

**AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2015 DEL TIPO DI  
OPERAZIONE 16.1.01 "GRUPPI OPERATIVI DEL PEI PER LA PRODUTTIVITÀ E LA  
SOSTENIBILITÀ DELL'AGRICOLTURA"  
FOCUS AREA 2A, 4B, 4C, 5A E 5E  
DGR N. 2268 DEL 28 DICEMBRE 2015**

**RELAZIONE TECNICA  INTERMEDIA  FINALE**

**DOMANDA DI SOSTEGNO** ..... 5005108.....

**DOMANDA DI PAGAMENTO** ..... 5157050.....

**FOCUS AREA:** ... 2A... ..

Titolo Piano	LINEE GUIDA PER IL CONTRASTO DELLA FUSARIOSI SU AGLIO BIANCO PIACENTINO
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	AGRISILVA SCRL
Elenco partner del Gruppo Operativo	AGRISILVA SCRL COPAP SCARL UNIVARSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE - DIPROVES IRECOOP SOC. COOP.

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	36
Data inizio attività	14 OTTOBRE 2016
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	11 GENNAIO 2020

Relazione relativa al periodo di attività dal	10/2016	12/2019
Data rilascio relazione	09/03/2020	

Autore della relazione	Piva Claudio – Agrisilva srl		
telefono		email	c.piva@agrisilva.it

## Sommario

<b>1 - DESCRIZIONE DELLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PIANO</b>	<b>3</b>
<b>1.1 STATO DI AVANZAMENTO DELLE AZIONI PREVISTE NEL PIANO</b>	<b>3</b>
<b>2 - DESCRIZIONE PER SINGOLA AZIONE</b>	<b>3</b>
<b>2.1 ATTIVITÀ E RISULTATI</b>	<b>3</b>
<b>2.2 PERSONALE</b>	<b>4</b>
<b>2.3 TRASFERTE</b>	<b>4</b>
<b>2.4 MATERIALE CONSUMABILE</b>	<b>4</b>
<b>2.5 SPESE PER MATERIALE DUREVOLE E ATTREZZATURE</b>	<b>5</b>
<b>2.6 MATERIALI E LAVORAZIONI DIRETTAMENTE IMPUTABILI ALLA REALIZZAZIONE DEI PROTOTIPI</b>	<b>5</b>
<b>2.7 ATTIVITÀ DI FORMAZIONE</b>	<b>5</b>
<b>2.8 COLLABORAZIONI, CONSULENZE, ALTRI SERVIZI</b>	<b>6</b>
<b>3 - CRITICITÀ INCONTRATE DURANTE LA REALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ</b>	<b>6</b>
<b>4 - ALTRE INFORMAZIONI</b>	<b>6</b>
<b>5 - CONSIDERAZIONI FINALI</b>	<b>7</b>
<b>6 - RELAZIONE TECNICA</b>	<b>7</b>

# 1 - Descrizione dello stato di avanzamento del Piano

Descrivere brevemente il quadro di insieme relativo alla realizzazione del piano. Richiamare eventuali richieste di modifiche inviate agli organi Regionali ed apportate al progetto.

**Quadro d'insieme relativo alla realizzazione del Piano:** Tutte le azioni previste inizialmente dal Piano sono state realizzate nel periodo compreso tra l'inizio del progetto (Ottobre 2016) e la sua conclusione (Gennaio 2020). Per il loro completamento è stato necessario richiedere proroga di 90 giorni del termine delle attività, al fine di completare il terzo ciclo colturale e le successive indagini di post raccolta. Non deve essere segnalata alcuna variazione rispetto al programma previsto.

In particolare, UCSC-DIPROVES, insieme a COPAP ha svolto le attività afferenti al work package 1 (WP 1) di raccolta dei principali parametri per la caratterizzazione delle aziende socie della cooperativa e delle strutture della stessa.

Sono state inoltre svolte attività di monitoraggio in campo, dalla semina alla raccolta, e analisi delle partite destinate al consumo durante lo stoccaggio, come previsto nel WP 2.

Infine, sono state eseguite analisi *in vitro* e in campo per valutare l'efficacia di composti chimici e biologici nel contenimento della malattia (WP 3).

A partire da Novembre 2016, la dott.ssa Letizia Mondani, ha collaborato al progetto in modo continuativo come assegnista di ricerca di UCSC-DIPROVES con il coordinamento della Prof.essa Paola Battilani. Il dott. Giorgio Chiusa, invece ha collaborato in modo continuativo al progetto in qualità di consulente.

COPAP scarl, oltre a supportare con il proprio personale con i consulenti dott. Bracchi e dott. Segalla le attività svolte da UCSC, ha provveduto all'implementazione di specifico sito web dedicato alla descrizione del progetto, al suo svolgimento ed agli obiettivi attesi:

<http://fusariosiaglio.it/>

Si segnala che, la rendicontazione finale dei soggetti partecipanti al GO fa riferimento a GENNAIO 2020.

IRECOOP ha realizzato le azioni di formazione rivolte alle aziende agricole socie di COPAP: un corso di formazione e le successive attività di coaching.

**Richieste di modifiche:** come da documentazione allegata si segnalano alcuni affiancamenti di personale/collaboratori/ assegnisti:

AGRISILVA: rispetto a quanto previsto nel piano approvato, è stato comunicato l'affiancamento al socio Claudio Piva del collaboratore dottore agronomo Lorenzo Casalini;

COPAP: rispetto a quanto previsto nel piano approvato, è stato comunicato l'affiancamento all'impiegata di concetto Giuseppina Serena dell'impiegata di concetto Barbara Caminati;

UCSC-DIPROVES: è stata comunicata l'attivazione un contratto di collaborazione coordinata e continuativa con la dottoressa Letizia Mondani.

## 1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

Indicare per ciascuna azione il mese di inizio dell'attività originariamente previsto nella proposta ed il mese effettivo di inizio, indicare analogamente il mese previsto ed effettivo di termine delle attività. Indicare il numero del mese, ad es.: 1, 2, ... considerando che il mese di inizio delle attività è il mese 1. Non indicare il mese di calendario.

