungistasi risulta essere positivamente correlato alla respirazione del suolo misurata durante i 20 giorni di incubazione (Pearson  $r = 0.45$ ,  $P < 0.01$ ,  $n = 1080$ ). Allo stesso modo dall'analisi dei risultati delle singole specie fungine, sono state osservate significative correlazioni positive tra respirazione del suolo e perdita di fungistasi (Pearson  $r$  pari a 0.39, 0.40, 0.43 e 0.59, rispettivamente per *T. harzianum*, *B. cinerea*, *P. lycopersici* e *A. niger*). In contrasto, la perdita di fungistasi non è risultata correlata all'attività enzimatica del suolo FDA, né considerando i dati dei 4 funghi (Pearson  $r = 0.06$ ,  $P = 0.56$ ,  $n = 1080$ ), e neppure considerandoli separatamente (Coefficiente di Pearson pari a 0.01, 0.02, 0.14 e 0.17, rispettivamente per *B. cinerea*, *A. niger*, *P. lycopersici* e *T. harzianum*).



**Fig. 3.** Respirazione del suolo (in alto) ed attività enzimatica FDA (in basso) durante il periodo di incubazione di 20 giorni successivi ad una singola applicazione di residui vegetali (freccia). Ad ogni punto dell'intervallo di tempo successivo all'applicazione dei residui (6 ore, e 1, 3, 5, 10 e 20 giorni) i valori sono medie di tutti i 14 tipi di residui vegetali alle tre diverse età di decomposizione (0, 30 e 180 giorni). I valori al giorno -1 si riferiscono ai tassi medi di respirazione del suolo prima dell'applicazione dei residui vegetali. Le barre relative alla variabilità dei dati non sono indicate per migliorare la leggibilità dei grafici; le statistiche sono riportate nella Tabella 1.

### 2.3.3. Relazioni tra rilascio di fungistasi e qualità biochimica dei substrati

Considerando i dati scaturiti dai saggi riferiti a tutte le specie fungine, la perdita di fungistasi risulta essere correlata positivamente con il contenuto in carbonio labile dei diversi materiali organici e negativamente con il contenuto di lignina (Tab. 2). Non sono state osservate relazioni significative tra perdita di fungistasi e contenuto in cellulosa ed azoto, così come con il rapporto C/N e L/N (Tab. 2). Tali relazioni sono risultate coerenti anche quando si sono considerati le 4 specie fungine separatamente. Le due uniche eccezioni hanno riguardato la significativa correlazione positiva tra il rapporto C/N dei residui vegetali e la perdita di fungistasi nel caso di *B. cinerea* e *T. harzianum*, ed una significativa relazione negativa tra il rapporto L/N e il rilascio di fungistasi nel caso di *A. niger* (Tab. 2).

Considerando le regioni dello spettro NMR del  $^{13}\text{C}$ , quando sono stati correlati i dati relativi a tutti i funghi, non si è evidenziata alcuna significativa correlazione con la perdita di fungistasi in corrispondenza delle regioni del C – carbossilico, H – C composti del carbonio aromatici sostituiti, O – composti aromatici C sostituiti, di – O – C alchilici, e carbonio alchilico (Tab. 2). Comunque, una importante correlazione negativa è stata osservata tra perdita di fungistasi e le regioni dello spettro NMR del  $\text{C}^{13}$ - CPMAS, riferite al gruppo del carbonio metossilico ed alifatico (Tab. 2). Le stesse regioni dello spettro NMR erano correlate negativamente con la perdita di fungistasi di *B. cinerea* e *T. harzianum* (Tab. 2). Il rapporto alchilico C/O – alchilico C, ampiamente utilizzato, non mostra significative correlazioni con la perdita di fungistasi, sia considerando separatamente che agglomerati i dati delle singole specie fungine (Tab. 2). Al contrario, l'indice CC/MC ed in particolare il rapporto 70 – 75/52 – 57 ha mostrato correlazioni positive statisticamente significative con la perdita di fungistasi (Tab.



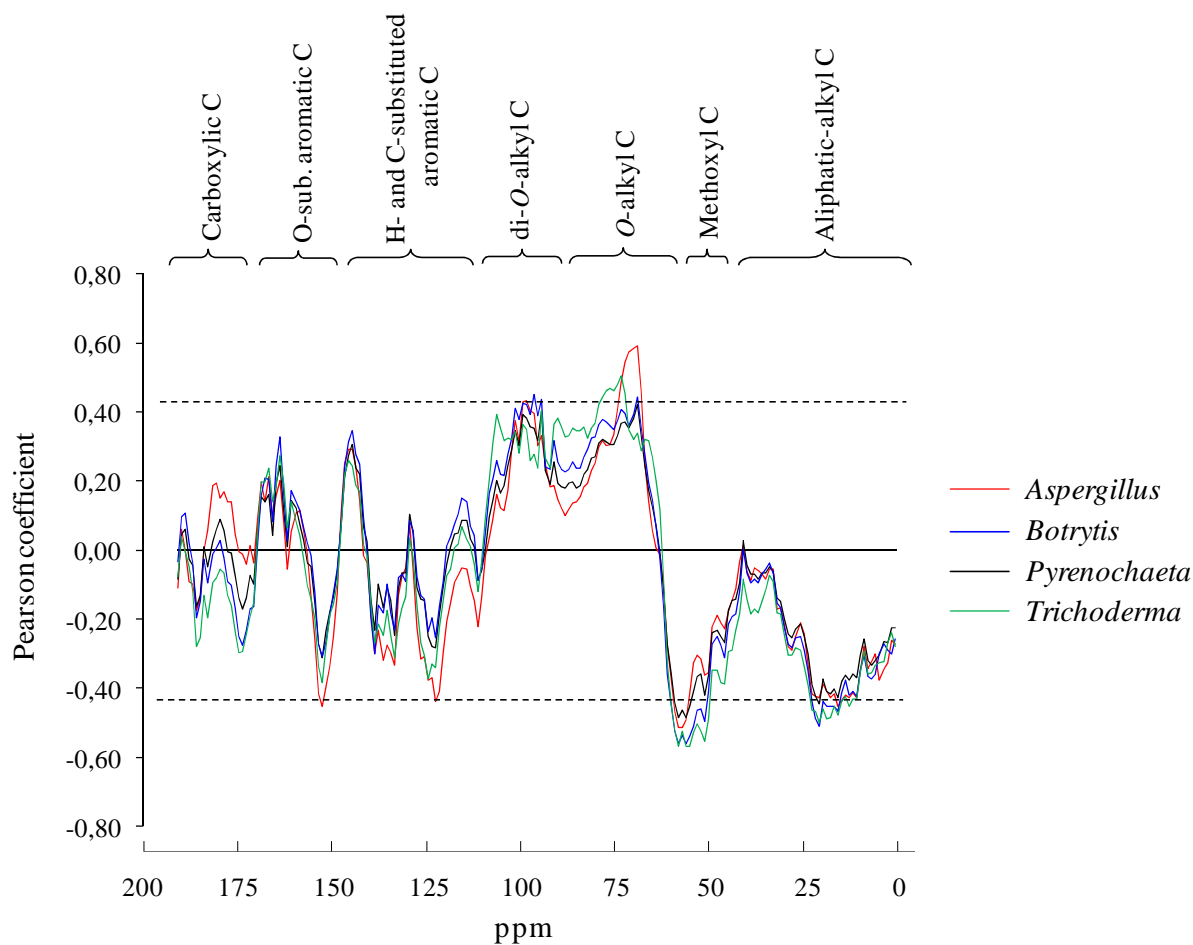
2). Un'ampia analisi di correlazione riferita alla crescita delle 4 specie fungine considerate separatamente, con tutti i segnali dello spettro NMR del C<sup>13</sup>-CPMAS, ha mostrato che diverse e specifiche regioni erano correlate positivamente o negativamente con la perdita di fungistasi (Fig. 4). Tra queste, le regioni limitate a 70 – 75 ppm e a 52 – 57 ppm, mostravano rispettivamente correlazioni estremamente positive e negative con la perdita di fungistasi riferita a tutte le specie fungine (Fig. 4).

**Table 2**

Coefficienti di correlazione semplice (r di Pearson) calcolati tra l'intensità di perdita di fungistasi ed i parametri derivati dall'analisi 13C-NMR CPMAS, che descrivono la qualità biochimica dei 42 ammendanti organici. I dati sono riportati per ciascuna specie fungina e per l'insieme di tutte le specie. In grassetto sono indicati i valori statistici significativi di r (P <0,05).

Qualità biochimica delle lettiere	Specie fungine				
	<i>Aspergillus</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>Trichoderma</i>	All fungi
<i>Parametri chimici</i>					
Labile C (%)	<b>0.62</b>	<b>0.50</b>	<b>0.53</b>	<b>0.57</b>	<b>0.53</b>
Cellulose (%)	-0.02	0.07	-0.05	0.11	0.01
Lignin (%)	<b>-0.58</b>	<b>-0.52</b>	<b>-0.49</b>	<b>-0.61</b>	<b>-0.52</b>
N content (%)	-0.02	-0.31	-0.19	-0.30	-0.19
C/N ratio	0.35	<b>0.52</b>	0.40	<b>0.54</b>	0.44
Lignin/N ratio	<b>-0.51</b>	-0.41	-0.41	-0.44	-0.42
<i><sup>13</sup>C-CPMAS NMR parameters</i>					
Carboxylic C: 161-190 p.p.m.	0.07	-0.11	-0.04	-0.17	-0.06
O-sub. aromatic C : 141-160 p.p.m.	-0.11	0.01	-0.03	-0.07	-0.05
H- & C-sub. aromatic C: 111-140 p.p.m.	-0.18	-0.01	-0.03	-0.12	-0.09
di-O-alkyl C: 91-110 p.p.m.	0.24	0.35	0.28	0.40	0.32
O-alkyl C: 61-90 p.p.m.	0.36	0.36	0.32	0.45	0.37
Methoxyl and N-alkyl C: 46-60 p.p.m.	-0.41	<b>-0.51</b>	-0.43	<b>-0.55</b>	<b>-0.48</b>
Alkyl C: 0-45 p.p.m.	-0.26	-0.27	-0.24	-0.31	-0.27
Alkyl C / O-alkyl C ratio	-0.27	-0.27	-0.24	-0.28	-0.29
CC / MC ratio*	0.41	0.44	<b>0.54</b>	<b>0.52</b>	<b>0.51</b>
70-75 / 52-57 ratio	<b>0.53</b>	<b>0.61</b>	<b>0.55</b>	<b>0.60</b>	<b>0.59</b>

\* CC/MC: O-alkyl C / methoxyl and N-alkyl C rapporto.



**Fig. 4.** Profili di correlazione (coefficiente di Pearson,  $r$ ) tra la perdita di fungistasi a seguito dell'ammendamento, per le quattro specie fungine in esame con i segnali spettrali  $^{13}\text{C}$ -NMR CPMAS relativi ai 42 campioni organici. Le linee tratteggiate indicano i valori soglia di significatività statistica per  $r$  ( $P < 0.01$ ). Le sette classi principali di C organico valutate mediante spettroscopia  $^{13}\text{C}$ -NMR CPMAS nei 42 materiali organici sono riportati sulla parte superiore del grafico.

## 2.4. Discussione

In questo studio si è dimostrato che la qualità degli ammendanti organici rappresenta uno dei principali fattori di controllo della fungistasi. L'elevata perdita di fungistasi, osservata quando il suolo è stato ammendato con substrati poveri in lignina ma con un alto contenuto in carbonio labile, ha dimostrato un forte, seppur indiretto supporto all'ipotesi della competizione nutrizionale come principale meccanismo di induzione della fungistasi (Steiner and lockwood, 1970). Inoltre, dai risultati ottenuti si evincono importanti informazioni riguardanti il tempo necessario al ripristino delle condizioni fungistatiche del suolo in seguito ad applicazione dei differenti materiali organici testati.

L'ipotesi principale è che, l'esaurimento di composti aventi un alto contenuto in carbonio labile, dovuto all'intensa attività microbica del suolo, rappresenti il modello più accreditato per spiegare i meccanismi di dinamica della fungistasi (Steiner and Lockwood, 1970). Il presente lavoro fornisce alcune delle maggiori evidenze che supportano questo modello:

- (1) Una temporanea perdita della fungistasi del suolo a seguito dell'ammendamento organico;
- (2) L'intensità del rilascio di fungistasi risulta direttamente correlata al contenuto in C labile dei diversi substrati;
- (3) Il tempo necessario per il ripristino delle condizioni fungistatiche dopo l'ammendamento del suolo risulta essere correlato negativamente con la qualità biochimica dei materiali organici;
- (4) L'aggiunta di substrati nutritivi (PDB), agli estratti di suolo sterili, determina la totale perdita della fungistasi, e ciò comporta il ripristino della crescita fungina. Inoltre, la respirazione del suolo, lungo l'intero periodo di incubazione risulta correlata in maniera evidente alla perdita di fungistasi,

tradotta come crescita fungina, e per tutti e 4 i funghi. Dall'insieme dei risultati è emerso che la germinazione delle spore e la crescita delle specie "nutrienti – dipendenti" sono stati in gran parte limitate dalla disponibilità nel suolo di composti labili del carbonio.

Una temporanea, seppur netta perdita di fungistasi in seguito ad applicazione di ammendanti organici, era stata riportata già in studi precedenti (Adams et al., 1968; de Boer et al., 2003; Berendsen et al., 2012), sebbene i meccanismi relativi all'intensità e alla tempistica di rilascio della fungistasi, risultavano spesso incoerenti (Garbeva et al., 2011). In questo lavoro è stato dimostrato che la qualità biochimica della sostanza organica rappresenta il fattore ecologico chiave nel controllo dell'intensità di perdita della fungistasi. In questo ambito, tutte le specie fungine hanno mostrato un rapido ed intenso sviluppo in seguito all'applicazione di residui vegetali non decomposti come *Coronilla emerus* e *Fraxinus ornus*, ad eccezione di quando è stato utilizzato *Fagus sylvatica* come ammendante fresco, in quanto in questo caso il rilascio di fungistasi è risultato estremamente limitato. Inoltre, i residui vegetali indecomposti determinano, rispetto agli stessi materiali decomposti per 30 e 180 giorni, un maggior rilascio di fungistasi. Ciò è probabilmente dovuto al progressivo esaurimento delle frazioni di carbonio labile durante la decomposizione delle lettiere accoppiato con un successivo accumulo di composti ricalcitranti che costituiscono un supporto minimo alla crescita fungina (Berg and McClaugherty, 2008). In un precedente studio, in cui si sono considerati i medesimi 42 materiali vegetali, si è dimostrata una rapida riduzione dei carboidrati (rappresentata dalle regioni dello spettro NMR tra i carboni di – O alchilici ed O – alchilici) assieme ad un relativo incremento del contenuto in lignina e delle regioni associate al carbonio metossilico ed alifatico (C. N – alchilico) durante la decomposizione delle lettiere (Bonanomi et al., 2013). Invece, le differenti intensità in termini di perdita di fungistasi osservata tra i 42 diversi

materiali vegetali, possono essere correlate alla qualità biochimica, o in altre parole, alla loro capacità di sostenere positivamente o negativamente la crescita fungina. Da ciò deriva che una chiara comprensione della qualità biochimica dei residui organici, rappresenta un passo fondamentale poter prevedere le risposte della fungistasi all'ammendamento del suolo.

Per quanto concerne i risultati delle analisi chimiche, appare evidente che solo il C labile ed il contenuto in lignina hanno, rispettivamente, una consistente correlazione positiva e negativa con la perdita di fungistasi. Nel primo caso, i risultati ottenuti indicano che quando come ammendante organico si utilizza un substrato contenente un elevato contenuto di carbonio labile e quindi facilmente degradabile, si ha una crescita fungina più intensa e prolungata nel tempo. Diversamente, se aumenta il grado di lignificazione dei residui vegetali apportati al suolo, cioè se per l'ammendamento si utilizzano lettiere a più alto contenuto in lignina, l'induzione del rilascio di fungistasi diminuisce e può essere addirittura del tutto inconsistente. Dal confronto tra i dati relativi alle analisi chimiche degli ammendanti organici ed il loro effetto sulla fungistasi, non è emersa invece alcuna correlazione tra questa proprietà del suolo ed il contenuto in cellulosa ed azoto dei vegetali impiegati.

Nel primo caso, riguardo la cellulosa, i risultati appaiono sorprendenti in quanto essa rappresenta il secondo bio-polimero più abbondante nei tessuti vegetali e numerosi funghi, incluso *T. harzianum*, sono in grado di degradarla, ed utilizzarla come fonte di carbonio. Questo dato potrebbe essere spiegato dal fatto che gran parte della cellulosa risulta chimicamente legata alla lignina, per cui la sua degradazione non può procedere indipendentemente da quella della lignina stessa (Adair et al., 2008). Anche per l'azoto, non sono state evidenziate significative correlazioni tra il contenuto di questo elemento negli ammendanti organici e la perdita di fungistasi. Pure questo risultato appare a prima vista sorprendente, dal

momento che l'azoto rappresenta un fattore chiave limitante per la crescita fungina. Precedenti studi hanno mostrato che il contenuto di azoto delle lettiera ha un duplice e contrastante effetto sul loro tasso di decomposizione; infatti nelle lettiera con alta percentuale di azoto, esso determina, nei primissimi stadi un aumento della decomposizione, per poi rallentarla successivamente (Knorr et al., 2005). Infatti, l'azoto disponibile per la crescita microbica, aumenta enormemente con l'età della lettiera. E' possibile però che tale azoto non risulti bio-disponibile per i funghi in quanto inglobato in macromolecole resistenti all'attacco microbico (Berg and McClaugherty, 2008). Il rapporto C/N viene considerato un importante indice per descrivere la qualità della lettiera (Taylor et al., 1989). Sfortunatamente, lo stesso non sembra essere vero per la fungistasi del suolo. Sia in termini di perdita che di tempo di ripristino della stessa. Questo andamento è probabilmente attribuibile agli effetti contrastanti descritti precedentemente sulla disponibilità di azoto, durante la decomposizione dei residui vegetali e per l'azione svolta dalla comunità microbica. L'unica eccezione rilevata, è la correlazione positiva tra rilascio della fungistasi e rapporto C/N per *B. cinerea* e *T. harzianum*. Studi ulteriori sono necessari per chiarire queste differenze specie – specifiche.

L'utilizzo delle moderne tecniche di spettroscopia NMR del  $^{13}\text{C}$ , consentiranno di chiarire le relazioni tra fungistasi del suolo e qualità biochimica degli ammendanti organici. Allo stato attuale il tentativo di evidenziare correlazioni tra le regioni dello spettro NMR del  $^{13}\text{C}$  e diversi indici dalla letteratura (Spaccini et al., 2000; Almendros et al., 2000; Kogel-Knabner, 2002), e la perdita di fungistasi ha dato esito negativo. Le uniche eccezioni sono rappresentate dalle correlazioni negative con le regioni del carbonio metossilico e N – alchilico, e positive con il rapporto CC/MC. Entrambi i parametri, essendo basati sui segnali NMR correlati al contenuto in lignina (Mather et al., 2007), rappresentano un possibile supporto all'ipotesi che il grado di lignificazione dei materiali vegetali che pervengono al

suolo risulta essere inversamente correlato con la perdita di fungistasi del suolo stesso. La limitata capacità delle regioni dello spettro NMR del  $^{13}\text{C}$ , nell'interpretazione dei processi ecologici come il tasso di decomposizione delle lettiere e gli effetti tossici delle stesse sullo sviluppo dell'apparato radicale delle piante, è stata descritta da studi precedentemente riportati in letteratura (Bonanomi et al., 2011;2012). Le analisi di correlazione applicate all'intero spettro NMR del  $^{13}\text{C}$ , hanno condotto ad un ulteriore miglioramento nella definizione della qualità biochimica dei residui organici in relazione alla fungistasi del suolo ( Fig. 4). Innanzitutto, sono state identificate due specifiche regioni del carbonio O – alchilico e metossilico (70 – 75 ppm e 52 – 57 ppm, rispettivamente), altamente correlate con la perdita di fungistasi per tutte le specie fungine. Questo risultato è stato raggiunto escludendo i picchi scarsamente correlati dalle corrispondenti più ampie regioni del C. O – alchilico e metossilico. Lo studio delle regioni NMR del  $^{13}\text{C}$ , in base anche a quanto riportato in letteratura, rappresenta uno strumento utile al fine di comprendere gran parte dei meccanismi che regolano sia positivamente che negativamente l'andamento della fungistasi del suolo. Ad esempio, la regione dello spettro che identifica il carbonio aromatico O – sostituito (141 – 160 ppm) ha mostrato rispettivamente correlazioni positive e negative negli intervalli 142 – 145 ppm e 148 – 154 ppm; proseguendo lungo lo spettro però, l'intera regione del carbonio aromatico O – sostituito non risultava più correlata alla perdita di fungistasi (Tab. 1).

L'indice che deriva dal semplice rapporto riferito alle due principali regioni significative (70 – 75/52 – 57) ha fornito le principali correlazioni rispetto alla perdita di fungistasi (Tab. 1). Queste due ristrette regioni, del carbonio O – alchilico e metossilico, giocano presumibilmente un ruolo fondamentale per quanto riguarda la qualità biochimica dei residui vegetali (Kogel - Knabner, 2002). Dal punto di vista ecologico, gli indici 70 – 75/52 – 57 indicano l'intensità di perdita

della fungistasi in seguito ad ammendamento organico che decresce con materiali molto lignificati, mentre aumenta con residui vegetali che contengono un alto quantitativo di carboidrati semplici (Fig 4). Inoltre è stato provato che l'indice  $70 - 75/52 - 57$ , oltre a dare informazioni sul tasso di decomposizione delle stesse (Bonanomi et al., 2013), risulta fortemente correlato con gli effetti di fitotossicità della lettiera (Bonanomi et al., 2011a). Sulla base di queste evidenze, si può asserire che questo indice ottenuto tramite analisi NMR, essendo in grado di evidenziare i segnali di carbonio organico correlati in maniera più significativa alla perdita o meno di fungistasi, potrebbe essere utilizzato su larga scala per caratterizzare i differenti materiali organici, in base ai diversi gruppi funzionali in essi presenti.

Le analisi di correlazione eseguite lungo l'intero spettro NMR del  $^{13}\text{C}$ , dei 42 materiali vegetali, ci aiutano ad interpretare le risposte specie – specifiche dei diversi funghi in seguito all'ammendamento con i diversi residui vegetali. Si sono osservate importanti differenze di sensibilità nei confronti della fungistasi, secondo il seguente ordine: *Aspergillus* > *Pyrenochaeta* e *Botrytis* > *Trichoderma*. Comunque, le quattro specie fungine hanno mostrato una risposta qualitativa molto simile, nei confronti delle diverse tipologie di materiali utilizzati come ammendanti. Ad esempio per tutti i funghi saggiati la perdita di fungistasi è risultata essere maggiormente correlata con le regioni dello spettro che identificavano il carbonio O – alchilico e metossilico (Fig. 4). Queste risposte simili sono dovute, almeno in parte, al fatto che lo sviluppo di queste quattro specie fungine è condizionato dalla disponibilità dei nutrienti e in particolare la germinazione dei propaguli fungini è strettamente correlata alla presenza di carbonio esogeno. Dal momento che questo studio si è basato su dati ottenuti saggiando specie fungine nutrienti – dipendenti, non si può per ora escludere un



potenziale ruolo di sostanze inibitrici che contribuiscono a regolare la fungistasi nel suolo.

Infine voglio ringraziare il prof. Alessandro Piccolo ed il dott. Riccardo Spaccini per le misure NMR C<sup>13</sup>- CPMAS, eseguite presso il centro di ricerca interdipartimentale, il CERMANU, dell'Università di Napoli Federico II.