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività effettivo	Mese termine attività previsto	Mese termine attività effettivo
Esercizio della cooperazione	AGRISILVA, COPAP, UCSC	Riunioni del comitato di coordinamento, altre attività di coordinamento	1	1	36	39 (dopo proroga)
Studi necessari alla realizzazione del piano (di mercato, di fattibilità, piani aziendali)	ATTIVITA' NON PREVISTA					
Specifiche azioni legate alla realizzazione del piano	COPAP, UCSC	Caratterizzazione delle aziende e delle strutture di stoccaggio; studio del ruolo dei parametri agronomici e meteorologici; interventi preventivi di controllo e sanizzazione; stesura di linee guida per la filiera aglio bianco piacentino	1	1	36	39 (dopo proroga)
Piano di divulgazione di trasferimento dei risultati e implementazione della rete PEI	AGRISILVA, COPAP, UCSC	Implementazione del sito web, organizzazione di seminari, articoli su riviste tecniche specialistiche	1	1	36	39 (dopo proroga)
Attività di formazione	IRECOOP	Corso di formazione e specifica azione di coaching	16	26	36	37

## 2 - Descrizione per singola azione

Compilare una scheda per ciascuna azione

### 2.1 Attività e risultati

Azione	<b>Esercizio della cooperazione</b>
Unità aziendale responsabile	AGRISILVA, COPAP, UCSC
Descrizione delle attività	Riunioni del comitato di coordinamento, altre attività di coordinamento generale delle attività dei singoli partner. Gli obiettivi inizialmente previsti dal Piano sono stati pienamente raggiunti. Non sono emerse particolari criticità.
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	<b>Scostamenti:</b> rispetto al piano di lavoro è stato comunicato per quanto riguarda il soggetto mandatario AGRISILVA SCRL l'affiancamento al dottore agronomo Claudio Piva, previsto nel piano approvato, il collaboratore dottore agronomo Lorenzo Casalini. Il progetto prevedeva l'organizzazione di n. 6 riunioni del comitato di coordinamento; queste sono state realizzate in numero superiore (n. 7 – come da verbali) nei tempi ritenuti opportuni e necessari.
Attività ancora da realizzare	

Azione	Studi necessari alla realizzazione del piano (di mercato, di fattibilità, piani aziendali) <b>ATTIVITA' NON PREVISTA</b>
Unità aziendale responsabile	
Descrizione delle attività	<i>descrizione delle attività svolte per il raggiungimento degli obiettivi previsti dall'azione</i>
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	<i>descrivere in che misura sono stati raggiunti gli obiettivi previsti, giustificando eventuali scostamenti dal progetto originario. Analizzare eventuali criticità tecnico-scientifiche emerse durante l'attività</i>
Attività ancora da realizzare	<i>Solo per relazioni intermedie - descrivere sinteticamente le attività ancora da realizzare</i>

Azione	<b>Specifiche azioni legate alla realizzazione del piano</b>
Unità aziendale	UCSC, COPAP
Descrizione delle attività	Identificazione delle aziende produttrici, monitoraggio ambienti destinati al prodotto in post raccolta, sintesi ed elaborazione dati raccolti, valutazione dell'incidenza di marciume di <i>Fusarium</i> in aglio destinato al consumo e alla moltiplicazione, determinazione del contenuto di fumonisine, ruolo delle condizioni agronomiche e scelta delle aziende da inserire nel progetto, analisi fitosanitarie dei terreni e dell'aglio in campo, elaborazione dei dati ottenuti con definizione delle condizioni di rischio, valutazione dell'efficacia di fungicidi e di antagonisti naturali, verifica dell'efficacia dei composti scelti in pre semina. Redazione di specifiche linee-guida.

<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</p>	<p>Il Piano d’Innovazione è stato completamente rispettato e gli obiettivi raggiunti. Per il dettaglio delle azioni eseguite si rimanda alla allegata relazione redatta da UCSC-DIPROVES.</p> <p><b>Scostamenti:</b> per il soggetto beneficiario COPAP è stato comunicato l’affiancamento all’impiegata di concetto Serena Giuseppina, prevista nel piano approvato, anche l’impiegata di concetto Caminati Barbara. Per il soggetto beneficiario UCSC-DIPROVES è stata comunicata l’attivazione un contratto di collaborazione coordinata e continuativa con la dottoressa Letizia Mondani.</p>
<p>Attività ancora da realizzare</p>	

<p>Azione</p>	<p><b>Piano di divulgazione di trasferimento dei risultati e implementazione della rete PEI</b></p>
<p>Unità aziendale responsabile</p>	<p>AGRISILVA, COPAP, UCSC</p>
<p>Descrizione delle attività</p>	<p>Implementazione del <u>sito web</u>: è stato implementato lo specifico sito web: <a href="http://fusariosiaglio.it/">http://fusariosiaglio.it/</a> riportante gli obiettivi del progetto, i metodi seguiti ed i risultati ottenuti ed il materiale sviluppato per gli eventi di formazione e divulgazione.</p> <p><u>Rassegna Stampa:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Link articolo fresh plaza <a href="http://www.freshplaza.it/article/84307/Fusariosi-dellaglio-parte-da-Piacenza-uno-studio-per-contrastarla">http://www.freshplaza.it/article/84307/Fusariosi-dellaglio-parte-da-Piacenza-uno-studio-per-contrastarla</a></li> <li>• Il Coltivatore, “Marciume secco dell’aglio a breve da una ricerca in cui è coinvolta anche l’Università Cattolica le linee guida per combattere la Fusariosi” (2016)</li> <li>• Corriere Ortofrutticolo 01-2017 “Aglio Bianco Piacentino: la COPAP fa innovazione”</li> <li>• Libertà 3-01-2017, “Melodi premiato per gli anni dedicati alla promozione dell’aglio “made in Piacenza”</li> <li>• Libertà 27-03-18 “Vino, produzioni vegetali e aglio Elia, Maria Chiara e Letizia al Lavoro.”</li> </ul> <p><u>Articoli scientifici e tecnici:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Submission 12-11-2019: “Promising results in the chemical and biological control of Fusarium spp involved in garlic dry rot”, Crop Protection. Ms. Ref. No.: CROPRO-D-19-01388</li> <li>• Terra e Vita, 9/2020, in pubblicazione: “Il marciume secco dell’aglio cause possibili soluzioni”.</li> </ul> <p><u>Convegni e seminari:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• XXIII Convegno SIPaV (10-2017): “Field investigation on garlic dry rot”</li> <li>• XXIV Convegno SIPaV (09-2018): “In vitro efficacy tests against Fusarium spp. causing garlic dry rot”</li> <li>• FICO (01-03-2019)“Innovazione e ricerca per il sistema agroalimentare in Emilia-Romagna”</li> </ul> <p><u>Seminari:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMINARIO: 4 ore presso la sede della cooperativa di produttori di aglio di Caraglio (Cu): “La fusariosi dell’aglio” (02-02-2018)</li> <li>• Agrisystem Ph.D. candidates Presentazione progetti di ricerca:</li> </ul>

	<p>“Garlic dry rot: an investigation on causal agents and possible solutions” (13-06-2019)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SEMINARIO: “Aaglio bianco piacentino”: la ricerca a sostegno di una lunga tradizione di qualità.</li> </ul> <p>Università Cattolica del Sacro Cuore - Sala convegni “G. Piana”, Via Emilia Parmense, 84 – Piacenza (19-12-2019 ore 10-12,30)</p>
<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</p>	<p>Gli obiettivi sono stati completamente raggiunti</p>
<p>Attività ancora da realizzare</p>	