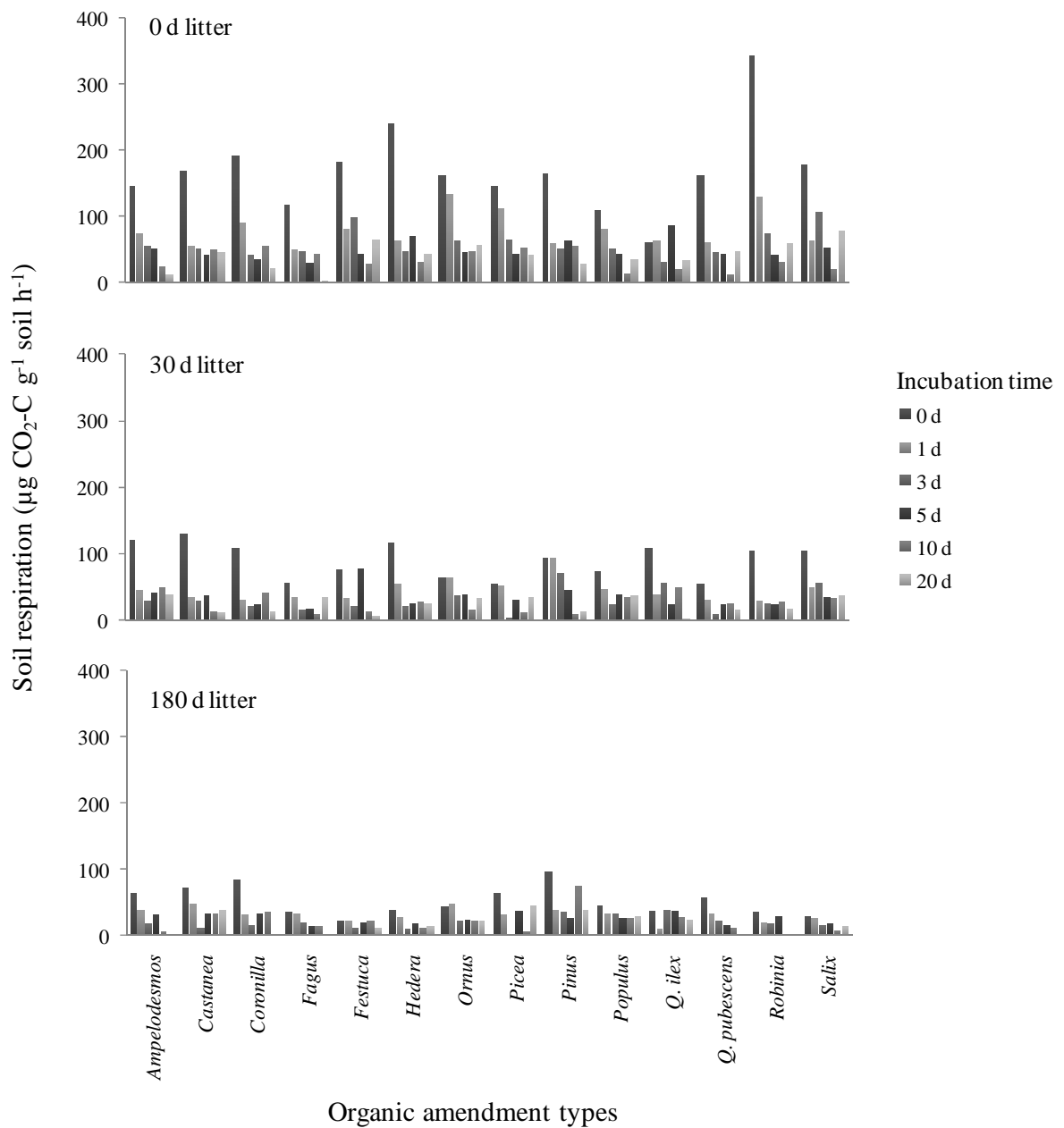
## **Figure supplementari**

### **Table S1**

Sviluppo miceliare (espresso come percentuale del controllo su PDB = 100) delle quattro specie fungine coltivate negli estratti acquosi di suolo nei 20 giorni di incubazione a seguito della singola applicazione di residui vegetali. I dati si riferiscono ai tre tempi di incubazione (0, 5 e 20 giorni) dopo l'applicazione di 14 diversi tipi di lettiere a tre età di decomposizione (0, 30 e 180 giorni). I dati degli altri tempi di incubazione intermedi (1, 3 e 10 giorni), sono omessi per migliorare la leggibilità della tabella; le statistiche sono riportate in Tabella 1.

Litter type		<i>Aspergillus</i>			<i>Botrytis</i>			<i>Pyrenochaeta</i>			<i>Trichoderma</i>		
Species	Age	0	5	20	0	5	20	0	5	20	0	5	20
<i>Ampelodesmos</i>	0	24	2	-3	19	3	0	39	14	4	140	23	0
<i>Castanea</i>	0	64	10	-3	20	3	-1	48	21	4	81	25	2
<i>Coronilla</i>	0	102	15	6	43	5	5	84	37	6	110	24	3
<i>Fagus</i>	0	0	3	-3	3	1	0	11	59	2	45	44	-1
<i>Festuca</i>	0	39	20	0	66	2	0	73	38	4	92	48	0
<i>Hedera</i>	0	47	5	-2	30	2	-2	18	14	3	71	14	1
<i>Ornus</i>	0	96	16	0	128	9	1	187	79	5	198	64	3
<i>Picea</i>	0	36	8	-3	40	4	0	57	13	1	113	21	1
<i>Pinus</i>	0	44	2	0	24	2	-1	26	24	5	66	18	-2
<i>Populus</i>	0	36	4	-1	21	1	-2	13	60	1	77	39	0
<i>Q. ilex</i>	0	36	4	-1	47	2	-2	44	15	2	75	15	-1
<i>Q. pubescens</i>	0	37	5	0	16	7	-1	39	24	2	72	44	-1
<i>Robinia</i>	0	60	22	0	18	3	1	43	13	9	64	36	3
<i>Salix</i>	0	63	12	-1	62	4	-2	106	39	3	83	60	0
<i>Ampelodesmos</i>	30	7	2	-1	5	2	0	15	19	3	44	18	2
<i>Castanea</i>	30	8	7	0	5	1	-3	15	25	2	50	47	0
<i>Coronilla</i>	30	3	6	-2	6	2	-1	19	15	3	66	16	5
<i>Fagus</i>	30	3	4	-3	3	1	0	14	65	0	44	17	-1
<i>Festuca</i>	30	-1	2	-3	3	1	-1	13	12	2	38	12	-1
<i>Hedera</i>	30	6	3	-2	11	1	-1	20	13	3	61	14	2
<i>Ornus</i>	30	16	9	3	12	4	-1	29	19	3	64	28	1
<i>Picea</i>	30	13	6	-4	4	2	-3	14	16	1	44	23	-2
<i>Pinus</i>	30	3	6	-1	6	3	0	21	17	3	40	10	-2
<i>Populus</i>	30	11	2	0	3	2	-1	12	13	3	36	30	1
<i>Q. ilex</i>	30	5	3	0	4	2	0	16	16	4	44	20	2
<i>Q. pubescens</i>	30	9	3	1	2	0	-2	11	10	1	32	14	-2
<i>Robinia</i>	30	10	13	0	4	2	-2	12	16	3	35	24	0
<i>Salix</i>	30	12	4	-1	4	1	-3	16	13	1	49	20	-2
<i>Ampelodesmos</i>	180	6	2	-2	5	2	0	13	12	1	35	20	1
<i>Castanea</i>	180	14	4	0	5	3	-1	15	12	1	47	16	0
<i>Coronilla</i>	180	5	12	-1	4	2	0	14	15	3	52	18	5
<i>Fagus</i>	180	2	2	-2	3	3	0	10	10	1	27	12	-1
<i>Festuca</i>	180	5	14	-1	4	3	-2	12	12	2	37	16	-2
<i>Hedera</i>	180	5	2	0	6	2	0	15	11	3	39	9	1
<i>Ornus</i>	180	15	12	-2	16	7	1	33	22	6	57	20	4
<i>Picea</i>	180	6	4	3	3	2	-2	11	10	0	35	8	-2
<i>Pinus</i>	180	8	8	-4	6	3	1	18	11	1	44	28	1
<i>Populus</i>	180	13	2	-1	4	2	0	11	11	8	35	11	1
<i>Q. ilex</i>	180	7	9	0	4	1	-1	14	11	2	37	10	-1
<i>Q. pubescens</i>	180	8	1	0	3	2	-1	11	11	1	31	11	-2
<i>Robinia</i>	180	10	2	-1	3	2	0	12	10	1	32	11	0
<i>Salix</i>	180	10	4	0	4	2	-2	13	12	1	40	8	-2

**Figure S1.** Respirazione del suolo durante il periodo di incubazione di 20 giorni in seguito ad una singola applicazione di residui vegetali. I dati si riferiscono ai vari tempi di incubazione (0, 1, 3, 5, 10 e 20 giorni) dopo l'applicazione di 14 diversi tipi di lettiere a tre età di decomposizione (0, 30 e 180 giorni) (n = 42); le statistiche sono riportate in Tabella 1.



## Referenze citate

- Adair, E.C., Parton, W.J., Del Grosso, S.J., Silver, W.L., Harmon, M.E., Hall, S.A., Burke, I.C., Hart, S.C., 2008. Simple three-pool model accurately describes patterns of long-term litter decomposition in diverse climates. *Glob. Change Biol.* 14, 2636–2660.
- Adams, P.B., Papavizas, G.C., 1969. Survival of root-infecting fungi in soil. X. Sensitivity of propagules of *Thielaviopsis basicola* to soil fungistasis in natural and alfalfa-amended soil. *Phytopathology* 59, 135-138.
- Adams, P.B., Lewis, J.A., Papavizas G.C., 1968. Survival of root-infecting fungi in soil. IX. Mechanism of control of *Fusarium* root rot of bean with spent coffee grounds. *Phytopathology* 58, 1603-1608.
- Alabouvette, C., Raaijmakers, J.M., De Boer, W., Notz, R., Defago, G., Steinberg, C., Lemanceau, P., 2006. Concept and methods to assess the phytosanitary quality of soils. In: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 257-269.
- Alef, K., 1995. Soil respiration. In: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 214–219.
- Almendros G, Dorado J, González-Vila FJ, Blanco MJ, Lankes U. 2000. <sup>13</sup>C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest shrub biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32, 793–804.
- Berendsen, R.L., Kalkhove, S.I.C., Lugones, L.G., Wösten, H.A.B., Bakker, P.A.H.M., 2012. Germination of *Lecanillium fungicola* in the mycosphere of *Agaricus bisporus*. *Environ. Microbiol. Reports* 4: 227-233.

- Berg B, McClaugherty, C., 2008. *Decomposition, humus formation, carbon sequestration*. Springer, Berlin, Plant litter
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* 42, 136-144.
- Bonanomi, G., D'Ascoli, R., Antignani, V., Capodilupo, M., Cozzolino, L., Marzaioli, R., Puopolo, G., Rutigliano, F.A., Scelza, R., Scotti, R., Rao, M.A., Zoina A. 2011b. Assessing soil quality under intensive cultivation and tree orchards in Southern Italy. *Appl. Soil Ecol.* 47,184-194.
- Bonanomi, G., Incerti, G., Barile, E., Capodilupo, M., Antignani, V., Mingo, A., Lanzotti, V., Scala, F., Mazzoleni, S., 2011a. Phytotoxicity, not nitrogen immobilization, explains plant litter inhibitory effects: evidence from solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *New Phytol.* 191, 1018-1030.
- Bonanomi, G., Incerti, G., Giannino, F., Mingo, A., Lanzotti, V., Mazzoleni, S., 2013. Litter quality assessed by solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy predicts decay rate better than C/N and Lignin/N ratios. *Soil Biol. Biochem.* 56, 40-48.
- De Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Appl. Environ. Microb.* 69, 835-844.
- Garbeva, P., Gera, W.H., Termorshuizen, A.J, Kowalchuk, G.A., de Boer, W., 2011. Fungistasis and general soil biostasis - A new synthesis. *Soil Biol. Biochem.* 43, 469-477.
- Gillon, D., Joffre, R., Ibrahima, A., 1999. Can litter decomposability be predicted by near infrared reflectance spectroscopy? *Ecology* 80, 175-186.
- Gotelli, N.J., Ellison, A.M., 2004. A primer of ecological statistics. Pp. 510. Sinauer Associates Publishers, Sunderland.

- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 427-446.
- Hsu, S.C., Lockwood, J.L. 1973. Soil fungistasis – behavior of nutrient-independent spores and sclerotia in a model system. *Phytopathology* 63, 334-337.
- Huang, Y., Stankiewicz, B.A., Eglinton, G., Snape, C.E., Evans, B., Latter, P.M., Ineson, P., 1998. Monitoring biomacromolecular degradation of *Calluna Vulgaris* in a 23 year field experiment using solid state  $^{13}\text{C}$ -NMR and pyrolysis-GC/MS. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1517-1528.
- Knorr, M., Frey, S. D., Curtis, P. S. 2005. Nitrogen additions and litter decomposition: a meta-analysis. *Ecology*, 86(12), 3252-3257.
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 34, 139-162.
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C., 1977. Effect of plant residues on chlamydospore germination of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* and on *Fusarium* root rot of beans *Phytopathology* 67, 925-929.
- Lockwood, J.L., 1977. Fungistasis in soils. *Biol Rev.* 52, 1-43.
- Martin, F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 325-350.
- Preston, C.M., Nault, J.R., Trofymow, J.A., 2009. Chemical changes during 6 years of decomposition of 11 litters in some Canadian forest sites. Part 2.  $^{13}\text{C}$  abundance, solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy and the meaning of “lignin”. *Ecosystems* 12, 1078-1102.

- Smith, A.M., 1973. Ethylene as a cause of soil fungistasis. *Nature* 246: 311-313.
- Steiner, G.W., Lockwood, J.L. 1970. Soil fungistasis: mechanism in sterilized, reinoculated soil. *Phytopathology* 60, 89-91.
- Taylor, B.R., Parkinson, D., Parsons, W.F.J., 1989. Nitrogen and lignin content as predictors of litter decay rates: a microcosm test. *Ecology* 70, 97-104.
- Workneh F, Van Bruggen AHC, Drinkwater LE, Sherman, C., 1993. Variables associated with a reduction in corky root and *Phytophthora* root rot of tomatoes in organic compared to conventional farms. *Phytopathology* 83, 581-589.
- Wu, M., Zhang, H., Li, X., Zhang, Y., Su, Z., Zhang, C., 2008. Soil fungistasis and its relations to soil microbial composition and diversity: A case study of a series of soils with different fungistasis. *J. Environ. Sci.* 20, 871–877.
- Xu, C.K., Mo, M.H., Zhang, L.M., Zhang, K.Q., 2004. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1997-2004.
- Zou, C.S., Mo, M.H., Gu, Y.Q., Zhou, J.P., Zhang, K.Q., 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2371-2379.



## Capitolo 3

### EFFETTO DELLA “STORIA” DEL SUOLO SULLA FUNGISTASI: INCREMENTO DELLA RESILIENZA ED ESALTAZIONE DELL’ATTIVITA’ MICROBICA

#### 3.1. Introduzione

La produttività degli agro ecosistemi risulta spesso limitata dall’attività dei patogeni tellurici delle piante. La dannosità di questi microrganismi aggressivi è spesso difficile da controllare con approcci di lotta convenzionali, come ad esempio l’uso di fungicidi di sintesi e di varietà di piante con diverse resistenze genetiche (McDowell and Woffenden, 2003). Il divieto di utilizzo del bromuro di metile, al pari di altri fumiganti del suolo (Martin, 2003), in concomitanza con le progressive restrizioni sull’uso dei fungicidi da parte della Comunità Europea, ha promosso la ricerca verso metodi di lotta alternativi ed ecosostenibili per il controllo dei patogeni. A tale proposito, la comprensione dei fattori ecologici limitanti la diffusione delle diverse specie microbiche risulta l’elemento chiave per un efficace controllo biologico dei patogeni delle piante.

La fungistasi è definita come la capacità dei suoli di inibire la germinazione e la crescita dei funghi terricoli, anche in presenza di condizioni ambientali favorevoli (temperatura, umidità del suolo, pH, rH), (Lockwood, 1977). Gli studi che riguardano la fungistasi si sono focalizzati sulla sensibilità di differenti funghi (Lockwood, 1977), sull’intensità del livello di fungistasi tra differenti tipi di suolo (Xu et al., 2004), sul ruolo di eventuali composti inibitori volatili (Zou et al., 2007), e sulle relazioni tra la complessità microbica del suolo e la fungistasi (de Boer et al., 2003; Wu et al., 2008). Al fine di comprendere i meccanismi che regolano la

fungistasi del suolo, due sono le ipotesi più accreditate scaturite dai diversi studi e che spesso intervengono sinergicamente e cioè:

- a. La presenza di metaboliti ad attività antifungina ([Berendsen et al., 2012](#)), inclusi composti volatili;
- b. L'esaurimento dei composti del carbonio labile e dei nutrienti, dovuto alla intensa competizione per questi elementi all'interno della comunità microbica del suolo ([Steiner and Lockwood, 1970](#)).

In supporto a quest'ultima ipotesi, numerosi studi dimostrano che, nel breve periodo, l'ammendamento del suolo determina una temporanea perdita di fungistasi, infatti le spore fungine subito dopo un' applicazione di carbonio organico, germinano abbondantemente ([Adams et al., 1968](#); [Bonanomi et al., 2013](#)).

In una recente revisione, di [Garbeva et al., \(2013\)](#), viene suggerito che la manipolazione della fungistasi del suolo risulta un potente mezzo per limitare l'invasione del suolo da parte di microrganismi patogeni, e conseguentemente potrebbe diventare un valido strumento per il controllo biologico dei patogeni tellurici delle piante. A questo riguardo, una potenziale strategia sarebbe quella di incrementare il potere fungistatico dei suoli in modo che la germinazione e la crescita dei patogeni sia ridotta anche in presenza della pianta ospite ([Garbeva et al., 2011](#)). Ciò sarebbe possibile grazie all'incremento ed alla esaltazione dell'attività della comunità microbica nativa del suolo in termini di depauperamento delle risorse disponibili, attraverso una più rapida metabolizzazione e degradazione dei nutrienti, che quindi permarrrebbero per poco tempo nella rizosfera, tutto ciò grazie a processi di competizione. Comunque, la traduzione di questo concetto ecologico, in un approccio pratico rappresenta ancora un obiettivo da raggiungere. In linea di massima, l'impiego di ammendanti organici nella pratica agronomica può essere considerato come

un possibile valido approccio, considerando i suoi effetti positivi ai fini della soppressione delle malattie di origine tellurica (Bonanomi et al., 2010), come risultante della maggiore attività microbica nel suolo (Hoitink and Boehm, 1999). D'altro canto, secondo un' ipotesi opposta, l'utilizzo di ammendante organico non risulterebbe una strategia valida per aumentare il livello di fungistasi nel suolo, a causa dell'azione negativa che si registra nel breve periodo, subito dopo l'aggiunta di materiale organico al suolo cioè quando il suo potere fungistatico si riduce temporaneamente o addirittura si annulla (Lewis and Papavizas 1977; Bonanomi et al., 2013). L'interazione tra ammendamento organico e fungistasi risulta complessa e non del tutto chiara, anche a causa della scarsità degli studi che hanno investigato l'effetto della qualità della sostanza organica e delle frequenza di applicazione degli ammendanti su questa proprietà.

Un'ampia gamma di materiali organici inclusi compost, residui colturali, torbe e residui organici viene impiegata come ammendanti del suolo. Comunque, la maggior parte degli studi disponibili in letteratura ha investigato gli effetti biologici ed agronomici immediati degli ammendanti organici addizionati mediante una applicazione singola ed all'inizio dell'esperimento, o di un solo ciclo colturale, oppure ripetendo il trattamento dopo un lungo intervallo di tempo, e solitamente sottoforma di una singola applicazione annuale in esperimenti di campo. Questa logica sembra piuttosto sorprendente, dal momento che negli ecosistemi naturali aggiunte frequenti di residui colturali e ammendanti organici sono la regola piuttosto che l'eccezione: ad esempio, il turnover radicale determina una continua disponibilità di tessuti radicali morti per la microflora e le foglie cadono sul suolo durante tutta la crescita delle piante, sebbene vi sia una certa variabilità legata all'andamento stagionale. In un agro – ecosistema l'input di carbonio organico segue complesse dinamiche in relazione alle lavorazioni cui è sottoposto il suolo e più in generale alla gestione degli ammendamenti, sia in termini di rotazioni colturali che

della propria “storia”. Al contrario poche informazioni sono disponibili sull’effetto che trattamenti con ammendanti, ripetuti a brevi intervalli hanno sul tasso di respirazione del suolo (Nett et al., 2011), sulla mineralizzazione del carbonio e dell’azoto (Duong et al., 2009), (Mallory and Griffin, 2007) sull’attività enzimatica (Stark et al., 2008). Per composti modello come il glucosio, è stato dimostrato che aggiunte frequenti di piccole quantità contribuiscono a mantenere l’attività microbica e aumentare il tasso di mineralizzazione del carbonio (Stark et al., 2008). Studi precedenti, hanno dimostrato che i suoli con un lungo periodo di storia di applicazione di ammendanti organici (da mesi ad anni), confrontati con suoli non ammendati, sviluppano una più abbondante ed efficiente biomassa microbica (Kandeler et al., 1999), ed una maggiore attività enzimatica (Dick et al., 1988). Ad esempio, la decomposizione dei nuovi ammendanti organici aggiunti al suolo, risultava differentemente influenzata, a seconda della “storia” dell’ammendamento e in relazione alla qualità biochimica degli stessi substrati incorporati: indifferente per i materiali facilmente e più prontamente degradabili, con un effetto positivo invece, nel caso di substrati a lenta decomposizione o recalcitranti (Nett et al., 2011). La logica alla base di questo modello, prende in considerazione il fatto che per utilizzare composti a lenta degradazione e non prontamente disponibili, sia necessaria una comunità microbica più specializzata ed attiva, mentre i materiali facilmente degradabili possono essere digeriti ed utilizzati da comunità microbiche generiche e meno complesse (Balsler and Firestone, 2005). In ogni caso, date le poche evidenze sperimentali, non si sa bene se e come storie diverse di ammendamenti organici influenzino la fungistasi. Le suddette considerazioni riguardanti la “storia” dell’applicazione di ammendanti organici unite ai processi chimico – fisici del suolo, ci hanno portato ad ipotizzare che “nutrire” un suolo con carbonio organico, esaltando in questo modo l’attività microbica, possa influenzare positivamente la fungistasi. Sembrerebbe che la frequente addizione di sostanza

organica (SO), facendo sviluppare una biomassa microbica di maggiore entità, potrebbe essere in grado di indurre la fungistasi più rapidamente rispetto a dei suoli che non hanno ricevuto carbonio organico nei periodi precedenti. Quando si nutre il suolo attraverso una singola applicazione, si mette a disposizione della microflora una serie di composti (zuccheri solubili, proteine, cellulosa, lignina, ecc.), utilizzati in momenti diversi in base alla loro velocità di decomposizione. L'adattamento del suolo a ripetute somministrazioni di residui vegetali, potrebbe determinare una maggiore efficienza della microflora tellurica nella loro decomposizione e indurre quindi una maggiore fungistasi. In pratica suoli con maggior contenuto in S.O. e a più elevata attività microbica mostrerebbero più elevati livelli di fungistasi, sia in termini di resilienza, e cioè di una maggiore capacità di ripristino delle condizioni di equilibrio del sistema suolo, che di resistenza, ovvero in termini di un più elevato potere tampone di tipo biologico del suolo; ed in questo modo l'opportunità dei patogeni di provocare danni risulterebbe ulteriormente limitata (Fig. 1).