Azione	<b>Attività di formazione</b>
Unità aziendale responsabile	IRECOOP
Descrizione delle attività	<p>Catalogo Verde domanda n. 5104450 - <b>Corso di formazione:</b>  <u>Identificazione delle cause di marciume e sistemi di ottimizzazione della filiera</u>  28-11-2018 “La fusariosi dell’aglio. Stato delle conoscenze. Presentazione del progetto di ricerca. Obiettivi e risultati attesi” – durata 4 ore – docente: Paola Battilani  5-12-2018 “Fusarium proliferatum: caratteristiche ed ecologia della specie, ciclo d’infezione, agenti biotici ed abiotici coinvolti nella fusariosi” – durata 4 ore – docente: Giorgio Chiusa  12-12-2018 “Il controllo della malattia dal magazzino al campo: potenziali punti critici nella gestione delle partite in magazzino e spetti di sanificazione aziendale” – durata 4 ore – docente: Giorgio Chiusa  19-12-2018 “Disciplinare di produzione della Regione Emilia Romagna. Linee guida per la prevenzione del marciume secco nella produzione dell’aglio. Ottimizzazione della filiera dal campo al post-raccolta” – durata 4 ore – docente: Paola Battilani</p> <p>Catalogo Verde domanda n. 5147365 – <b>Coaching:</b>  <u>Coaching sulle tecniche di contenimento del marciume in fase di coltivazione, raccolta, conservazione e lavorazione del prodotto aglio</u>  Durata: 4 ore per utente</p>
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate	Le attività previste sono state completamente realizzate.
Attività ancora da realizzare	



## 2.2 Personale

Elencare il personale impegnato, il cui costo è portato a rendiconto, descrivendo sinteticamente l'attività svolta. Non includere le consulenze specialistiche, che devono essere descritte a parte.

Cognome e nome	Mansione/ qualifica	Attività svolta nell'azione	Or a	Costo
	(COPAP)	Coordinamento 2016	104	€3.618,16
	(COPAP)	Coordinamento 2017	21	€360,36
	(COPAP)	Coordinamento 2017	110	€1.810,60
	(COPAP)	Coordinamento 2018	260	€ 4.490,20
	(COPAP)	Coordinamento 2019	340	€ 6.099,60
	(UCSC)	responsabile scientifico 2016	110	€ 5.291,00
	(UCSC)	responsabile scientifico 2017	351	€ 17.030,52
	(UCSC)	responsabile scientifico 2018	396	€ 20.247,48
	(UCSC)	responsabile scientifico 2019	546	€ 27.916,98
	(UCSC)	responsabile scientifico 2020	22	€1.124,86
	(UCSC)	responsabile analisi 2016	30	€1.681,50
	(UCSC)	responsabile analisi 2017	335	€19.242,40
	(UCSC)	responsabile analisi 2018	313	€17.978,72
	(UCSC)	responsabile analisi 2019	377	€21.654,88
	(UCSC)	Assistente di campo e lab.	267	€3.158,97
	(UCSC)	Assistente di campo e lab.	1.720	€23.681,29
	(UCSC)	Assistente di campo e lab.	1.302	€17.842,23
	(UCSC)	Assistente di campo e lab.	1.720	€23.789,64
<b>Totale SALDO:</b>				<b>€ 217.019,39</b>

## 2.3 Trasferte

Cognome e nome	Da/a	Descrizione	Costo
	dal 01/03 al ) 07/06/2017	Chiavenna Landi, Cortemaggiore	€18,60
	dal 01/03 al ) 07/06/2017	Villanova sull'Arda, San Pietro in Cerro, Polignano	€23,70
	dal 01/03 al ) 07/06/2017	Cortemaggiore	€27,60
	dal 01/03 al ) 07/06/2017	Chiavenna Landi, Cortemaggiore, Villanova sull'Arda, San Pietro in Cerro, Polignano	€25,50
	) 26-27/06/2017	Monticelli	€42,60
	) 20/07 e 29/07/2017	Monticelli	€19,20
	mesi di luglio, ) agosto, settembre, ottobre e novembre	Cortemaggiore, Fiorenzuola, San Pietro, Monticelli	€130,50
	) mesi di gennaio e febbraio	Chiavenna Landi, Fiorenzuola, Cortemaggiore, ecc.	€91,70

, mesi di marzo	Chiavenna Landi, Fiorenzuola, Cortemaggiore, ecc.	€91,70
mesi di agosto e , settembre 2018	Chiavenna Landi, Fiorenzuola, Cortemaggiore, ecc.	€151,20
, 8-10/11/2018	Milano	€46,10
mesi di gennaio - , aprile 2019	Pontenure, Fiorenzuola, Cortemaggiore, San Pietro in Cerro, ecc	€157,50
mesi di maggio e , giugno 2019	Pontenure, Fiorenzuola, Cortemaggiore, San Pietro in Cerro, ecc	€138,00
, mese di settembre	Pontenure, Fiorenzuola, Cortemaggiore, San Pietro in Cerro, ecc	€135,00
mesi giugno, , luglio, ottobre	Pontenure, Fiorenzuola, Cortemaggiore, San Pietro in Cerro, ecc	€180,00
, mese di novembre	Monticelli	€82,80
, 31/10 e 04/11/2019	Monticelli	€27,00
	<b>Totale SALDO</b>	<b>€1.388,70</b>

## 2.4 Materiale consumabile

Fornitore	Descrizione materiale	Costo
STUDIART (COPAP)	Progettazione e realizzazione sito fusariosi	€2.500,00
STUDIART (COPAP)	Servizio di hosting e gestione sito web	€1.500,00
SCHARLAB	Anse rigide sterili	€136,98
FISHER	Genejet plant gen DNA	€474,10
LIFE TECHNOLOGIES	Platinum taq DNA polymerase	€1.314,90
SCHARLAB	Puntali universali	€37,00
GHIARONI	Provetta eppendorf, guanti nitrile, scatole peltri	€565,36
FISHER	X50 syringe filter pes	€167,40
GHIARONI	Provetta eppendorf safe-lock	€335,40
SCHARLAB	Agar batteriologico	€741,12
FISHER	X50 syringe filter pes, microtube, nitrile glove	€467,50
GHIARONI	Ansa con ago sterile, puntali, ecc,	€641,60
GHIARONI	Scatole peltri, ago sterile, ecc.	€641,60
TERREPADANE	Opiniom ecna, custodia, quilt xcel, bumper,	€205,03
TERREPADANE	Patriot, serenade, mycostop, siapton	€532,23
FISHER	X50 syringe filter pes, microtube, nitrile glove	€467,50
GHIARONI	Scatole peltri, ago sterile, ecc.	€641,60