In questo contesto l'obiettivo dello studio è stato quello di valutare gli effetti di differenti storie di ammendamenti, di tipologie di substrati organici e del loro dosaggio, sulla dinamica della fungistasi.

A tale scopo si sono allestiti microcosmi per simulare la dinamica di campo della fungistasi, utilizzando dei contenitori Magenta, e sottoponendo il suolo a ripetute somministrazioni di S.O. a differenti dosaggi e tipologie di materiale organico in modo da coprire un ampio spettro della qualità biochimica dei composti organici. Successivamente, la risposta della fungistasi in seguito ad un'aggiunta massiva di sostanza organica, è stata investigata mediante test eseguiti con quattro funghi appartenenti a diverse nicchie ecologiche: *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum*, *Pyrenochaeta lycopersici* e *Botrytis cinerea*. In dettaglio, le ipotesi di lavoro sono state le seguenti:

1. La frequente addizione di C organico riduce l'intensità di rilascio della fungistasi (cioè aumenta la resistenza della fungistasi ad input di materiale organico, > potere fungistatico);
2. Le ripetute aggiunte di C organico riducono il tempo richiesto per ripristinare ai livelli originari le condizioni fungistatiche dei suoli (cioè porta ad un incremento della resilienza, e quindi il suolo è in grado di ristabilire le proprie condizioni di equilibrio più rapidamente);
3. L'aggiunta frequente di C organico, determinando una maggiore e continua disponibilità di fonti di carbonio facilmente utilizzabile, aumenta la biodiversità microbica, anche sotto l'aspetto della diversità funzionale.

## **3.2. Materiali e Metodi**

### *3.2.1 Ammendanti organici*

Per gli esperimenti sono stati selezionati tre diversi tipi di substrati organici, che si distinguono per un differente rapporto C/N e percentuale di N e lignina (L), indicati di seguito (i valori sono deviazioni medie forfettarie): i) fieno di erba medica (*Medicago sativa*) (contenuto di N =  $3.93 \pm 2.16\%$ ; rapporto C/N =  $11.43 \pm 2.98$ ; contenuto in L. =  $15.12 \pm 1.97\%$ ); ii) fieno di grano (*Triticum aestivum*) (contenuto di N =  $1.19 \pm 0.13\%$ ; rapporto C/N =  $42.01 \pm 3.16$ ; contenuto in L. =  $18.16 \pm 3.21\%$ ); iii) glucosio (contenuto di N = 0.00; rapporto C/N =  $\infty$ ; contenuto in L. = 0.00%). I fieni di grano e di erba medica sono stati prelevati da coltivazioni in campo, asciugati all'aria per 20 giorni fino all'ottenimento di un peso costante,

macinati finemente utilizzando un mulino a sfere e successivamente conservati a temperatura ambiente.

### 3.2.2. *Generazione delle “storie – suolo”*

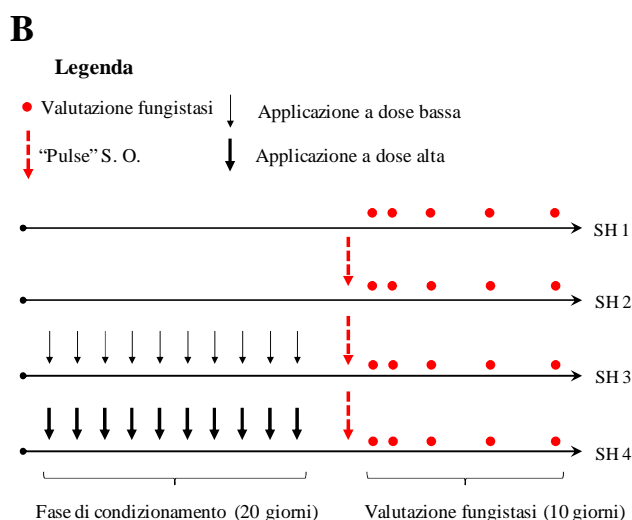
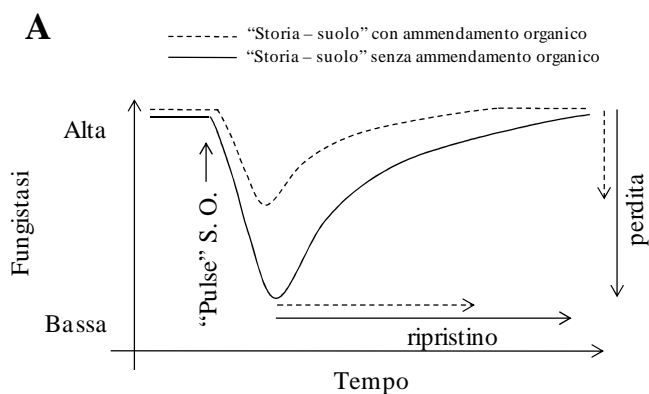
Il suolo utilizzato in questo studio, prelevato dal campo (circa 100 kg di suolo), entro i primi 20 cm di profondità, è risultato prevalentemente sabbioso ed è stato caratterizzato dal punto di vista chimico (sabbia 83.9%, limo 1.9%, argilla 14.2%, pH 8.41, sostanza organica 0.55%, azoto totale 0.65 g/kg, C/N 5, calcare totale 140 g/kg, fosforo disponibile ( $P_2O_5$ ), 48.1 mg/kg, potassio scambiabile 0.53 meq/100g, magnesio scambiabile 0.96 meq/100g, calcio scambiabile 15.5 meq/100g, sodio scambiabile 0.17 meq/100g, EC 0.188 dS/m). In seguito, il suolo è stato setacciato in laboratorio utilizzando un setaccio a maglie di dimensioni < 2mm, e 500 g di suolo sono stati posti in vasetti da 1 L, bagnati fino ad ottenere l'85% della capacità di trattenimento dell'acqua ed incubati a 20°C per 10 giorni in una camera buia prima di sottoporli ad ammendamento. I 10 giorni di pre incubazione sono serviti per evitare una ripresa dell'attività microbica all' inizio dell' esperimento quando al suolo asciugato all'aria è stata aggiunta acqua per inumidirlo (Fierer et al., 2003).

Per ciascun ammendante (glucosio, fieno di erba medica e di grano) sono state generate quattro storie di suoli denominate SH, e costituite nel seguente modo: la storia SH1, rappresenta un suolo che non ha subito ammendamento, quindi utilizzato come controllo; la storia SH2, è invece un suolo che ha subito un' aggiunta di ammendante organico in forma di una singola applicazione al termine della fase di “condizionamento” durata 20 giorni (30 mg di sostanza secca/g di

suolo), le storie SH3 e SH4, sono costituite dal suolo che ha subito durante la fase iniziale di “adattamento” durata 20 giorni, somministrazioni degli ammendanti organici, rispettivamente a dose bassa (1 mg di sostanza secca/kg di suolo) ed a dose alta (10 mg di sostanza secca/kg di suolo) ad intervalli di 2 giorni, per un totale quindi di 10 applicazioni (Fig. 1). Alla fine della fase di condizionamento (la fase iniziale di 20 giorni in cui le “storie – suolo” SH3 e SH4 sono state generate “nutrendo” il suolo frequentemente con gli ammendanti), è stata generata la “storia – suolo” SH2 mediante una singola applicazione degli ammendanti (indicata come “pulse” o dose massiva), alla dose di 30 mg g<sup>-1</sup> di sostanza secca (Fig. 1).



**Figura 1.** Pannello (A), illustrazione schematica delle dinamiche di risposta della fungistasi del suolo, ipotizzate a seguito di un'applicazione massiva di sostanza organica, in terreni senza (linea continua) e con (linea tratteggiata) una storia di ammendamenti organici. Subito dopo l'applicazione di sostanza organica, la fungistasi viene rapidamente persa, ma, non appena la comunità microbica metabolizza i substrati organici esogeni, la fungistasi del suolo è progressivamente ripristinata. La nostra ipotesi è che in terreni precedentemente modificati (SH) la l'intensità di rilascio e il tempo di ripristino della fungistasi sia rispettivamente, più basso e più veloce, rispetto a un suolo non trattato con SO. Il pannello (B) riporta il disegno sperimentale: quattro storie del suolo (SH) sono state generate mediante l'applicazione di diversi regimi di "nutrizione" con sostanza organica in una lunga fase condizionale di 20 giorni. Successivamente, è stata valutata la fungistasi, per cinque volte dopo l'input finale di C organico.



La logica alla base di questo approccio sperimentale (applicazione massiva di SO) è stata quella di simulare ciò che spesso avviene in un agro – ecosistema nel quale viene incorporata una grande quantità di carbonio organico alla fine di un ciclo colturale, quando i residui vegetali della coltura vengono interrati (ad esempio il fieno di erba medica e di grano), oppure localmente nella rizosfera durante il processo di rizodeposizione, fenomeno ubiquitario che riguarda il rilascio di carbonio organico nel suolo ad opera delle radici (ad esempio il glucosio). In seguito a ciascuna applicazione, i residui venivano mescolati con il suolo; i suoli non ammendati venivano mescolati alla stessa maniera in modo da trattare tutti i suoli allo stesso modo, anche rispetto al solo disturbo provocato dal rivoltamento. I suoli sono stati ammendati con i tre differenti materiali organici e con tre diverse storie di suolo; inoltre si è preso in considerazione come controllo il suolo non trattato, per un totale di 10 storie di suolo; queste scaturiscono dal seguente schema: 3 tipi di ammendanti (glucosio, fieno di erba medica e di grano) x 3 “storie” (SH2, SH3 ed SH4), più la storia del suolo controllo (SH1). L’intero disegno sperimentale ha incluso quindi 10 “storie – suolo” con 10 repliche per un totale complessivo di 100 unità sperimentali.

### *3.2.3. Saggio per la valutazione della fungistasi del suolo*

Al termine della fase iniziale, denominata di “condizionamento”, durata 20 giorni, la fungistasi è stata valutata, in seguito all’ input massivo di ammendante organico (“pulse” di S.O.), per tutte e quattro le storie del suolo, alle seguenti date di campionamento: dopo 6 ore, 1, 3, 5 e 10 giorni dall’ammendamento (Fig. 1). Le aliquote di suolo campionate sono state congelate a -20°C fino al momento delle analisi. Al fine di determinare la fungistasi, sono stati preparati estratti acquosi di

suolo da ciascun campione mediante mescolamento di 10 g di suolo con 10 ml di acqua sterile posti su una piattaforma oscillante per 30 minuti ad una velocità di 200 spm, a temperatura ambiente. Successivamente, le sospensioni di suolo ottenute sono state centrifugate per 10 minuti a 2400 g ed il supernatante è stato prelevato e sterilizzato, mediante microfiltrazione con filtri aventi pori di 0.22 µm e conservati a -20°C fino al momento dei bio saggi. La fungistasi degli estratti di suolo sterili è stata valutata mediante misura della crescita ifale (Alabouvette et al., 2006) di quattro funghi target appartenenti a differenti nicchie ecologiche: *Aspergillus niger* (patogeno delle piante opportunisto e saprofita ubiquitario), *Botrytis cinerea* (patogeno delle piante con un' ampia cerchia di ospiti), *Pyrenochaeta lycopersici* (patogeno delle piante con ristretto range di ospiti) e infine *Trichoderma harzianum* (fungo ubiquitario, micoparassita e saprofita, disponibile in commercio sotto forma di formulati utilizzati per il controllo biologico in agricoltura). In esperimenti preliminari, le spore dei quattro funghi sono state saggiate per la loro capacità o meno di germinare in acqua, in modo da valutare la loro sensibilità alla fungistasi,. L'incapacità di germinazione delle spore in acqua può essere considerata come una caratteristica positiva per lo studio dei meccanismi della fungistasi e di conseguenza dell'approccio nutrizionale, si parla quindi di spore germinanti solo in presenza di nutrienti (Hsu and Lockwood, 1973; Berendsen et al., 2012).

L'inoculo fungino è stato ottenuto mediante raccolta dei propaguli vitali dei funghi (conidi) direttamente dalle piastre di coltura, mediante aggiunta di 10 ml di acqua sterile alle macrocolonie fungine cresciute in piastre Petri sul substrato PDA (potato dextrose agar) per circa 10 giorni, e raschiando la superficie del micelio fungino con una spatola in modo da rimuovere i conidi. La sospensione acqua – spore così ottenuta è stata filtrata su garza sterile, centrifugata, sottoposta a doppio lavaggio con acqua sterile e portata ad una concentrazione di conidi di  $10^{-5} \text{ ml}^{-1}$

mediante emocitometro. La sospensione di spore utilizzate per i test di germinazione in piastra ELISA con i 4 funghi, è stata preparata in 10  $\mu$ l di acqua sterile. Gli estratti di suolo (90  $\mu$ l) sono stati aggiunti ai 96 pozzetti della piastra ed incubati a 24°C.

La crescita fungina è stata quantificata mediante spettrofotometro ( $\lambda = 590$  nm) dopo 20 ore di incubazione, utilizzando il lettore Thermomax micro piastra (Molecular Devices, Wokingham, UK).

#### *3.2.4 Analisi del suolo*

La respirazione del suolo, riferita a 50 g di suolo essiccato, è stata misurata mediante incubazione in vasetti con tappo a vite con capacità di 500 ml. I suoli sono stati campionati in tutto 16 volte per misurarne la respirazione e cioè: ogni 2 giorni durante la fase iniziale di 20 giorni di condizionamento per un totale di 10 volte, ed altre 6 volte dal momento dell'ultima applicazione di ammendante organico (applicazione massiva di S.O.) e più precisamente dopo 6 ore, e dopo 1, 2, 3, 5 e 10 giorni. La concentrazione di CO<sub>2</sub> intrappolata nello spazio di testa è stata misurata mediante il metodo trappola degli alcali (Alef, 1995). In pratica: 5 ml di KOH 1N, sono stati posti in una provetta posizionata all'interno del microcosmo costituito dal suolo in esame nel vaso con chiusura ermetica; la soluzione di idrossido di potassio è rimasta esposta per 48 ore nei microcosmi, e successivamente la base è stata titolata con HCl 0.1 N per misurare la quantità di anidride carbonica rilasciata dai microcosmi ed assorbita dall'idrossido di potassio.

Il profilo fisiologico (CLPP: community level physiological profile) delle popolazioni microbiche presenti nei campioni di suolo è stato valutato mediante il

metodo BIOLOG EcoPlates™ (BLG), basato sulla capacità della comunità microbica di utilizzare diverse fonti di carbonio disponibili dando, quindi, una misura della sua diversità funzionale. L'analisi Biolog è stato valutato una volta conclusa la fase di condizionamento delle quattro storie. La piastra BIOLOG consiste di 96 pozzetti contenenti 31 differenti fonti di carbonio, e un bianco in 3 repliche. Come indicatore viene utilizzato il colorante violetto di tetrazolio che quando si riduce, sviluppa un colore viola. Le letture di assorbanza sono state effettuate ogni 24 ore e per 4 giorni consecutivi, mediante un lettore di micropiastre tarato a 590 nm (Thermomax Molecular Devices, Wokingham, UK). Il saggio è stato condotto come descritto in precedenza da [Bartelt–Ryser et al., \(2005\)](#). Lo sviluppo medio del colore (AWCD) è stato calcolato considerando sia tutti i substrati nell'insieme che considerando separatamente le principali classi chimiche utilizzate dai microrganismi (amminoacidi, ammine, carboidrati, fenoli, acidi carbossilici e polimeri). Infine, al termine del periodo di 30 giorni di incubazione, la quantità dei nitrati presenti nel suolo è stata valutata spettrofotometricamente (nano-Color 400 D) dopo estrazione con KCl 1 N.

### *3.2.5 Analisi dei dati*

Per l'analisi statistica dei risultati del biosaggio, i dati sono stati trasformati (*log.*) al fine di soddisfare le ipotesi di normalità e di omogeneità della varianza, e sottoposti ad analisi ANOVA, utilizzando il software STATISTICA 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). In particolare, modelli a tre vie ANOVA sono stati utilizzati per valutare la crescita dei funghi, considerando gli effetti principali e di interazione della storia del suolo (4 livelli), il tipo di ammendamento (3 livelli) e il tempo di incubazione (5 livelli). L'analisi a tre vie ANOVA è stata eseguita

separatamente quattro volte per ogni specie fungina. Le differenze sono state testate a coppie utilizzando HSD test post-hoc di Tukey. Due ulteriori modelli a due vie di ANOVA sono stati utilizzati per valutare la respirazione del suolo e i dati AWCD dell'analisi Biolog, considerando gli effetti principali e di interazione della storia del suolo e del tipo di modifica apportata (ammendamento).

### **3. Risultati**

#### *3.3.1. L'effetto della "storia" del suolo sulla fungistasi*

Nei biosaggi eseguiti per valutare la fungistasi, la generazione della "storia" del suolo, così come il tipo di ammendamento organico ed il tempo di incubazione, hanno avuto effetti significativi sulla crescita di tutte e quattro le specie fungine in prova (Tabella supplementare 1).

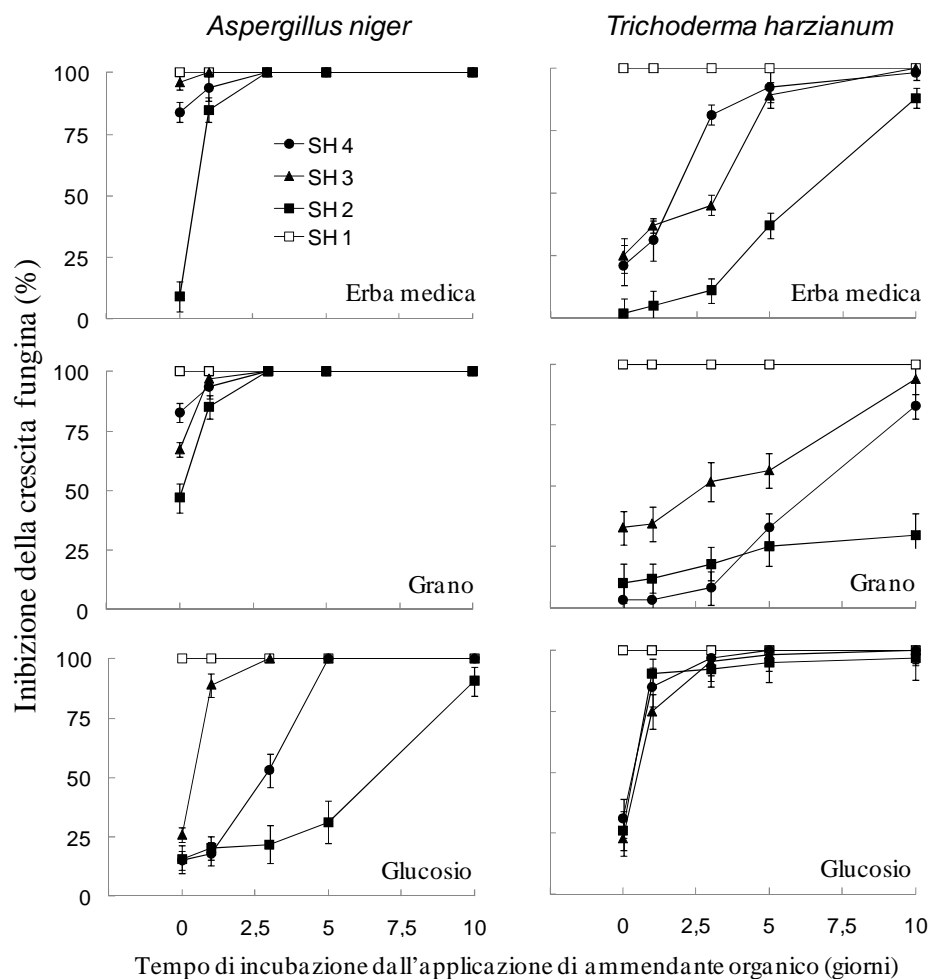
**Tabella supplementare 1.**

I risultati dell'analisi a tre vie ANOVA per valutare la crescita dei funghi *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Pyrenochaeta lycoperici*, e *Trichoderma harzianum*. L'analisi ANOVA si riferisce alle storie del suolo (S1, S2, S3 e S4, quattro livelli), al tipo di ammendamento (glucosio, erba medica e paglia di grano, tre livelli), ed al tempo di incubazione (6 ore, 1, 3, 5 e 10 giorni dall'aggiunta massiva di C organico, cinque livelli) che rappresentano le variabili indipendenti. I valori statisticamente significativi sono mostrati in grassetto.

<b>Parameter</b>	<b>Source</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P-value</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Soil history (SH)	3	45,9	< <b>0.01</b>
	Amendment type (AT)	2	147,2	< <b>0.01</b>
	Incubation time (IT)	4	69,2	< <b>0.01</b>
	SH x AT	6	15,9	< <b>0.01</b>
	SH x IT	12	8,6	< <b>0.01</b>
	AT x IT	8	12,3	< <b>0.01</b>
	SH x AT x IT	24	10,6	< <b>0.01</b>
<i>Botrytis cinerea</i>	Soil history (SH)	3	27,4	< <b>0.01</b>
	Amendment type (AT)	2	157,2	< <b>0.01</b>
	Incubation time (IT)	4	81,1	< <b>0.01</b>
	SH x AT	6	48,5	< <b>0.01</b>
	SH x IT	12	12,9	< <b>0.01</b>
	AT x IT	8	13,4	< <b>0.01</b>
	SH x AT x IT	24	17,9	< <b>0.01</b>
<i>Pyrenochaeta lycoperici</i>	Soil history (SH)	3	49,2	< <b>0.01</b>
	Amendment type (AT)	2	51,1	< <b>0.01</b>
	Incubation time (IT)	4	132,2	< <b>0.01</b>
	SH x AT	6	16,3	< <b>0.01</b>
	SH x IT	12	14,6	< <b>0.01</b>
	AT x IT	8	21,0	< <b>0.01</b>
	SH x AT x IT	24	5,6	< <b>0.01</b>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Soil history (SH)	3	27,4	< <b>0.01</b>
	Amendment type (AT)	2	109,3	< <b>0.01</b>
	Incubation time (IT)	4	204,7	< <b>0.01</b>
	SH x AT	6	44,4	< <b>0.01</b>
	SH x IT	12	6,5	< <b>0.01</b>
	AT x IT	8	11,0	< <b>0.01</b>
	SH x AT x IT	24	9,9	< <b>0.01</b>

L'aggiunta al suolo in un'unica soluzione e a dose alta ("pulse" O. M.) di substrati organici ha temporaneamente ridotto o addirittura annullato il suo potere fungistatico. (figg. 2-3).