FISHER	X50 syringe filter, microtube, ecc	€431,50
EUROLAB	Fumotest widw bire VICAM	€579,00
FISHER SCIENTIFIC	Fisherbrand SureOne Filter, punte con filtro	€655,60
GHIARONI	Scatole peltri, guanti in nitrile, provette, ecc.	€357,00
CIEMME	Roll up, colori su telo	€73,50
PROMEGA ITALIA	GoTaq, colorless masteriz mix	€1.278,75
GHIARONI	Scatole peltri, ansa con ago, ecc.	€359,16
GHIARONI	Guanti in nitrile, provette	€357,00
GHIARONI	Scatole petri, provette, ecc.	€357,00
GHIARONI	Scatole petri, puntali, ecc.	€359,16
CARLO ERBA	FC140770N NS planT II 250 prep.	€1.199,92
CARLO ERBA	FC140770N NS planT II 250 prep.	€599,96
GHIARONI	Provette, guanti, ecc.	€448,94
PROMEGA ITALIA	GoTaq Colorless master mix	€4.262,50
CARLO ERBA	FC140770N NS planT II 250 prep.	€4.199,72
GHIARONI	Provette, guanti, ecc.	€448,94
CARLO ERBA	FPE204030, syringe filters, ecc.	€2.446,20
SARSTEDT	Piastra petri, ansa	€344,64
SCHARLAB	Petri, agar batteriologico, ecc.	€5.966,64
PROMEGA ITALIA	Go Taq colorless master mix	€1.278,75
CARLO ERBA	FC140770N NS planT II 250 prep., ecc.	€1.292,64
GHIARONI	Scatole petri, guanti in nitrile, ecc.	€448,94
FISHER SCIENTIFIC	Syringe, provette, ecc.	€2.082,20
FISHER SCIENTIFIC	Punte, provette, ecc.	€834,00
SARSTEDT	Piastre	€394,56
FISHER SCIENTIFIC	500gr agarose, molecular	€451,20
EUROLAB	Fumonitest wide bire	€2.049,88
	Totale SALDO	€ 44.926,62

## 2.5 Spese per materiale durevole e attrezzature

Fornitore	Descrizione dell'attrezzatura	Costo
		Totale:

## 2.6 Materiali e lavorazioni direttamente imputabili alla realizzazione dei prototipi

Descrivere i prototipi realizzati e i materiali direttamente imputabili nella loro realizzazione

Fornitore	Descrizione	Costo
		Totale:

## 2.7 Attività di formazione

Descrivere brevemente le attività già concluse, indicando per ciascuna: ID proposta, numero di partecipanti, spesa e importo del contributo richiesto

Catalogo Verde domanda n. 5104450 - **Corso di formazione: 16 partecipanti**

Identificazione delle cause di marciume e sistemi di ottimizzazione della filiera

28-11-2018 "La fusariosi dell'aglio. Stato delle conoscenze. Presentazione del progetto di ricerca.

Obiettivi e risultati attesi" – durata 4 ore – docente: Paola Battilani

5-12-2018 "Fusarium proliferatum: caratteristiche ed ecologia della specie, ciclo d'infezione, agenti biotici ed abiotici coinvolti nella fusariosi" – durata 4 ore – docente: Giorgio Chiusa

12-12-2018 "Il controllo della malattia dal magazzino al campo: potenziali punti critici nella gestione delle partite in magazzino e spetti di sanificazione aziendale" – durata 4 ore – docente: Giorgio Chiusa

19-12-2018 "Disciplinare di produzione della Regione Emilia Romagna. Linee guida per la prevenzione del marciume secco nella produzione dell'aglio. Ottimizzazione della filiera dal campo al post-raccolta" – durata 4 ore – docente: Paola Battilani

Costo totale del corso di formazione: 6.338,56 € - contributo richiesto: 5.704,76

Catalogo Verde domanda n. 5147365 – **Coaching: 12 partecipanti**

Coaching sulle tecniche di contenimento del marciume in fase di coltivazione, raccolta, conservazione e lavorazione del prodotto aglio

Costo totale del coaching: 2.976,00 € - contributo richiesto: 2.380,80

## 2.8 Collaborazioni, consulenze, altri servizi

### CONSULENZE - PERSONE FISICHE

Nominativo del consulente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
		Implementazione data base	€2.040,00
		Assistenza e collaborazione prove di campo	€3.000,00
		Censimento aziende agricole e raccolta dati agronomici	€1.000,00
		Censimento aziende agricole e raccolta dati agronomici	€1.000,00
		Censimento aziende agricole e raccolta dati agronomici	€1.000,00
		Collaborazione prove di campo 2018	1.000,00
		Collaborazione prove di campo 2019	1.000,00
		Collaborazione prove di campo 2019	2.000,00
		Collaborazione prove di campo 2019	1.000,00
		Collaborazione prove di campo	4.000,00
		Collaborazione prove di campo	4.000,00
		Attività di coordinamento ed esercizio della cooperazione e per la realizzazione del piano di divulgazione	20.460,01
		Attività di coordinamento ed esercizio della cooperazione e per la realizzazione del piano di divulgazione	20.460,00
		Diagnosi di nematodi e Fusarium in campioni di terreno agrario prelevato da coltivazioni di aglio.	€6.120,00
		Diagnosi di nematodi e Fusarium in campioni di terreno agrario prelevato da coltivazioni di aglio.	€6.120,00
		Diagnosi di nematodi e Fusarium in campioni di terreno agrario prelevato da coltivazioni di aglio.	€6.120,00

	Diagnosi di nematodi e Fusarium in campioni di terreno agrario prelevato da coltivazioni di aglio. Identificazione e analisi molecolari. Monitoraggio ambientale locali di lavorazione e stoccaggio	€6.120,00
	Diagnosi di nematodi e Fusarium in campioni di terreno agrario prelevato da coltivazioni di aglio. Identificazione e analisi molecolari. Monitoraggio ambientale locali di lavorazione e stoccaggio	€6.120,00
	Diagnosi di nematodi e Fusarium in campioni di terreno agrario prelevato da coltivazioni di aglio. Identificazione e analisi molecolari. Monitoraggio ambientale locali di lavorazione e stoccaggio	€6.120,00
	Diagnosi di nematodi e Fusarium in campioni di terreno agrario prelevato da coltivazioni di aglio. Identificazione e analisi molecolari. Monitoraggio ambientale locali di lavorazione e stoccaggio	€2.040,00
	Analisi fitosanitarie e allestimento prove	€6.120,00
	Analisi fitosanitarie e allestimento prove	€6.120,00
	Analisi fitosanitarie e allestimento prove	€6.120,00
	Analisi fitosanitarie e allestimento prove	€2.880,00
<b>Totale SALDO</b>		<b>121.960,01</b>

#### CONSULENZE - SOCIETÀ

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
<b>Totale:</b>				

### 3 - Criticità incontrate durante la realizzazione dell'attività

Lunghezza max 1 pagina

<b>Criticità tecnico-scientifiche</b>	Durante il progetto non si sono rilevate particolari criticità tecnico-scientifiche
---------------------------------------	---

<b>Criticità gestionali</b> (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Durante il progetto non si sono rilevate particolari criticità gestionali.
<b>Criticità finanziarie</b>	Non si sono rilevate particolari criticità finanziarie

#### **4 - Altre informazioni**

*Riportare in questa sezione eventuali altri contenuti tecnici non descritti nelle sezioni precedenti*

Per un maggiore dettaglio delle attività svolte si rimanda all'allegata relazione.



## 5 - Considerazioni finali

Riportare qui ogni considerazione che si ritiene utile inviare all'Amministrazione, inclusi suggerimenti sulle modalità per migliorare l'efficienza del processo di presentazione, valutazione e gestione di proposte da cofinanziare

## 6 - Relazione tecnica

DA COMPILARE SOLO IN CASO DI RELAZIONE FINALE

Descrivere le attività complessivamente effettuate, nonché i risultati innovativi e i prodotti che caratterizzano il Piano e le potenziali ricadute in ambito produttivo e territoriale

Per rinvio all'allegata relazione finale per maggiori ed esaustivi dettagli, di seguito si riportano i principali risultati ottenuti.

### IN CAMPO

Indagini sul terreno:

- Bassa carica di nematodi, ed assenza di *Ditylenchus dipsaci*
- La carica micotica varia negli anni, mentre quella di *Fusarium* rimane costante con valori pari a 103

Indagini condotte sulla coltura:

- La zona di abscissione è il punto preferenziale di penetrazione del fungo
- La gravità dei sintomi sulle corone aumenta durante la stagione colturale
- Nell'anno 1 *F. oxysporum* ha prevalso rispetto a *F. proliferatum*
- Le due specie assumono andamento contrapposto, all'aumentare dell'una diminuisce l'altra
- Stagioni piovose favoriscono *F. proliferatum*, stagioni siccitose *F. oxysporum*
- Durante la stagione colturale non si osserva accumulo di fumonisine nelle piante

Tecniche colturali:

- Aziende storicamente più colpite:
- Applicano una concimazione azotata più abbondante
- Hanno maggiore produzione unitaria

### IN POST- RACCOLTA

Sulle corone:

- L'incidenza di *F. oxysporum* aumenta dalla raccolta allo stoccaggio
- *F. proliferatum* rimane costante nel tempo dalla raccolta all'uscita dalla cella frigorifera

Sui bulbilli:

- *F. proliferatum* è correlato alla gravità dei sintomi sugli spicchi
- *F. proliferatum* è stato isolato sia negli spicchi sintomatici che in quelli asintomatici
- Lo stoccaggio in cella contiene il patogeno, ma una volta che il prodotto viene riportato a temperatura ambiente l'incidenza di *F. proliferatum* aumenta
- L'acqua libera (aw) diminuisce durante il periodo di essiccazione in campo e aumenta dall'ingresso in cella frigo
- Le fumonisine sono state rilevate al di sotto dei limiti di legge normati per il mais

Data 09/03/2020

IL LEGALE RAPPRESENTANTE



## **Linee guida per il contrasto della fusariosi su aglio bianco piacentino**

*Focus area 2A: "Migliorare le prestazioni economiche di tutte le aziende agricole e incoraggiare la ristrutturazione e l'ammodernamento delle aziende agricole, in particolare per aumentare la quota di mercato e l'orientamento al mercato nonché la diversificazione delle attività"*

### **Relazione**

**Novembre 2016-Gennaio 2020**

**Letizia Mondani, Giorgio Chiusa, Paola Battilani**

**DIPROVES-Università Cattolica del Sacro Cuore**

## Sommario

Riassunto .....	3
WP 1. CARATTERIZZAZIONE DELLE AZIENDE SOCIE DELLA COPERATIVA CO.P.A.P. E DELLE STRUTTURE DI STOCCAGGIO .....	5
WP 1.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE AZIENDE .....	5
Materiali e metodi .....	5
Risultati .....	6
WP 1.2. MONITORAGGIO AMBIENTI DESTINATI AL PRODOTTO IN POST RACCOLTA .....	17
Materiali e metodi .....	17
Risultati .....	21
WP 2. RUOLO DEI PARAMETRI AGRONOMICI E METEREologici .....	24
WP 2.1. VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DI MARCIUMI DA <i>FUSARIUM</i> .....	25
Materiali e metodi .....	25
Risultati delle analisi in pre-semina .....	28
Materiali e metodi delle analisi durante la stagione colturale.....	37
Risultati delle analisi durante la stagione colturale.....	39
Materiali metodi delle analisi post raccolta .....	44
Risultati delle analisi di post raccolta .....	45
WP 2.2 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI FUMONISINE .....	54
Materiali e metodi .....	54
Risultati .....	55
WP 3 INTERVENTI DI CONTROLLO E SANITAZIONE .....	58
WP 3.1 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI FUNGICIDI E DI ANTAGONISTI NATURALI .....	58
Materiali e Metodi .....	58
Risultati .....	64
LINEE GUIDE .....	76

## **Riassunto**

Nel periodo compreso tra l'inizio del progetto (Ottobre 2016) e Gennaio 2020 sono state eseguite tutte le attività previste nel progetto; pertanto, non deve essere segnalata alcuna variazione rispetto al programma previsto.

In particolare, UCSC ha svolto le attività afferenti al work package 1 (WP 1) di raccolta dei principali parametri per la caratterizzazione delle aziende socie della cooperativa e delle strutture della stessa.

Sono state inoltre svolte attività di monitoraggio in campo, dalla semina alla raccolta, e analisi delle partite destinate al consumo durante lo stoccaggio, come previsto nel WP 2.

Infine, sono state eseguite analisi invitro e in campo per valutare l'efficacia di composti chimici e biologici nel contenimento della malattia (WP 3).

A partire da Novembre 2016, la dott.ssa Letizia Mondani, con il coordinamento della Prof.essa Paola Battilani, ha collaborato al progetto in modo continuativo come assegnista di ricerca. Il dott. Giorgio Chiusa, invece ha collaborato in modo continuativo al progetto in qualità di consulente.

Le attività svolte sono sintetizzate nella tabella che segue.