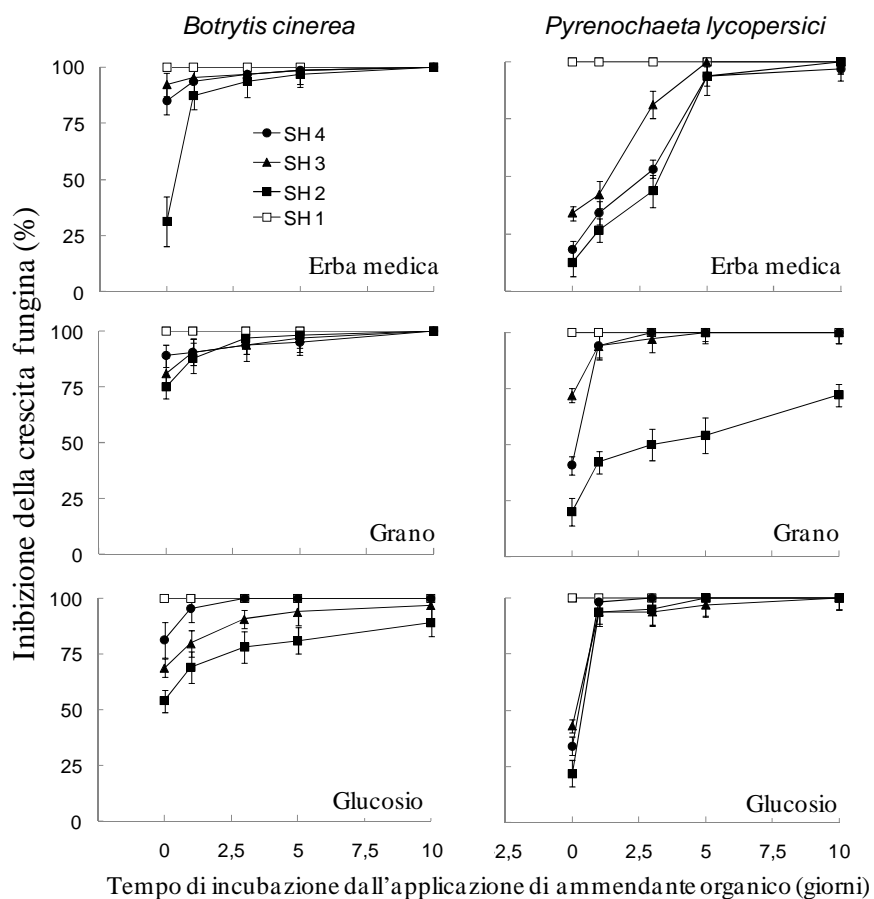
**Figura 2.** Inibizione della crescita fungina (espressa come percentuale sul controllo, rispetto allo sviluppo in PPB = 0) di *Aspergillus niger* e *Trichoderma harzianum* negli estratti acquosi di suolo durante il periodo di incubazione di 10 giorni che ha seguito la fase condizionale e l'applicazione massiva di sostanza organica. Per ogni storia del suolo i valori riportati sono le medie  $\pm$  SD di tutte e 5 le repliche,.





Tuttavia, questo effetto è risultato fortemente dipendente dalla storia del suolo (SH), dal substrato organico somministrato e dal tempo di incubazione successivo all'ammendamento massivo. Nella storia SH1, corrispondente al suolo mai modificato (controllo), cioè quello che non ha subito alcun tipo di ammendamento, la crescita delle quattro specie fungine risultava completamente inibita durante l'intera durata dell'esperimento (Figg. 2-3). Al contrario, per le storie SH2, SH3 e SH4, la crescita di tutte e quattro le specie fungine ha mostrato un aumento significativo (cioè perdita di fungistasi) (6 ore) subito dopo l'aggiunta massiva dei tre substrati organici (Figg. 2-3). Successivamente, lo sviluppo dei funghi ha però mostrato una diminuzione significativa, con differenze legate sia al tipo di substrato che alla specie fungina, durante il successivo periodo di incubazione (Figg. 2-3). Dopo i dieci giorni dall'ammendamento finale, la crescita fungina è risultata completamente inibita in quasi tutte le combinazioni substrato – fungo – SH (figg. 2-3) a dimostrazione del ripristino del livello di fungistasi originario.

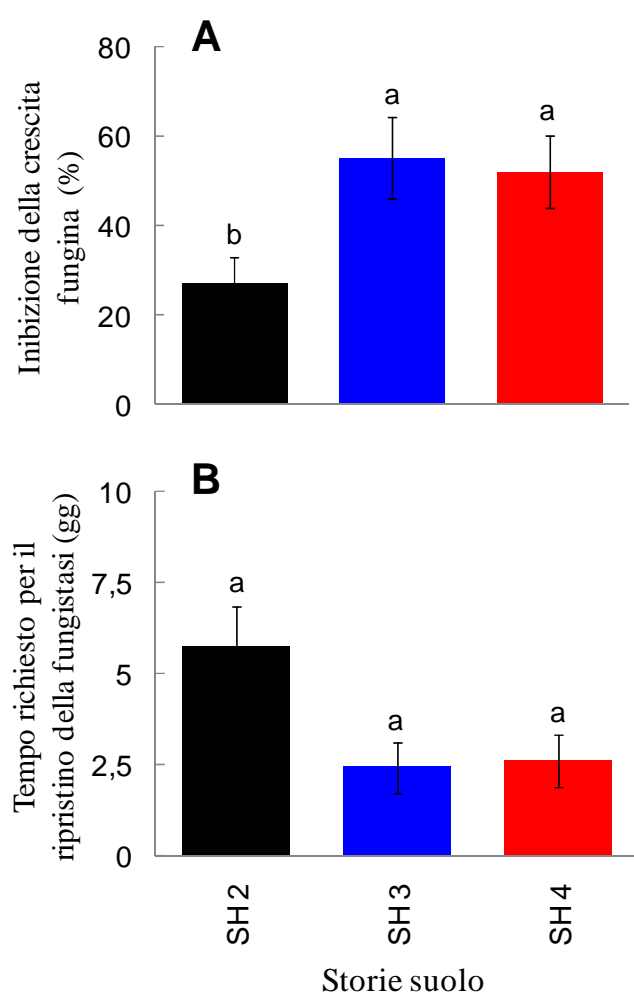
**Figura 3.** Inibizione della crescita fungina (espressa come percentuale sul controllo, rispetto allo sviluppo in PPB = 0) di *Botrytis cinerea* e *Pyrenochaeta lycopersici* negli estratti acquosi di suolo durante il periodo di incubazione di 10 giorni che ha seguito la fase condizionale e l' applicazione massiva di sostanza organica. Per ogni storia del suolo i valori riportati sono le medie  $\pm$  SD di tutte e 5 le repliche,.



Questo risultato indica che la fungistasi viene ripristinata entro i 10 giorni successivi all'ammendamento massivo somministrato al termine della fase preliminare di condizionamento.

La progressiva diminuzione della crescita fungina, indice del progressivo ripristino della fungistasi nel suolo, è risultata più rapida per alcune combinazioni ammendante – fungo – SH, rispetto ad altre. Nel complesso, l'applicazione massiva di ammendante organico ha determinato una forte perdita di fungistasi specialmente nella storia SH2 rispetto ad SH3 e SH4 (Fig. supplement. 1). Queste differenze tra le storie del suolo SH2 (nessun apporto di OM prima dell'ammendamento massivo) e quelle invece generate nutrendo frequentemente il suolo con ammendanti organici (come è avvenuto per le storie SH3 e SH4), risultavano statisticamente significative nella maggior parte delle prove eseguite. In particolare, la differenza in termini di perdita di fungistasi, risultava significativa con tutti i tipi di ammendante (fieni di erba medica e frumento e glucosio) per *A. niger* (Fig. 2) e *B. cinerea* (Fig. 3); solo con erba medica e grano, invece, per *T. harzianum* e *P. lycopersici* (Figg. 2-3). In media, riunendo insieme i dati relativi a tutti i substrati e le quattro specie fungine, il ripristino della fungistasi per la storia SH2 ha richiesto un tempo più lungo (5,75 giorni) rispetto ad SH3 (2,41 giorni) ed SH4 (2,58 giorni) (Fig. complementare. 1). Considerando poi anche le differenti tipologie di ammendanti, il ripristino della fungistasi è risultato più lento per i funghi *A. niger* e *B. cinera* quando come ammendante è stato utilizzato il glucosio, mentre per *T. harzianum* e *P. lycopersici* ciò si è verificato con erba medica e grano (figg. 2-3).

**Figura supplementare 1.** Pannello (A) E' mostrato il rilascio della fungistasi inteso come percentuale di inibizione della crescita fungina (espressa come percentuale di crescita rispetto al controllo sul PPB = 0) di *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Pyrenochaeta lycopersici* e *Trichoderma harzianum* negli estratti acquosi di suolo 6 ore dopo la applicazione di sostanza organica. Pannello (B) E' riportato il tempo necessario per ripristinare nel suolo le condizioni fungistatiche, espresso come numero di giorni necessari per ottenere un' inibizione della crescita fungina > 85%. In entrambi i grafici, i valori sono medie  $\pm$  SD (N = 12); le differenti lettere indicano differenze statisticamente significative di gruppo (test ANOVA Duncan, P <0,05).



### *3.3.2. Storia del suolo, respirazione e diversità microbica funzionale*

La respirazione del suolo è stata significativamente influenzata dalla SH e dal tempo di incubazione (Tabella complementare S2). E' stato osservato un aumento progressivo del tasso di respirazione durante la fase condizionale per le storie SH3 e SH4, che hanno subito appunto i trattamenti periodici con i materiali organici (erba medica, frumento e glucosio) durante i 20 giorni della fase di condizionamento (Fig. 4). Tuttavia, nella storia SH4 l'ammendamento con glucosio ha indotto un tasso di respirazione che ha raggiunto un plateau dopo 10-12 giorni dall'inizio della fase condizionale (Fig. 4). In tutte le condizioni è stato osservato un marcato scoppio della respirazione immediatamente dopo l'applicazione massiva del materiale organico (Fig. 4). Tale aumento del rilascio di CO<sub>2</sub> è stato più evidente per la storia SH4, rispetto ai trattamenti SH2 e SH3, ma solo quando sono stati applicati come ammendanti fieno di erba medica e di frumento (Fig. 4). Il picco di respirazione, tuttavia, è durato solo pochi giorni; dopo l'input massivo di sostanza organica, infatti, il tasso di respirazione del suolo ha mostrato una rapida e progressiva diminuzione raggiungendo, entro 10-15 giorni, i livelli osservati nel trattamento non ammendato SH1, riducendosi alla respirazione basale di un qualsiasi suolo indisturbato (Fig. 4). Questo andamento del tasso di respirazione si è riprodotto con tutti tipi di ammendanti.

**Tabella integrativa 2.**

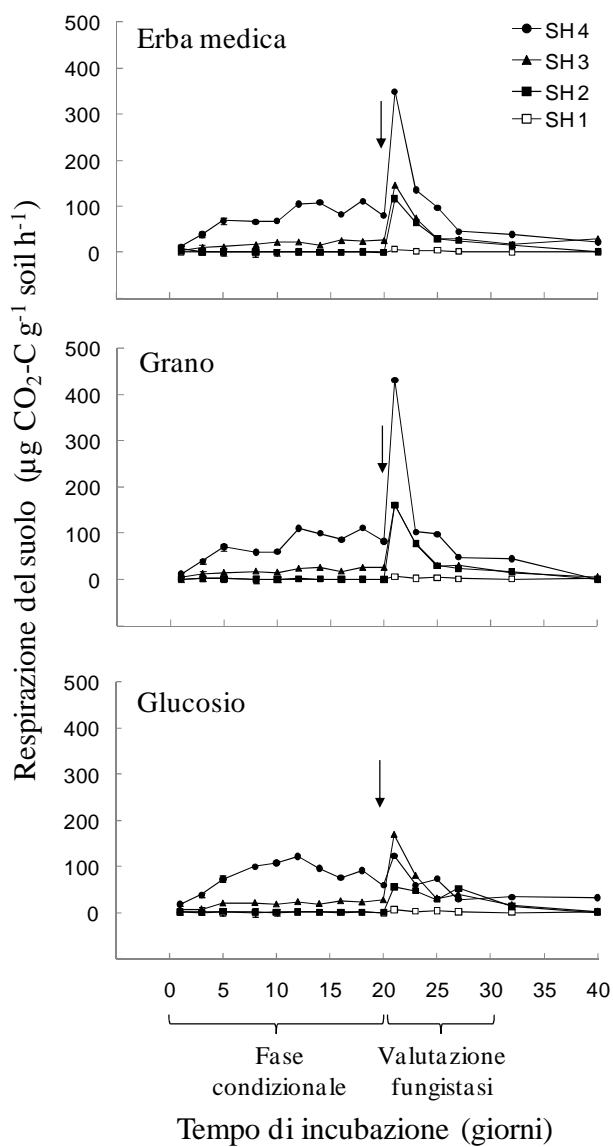
Risultati sintetici dell'analisi a tre vie ANOVA relativa alla respirazione del suolo. In questa analisi, la storia del suolo (quattro livelli, SH1, SH2, SH3, SH4 ), il tipo di ammendamento (tre livelli, glucosio, fieno di erba medica e di grano), ed il tempo di incubazione (sedici livelli) sono le variabili indipendenti. I valori statisticamente significativi sono mostrati in grassetto.

---

<b>Parameter</b>	<b>Source</b>	<b>df</b>	<b>F</b>	<b>P-value</b>
Soil respiration	Soil history (SH)	3	119.8	<b>&lt;0.01</b>
	Amendment type (AT)	2	31.6	<b>&lt;0.01</b>
	Incubation time (IT)	4	87.4	<b>&lt;0.01</b>
	SH x AT	6	4.9	<b>&lt;0.01</b>
	SH x IT	12	5.4	<b>&lt;0.01</b>
	AT x IT	8	9,3	<b>&lt;0.01</b>
	SH x AT x IT	24	6,3	<b>&lt;0.01</b>

---

**Figura 4.** Respirazione del suolo durante la fase condizionale (20 giorni), e nei 20 giorni successivi all'applicazione massiva di sostanza organica (freccia). Si noti che la storia SH1 non ha ricevuto l'ammendamento. I valori sono medie di 5 repliche. Le barre per la variabilità dei dati (SD) non sono indicate per migliorare la leggibilità; le statistiche sono riportate nella tabella integrativa 2.

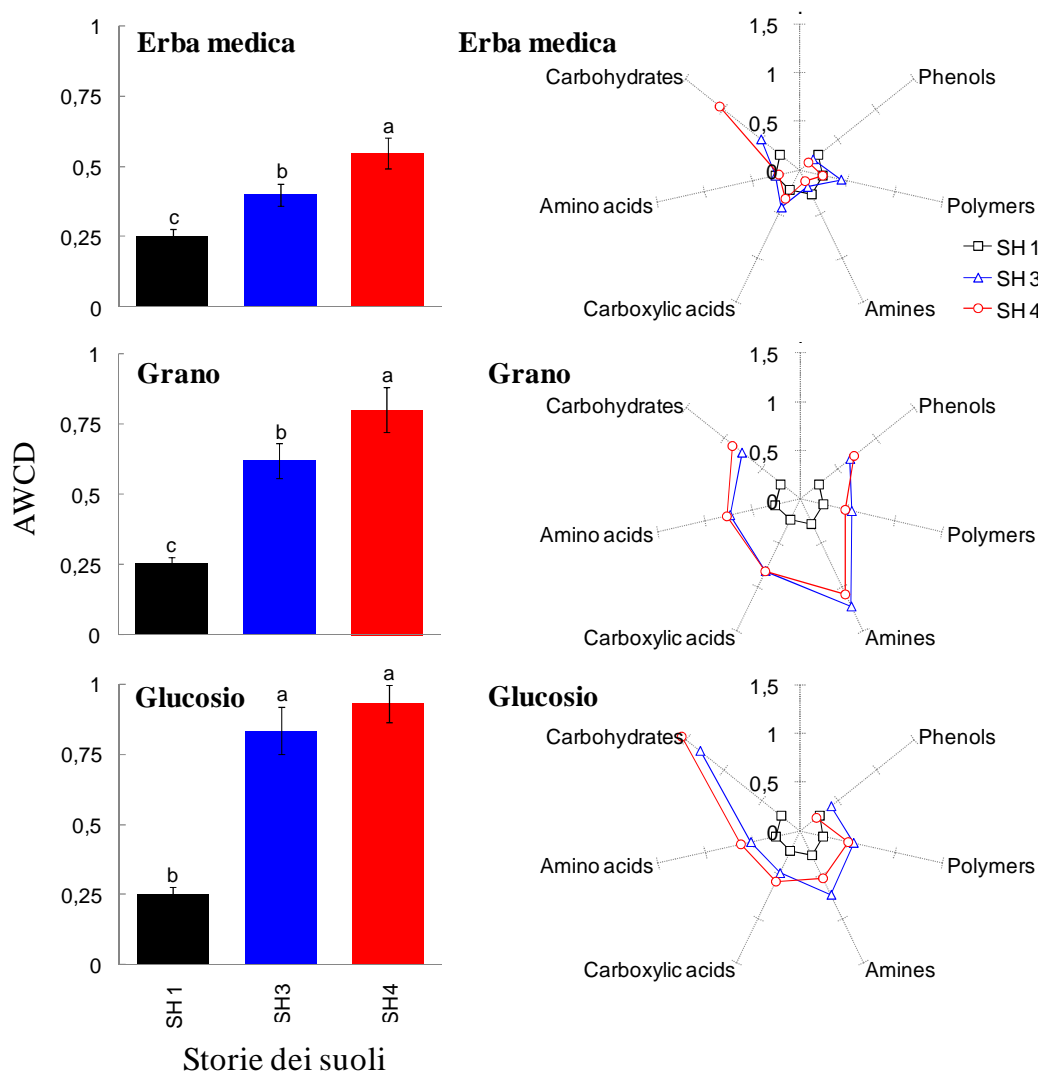


L'esame del profilo fisiologico delle comunità microbiche (CLPP) presenti nei suoli delle diverse storie è stato effettuato tramite il test BIOLOG e l'analisi dei dati relativi alla colorazione media dei pozzetti (AWCD) ha evidenziato valori significativamente più elevati nelle storie SH3 e SH4 (suoli ammendati periodicamente con i fieni di erba medica e di grano e con glucosio) rispetto al suolo non trattato SH1 (Fig. 5, pannelli a sinistra). I valori AWCD, inoltre, sono stati significativamente più elevati nel caso dei suoli SH3 e SH4 ammendati con quantità maggiori di fieno di erba medica e grano (Fig. 5).

L'analisi dei dati (AWCD: average well color development), relativi alla capacità delle comunità microbiche, sviluppatasi nel suolo sottoposto ai diversi trattamenti, di utilizzare i principali gruppi di composti organici (carboidrati, acidi carbossilici, amminoacidi, ammine, composti fenolici e polimeri), (Fig 5 pannelli a destra), ha dimostrato che quando il terreno è stato ammendato con fieno di frumento, la microflora presente in SH3 e SH4 utilizzava tutti i gruppi dei composti molto meglio della microflora presente in SH1 e lo stesso risultato, con l'eccezione dei composti fenolici, si otteneva con il glucosio come ammendante. L'ammendamento con fieno di medica, invece, ha determinato in SH3 e SH4 lo sviluppo di una microflora che, rispetto a quella presente in SH1, ha una maggiore capacità competitiva solo nei confronti dei carboidrati, (il che comunque rappresenta la componente più rilevante della capacità fungistatica di un suolo se si aderisce alla teoria della competizione nutrizionale quale meccanismo principale della fungistasi).

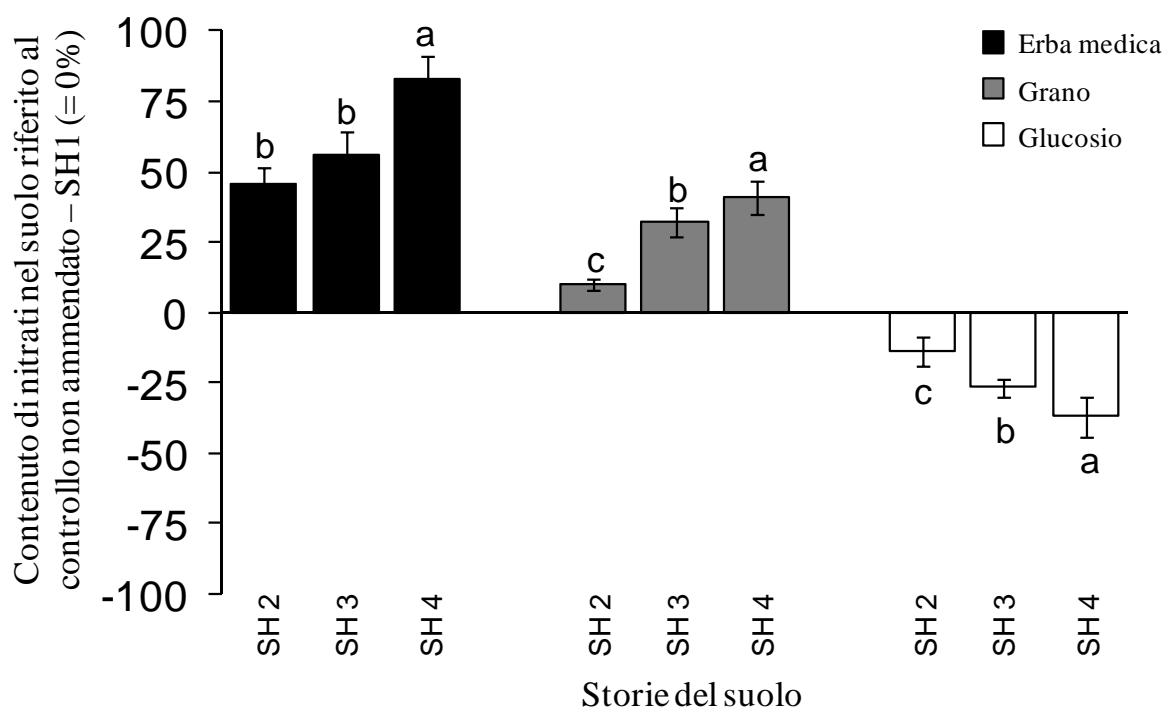


**Figura 5.** Sviluppo medio del colore dei pozzetti (AWCD - pannelli a sinistra) per l'utilizzo del carbonio da parte delle popolazioni microbiche, come risultato di 31 diverse fonti di C incubate in piastre BIOLOG Ecoplates™, nel suolo ammendato con fieno di erba medica (in alto), fieno di grano (al centro) e glucosio (in basso) e campionato alla fine della fase condizionale (20 giorni). I valori sono medie  $\pm$  SD, le lettere differenti indicano differenze statisticamente significative di gruppo (test ANOVA Duncan,  $P < 0,05$ ). Sui pannelli di destra, la AWCD ha registrato la capacità di utilizzazione da parte delle comunità microbiche non specifiche per i sei gruppi chimici principali (carboidrati, amminoacidi, acidi carbossilici, ammine, polimeri e fenoli) delle 31 diverse sorgenti di C considerate.



Le storie del suolo generate con i diversi tipi di ammendanti organici influenzano in modo significativo la concentrazione di nitrati che si ritrovano nel suolo al termine dei 30 giorni di incubazione (Fig. complementare. 1). La quantità dei nitrati è risultata più elevata nelle storie SH4 e SH3 rispetto a SH2 e al controllo non trattato (SH1), quando sono stati incorporati fieni di medica e di grano (Fig. complementare. 1). Al contrario, una netta riduzione del contenuto in nitrati è stata osservata nel terreno ammendato con glucosio, e tale riduzione è risultata direttamente correlata alla quantità di glucosio aggiunto al suolo (Fig. complementare. 2).

**Figura integrativa 2.** Effetto dei diversi ammendamenti sulla concentrazione dei nitrati nel suolo al termine del periodo di incubazione di 30 giorni. I valori sono medie  $\pm$  SD, le diverse lettere indicano differenze statisticamente significative all'interno di ogni storia del suolo (test ANOVA Duncan,  $P < 0,05$ ).