		Anno 1				Anno 2				Anno 3				UNITA' COINVOLTE					
		3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36						
WP 1.	<b>CARATTERIZZAZIONE DELLE AZIENDE SOCIE DELLA COOPERATIVA CO.P.A.P.</b>																		
WP 1.1.	Identificazione delle aziende produttrici e caratterizzazione																	Copap	
WP 1.2.	Monitoraggio ambienti destinati al prodotto in post raccolta																	Unicatt	
WP 1.3.	Sintesi ed elaborazione dati raccolti																	Unicatt	
WP 1.4.	Relazione finale																	Unicatt	Copap Agrisilva
WP 2.	<b>VALUTAZIONE RUOLO PARAMETRI AGRONOMICI</b>																		
WP 2.1.	Incidenza di marciume da <i>Fusarium</i> in aglio destinato al consumo e alla moltiplicazione																	Unicatt	Copap
WP 2.2.	Ruolo delle condizioni agronomiche e scelta delle aziende da inserire nel progetto																	Unicatt	Copap
WP 2.3.	Analisi fitosanitarie dei terreni e dell'aglio in campo																	Unicatt	
WP 2.4.	Determinazione del contenuto di fumonisine																	Unicatt	
WP 2.5.	Valutazione/elaborazione dei risultati ottenuti																	Unicatt	
WP 2.6.	Relazione finale, definizione delle condizioni di rischio																	Unicatt	
WP 3.	<b>INTERVENTI PREVENTIVI E DI SANITIZZAZIONE</b>																		
WP 3.1.	Valutazione <i>in vitro</i> dell'efficacia di fungicidi e antagonisti naturali																	Unicatt	
WP 3.2.	Verifica dell'efficacia dei composti scelti in pre semina																	Unicatt	
WP 3.3.	Valutazione <i>in vitro</i> dell'efficacia di composti disinfettanti																		
WP 3.4.	Verifica dell'efficacia dei composti scelti negli ambienti																	Unicatt	
WP 3.5.	Relazione finale, definizione dei possibili mezzi preventivi/di sanitizzazione																	Unicatt	
WP 4.	<b>STESURA DI LINEE GUIDA NELLA PRODUZIONE</b>																		
WP 4.1.	Valutazione dei disciplinari e protocolli adottati da CO P A P																	Copap	
	Analisi dei dati raccolti nel progetto																	Unicatt	
	Definizione dei punti critici nella filiera (seme e consumo)																	Unicatt	
WP 4.2.	Definizione dei rischi igienico sanitari																	Unicatt	
WP 4.3.	Stesura di linee guida per la produzione aglio da seme e da consumo																	Unicatt	Copap
WP 5.	<b>ATTIVITA' DIVULGAZIONE E DISSEMINAZIONE</b>																		
WP 5.1.	Implementazione del sito web																	Copap	
WP 5.2.	Organizzazione di seminari																	Unicatt	Copap
WP 5.3.	Articoli su riviste tecniche specialistiche																	Unicatt	Copap Agrisilva Consulente
WP 6.	<b>ATTIVITA' DI FORMAZIONE</b>																		
WP 6.1.	Corso di formazione																	Unicatt	Irecoop Agrisilva Consulente
WP 6.2.	Coaching																	Consulente	
WP 7.	<b>ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE</b>																		
WP 7.1.	Riunioni del comitato di coordinamento																	Unicatt	Copap Agrisilva
WP 7.2.	Altre attività di coordinamento																		Agrisilva

## **WP 1. CARATTERIZZAZIONE DELLE AZIENDE SOCIE DELLA COPERATIVA CO.P.A.P. E DELLE STRUTTURE DI STOCCAGGIO**

### **Attività prevista nel progetto**

#### **WP 1.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE AZIENDE (DA ESEGUIRE DA PARTE DI COPAP)**

Tutte le aziende socie di COPAP saranno coinvolte nel progetto. Saranno raccolti dati generali per ciascuna azienda e informazioni relative agli aspetti culturali e produttivi. In particolare, si raccoglieranno i seguenti dati:

Dati generali:

- numero ed età dei componenti l'azienda;
- ubicazione geografica;
- superficie agricola utilizzata;
- indirizzo produttivo con specifico riferimento a specie appartenenti alla famiglia delle liliacee quali aglio, cipolla Borettana, cipolle bianche, gialle e rosse nonché scalogno giallo e rosso e loro superficie.

Dati culturali e produttivi:

- caratteristiche pedologiche dei terreni destinati alla coltivazione dell'aglio;
- avvicendamenti/rotazioni adottate;
- tecnica culturale (lavorazioni, epoca di semina, concimazioni, trattamenti fitosanitari (diserbanti, fungicidi, insetticidi/nematocidi);
- eventuali irrigazioni di soccorso;
- tipologia di seme impiegato;
- quantità e qualità dell'aglio conferito nell'ultimo quinquennio.

#### **WP 1.1 CARATTERIZZAZIONE DELLE AZIENDE**

##### **Materiali e metodi**

Nel primo anno di attività è stato creato un database per raccogliere i dati relativi alle aziende della cooperativa coinvolte nel progetto. In particolare sono stati raccolti dati relativi alla conduzione aziendale con riferimento a parametri culturali e produttivi quali:

- L'ubicazione geografica, la SAU, l'indirizzo produttivo e il numero di dipendenti;
- La tessitura del terreno e l'avvicendamento culturale;
- Il tipo di seme utilizzato, la data di semina le lavorazioni e le concimazioni apportate nella stagione culturale;
- La concia applicata al seme e i trattamenti fitosanitari eseguiti sulla coltura.

Il database costituito durante i tre anni del progetto verrà utilizzato al termine delle indagini per caratterizzare le aziende della cooperativa per il rischio di insorgenza del marciume secco.

Per le indagini riguardanti il progetto, sono state selezionate sei aziende tra quelle socie di COPAP sulla base della loro storia pregressa. Tre di esse negli anni avevano mostrato una forte incidenza del marciume secco, le altre tre, invece, non avevano riportato infezioni rilevanti negli scorsi anni.