### 3.4. Discussione

L'esperimento sopra descritto, che ha visto coinvolte quattro specie fungine e tre substrati organici, che costituiscono un campione rappresentativo delle principali qualità biochimiche dei diversi ammendanti organici utilizzabili in agricoltura, ha dimostrato che l'effetto delle storie del suolo generate, nel medio periodo, in seguito all'ammendamento con C organico, influenza notevolmente la dinamica della fungistasi del suolo. In particolare si è dimostrato che, indipendentemente dalla specie fungina e dal tipo di ammendante, la frequente aggiunta di C organico al suolo riduce sia l'intensità della perdita di fungistasi (ossia viene aumentata la resistenza del suolo a squilibri che indurrebbero forti variazioni del suo livello fungistatico a seguito di apporti di materiale organico) sia il tempo necessario per il ripristino della stessa (cioè risulta aumentare anche la resilienza). Inoltre, la frequente aggiunta di C organico, probabilmente come risultato di un continuo approvvigionamento di composti organici facilmente decomponibili, determina un aumento della respirazione e delle specifiche capacità cataboliche della microflora che si sviluppa nel suolo. I risultati derivanti dalle prove svolte, supportano come ipotesi principale per lo studio delle dinamiche della fungistasi, quella basata sulla competizione nutrizionale per nutrienti a basso peso molecolare e forniscono indicazioni positive per un efficace utilizzo degli ammendanti organici ai fini della difesa dai patogeni tellurici. Questo studio ha evidenziato che l'ammendamento organico rappresenta un importante fattore di controllo della fungistasi del suolo. Tuttavia, gli effetti dell'ammendamento con C organico sono dipendenti dalla scala temporale di analisi : negativi nel breve periodo (ore o giorni), ma positivi nel medio – lungo periodo (settimane o mesi). La rapida ma temporanea perdita di fungistasi, in seguito all'applicazione di sostanza organica al suolo è stata precedentemente descritta in alcuni studi ([Adams](#)

and Papavizas, 1969; de Boer et al., 2003; Berendsen et al., 2012), che hanno messo in evidenza come il tempo di ripristino e l'intensità della perdita di fungistasi siano correlati alla qualità biochimica del C organico apportato (Bonanomi et al., 2013). Il rilascio di fungistasi osservato con le tre fonti di carbonio esaminate, fornisce un importante, anche se indiretto, supporto all'ipotesi della competizione per i nutrienti, come meccanismo principale di controllo della fungistasi (Steiner and Lockwood, 1970).

Se ci si concentra solo sull'effetto immediato derivante dall'applicazione del C organico al suolo, appare evidente che l'impiego di ammendamenti organici in agricoltura, non sia una strategia proficua per migliorare i livelli di fungistasi nel suolo, in quanto questo trattamento conduce nel breve periodo alla riduzione di questa proprietà. In altre parole, gli effetti positivi dell'applicazione di C organico sulla dinamica della fungistasi, non possono essere compresi se non si considerano i risultati ottenuti nel medio/lungo termine. A questo proposito, il presente lavoro fornisce due importanti prove a sostegno del parere che il progressivo adattamento del suolo alle applicazioni frequenti di C organico influisce positivamente sulla fungistasi: (1) l'intensità di rilascio della fungistasi è ridotta nel suolo che ha una storia di ammendamenti organici frequenti nel tempo, rispetto al suolo controllo non trattato (cioè nel primo si osserva un aumento della resistenza della fungistasi nel caso di eventi squilibranti), (2) il tempo necessario per il ripristino della fungistasi in seguito ad un input di carbonio organico si riduce nel suolo che ha subito precedenti ammendamenti (fase di condizionamento), (cioè si ha una maggiore resilienza del suolo). I risultati ottenuti, appaiono coerenti con le ipotesi formulate e con le informazioni presenti in letteratura, in quanto sono stati scelti come ammendanti una discreta gamma di residui organici e per i test di germinazione sono state confrontate quattro specie fungine.

Il ripristino della fungistasi, osservato nelle storie del suolo che hanno subito l'ammendamento periodico con i materiali organici in prova, può essere correlato ad un rapido consumo delle fonti di carbonio labili. La valutazione da un punto di vista quantitativo circa la capacità di un suolo di opporsi a variazioni della fungistasi, cioè il tempo richiesto da ogni terreno per ripristinare la condizione micostatica (resilienza), indica come la storia dell'applicazione di C organico sia in grado di migliorare in modo significativo questa proprietà (potere tampone di tipo biologico o fungistatico). Infatti, in media sono trascorsi rispettivamente 2,51 e 5,75 giorni per ripristinare la fungistasi in seguito all'ammendamento massivo con sostanza organica nei suoli con una storia di applicazione frequente (fase di condizionamento) rispetto al suolo controllo. Questo dato corrisponde ad una notevole riduzione (circa il 56%) del tempo necessario per il ripristino della fungistasi. A questo punto, alla luce dei risultati ottenuti, appaiono due i quesiti a cui bisognerebbe poter rispondere: il primo, come la resilienza alla fungistasi nel suolo aumenta nei suoli aventi una storia di frequenti applicazioni di ammendanti; il secondo, quali potrebbero essere le implicazioni ecologiche e pratiche per il controllo biologico dei patogeni tellurici? Per quanto riguarda il primo quesito, il ripristino della fungistasi può essere probabilmente correlato ad un impoverimento progressivo delle frazioni labili del carbonio nel suolo dovuto all'attività metabolica della microflora tellurica (Bonanomi et al., 2013). Negli esperimenti condotti, il verificarsi di una maggiore capacità concorrenziale per i nutrienti da parte dei microbi, può spiegare il più rapido ripristino della fungistasi osservato nei suoli aventi, nel loro recente passato, subito applicazioni di sostanza organica (SH). A questo proposito, la respirazione del suolo ed i dati scaturiti dal profilo nutrizionale (Biolog), forniscono un sostegno indiretto a questa ipotesi. I picchi di respirazione più alti in seguito all'ammendamento e la tendenza coerente per le attività cataboliche superiori, misurate con il metodo BIOLOG Ecoplates™,

registrate nel suolo con una storia di applicazione di materiali organici, probabilmente riflettono un'attività microbica superiore e maggiormente differenziata. In particolare, l'analisi del profilo fisiologico a livello di comunità (CLPP), ha mostrato una capacità di degradazione dei nutrienti più elevata quando i terreni sono stati ammendati con glucosio e grano. Una notevole e superiore capacità di metabolizzare i carboidrati è stata osservata in tutti i terreni ammendati rispetto al controllo non ammendato. Il risultato è particolarmente rilevante nel contesto della fungistasi del suolo. Precedenti studi ([Garbeva et al., 2011](#)) sottolineano che l'induzione della fungistasi è legata alla capacità delle comunità microbiche di utilizzare rapidamente le risorse del suolo fino ad esaurimento delle stesse (diverse fonti di C labile). Ad esempio, nello studio di [Steiner and Lockwood, \(1970\)](#) è riportato che la rapidità di utilizzazione del glucosio nel suolo è correlata direttamente al ripristino della fungistasi. Dai dati ottenuti nel presente lavoro non si può asserire di avere ottenuto una prova diretta di un utilizzo più rapido delle risorse in un suolo "nutrito" con varie fonti di C organico, rispetto al suolo controllo non modificato. Tuttavia, la superiore capacità catabolica dei suoli con una storia di ammendamento osservata, risulta coerente con il veloce ripristino della fungistasi dopo un input di C organico. Infine, si può notare, che le quattro specie fungine impiegate nell'esperimento hanno mostrato un comportamento molto simile a seguito dell'ammendamento organico massivo e in tutte le situazioni ecologiche generate nel suolo dalle "storie" (SH) che in questo erano state generate. Tutti i funghi, cioè, hanno inizialmente mostrato una maggiore capacità di sviluppo (rilascio della fungistasi) in seguito all'aggiunta massiva di ammendante organico, mentre nei 10 giorni successivi si è assistito alla loro completa inibizione dovuta al progressivo ripristino delle proprietà fungistatiche in tutti i suoli della prova. La spiegazione a questo comportamento simile dei quattro funghi in prova, è da ricercarsi, almeno in parte, nella natura dei meccanismi di competizione

nutrizionale coinvolti nella dinamica della fungistasi, e in particolare nel fenomeno del veloce esaurimento dei nutrienti nel suolo resi quindi indisponibili alle spore delle quattro specie bersaglio che per germinare necessitano di una sorgente esterna di carbonio. Tuttavia, sulla base dei dati ottenuti nel presente studio, nel quale sono state considerate esclusivamente specie fungine il cui sviluppo è legato alla disponibilità di nutrienti esogeni (dette specie “carbonio dipendenti”), non si è in grado di escludere il potenziale ruolo di sostanze inibitrici presenti nel suolo, quale importante meccanismo di fungistasi altrettanto valido per una sua proficua gestione.

Garbeva et al., (2011) suggeriscono che la gestione della fungistasi nel suolo, mediante l'incremento della capacità di utilizzazione delle risorse nutritive da parte delle comunità microbiche, e riducendone in questo modo il loro tempo di permanenza nel suolo e nella rizosfera, può risultare uno strumento utile per il controllo biologico dei patogeni delle piante. A questo proposito, i nostri risultati forniscono un chiaro supporto all'ipotesi che la qualità di un suolo definita come “fungistasi” possa essere migliorata, sia in termini di resistenza che resilienza, nel breve termine di 20 giorni, ammendando il suolo con applicazioni frequenti e con diverse sorgenti di C organico. A questo punto, tuttavia, non è ancora del tutto chiaro se la riduzione del tempo di ripristino della fungistasi che è in media risultato di 3,24 giorni, possa essere considerato rilevante nella pratica agricola al fine di ridurre le finestre di opportunità di cui i patogeni tellurici necessitano per indurre malattie sia nell'ambito del suolo rizosferico che del “bulk soil”. A tale proposito, sulla base di queste informazioni, sono necessari studi successivi per provare indissolubilmente l'utilità degli ammendanti organici come fattori di controllo dei patogeni tellurici.

### **3.5. Conclusioni**

In questo studio, con un intervento relativamente semplice, della durata di 20 giorni, consistente in apporti di ammendanti organici di diversa origine, si è generato un suolo con una funzionalità biologica distinta rispetto al suolo originario non trattato, e con una resistenza e resilienza alla fungistasi notevolmente migliorate. Questo fenomeno, presumibilmente, è dovuto allo sviluppo di una comunità microbica metabolicamente più attiva e diversificata. I risultati suggeriscono che l'applicazione di C organico può essere uno strumento utile per il controllo dei fitopatogeni tellurici. Sarebbe ' comunque necessario tenere presente, il duplice effetto dell'aggiunta di C organico sulla fungistasi, negativo nel breve periodo (da ore ad alcuni giorni), ma positivo in tempi successivi (poche settimane). Se si volesse tuttavia ipotizzare un impiego di queste acquisizioni (da considerare ancora del tutto preliminari) nella pratica agronomica bisognerebbe prima approfondire alcune importanti questioni aperte dai risultati della sperimentazione. Nel dettaglio, ulteriori informazioni sono sicuramente necessarie per stabilire l'efficacia delle diverse fonti di C organico, e la frequenza e la quantità della loro applicazione, definire il tempo necessario per la fase di costituzione della "storia" di un suolo, quanto questa condizione di "storia suolo" possa protrarsi nel tempo e quando gli effetti derivanti dall'input di sostanza organica al suolo potranno essere considerati cessati. Il complesso di queste conoscenze sarà determinante per impostare correttamente una successiva sperimentazione con patogeni e piante modello i cui esiti potranno consentire una precisa definizione della tecnica degli ammendamenti utilizzabile nella pratica agricola nell'ambito di un approccio integrato al controllo delle malattie delle piante di origine tellurica.



## Ringraziamenti

Sono molto grato a Gaspare Cesarano, Francesca Ippolito, e Marica Pascale per la loro assistenza tecnica ed il prezioso aiuto che mi hanno dato in laboratorio.

### 3.6. Referenze citate

- Adams, P.B., Papavizas, G.C., 1969. Survival of root-infecting fungi in soil. X. Sensitivity of propagules of *Thielaviopsis basicola* to soil fungistasis in natural and alfalfa-amended soil. *Phytopathology* 59, 135-138.
- Adams, P.B., Lewis, J.A., Papavizas G.C., 1968. Survival of root-infecting fungi in soil. IX. Mechanism of control of *Fusarium* root rot of bean with spent coffee grounds. *Phytopathology* 58, 1603-1608.
- Alabouvette, C., Raaijmakers, J.M., De Boer, W., Notz, R., Defago, G., Steinberg, C., Lemanceau, P., 2006. Concept and methods to assess the phytosanitary quality of soils. In: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 257-269.
- Alef, K., 1995. Soil respiration. In: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 214–219.
- Balser, T. C., & Firestone, M. K. (2005). Linking microbial community composition and soil processes in a California annual grassland and mixed-conifer forest. *Biogeochemistry*, 73(2), 395-415.

- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balser, T., 2005. Soil feedbacks of plant-diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspect. Plant Ecol.* 7, 27-49.
- Berendsen, R.L., Kalkhove, S.I.C., Lugones, L.G., Wösten, H.A.B., Bakker, P.A.H.M., 2012. Germination of *Lecanillium fungicola* in the mycosphere of *Agaricus bisporus*. *Environ. Microbiol. Reports* 4: 227-233.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Capodilupo, M., Scala, F., 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biol. Biochem.* 42, 136-144.
- Bonanomi, G., D'Ascoli, R., Antignani, V., Capodilupo, M., Cozzolino, L., Marzaioli, R., Puopolo, G., Rutigliano, F.A., Scelza, R., Scotti, R., Rao, M.A., Zoina A. 2011. Assessing soil quality under intensive cultivation and tree orchards in Southern Italy. *Appl. Soil Ecol.* 47,184-194.
- Bonanomi, G., Gaglione, S. A., Incerti, G., & Zoina, A. (2013). Biochemical quality of organic amendments affects soil fungistasis. *Applied Soil Ecology*,72, 135-142.
- de Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., Kowalchuk, G.A., van Veen, J.A., 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Appl. Environ. Microb.* 69, 835-844.
- Dick, R. P., Rasmussen, P. E., & Kerle, E. A. (1988). Influence of long-term residue management on soil enzyme activities in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system. *Biology and Fertility of Soils*, 6(2), 159-164.
- Duong, T. T. T., Baumann, K., & Marschner, P. (2009). Frequent addition of wheat straw residues to soil enhances carbon mineralization rate. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1475-1482.

- Garbeva, P., Gera, W.H., Termorshuizen, A.J, Kowalchuk, G.A., de Boer, W., 2011. Fungistasis and general soil biostasis - A new synthesis. *Soil Biol. Biochem.* 43, 469-477.
- Hoitink, H.A.J., Boehm, M.J., 1999. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 427-446.
- Kandeler, E., Stemmer, M., & Klimanek, E. M. (1999). Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fractions to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(2), 261-273.
- Lewis, J.A., Papavizas, G.C., 1977. Effect of plant residues on chlamydospore germination of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* and on *Fusarium* root rot of beans *Phytopathology* 67, 925-929.
- Lockwood, J.L., 1977. Fungistasis in soils. *Biol Rev.* 52, 1-43.
- Mallory, E. B., & Griffin, T. S. (2007). Impacts of soil amendment history on nitrogen availability from manure and fertilizer. *Soil Science Society of America Journal*, 71(3), 964-973.
- Martin, F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 325-350.
- McDowell, J. M., & Woffenden, B. J. (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology*, 21(4), 178-183.
- Nett, L., Ruppel, S., Ruehlmann, J., George, E., & Fink, M. (2012). Influence of Soil Amendment History on Decomposition of Recently Applied Organic Amendments. *Soil Science Society of America Journal*, 76(4), 1290-1300.
- Smith, A.M., 1973. Ethylene as a cause of soil fungistasis. *Nature* 246: 311-313.

- Stark, C. H., Condon, L. M., O'Callaghan, M., Stewart, A., & Di, H. J. (2008). Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralisation resulting from farm management history and organic matter amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(6), 1352-1363.
- Steiner, G.W., Lockwood, J.L. 1970. Soil fungistasis: mechanism in sterilized, reinoculated soil. *Phytopathology* 60, 89-91.
- Wu, M., Zhang, H., Li, X., Zhang, Y., Su, Z., Zhang, C., 2008. Soil fungistasis and its relations to soil microbial composition and diversity: A case study of a series of soils with different fungistasis. *J. Environ. Sci.* 20, 871–877.
- Xu, C.K., Mo, M.H., Zhang, L.M., Zhang, K.Q., 2004. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1997-2004.
- Zou, C.S., Mo, M.H., Gu, Y.Q., Zhou, J.P., Zhang, K.Q., 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2371-2379.

## **Capitolo 4**

### **Monitoraggio della fungistasi in dodici suoli della Regione Campania**

#### **4.1. Introduzione**

La germinazione dei propagoli fungini è normalmente inibita nella maggior parte dei suoli grazie al fenomeno chiamato fungistasi descritto per la prima volta Dobbs e Hinson nel 1953. Numerosi fattori influenzano direttamente o indirettamente le variazioni del livello fungistatico di un suolo, incluse le sue proprietà fisico – chimiche, i cambiamenti pedoclimatici, le caratteristiche biologiche delle specie fungine presenti, la diversità funzionale delle comunità microbiche native. Tutti questi fattori sono stati ampiamente studiati negli ultimi 50 anni, fornendo diverse spiegazioni che hanno migliorato la comprensione di questa proprietà del suolo. Due ipotesi sono state proposte per spiegare la fungistasi. La prima ipotesi sostiene che la competizione nutrizionale, dovuta alla microflora nativa, per i composti altamente degradabili, rende quasi del tutto indisponibili, per la germinazione delle spore fungine, eventuali fonti energetiche esogene; la seconda ipotesi sostiene che la presenza nel suolo di fattori inibitori la germinazione rappresenta il principale fattore di controllo della fungistasi ([Romine and Baker, 1973](#)).

Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato l'importante ruolo svolto dai microrganismi del suolo in termini di variazioni del livello di fungistasi ([Alabouvette, 1999](#); [Ellis et al., 2000](#)). Ad esempio la fungistasi può essere ridotta in seguito ad alcune modificazioni indotte nel suolo quali la sterilizzazione o l'aggiunta di antibiotici. [De Boer et al, \(2003\)](#), sostenitori della teoria degli

inibitori, hanno dimostrato che la composizione della comunità microbica del suolo rappresentava un importante fattore nel controllo della fungistasi, specialmente per la presenza di batteri del genere *Pseudomonas*. Inoltre in letteratura sono anche presenti vari studi che mettono in evidenza l'importante ruolo nel controllo della fungistasi, di composti organici volatili come ad esempio l'ammoniaca e l'etilene che possono ridurre o inibire la germinazione delle spore fungine di numerose specie (Xu et al., 2004). Molti di questi composti con azione fungistatica, sono stati rilevati in suoli neutri o alcalini (Liebman and Epstein, 1994).

La qualità del suolo, pertanto, soprattutto in presenza di ridotti apporti organici, degrada in pochi anni con i seguenti effetti negativi : i patogeni tellurici ed epigei divengono di difficile controllo, la lotta chimica tradizionale perde di efficacia per lo sviluppo di ceppi resistenti ai fungicidi, l'efficienza di utilizzo dei fertilizzanti si abbassa, e le reti trofiche del suolo risultano estremamente semplificate. Per mitigare tali effetti è necessario collaudare tecniche colturali innovative. In agricoltura sia biologica che convenzionale, per il recupero della qualità dei suoli, è stato proposto l'utilizzo dell'ammendamento organico (Bonanomi et al., 2007). Tale soluzione viene proposta per rivitalizzare la risorsa suolo attraverso l'uso del compost, quale prodotto del processo di biostabilizzazione aerobica di matrici fermentescibili. Sono stati indicati meccanismi complementari tra loro per spiegare la capacità degli ammendanti organici di ostacolare i patogeni tellurici: i) aumento dell'attività dei microbi antagonisti; ii) incremento della competizione per le risorse a discapito dei patogeni ed insorgenza della fungistasi; iii) rilascio di composti fungitossici durante la decomposizione della sostanza organica; iv) induzione della resistenza sistemica nelle piante ospiti. Per questi motivi risulta importante conoscere le proprietà del suolo che hanno un'azione sia diretta che indiretta nella regolazione dell'intensità di fungistasi e del tempo di resilienza, cioè il tempo necessario al ripristino della

fungistasi in seguito allo squilibrio apportato al suolo dall'aggiunta di ammendanti (Bonanomi et al., 2013).

In tale contesto l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare il livello di fungistasi in diversi suoli campionati nella Regione Campania, provenienti sia da ecosistemi naturali sia da agro ecosistemi. In generale si è voluto valutare l'effetto congiunto del tipo di suolo e di una differente gestione dello stesso sulla fungistasi. A tal fine sono stati inclusi nell'analisi un ampio spettro di tipologie di suoli per comprendere meglio le relazioni tra le caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche dei suoli e la loro attività fungistica.



**Fig. 1** Mappa dei siti di campionamento degli 11 suoli ecosistemi nella Regione Campania.

Poiché la qualità del suolo dipende da molteplici fattori, e la stessa fungistasi risulta dipendente da più processi e proprietà del sistema suolo, al fine di valutare il potere fungistatico dei suoli campionati ed in modo da differenziarli in base alla loro capacità di indurre o meno fungistasi e quindi di inibire o rallentare lo sviluppo di funghi terricoli, risulta necessario misurare una grande varietà di parametri, chimici, fisici, biologici e microbiologici. In questo studio multidisciplinare sono stati comparati 12 differenti suoli provenienti da ecosistemi diversi e selezionati in diverse aree geografiche della Regione Campania (Fig. 1). Ogni suolo è stato sottoposto ad analisi chimiche, fisiche, microbiologiche, enzimatiche ed infine è stato effettuato un bio saggio con 2 piante test (*Lactuca sativa* e *Beta vulgaris*). L'ipotesi da testare era quella che i suoli con maggior contenuto in sostanza organica e a più elevata attività microbica mostrassero più elevati livelli di fungistasi.

## **4.2. Materiali e Metodi**

### *4.2.1 Selezione, campionamento e analisi dei suoli*

Tutti i suoli selezionati sono provenienti da diverse zone della regione Campania, caratterizzata da un tipico clima Mediterraneo. Il criterio scelto per la selezione dei 12 suoli è stato quello di includere suoli molto differenti fra loro e provenienti da due diversi regimi di gestione: suoli provenienti da ecosistemi naturali (denominati: Faggeta, Sedimento lacustre, Pineta costiera, Prateria parco Gussone, Pascolo montano, Arbusteto, Lecceta parco Gussone) che da agroecosistemi (Terriccio, Ortivo serra tunnel, Orto familiare, Serra parco Gussone, Oliveto), (Tab. 1).



Denominazione	Gestione	Coordinate geografiche e quota
Arbusteto	Arb. a <i>Q. ilex</i> , <i>M. communis</i> cedui	40°24'0.386"N 15°06'00.25"E mt. slm 346
Faggeta	Bosco di faggio ad alto fusto	40°47'39.25"N 15°08'24.25"E mt. slm 1366
Lecceta p. Gussone	Bosco di <i>Q. ilex</i> ad alto fusto su andosuolo	40°48'43.28"N 14°20'46.37"E mt. slm 68
Oliveto	Oliveto coetaneo di 20 anni di età	40°19'43.35"N 15°07'10.00"E mt. slm. 179
Ortivo serra tunnel	Suolo da serra tunnel	40°26'15.76"N 14°59'29.69"E mt. slm. 5
Orto familiare	Orto familiare	40°20'16.77"N 15°00'35.17"E mt. slm 22
Pascolo montano	Prateria pascolata di alta quota	40°47'13.01"N 15°08'53.79"E mt. slm 1583
Pineta costiera	Pineta a <i>Pinus pinea</i>	40°25'22.51"N 14°59'12.29"E mt. slm. 2
Prateria p. Gussone	Prateria sfalciata di pianura su andosuolo	40°48'54.41"N 14°20'52.37"E mt. slm 75
Sedimento lacustre	Sedimento da deposizione fluviale	40°19'28.28"N 15°08'06.82"E mt. slm. 115
Serra patologia	Andosuolo sotto serra tunnel	40°48'47.58"N 14°20'39.45"E mt. slm 59
Terriccio	Terriccio universale Manna Italia	

**Tab. 1.** Elenco dei 12 suoli campionati, indicati per tipo di gestione e sito di campionamento.

I campioni di suolo sono stati raccolti dai primi 20 cm di profondità nella primavera del 2013 (Aprile – Maggio), considerato come periodo ottimale per la raccolta del suolo (Bloem et al., 2006a). I campioni sono stati successivamente posti in buste di polietilene, trasferiti in laboratorio e setacciati mediante apposito setaccio con maglie di 2 mm. Le analisi biochimiche e microbiologiche e i biosaggi, sono stati effettuati sui campioni di suolo freschi conservati a + 4°C sino al momento delle analisi condotte entro 10 giorni dal campionamento. La tessitura e le analisi chimiche sono state valutate sui campioni secchi, mantenuti a temperatura ambiente sino al raggiungimento di un peso costante.

#### 4.2.2. *Analisi fisico chimiche*

Le proprietà fisiche e chimiche dei suoli sono state determinate mediante metodi ufficiali (Sparks, 1996). Campioni di suolo indisturbati di volume noto prelevati nei primi 20 cm di profondità, sono stati analizzati per determinare la densità apparente mediante metodo gravimetrico dopo essiccamento per 48 ore a 105°C. Per la determinazione della tessitura si è ricorso al metodo “della pipetta”; il pH e la conducibilità elettrica sono stati misurati mediante una sospensione suolo: con estratto acquoso con rapporto di 1:2.5 e di 1:5 rispettivamente. I carbonati totali (calcare) sono stati determinati mediante il metodo calcimetrico di Dietrich – Fruehling (Loeppert and Suarez, 1996). Il contenuto di C organico è stato valutato su 1 g di suolo polverizzato mediante il metodo della titolazione del acido cromico. L’azoto totale (riferito a 30 mg di suolo polverizzato) è stato determinato mediante combustione flash con un analizzatore elementare CNS (Thermo FlashEA 1112). Il potassio assimilabile è stato misurato mediante estrazione in bicarbonato. La capacità di scambio cationico è stata misurata in seguito a trattamento del suolo con una soluzione di cloruro di bario e trietanolammina a pH 8.20. Infine le basi di scambio ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) sono state saggiate mediante spettrometria di assorbimento atomico di fiamma. Ferro, rame, zinco e manganese assimilabili sono stati estratti mediante una soluzione di acido dietiletilentriamminopentacetico. (DTPA) più calcio cloruro e trietanolammina a pH 7.30, ed analizzati mediante spettroscopia ad assorbimento atomico (AAS), (DM. 13/9/1999, Gazzetta Ufficiale 248 del 21/10/1999).

#### 4.2.3. Analisi microbiologiche

L'attività microbica è stata valutata mediante l'analisi di differenti parametri. E' stata valutata l'attività microbica totale misurando la respirazione potenziale del suolo come quantità di CO<sub>2</sub> emessa. I campioni di suolo (50 g di suolo secco e setacciato a 2 mm), sono stati portati alla capacità di campo e dopo 3 giorni si è aggiunto glucosio in polvere alle seguenti concentrazioni: 0,1 – 0,3 – 1 – 3 %, avendo cura di mescolarlo uniformemente. Successivamente i microcosmi così generati sono stati incubati in camera di crescita a 24°C ed è stata misurata la respirazione dopo 48, 96 e 168 ore dall'ammendamento con glucosio. La respirazione del suolo, riferita a 10 g di suolo secco, è stata misurata mediante incubazione in contenitori con tappo a vite con capacità di 500 ml. La CO<sub>2</sub> rilasciata è stata misurata mediante il metodo trappola degli alcali (Alef, 1995). In breve, 5 ml di KOH 1N, sono stati posti in una provetta con tappo a vite. L'idrossido di potassio è stato esposto per 48 ore con i microcosmi di suolo all'interno del contenitore a chiusura ermetica e successivamente la base è stata titolata con HCl 0.1 N.

L'attività microbica è stata quantificata anche con il metodo della fluoresceina diacetato (FDA) che misura l'attività enzimatica totale (proteasi, lipasi, esterasi - non specifiche) importante durante la decomposizione della sostanza organica, (Workneh et al., 1993).

Il profilo fisiologico a livello comunitario (CLPP) delle popolazioni microbiche è stato analizzato mediante il metodo BIOLOG EcoPlates™ (BLG). Questo metodo quantifica la diversità funzionale misurando la capacità delle comunità microbiche di utilizzazione di diverse fonti di carbonio. Il test BIOLOG è stato applicato su tutti i campioni di suolo in esame al fine di valutare le potenzialità metaboliche della microflora nativa. La piastra BIOLOG consiste di 96

pozzetti contenenti 31 differenti fonti di carbonio e un bianco in 3 repliche. Come indicatore dell'utilizzazione del substrato è utilizzato il violetto di tetrazolio che quando si riduce, sviluppa un colore viola. Le letture di assorbanza sono state effettuate a 590 nm con un lettore di piastre ogni 24 ore e per 4 giorni, mediante un lettore di micropiastre (Thermomax Molecular Devices, Wokingham, UK). Il saggio è stato condotto come descritto in precedenza da [Bartelt–Ryser et al. \(2005\)](#). Lo sviluppo medio del colore (AWCD) è stato calcolato come la somma dei pozzetti con attività per piastra, diviso per le 31 fonti di carbonio

Infine la biomassa microbica totale è stata determinata mediante il metodo di fumigazione – estrazione di [Vance et al. \(1987\)](#). Esso consiste nel provocare la morte dei microrganismi del suolo mediante trattamento con cloroformio (fumigazione) e successiva estrazione del C liberato con  $K_2SO_4$ . Per differenza tra il C estratto con  $K_2SO_4$  dai campioni fumigati e il C estratto dai campioni non fumigati (flusso di carbonio), si determina il C associato ai microrganismi morti. In presenza di un acido forte, la sostanza organica viene ossidata e il Cr (+6) si riduce a Cr (+3). Per titolazione con Ferro ammonio solfato esaidrato si determina l'eccesso di dicromato. Per il calcolo del carbonio associato alla biomassa microbica, si dividono i mg di C/100g di s.s. per il fattore 0,45 ([Vance et al. 1987](#)).

#### 4.2.4. Biosaggio per la valutazione della fungistasi del suolo

Dal punto di vista metodologico la fungistasi è stata valutata quantificando lo sviluppo ifale di tre specie fungine: *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* e *Trichoderma harzianum*. La crescita fungina è stata quantificata in suoli ammendati con glucosio a concentrazioni crescenti (0 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 %) dopo 48, 96 e 168 ore dall'ammendamento.

Dai suoli ammendati sono stati preparati estratti acquosi mediante mescolamento di 10 g di suolo con 10 ml di acqua distillata – sterile (rapporto acqua:suolo 1:1) in tubi falcon posti su una piattaforma oscillante per 30 minuti ad una velocità di 200 spm, e mantenuti a temperatura ambiente (21°C). Successivamente, le sospensioni di suolo ottenute sono state centrifugate per 10 minuti a 2400 g ed il supernatante è stato prelevato e sterilizzato mediante microfiltrazione con filtri aventi pori con dimensioni di 0.22 µm e conservati a -20°C fino al momento dei biosaggi. La fungistasi degli estratti di suolo sterili è stata valutata mediante misura della crescita ifale ([Alabouvette et al., 2006](#)) di tre funghi appartenenti a differenti gruppi funzionali: *Aspergillus niger* (patogeno opportunisto e saprofita ubiquitario), *Botrytis cinerea* (fitopatogeno estremamente polifago), e *Trichoderma harzianum* (fungo ubiquitario, micoparassita e saprofita, disponibile in commercio sotto forma di formulati utilizzati per il controllo biologico delle malattie in agricoltura). In esperimenti preliminari le spore di tutti i funghi sono state saggiate per la loro capacità o meno di germinare in acqua, in modo da valutare la loro sensibilità alla fungistasi. Tale analisi ha mostrato che le spore delle tre specie fungine non sono in grado di germinare in acqua coerentemente con quanto riportato in letteratura ([Hsu and Lockwood, 1973](#); [Berendsen et al., 2012](#)).

L'inoculo fungino per i biosaggi è stato ottenuto mediante raccolta dei propagoli vitali dei funghi (conidi) direttamente dalle piastre di germinazione, mediante aggiunta di 10 ml di acqua sterile alle colture fungine cresciute in piastre Petri su PDA (potato dextrose agar) per circa 10 giorni, e raschiando la superficie del micelio fungino con una spatola in modo da rimuovere i conidi. La sospensione acqua – spore così ottenuta è stata filtrata, centrifugata, sottoposta a doppio lavaggio con acqua sterile e portata a una concentrazione di conidi di  $10^{-5} \text{ ml}^{-1}$  mediante emocitometro. La sospensione di spore utilizzate per i test di germinazione in piastra ELISA con i 3 funghi, è stata preparata in 10  $\mu\text{l}$  di acqua sterile. Gli estratti di suolo (90  $\mu\text{l}$ ) sono stati aggiunti ai 96 pozzetti della piastra ed incubati a 24°C.

La crescita fungina è stata quantificata mediante lettura spettrofotometrica ( $\lambda = 590 \text{ nm}$ ) dopo 48 ore di incubazione utilizzando il lettore Thermomax micro piastra (Molecular Devices, Wokingham, UK).

#### 4.2.5. Biosaggi con *Lactuca sativa* e *Beta vulgaris*

Un biosaggio sui suoli è stato condotto per valutare la crescita di due specie vegetali, lattuga e bietola (*Lactuca sativa* e *Beta vulgaris*).

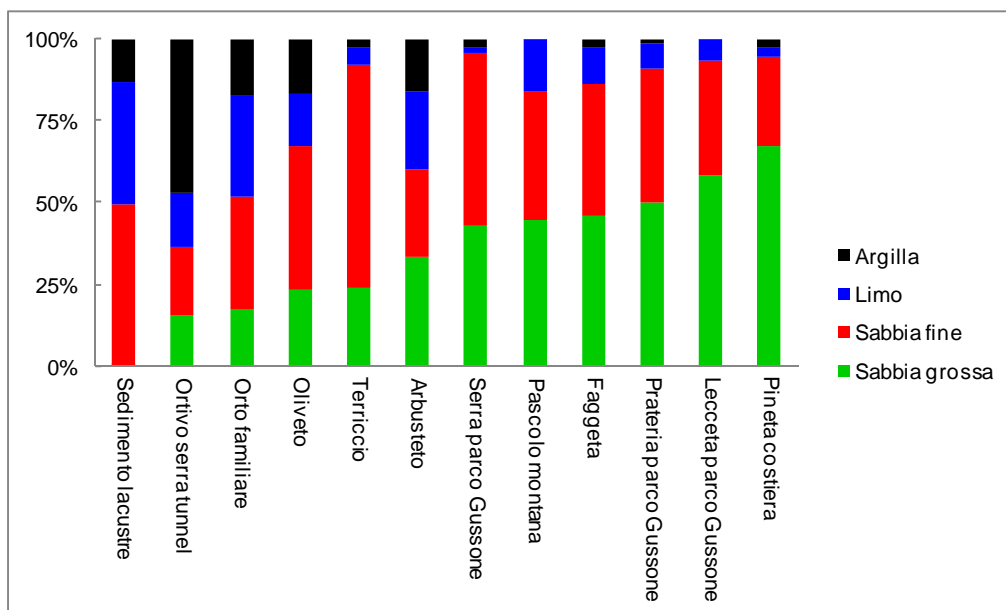
L'esperimento è stato condotto su 7 dei 12 suoli campionati per gli esperimenti di monitoraggio della fungistasi. Cinque suoli non sono stati inclusi (sedimento lacustre, pineta costiera, arbusteto, faggeta e pascolo montano) in quanto non era disponibile il quantitativo sufficiente per la prova. Per ogni suolo sono stati considerati 2 trattamenti: suolo sterilizzato in autoclave e suolo non sterile. Vassoi di alluminio forati (dimensioni 21x14x4 cm lunghezza, larghezza ed

altezza) sono stati riempiti con 1 kg di suolo setacciato ed asciugato all'aria. Per ogni suolo sono stati allestiti 6 vassoi: 3 con suolo non sterile ed altri 3 con suolo sterilizzato in autoclave. Per la semina (24 semi per vaso) sono stati utilizzati semi pre germinati di 3 giorni di età messi a dimora nei vassoi e successivamente questi sono stati posti in serra ( $25 \pm 4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) per 40 giorni. I vassoi sono stati bagnati con acqua distillata ogni 2 giorni fino a raggiungere la capacità di ritenzione idrica. Infine, dopo 40 giorni di crescita è stata valutata la biomassa fresca delle piante.

## **4.3. Risultati**

### *4.3.1. Caratteristiche fisico – chimiche e microbiologiche dei suoli*

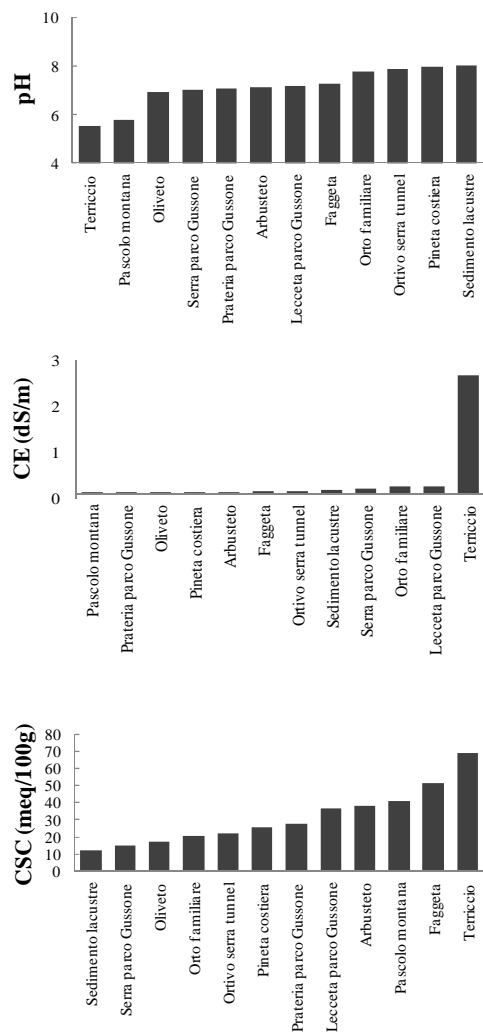
A seguito dell'analisi tessiturale i suoli campionati dai seguenti ecosistemi: Pineta costiera, Lecceta e Serra del parco Gussone risultano prevalentemente sabbiosi soprattutto per la componente di sabbia grossa a differenza del Terriccio più ricco nella frazione di sabbia fine. Mediamente sabbiosi sono risultati i suoli campionati dall'Oliveto e dall'Orto familiare. Mentre prevalentemente argillosi sono i suoli da Ortivo serra tunnel e da Arbusteto. Infine, il Sedimento lacustre presenta una cospicua frazione limosa (Fig. 4.2).



**Fig. 4.2.** Contenuto percentuale di argilla, limo, sabbia fine e sabbia grossa nei 12 suoli selezionati per il monitoraggio.

Il pH è risultato più elevato per Sedimento lacustre, Pineta costiera, Ortivo serra tunnel ed Orto familiare. Valori di pH sub-acido si sono rilevati per Terriccio e Pascolo montano. In tutti gli altri suoli si sono rilevati valori del pH intorno alla neutralità. La conducibilità elettrica invece si presentava molto bassa ed intorno a valori inferiori a 1 dS/m per tutti i suoli, tranne che per il Terriccio dove si sono misurati valori più alti. La capacità di scambio cationico è risultata molto elevata nel Terriccio. I suoli campionati da Sedimento e da Serra parco Gussone presentavano una bassa capacità di scambio cationico. Infine valori medi si sono registrati nei restanti suoli in prova (Fig. 4.3).

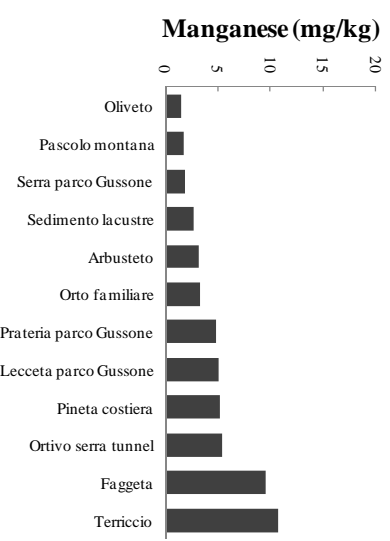
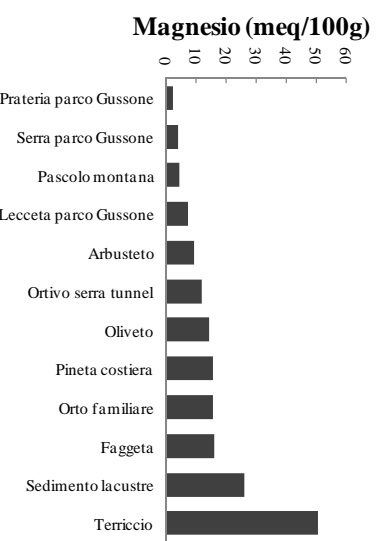
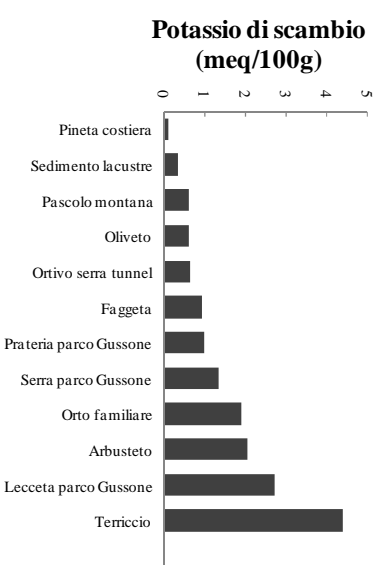
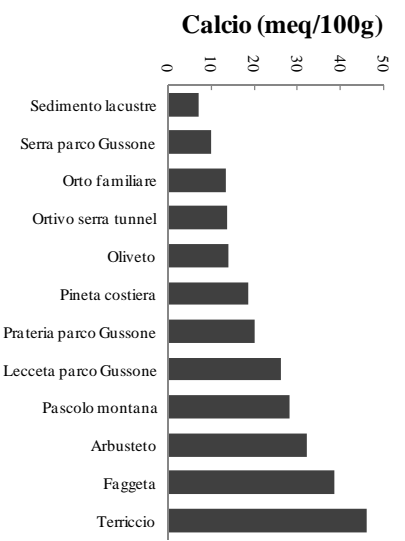
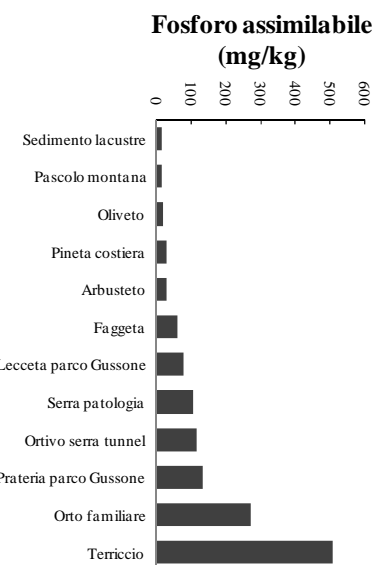
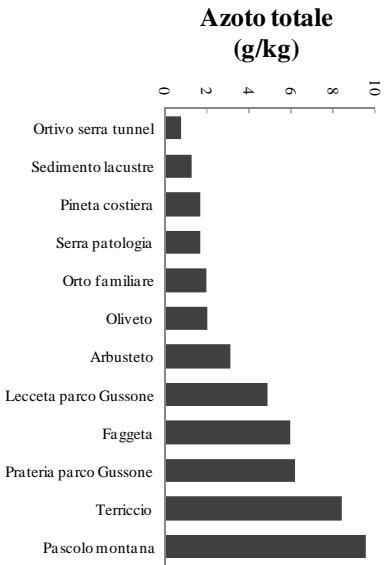




**Fig. 4.3.** Valori di pH (grafico superiore), CE (grafico intermedio) e CSC (grafico inferiore), dei 12 suoli selezionati per il monitoraggio.

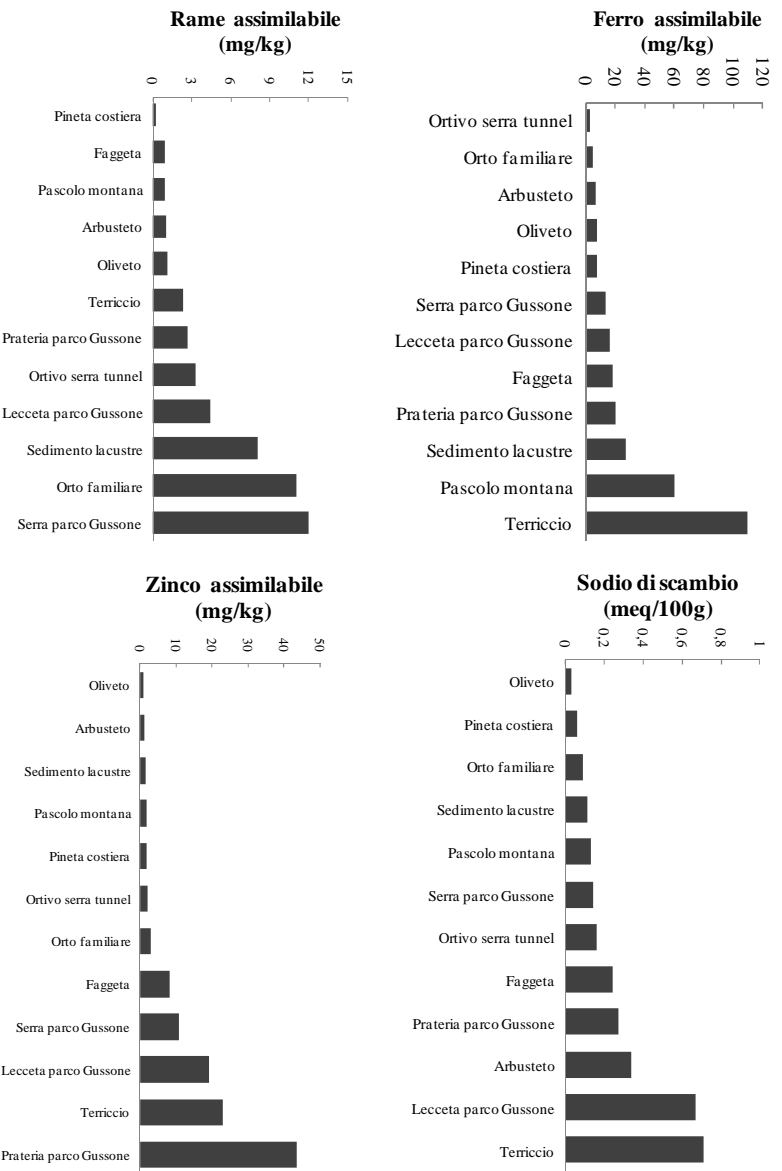
In figura 4.4 sono mostrati i valori relativi al contenuto dei tre macroelementi nei dodici suoli. Si nota che il Terriccio risulta essere un suolo estremamente ricco in azoto fosforo e potassio. Il suolo campionato dal Pascolo montano risulta essere molto ricco in azoto, ma povero in fosforo e potassio. I suoli da Lecceta, Serra e Prateria parco Gussone, presentano un quantitativo medio in potassio rispetto agli altri suoli dove questo risulta essere inferiore. In generale i suoli a più elevato

contenuto in azoto sono: Pascolo montano, Terriccio, Faggeta, Prateria e Lecceta parco Gussone. Il fosforo risulta essere presente ad elevate concentrazioni in Terriccio e Orto familiare. Il Terriccio risulta essere molto ricco anche per i cationi calcio, magnesio e manganese. Il contenuto in calcio è elevato anche in Faggeta, Arbusteto, Pascolo montano e Lecceta.