## Risultati

### **Anno1**

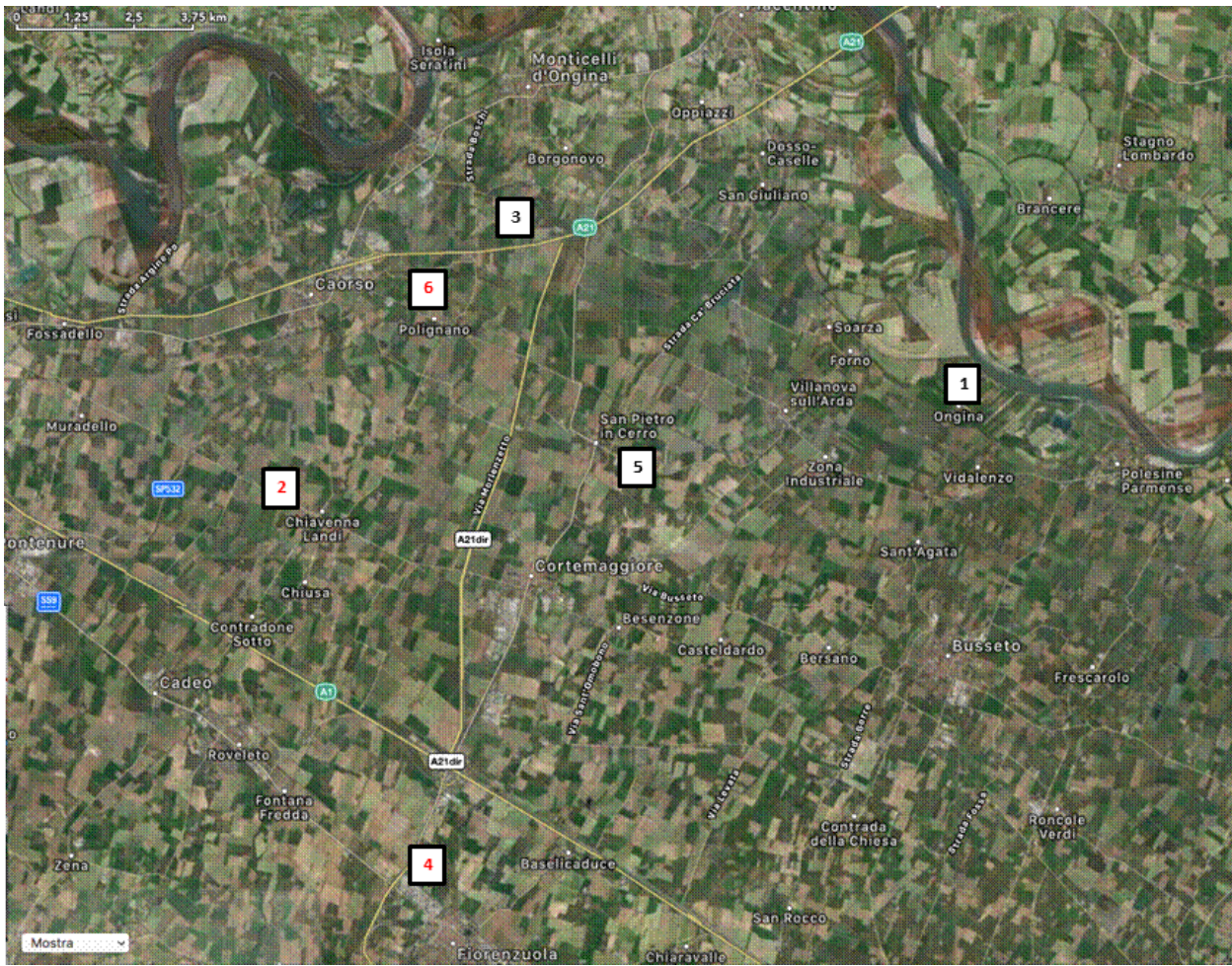
Le aziende oggetto dello studio sono ubicate nella zona di pianura del territorio della Provincia di Piacenza in un'area delimitata ad est dal torrente Arda e a nord dal fiume Po (Figura 1). La conduzione è familiare con uno o due titolari. Varia, invece, il numero di salariati impiegati durante il periodo della raccolta. In alcune realtà i salariati sono assunti direttamente dall'azienda mentre altre si appoggiano ad aziende conto terzi come la OM Service. Tutte le aziende hanno indirizzo erbaceo-orticolo, destinando parte della SAU alla produzione di aglio, cipolle e pomodoro da mensa, mentre la maggior parte della SAU è impiegata per la produzione di colture cerealicole, come mais e frumento, o industriali, come bietola e soia (Tabella 1).

Per quanto riguarda le rotazioni, nella stagione 2015-2016 in tutte le aziende in precessione all'aglio era stato seminato grano tenero. Normalmente, all'interno della rotazione quadriennale sono inserite cerealicole e colture industriali. Fanno eccezione l'azienda 1 con colture prative negli anni 2013-2014, l'azienda 5, che nel 2015 aveva seminato pomodoro da mensa e l'azienda 4 che aveva inserito la cipolla all'interno della rotazione quadriennale nell'anno 2015. Essendo la cipolla una specie appartenete alla stessa famiglia dell'aglio, questo fattore potrebbe essere importante al fine dello sviluppo della fusariosi (Tabella 2).

Prendendo in esame la tessitura del terreno le aziende possono essere classificate in tre categorie secondo il triangolo delle granulometrie USDA. Le aziende 2 e 3 presentano terreni argillosi con percentuali di argilla superiori al 50%, limo tra 30-40% e sabbia tra 0-10%. Le aziende 1 e 6, invece, mostrano tessitura argillosa-limosa, con percentuali di argilla intorno al 50%, sabbia e limo tra il 20-30%. Infine, Le aziende 4 e 5 presentano terreni con tessitura franco limosa argillosa, con percentuali di argilla intorno al 30%, limo superiore al 50% e argilla tra lo 0 e il 15% (Tabella 2).

In tutte le aziende oggetto dello studio il terreno è stato preparato attraverso l'esecuzione di un'aratura profonda, mentre il letto di semina è stato preparato con erpicatura e coltivatore. Le concimazioni sono state apportate in pre-semina e in copertura secondo i titoli previsti dal disciplinare regionale, soltanto l'azienda 1 ha apportato una concimazione organica. La semina è stata eseguita a partire dalla seconda decade di ottobre utilizzando la varietà Ottolini con una densità di semina di 270000 bulbilli ettaro, solo l'azienda 6 ha destinato parte della SAU alla semina della varietà Serena. Essendo un'annata piuttosto secca in tutte le aziende sono stati eseguiti almeno 3 interventi irrigui, secondo quando riportato in Tabella 3.

I trattamenti fitosanitari sono stati eseguiti secondo quanto previsto dai disciplinari di produzione integrata della regione Emilia Romagna e sono riportati in Tabella 4. I trattamenti fungicidi sono stati eseguiti con principi attivi appartenenti alla famiglia dei triazoli, delle strobilurine e dei carbammati, allo scopo di difendere la coltura da Peronospora e Ruggine. Solo le aziende 2 e 6 hanno eseguito un trattamento insetticida con Etofenprox contro la mosca dell'aglio nel mese di Febbraio.



**Figura 1** Dislocazione delle aziende scelte: 1=Melodi; 2=Merli; 3=Opizzi; 4=Pezza; 5=Rastelli; 6=Zaninoni. In rosso le aziende più colpite negli anni passati. Scala visibile in alto a sinistra.