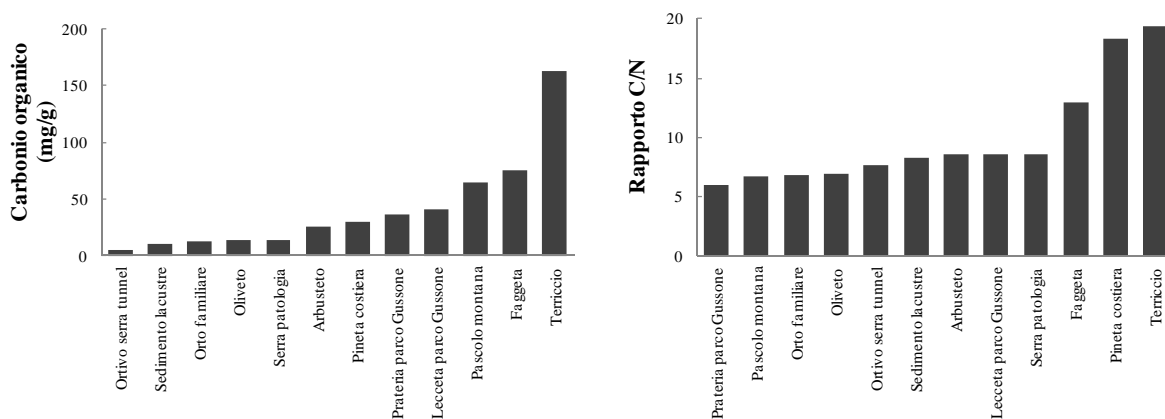
**Fig. 4.4.** Valori di azoto –fosforo – potassio (lato sinistro) e di calcio magnesio e manganese (lato destro), dei 12 suoli selezionati per il monitoraggio.

Il contenuto in ferro risulta essere più abbondante in Terriccio e Pascolo montano rispetto agli altri suoli. I suoli da serra Parco Gussone, Orto familiare e Sedimento lacustre, hanno un maggior contenuto in rame rispetto agli altri suoli analizzati (Fig. 4.5). Il Terriccio e i suoli campionati da Arbusteto, Prateria e Lecceta parco Gussone, presentano un maggiore contenuto in sodio e zinco rispetto ai restanti suoli esaminati (Fig. 4.5).



**Fig. 4.5.** Valori di ferro e rame assimilabili (in alto nel lato sinistro) e di sodio e zinco (lato destro in alto).

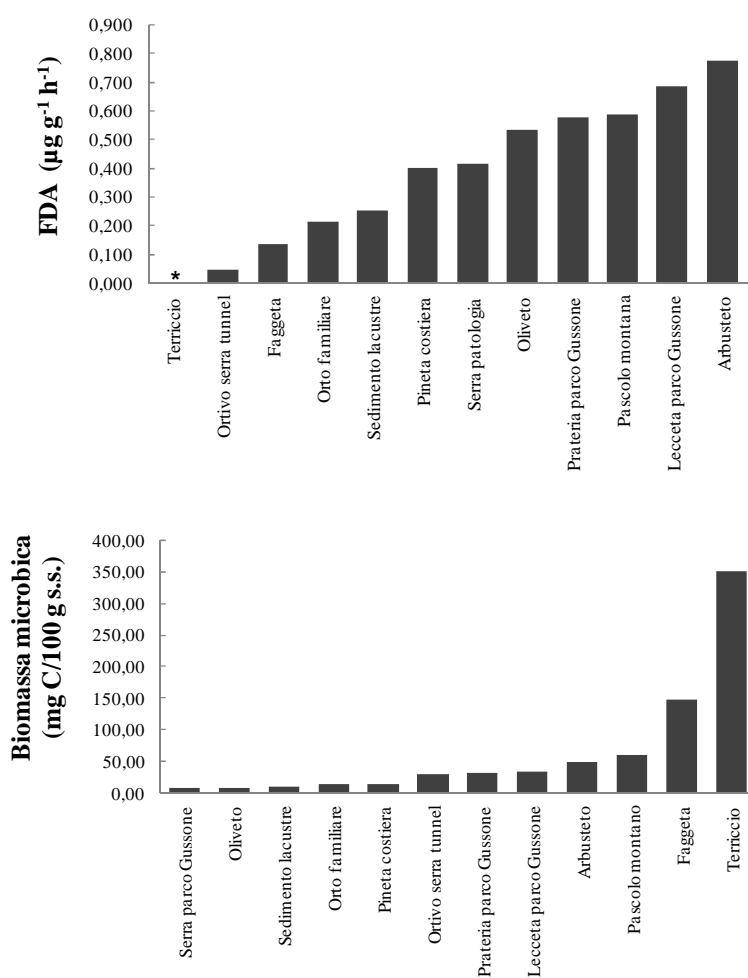
Il contenuto in carbonio organico, rispetto ai suoli monitorati, risulta maggiore in Terriccio, medio in Faggeta e Pascolo montano, e basso in Ortivo serra tunnel e Sedimento lacustre. Il rapporto C/N risulta elevato in Terriccio, Pineta costiera e Faggeta e medio negli altri suoli monitorati (Fig. 4.6).



**Fig. 4.6.** Carbonio organico (sinistra) e rapporto C/N (destra), dei 12 suoli selezionati per il monitoraggio.

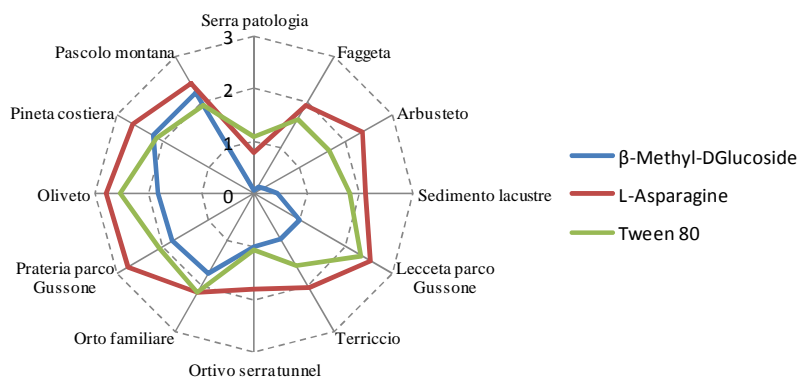
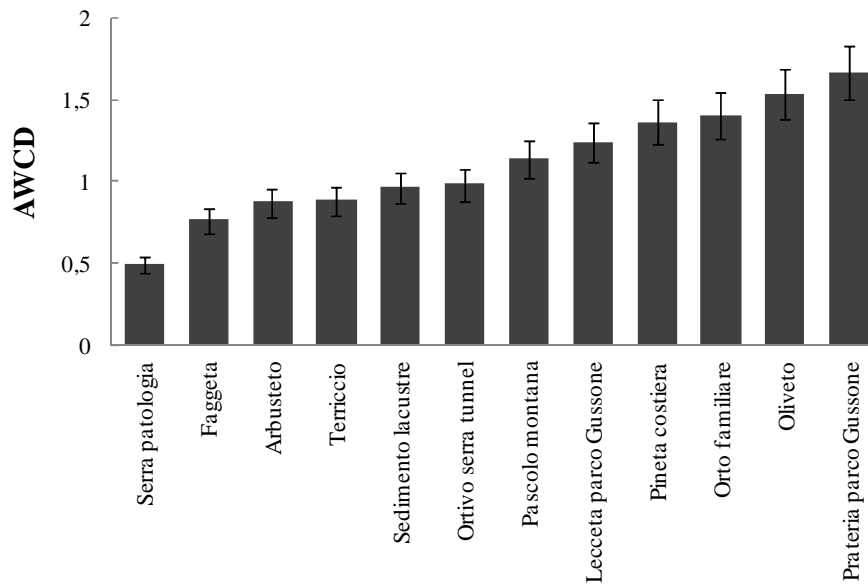
L'attività enzimatica totale (FDA), risulta più elevata nei suoli da Arbusteto, Pascolo montano, Lecceta e Prateria parco Gussone. Valori intermedi si sono misurati nei suoli campionati da Pineta costiera e Sedimento lacustre. Il suolo Ortivo in serra tunnel presenta un valore basso di FDA.

Il contenuto in carbonio associato alla biomassa microbica risulta estremamente elevato in Terriccio (Fig. 4.7).



**Fig. 4.6.** Valori dell'attività enzimatica, FDA, (in alto) e biomassa microbica associata al carbonio (in basso), dei 12 suoli selezionati per il monitoraggio. L'asterisco indica dati mancanti.

I valori del test Biolog relativi all'AWCD sono risultati maggiori in Prateria parco Gussone, seguiti da Oliveto, Orto familiare e Pineta costiera. Il valore più basso è risultato dal suolo campionato dalla serra del parco Gussone, con valori intermedi nei rimanenti suoli. In figura (Fig. 4.7) è mostrato un dettaglio delle attività specifiche di utilizzazione dei substrati presenti nelle piastre Biolog. In particolare si può rilevare come la L-Asparagina viene utilizzata in maniera simile in tutti i suoli con eccezione del suolo campionato dalla Serra del parco Gussone. La degradazione del  $\beta$  Metile D- glucoside si differenzia notevolmente tra i suoli. In particolare, la degradazione risulta molto rapida per Pascolo montano e Pineta costiera, media per Oliveto, Prateria parco Gussone e Orto familiare, e rallentata per i rimanenti suoli. Infine la degradazione del Tween 80 risulta discreta per gran parte dei suoli ad eccezione dei suoli campionati da Serra e Serra tunnel (Fig. 4.8).



**Fig 4.8** Valori del AWCD derivanti dal test Biolog dei dodici suoli esaminati. In basso è riportato in particolare l'attività degradativa di 3 substrati specifici.



	FDA	Densità apparente	C microbico	Sabbia grossa	Sabbia fine	Limo	Argilla	pH	Conduitt. Elettr.	Calcare totale	Carbonio organico	Sostanza organica	Azoto totale	Rapporto C/N	Fosforo assim.	CSC	Calcio	Magnesio	Sodio	Potassio	Ferro assimilabile	Rame assimilabile	Zinco assimilabile	Manganese assimilabile
FDA	1	-0,20	-0,16	0,44	0,07	-0,25	-0,49	-0,57	-0,23	-0,28	0,17	0,17	0,39	-0,19	-0,35	0,23	0,31	-0,41	0,47	0,43	0,23	-0,29	0,31	-0,55
Densità apparente		1,00	0,99	-0,11	0,62	-0,28	-0,20	-0,63	0,95	-0,16	0,94	0,94	0,57	0,69	0,82	0,84	0,77	0,81	0,68	0,75	0,84	-0,27	0,35	0,84
C microbico			1,00	-0,06	0,62	-0,31	-0,24	-0,62	0,91	-0,17	0,95	0,95	0,60	0,67	0,78	0,87	0,81	0,85	0,69	0,73	0,81	-0,28	0,39	0,78
Sabbia grossa				1,00	-0,21	-0,75	-0,62	-0,12	-0,20	0,38	0,12	0,12	0,31	0,26	-0,24	0,23	0,28	0,12	0,18	-0,05	-0,10	-0,37	0,33	-0,44
Sabbia fine					1,00	-0,19	-0,49	-0,60	0,69	-0,29	0,62	0,62	0,41	0,32	0,55	0,35	0,27	0,27	0,35	0,49	0,73	0,24	0,36	0,60
Limo						1,00	0,45	0,38	-0,25	-0,07	-0,39	-0,39	-0,33	-0,45	-0,17	-0,36	-0,35	-0,36	-0,36	-0,23	-0,21	0,28	-0,48	0,09
Argilla							1,00	0,44	-0,17	-0,21	-0,45	-0,45	-0,58	-0,31	-0,04	-0,37	-0,38	-0,13	-0,29	-0,21	-0,38	0,07	-0,42	-0,01
pH								1,00	-0,61	0,54	-0,76	-0,76	-0,84	-0,20	-0,43	-0,69	-0,66	-0,22	-0,49	-0,55	-0,82	0,30	-0,30	-0,29
Conduitt. Elettr.									1,00	-0,22	0,85	0,86	0,45	0,65	0,88	0,69	0,60	0,66	0,67	0,80	0,85	-0,07	0,32	0,87
Calcare totale										1,00	-0,12	-0,12	-0,29	0,53	-0,27	-0,13	-0,12	0,16	-0,31	-0,42	-0,26	-0,16	-0,25	0,07
Carbonio organico											1,00	1,00	0,79	0,66	0,68	0,93	0,87	0,76	0,68	0,69	0,90	-0,36	0,38	0,68
Sostanza organica												1,00	0,79	0,66	0,68	0,93	0,87	0,76	0,68	0,69	0,90	-0,36	0,38	0,68
Azoto totale													1,00	0,20	0,33	0,79	0,76	0,41	0,51	0,42	0,76	-0,42	0,46	0,18
Rapporto C/N														1,00	0,45	0,58	0,54	0,72	0,37	0,36	0,49	-0,33	0,04	0,69
Fosforo assim.															1,00	0,54	0,43	0,60	0,55	0,80	0,65	0,19	0,40	0,71
CSC																1,00	0,98	0,78	0,72	0,67	0,73	-0,51	0,30	0,51
Calcio																	1,00	0,73	0,69	0,63	0,63	-0,57	0,27	0,42
Magnesio																		1,00	0,61	0,52	0,48	-0,34	0,37	0,62
Sodio																			1,00	0,87	0,55	-0,16	0,53	0,42
Potassio																				1,00	0,60	0,08	0,39	0,55
Ferro assimilabile																					1,00	-0,19	0,30	0,69
Rame assimilabile																						1,00	-0,04	-0,06
Zinco assimilabile																							1,00	0,01
Manganese assim.																								1,00

**Tabella x** Matrice di correlazione tra i parametri fisici, chimici, biochimici e microbiologici. Le correlazioni significative dall'analisi di regressione lineare ( $P < 0.01$ ) sono indicati in rosso.

L'analisi di correlazione ha mostrato una forte correlazione positiva tra pH ed il contenuto in sostanza organica, e di calcio e ferro (Tab. 2). Il contenuto in carbonio organico risulta correlato positivamente con azoto totale e CSC. Il contenuto in carbonio associato alla biomassa microbica risulta correlato positivamente alla conducibilità elettrica, alla frazione organica, alla CSC. Il valore del FDA invece risulta essere correlato negativamente con gran parte dei parametri analizzati (Tab. 2).

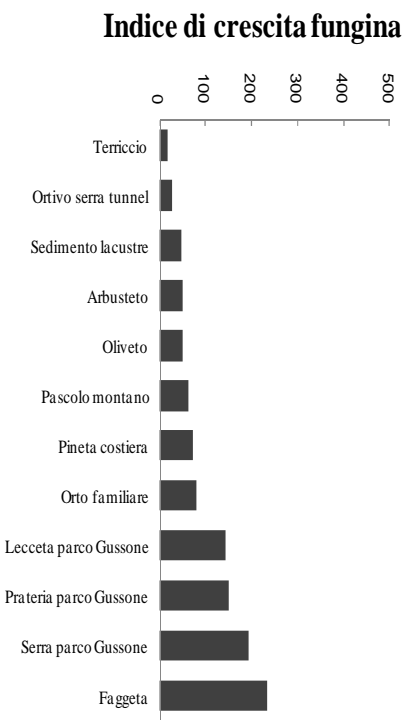
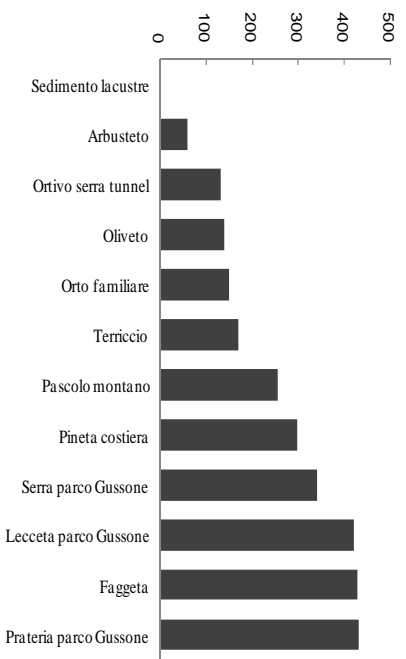
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
FDA	0,24	-0,06	0,14
Densità apparente	-0,29	-0,22	-0,03
C microbico	-0,23	-0,12	0,03
Sabbia grossa	<b>0,80</b>	<b>0,49</b>	<b>0,79</b>
Sabbia fine	-0,14	0,05	0,00
Limo	<b>-0,52</b>	-0,33	<b>-0,67</b>
Argilla	<b>-0,60</b>	<b>-0,50</b>	<b>-0,59</b>
pH	-0,20	-0,08	-0,31
Condutt. Elettr.	-0,37	-0,33	-0,14
Calcare totale	0,22	0,09	0,13
Carbonio organico	0,03	0,02	0,25
Sostanza organica	0,03	0,02	0,25
Azoto totale	<b>0,41</b>	0,24	<b>0,51</b>
Rapporto C/N	-0,04	-0,08	0,10
Fosforo assim.	-0,37	-0,30	-0,15
CSC	0,11	0,11	0,31
Calcio di scambio	0,13	0,14	0,31
Magnesio di scambio	-0,10	0,03	0,18
Sodio di scambio	-0,08	-0,05	0,16
Potassio di scambio	-0,25	-0,14	-0,02
Ferro assimilabile	-0,06	-0,14	0,08
Rame assimilabile	-0,12	0,15	-0,17
Zinco assimilabile	0,12	-0,02	0,24
Manganese assimilabile	<b>-0,58</b>	<b>-0,42</b>	<b>-0,39</b>

**Tab. 3.** Matrice di correlazione tra i parametri fisici, chimici, biochimici e microbiologici con la crescita di *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* e *Trichoderma harzianum* rilevata nei 12 suoli. Le correlazioni risultate significative dall'analisi di regressione lineare ( $P < 0.01$ ) sono indicate in rosso

La tabella mostra l'analisi di correlazione tra la crescita dei 3 funghi selezionati con i 23 parametri del suolo misurati. La crescita fungina di *Aspergillus niger* è risultata correlata negativamente per il contenuto in argilla e manganese assimilabile, ma positivamente per il contenuto in sabbia grossa e azoto totale. La crescita del fungo *Botrytis cinerea* è correlata positivamente con il contenuto in sabbia grossa e negativamente con il contenuto in argilla e manganese. Infine anche per *Trichoderma harzianum* si sono rilevate le medesime correlazioni crescita – parametri chimici.

Si può concludere ,infine, che in base all'analisi delle correlazioni tra i parametri fisico-chimici dei diversi suoli e la crescita dei tre funghi è emerso che i terreni sabbiosi sono risultati i meno fungistatici, in particolare lo sviluppo miceliare dei funghi test aumenta in maniera proporzionale con il contenuto in sabbia (coeff. di Pearson  $r = 0,80$ ). L'attività microbica è stata valutata mediante la misura della respirazione e del carbonio microbico. Inoltre è stata misurata anche l'attività enzimatica (FDA) del suolo,. Contrariamente all'ipotesi iniziale non si è evidenziata correlazione significativa tra fungistasi e biomassa microbica, mentre risulta influente il profilo metabolico della microflora tellurica (Fig. 4.8 e Tab. 3).

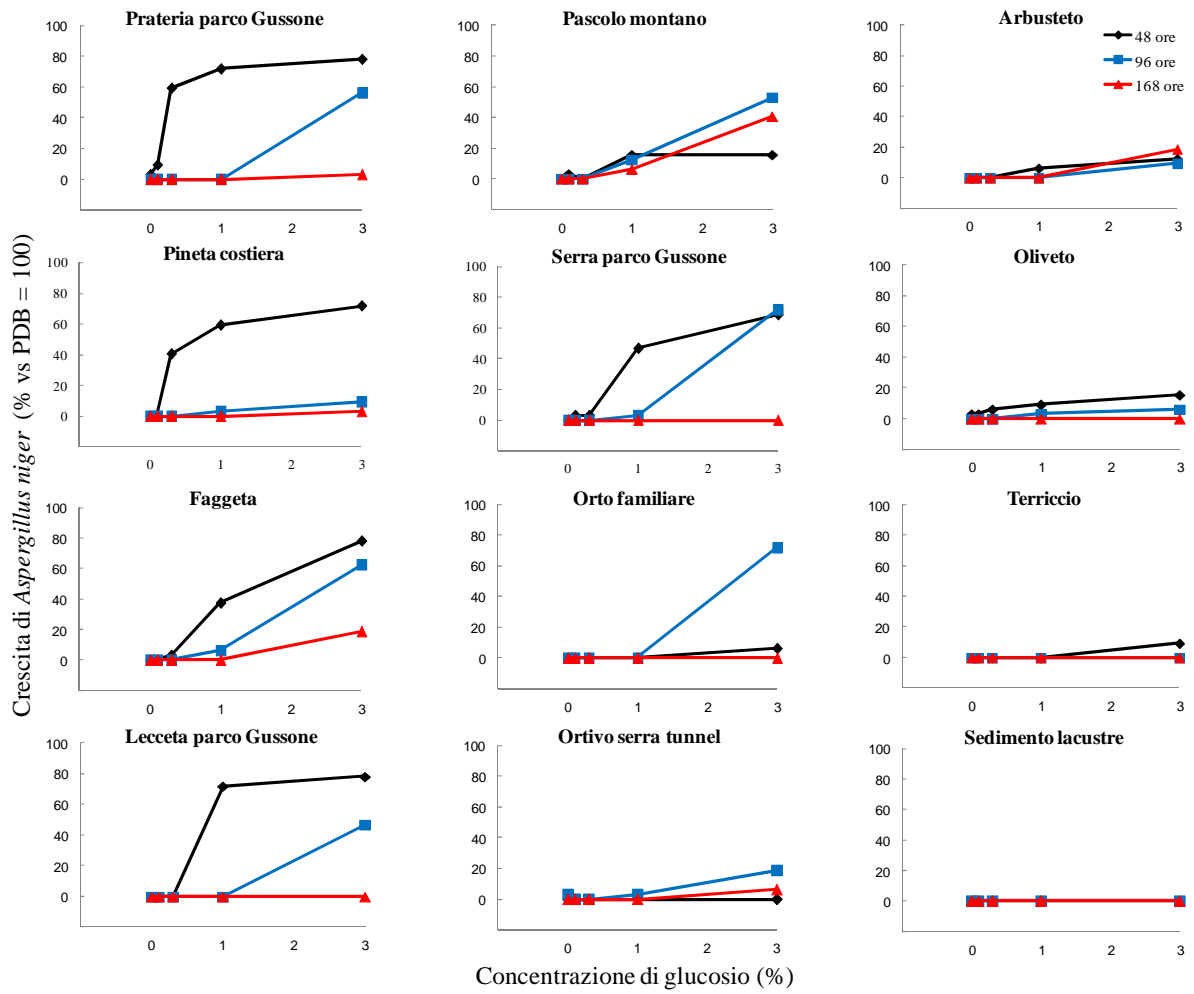
Considerando in termini assoluti il livello fungistatico misurato per i diversi suoli, nel caso di *Aspergillus niger*, la fungistasi è risultata massima in Sedimento e Terriccio, leggermente inferiore in Pineta costiera e Lecceta e minima in Faggeta e Prateria. Nel caso di *Botritis cynerea* la fungistasi risulta massima nel Terriccio e per i suoli Ortivo in serra tunnel e Sedimento lacustre, leggermente inferiore in Lecceta e Prateria parco Gussone e minima in Serra parco Gussone e Faggeta. Infine per *Trichoderma harzianum*, i livelli di fungistasi sono risultati massimi in Sedimento lacustre, medi nei suoli da Pascolo montano e Pineta costiera, e bassi in Faggeta e Prateria parco Gussone (Fig. 4.9 e 4.10).



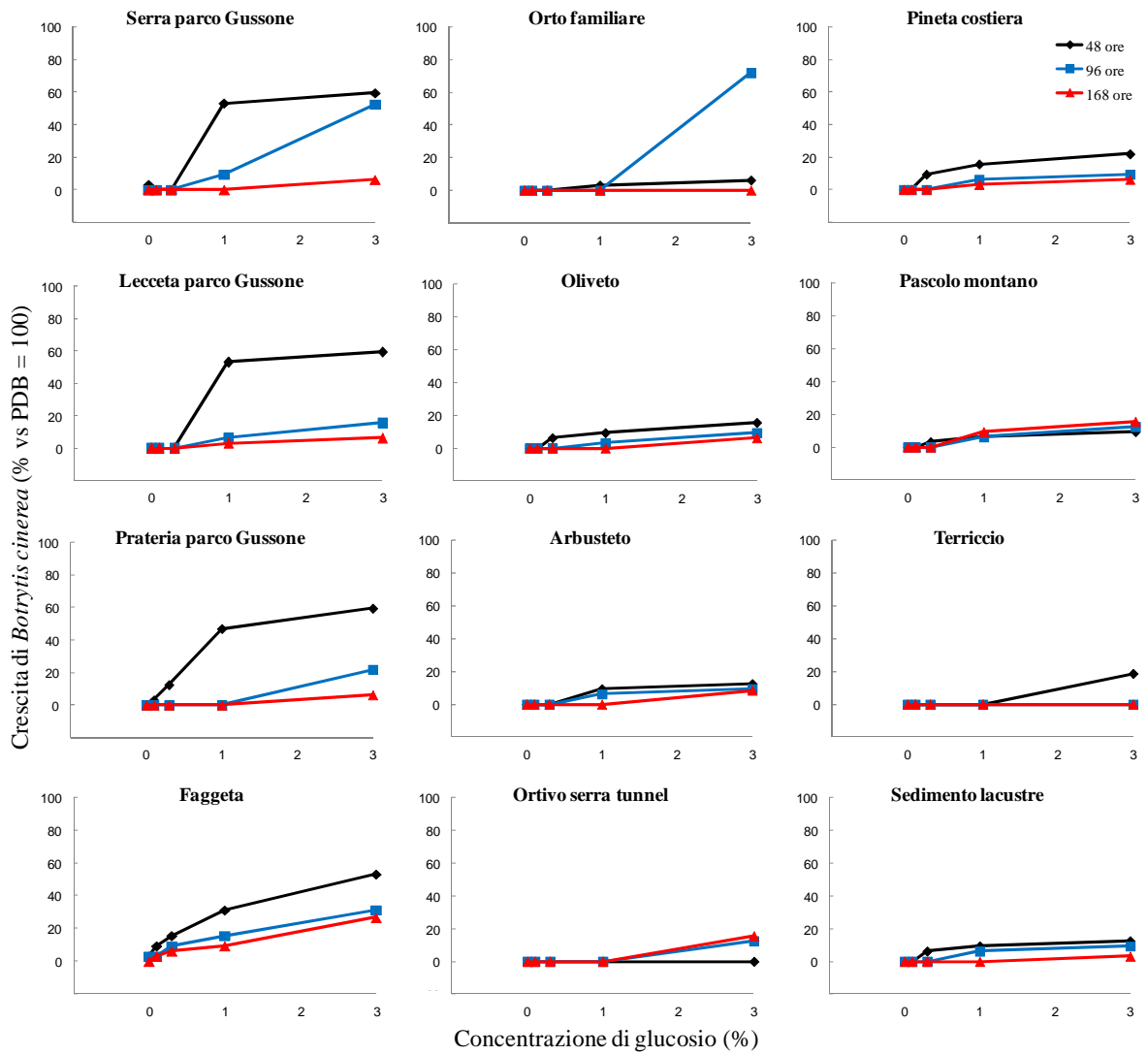
**Fig. 4.9.** Crescita fungina di *Aspergillus niger* (sopra), *Botritis cynerea* (in mezzo) e *Trichoderma harzianum* (in basso), rilevata dopo 48 – 96 – 168 ore, espressa come indice di crescita microbica (sviluppo miceliare) nei 12 suoli.

#### *4.3.2 Risposta della fungistasi in seguito ad ammendamento dei suoli*

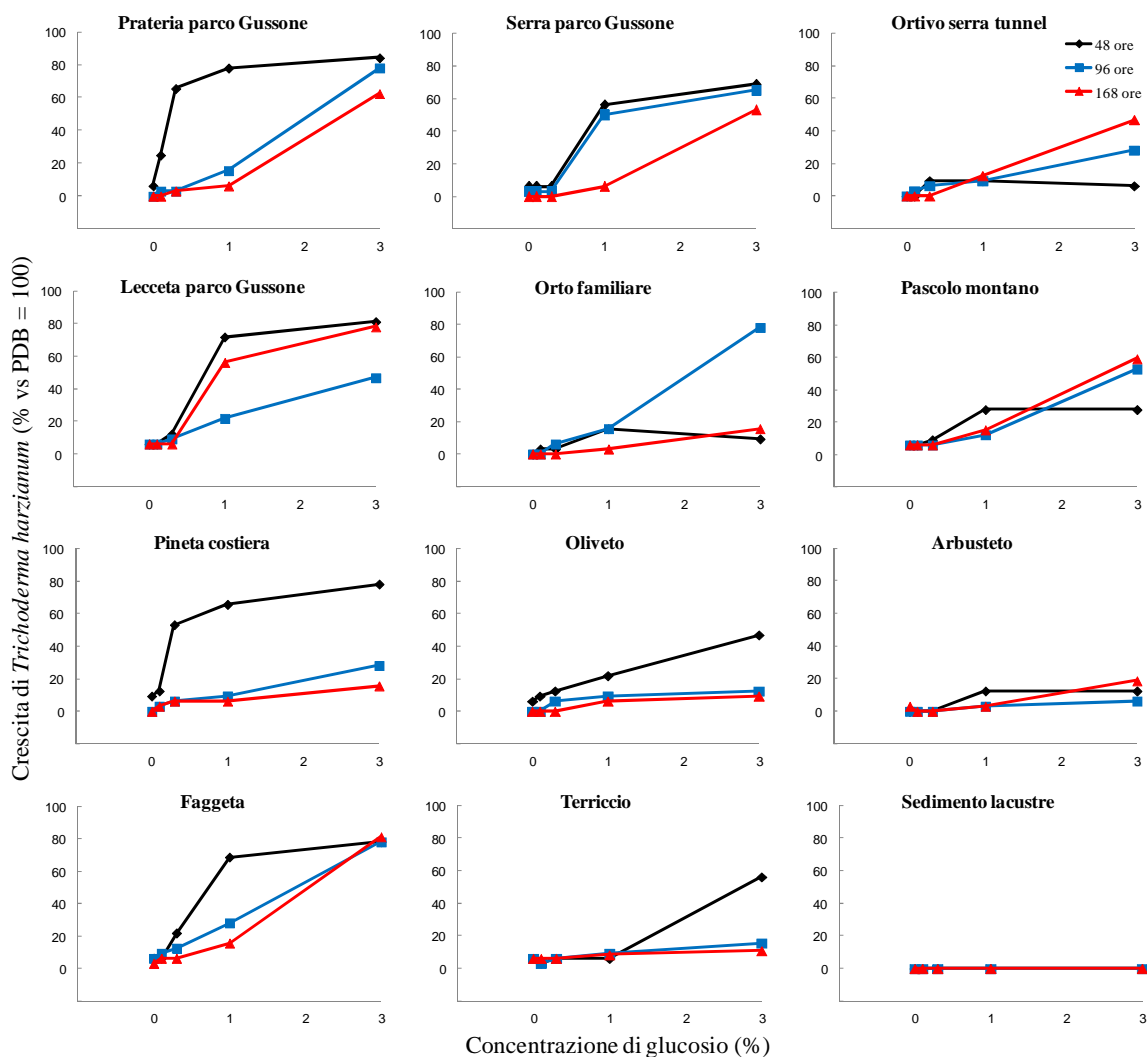
La crescita delle tre specie fungine è risultata elevata solo dopo le prime 48 ore dall'ammendamento con glucosio, mentre con il procedere della incubazione la crescita di tutti i funghi subiva un forte calo e a 168 ore dall'ammendamento la crescita dei funghi è praticamente azzerata, quindi si può asserire che la fungistasi è stata ripristinata. La velocità di ripristino della fungistasi è risultata più elevata nei suoli da Pineta e Oliveto, intermedia in quello da faggeta e bassa in quelli da prateria, parco Gussone e orto familiare e serra tunnel. In ogni caso dopo 7 giorni dall'ammendamento (168 ore) con glucosio tutti i suoli risultavano fungistatici (Fig. 4.10).



I risultati ottenuti appaiono coerenti anche per gli altri due funghi in prova.

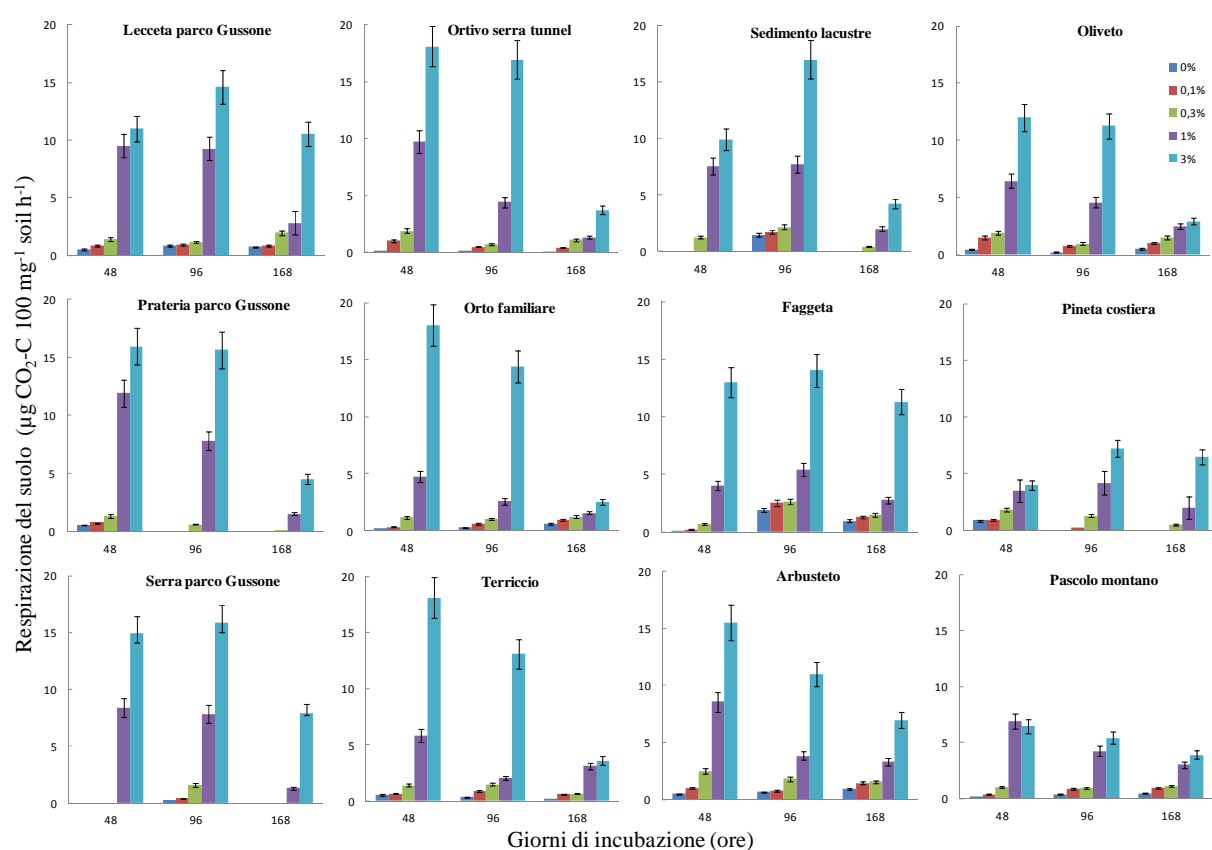






**Fig. 4.10.** Sviluppo miceliare di *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* e *Trichoderma harzianum* dopo ammendamento con glucosio a cinque concentrazioni, espressa in % rispetto al controllo cresciuto su PDB. I valori sono riferiti ai test di germinazione sui 12 suoli monitorati e a tre tempi di incubazione (48, 96, e 168 ore). I grafici sono stati disposti in modo da indicare i suoli dal meno fungistatico al suolo con più elevato potere fungistatico, considerando sia l'entità della crescita fungina sia il tempo di ripristino della fungistasi entro le 168 ore dall'ammendamento.

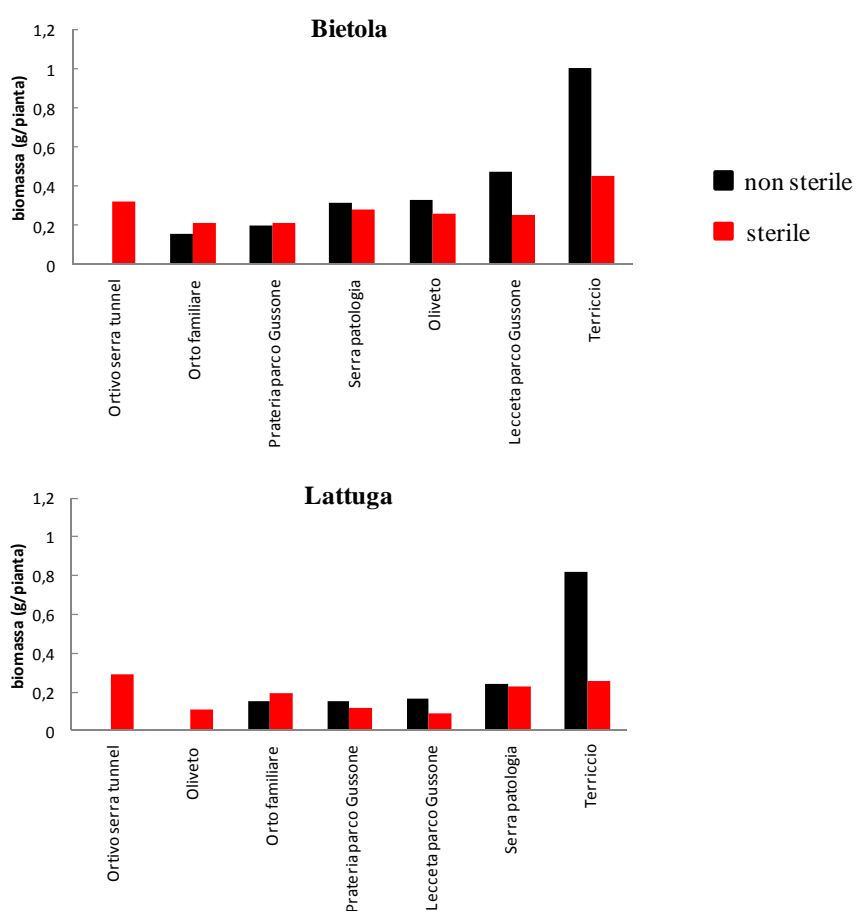
La respirazione nei vari suoli è risultata significativamente influenzata dal tempo di incubazione, mostrando un livello più elevato dopo le prime 48 ore dall'ammendamento con glucosio e mantenendo, in alcuni casi, livelli medio - alti ancora a 96 ore. Dopo sette giorni dall'ammendamento, la respirazione ha subito una progressiva diminuzione anche quando il suolo era stato ammendato con la concentrazione più alta di glucosio ( 3%) (Fig. 4.11).



**Fig. 4.11.** Valori della respirazione del suolo rilevata dopo 48, 96, e 168 ore dall'ammendamento con glucosio nei 12 suoli selezionati.

### 4.3.3 Crescita di *Lactuca sativa* e *Beta vulgaris*

I risultati relativi alla biomassa delle due specie vegetali in esame, mostrano che sia la bietola che la lattuga presentano un accrescimento maggiore sul Terriccio soprattutto quando questo non è stato sterilizzato. In generale, comunque, le due specie hanno mostrato uno sviluppo migliore quando sono state coltivate nei vassoi contenenti i suoli non sterili (Fig. 4.12). Il suolo serra tunnel risulta un'eccezione in quanto le due specie sono crescite solo nel suolo sterile mentre hanno fatto rilevare una mortalità del 100% nel suolo non sterile.



**Fig. 4.12.** Peso fresco di piantine di bietola e lattuga coltivate per 40 giorni in condizioni controllate su 7 differenti suoli, sterilizzati e non.

#### **4.4. Discussione**

In termini generali, i dodici suoli campionati per il monitoraggio della fungistasi risultano essere molto differenti tra loro sia per le proprietà fisico - chimiche, che per le loro caratteristiche microbiologiche. L'eterogeneità dei dodici suoli ha consentito di comprendere meglio i meccanismi alla base della fungistasi e di poter discriminare i suoli in base al loro potere fungistatico, il quale si è visto essere correlato direttamente ed indirettamente ad alcune delle proprietà del sistema suolo (Fig. 4.2). In particolare dallo studio è emerso che esistono differenze nella fungistasi tra i diversi suoli. Alcuni hanno un alto potere fungistatico e sono Sedimento lacustre, Terriccio, Arbusteto ed Ortivo serra tunnel; altri suoli hanno mostrato un livello medio di fungistasi, e in particolare Pascolo montano e Pineta costiera. Infine in alcuni suoli, l'indice di crescita fungina risulta estremamente elevato e ciò corrisponde ad un basso livello di fungistasi, ad esempio per i suoli prelevati da Faggeta e Serra parco Gussone. Dall'analisi di correlazione si evince che la crescita dei tre funghi in prova è risultata influenzata in maniera simile dai fattori pedologici, suggerendo una ecologia simile per tutti e tre i funghi. Dai risultati dei saggi per valutare la fungistasi è emerso che la crescita di tutti e tre i funghi ha un comportamento analogo, e quando è maggiore si ha anche un aumento del tasso di respirazione nel suolo, soprattutto nelle 48 ore dopo l'ammendamento, suggerendo una relazione tra fungistasi e tasso di respirazione. La fungistasi sembra dipendere sia dal contenuto in sostanza organica che dalla biomassa microbica come si è visto per Terriccio che risulta molto fungistatico. L'importanza della microflora tellurica è stata evidenziata anche durante il saggio di crescita di lattuga e bietola, col quale si è visto che nei suoli non sterili, grazie alla componente microbica le piante crescevano molto di più rispetto a quando i suoli venivano sterilizzati.

Infine possiamo dire che contrariamente all'ipotesi formulata non c'è stata una netta correlazione tra fungistasi e biomassa microbica, mentre risulta influente il profilo metabolico della microflora tellurica. Il monitoraggio ha mostrato che esistono notevoli differenze nel potere fungi statico dei diversi suoli, ciò consente di poter classificare i suoli sulla base della loro capacità di inibire o rallentare lo sviluppo di funghi terricoli.

#### 4.5. Referenze citate

- Alabouvette, C., 1999. Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease suppressive soil. *Australasia Plant Pathology* 28, 57–64.
- Alabouvette, C., Raaijmakers, J.M., De Boer, W., Notz, R., Defago, G., Steinberg, C., Lemanceau, P., 2006. Concept and methods to assess the phytosanitary quality of soils. In: Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A. (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 257-269.
- Alef, K., 1995. Soil respiration. In: Alef, K., Nannipieri, P. (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 214 - 219.
- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balser, T., 2005. Soil feedbacks of plant-diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspect. Plant Ecol.* 7, 27-49.
- Berendsen, R.L., Kalkhove, S.I.C., Lugones, L.G., Wösten, H.A.B., Bakker, P.A.H.M., 2012. Germination of *Lecanocillium fungicola* in the mycosphere of *Agaricus bisporus*. *Environ. Microbiol. Reports* 4: 227-233.
- Bloem, J., Hopkins, D.W., Benedetti, A., 2006a. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI Publishing, Oxfordshire, UK.
- Bonanomi, G., Antignani, V., Pane, C., Scala, F. 2007. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. *Journal of Plant Pathology* 89: 311-340.
- Bonanomi, G., Incerti, G., Giannino, F., Mingo, A., Lanzotti, V., Mazzoleni, S., 2013. Litter quality assessed by solid state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy predicts decay rate better than C/N and Lignin/N ratios. *Soil Biol. Biochem.* 56, 40-48.
- De Boer, W., Verheggen, P., Klein Gunnewiek, P.J.A., George, A.K., Johannes, A.V., 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied Environmental and Microbiology* 69, 835–844.

- Ellis, R.J., Timms-Wilson, T.M., Bailey, M.J., 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Environmental Microbiology* 2, 274–284.
- Hsu, S.C., Lockwood, J.L. 1973. Soil fungistasis – behavior of nutrient independent spores and sclerotia in a model system. *Phytopathology* 63, 334-337.
- Liebman, J.A., Epstein, L., 1994. Partial characterization of volatile fungistatic compound(s) from soil. *Phytopathology* 84, 442–446.
- Loeppert, R.H., Suarez, D.L., 1996. Carbonate and gypsum. In: Sparks, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 3 e Chemical Methods*. SSSA Book Series no. 5. SSSA-ASA, Madison, WI, USA, pp. 437–474.
- Romine, M., Baker, R., 1973. Soil fungistasis: evidence for an inhibitory factor. *Phytopathology* 63, 756–759.
- Sparks, D.L., 1996. *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. SSSA Book Series 5. SSSA and ASA, Madison, WI.
- Vance, E.D. , Brookes, P.C. , Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. and Biochem.* vol. 19, Issue 6, 1987, p. 703–707.
- Workneh F, Van Bruggen AHC, Drinkwater LE, Sherman, C., 1993. Variables associated with a reduction in corky root and *Phytophthora* root rot of tomatoes in organic compared to conventional farms. *Phytopathology* 83, 581-589.
- Xu, C.K., Mo, M.H., Zhang, L.M., Zhang, K.Q., 2004. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1997-2004.

## *Ringraziamenti*

Desidero sinceramente ringraziare il prof. Zoina che mi ha seguito passo passo durante il mio percorso universitario, trasmettendomi la passione per la patologia vegetale ed ho tratto dalla sua professionalità tanti insegnamenti anche di vita. Un grande grazie va al mio co-tutore il dott. Bonanomi col quale ho lavorato benissimo durante questi 3 anni e spero di lavorarci ancora per molto. Ringrazio anche tutti i ragazzi del laboratorio, in particolare Marica la nostra tesista, e i nuovi dottorandi Francesca e Rino, sempre pronti a darmi una mano. Un valido supporto tecnico e morale lo devo anche alla dott.ssa Cozzolino che conosco dai tempi della tesi triennale. Infine desidero ringraziare la mia famiglia che mi ha sempre seguito durante i vari percorsi scolastici e di vita.