**Tabella 1** Ubicazione geografica, SAU, indirizzo produttivo e numero di dipendenti

AZIENDE	n ° COMPONENTI		UBICAZIONE CAMPI		SAU (ha)		INDIRIZZO PRODUTTIVO
	TITOLARI	SALARIATI	Comune e Località	Coordinate Geografiche	Aglione	Aziendale	
1	1	12	Villanova sull'Arda	45°01'17.8"N 10°02'28.8"E	1,39	34	ERBACEO- ORTICOLE
2	2	0*	Cortemaggiore -Il segno	45°01'17.2"N 9°51'37.0"E	1,63	31	ERBACEO- ORTICOLE
3	1	0*	Monticelli d'Ongina- loc. Busacca	45°03'57.0"N 9°56'09.8"E	1,17	13	ERBACEO- ORTICOLE
4	1	5	Fiorenzuola d'Arda- pod. Calcinaro Paullo	44°56'19.1"N 9°54'16.1"E	3,40	77	ERBACEO- ORTICOLE
5	1	12	San Pietro in Cerro	45°00'23.4"N 9°56'51.2"E	2,42	43	ERBACEO- ORTICOLE
6	1	1*	San Pietro in Cerro- Polignano	45°02'45.0"N 9°54'29.0"E	2,75	52,5	ERBACEO- ORTICOLE

\*Aziende che si appoggiano alla ditta OM Service per la raccolta.

**Tabella 2** Tessitura del terreno e l'avvicendamento culturale delle sei aziende selezionate

AZIENDE	ROTAZIONI					TESSITURA*
	2017	2016	2015	2014	2013	
1	Aglione	Grano T.	Grano T.	Erba Medica	Erba Medica	AL
2	Aglione	Grano T.	Grano T.	Grano T.	Mais	S:4,3% L:39,4% A:56,3%
3	Aglione	Grano T.	Mais	Grano T.	Soia	A
4	Aglione	Grano T.	Cipolla	Grano T.	Mais	S:12,9% L:55,5% A:32,6%
5	Aglione	Grano T.	Pomodoro	Mais	Bietola	S:5,4% L:63% A:31,6%
6	Aglione	Grano T.	Mais	Grano T.	Mais	S:31,5% L:18,8 % A:49,7%

\*AL= Argilloso-Limoso; A= Argilla; L=Limo; S=Sabbia



**Tabella 3** Tecniche colturali adottate.

AZIENDE	LAVORAZIONI		SEMINA	IRRIGAZIONI
	<i>Profonde</i>	<i>Superficiali</i>		
1	Aratura	Erpicoltura	20/10/16	3
2	Aratura	Erpicoltura-Coltivatore	10/10/16	3
3	Aratura	Erpicoltura	09/10/16	4
4	Aratura	Erpicoltura-Coltivatore	26/10/16	3
5	Ripuntatura	Erpicoltura-Coltivatore	12/10/16	3
6	Aratura	Erpicoltura-Coltivatore	10/10/16	3

**Tabella 4** Trattamenti fitosanitari eseguiti

AZIENDE	DISERBO	FUNGICIDI	INSETTICIDI
1	Pendimentalin-Stomp Aqua 4 L		
2	Pre Emergenza: Activus Ec 4,25 L Pendimentalin-06/04 e 20/04 Brtomoxynil 0,3 Kg/ha 06/04 Propaquizafop 1,15 L/ha	Tebuconazolo 1 Intervento 0,5 L/ha (Ruggine)	Febbraio Etofenprox 0,3 L/ha (Mosca Dell'aglio)
3	Pre Emergenza: Pendimentalin Activus Ec 5,2 L-18/03 Pendimentalin 2,3 L- 25/03 Propaquizafop 1,5 L-08/04 Piridate 3 L- 16/05 Quizalofop-P-Etile 3 L- 31/05 Propaquizafop 1,5 L	11/05 e 25/05 Azoxystrobin 1,5 L Per Volta (Ruggine)	
4	Pre Emergenza: Pendimentalin- Activus Ec 10 L	Tebuconazolo 3 Interventi 0,5 L/ha Cad. (Ruggine)+ Dimetomorph e Piraclostrobin 2,5 L/ha (Peronospora)	
5	Pre Emergenza: Stomp Aqua 5,2 L Pendimentalin		
6	Pre Emergenza: Stomp Aqua 7,56 L Pendimentalin-Primavera: 2 X Bromoxinil 0,5 Kg/ha	Tebuconazolo 3 Interventi 0,5 L/ha Cad. (Ruggine) + Dimetomorph e Piraclostrobin 2,5 L/ha (Peronospora)	Fine febbraio-Etofenprox 0,3 L/ha (Mosca Dell'aglio)

## **Anno 2**

Le aziende coinvolte nello studio sono le medesime dell'anno precedente ma, essendo la coltura dell'aglio inserita in una rotazione quadriennale o quinquennale, l'ubicazione degli appezzamenti all'interno dell'azienda varia a seconda della stagione. I dati relativi alla conduzione delle aziende e al numero di salariati sono invariati rispetto all'anno precedente. Tutte le aziende hanno indirizzo erbaceo-orticolo, destinando parte della SAU alla produzione di aglio, cipolle e pomodoro da mensa, mentre la maggior parte della SAU è impiegata per la produzione di colture cerealicole, come mais e frumento, o industriali, come bietola e soia (Tabella 5).

Per quanto riguarda le rotazioni nella stagione 2016-2017 in tutte le aziende in precessione all'aglio era stato seminato grano tenero ad eccezione dell'azienda 6 che aveva seminato fagiolo. Normalmente, all'interno della rotazione quadriennale erano inserite cerealicole e colture industriali. Fanno eccezione L'azienda 4 e 5, che nel 2016 avevano rispettivamente seminato cipolla e pomodoro da mensa. Essendo la cipolla una specie appartenete alla stessa famiglia dell'aglio, questo fattore va tenuto in considerazione al fine dello sviluppo della fusariosi (Tabella 6).

Prendendo in esame la tessitura del terreno degli appezzamenti 2017-2018 le aziende possono essere classificate in tre categorie secondo il triangolo delle granulometrie USDA. Le aziende 2 e 5 presentano terreni argillosi con percentuali di argilla intorno al 50%, limo tra 30-40% e sabbia tra 0-10%. Le aziende 3 e 4, invece, mostrano tessitura argillosa-limosa, con percentuali di argilla tra 30-50% e limo tra il 30-50%. Infine, le aziende 1 e 6 presentano terreni con tessitura franco-limosa-argillosa, con percentuali di argilla intorno al 30%, limo superiore al 50% e sabbia tra lo 0 e il 30% (Tabella 6).

In tutte le aziende oggetto dello studio il terreno è stato preparato attraverso l'esecuzione di un'aratura profonda o di una ripuntatura, mentre il letto di semina è stato preparato con un intervento di erpicatura. Inoltre, nel mese di aprile sono stati eseguiti interventi di estirpatura e sarchiatura contro le malerbe. Le concimazioni sono state apportate in pre-semina e in copertura secondo i titoli indicati nel disciplinare di produzione integrata, le aziende 1 e 5 hanno apportato una concimazione organica. A differenza dell'anno precedente, non sono state eseguite irrigazioni, ad eccezione dell'azienda 6 che ha irrigato prima della semina. La semina è stata eseguita a partire dal mese di ottobre utilizzando la varietà Ottolini con una densità di semina di 270000 bulbilli ettaro; come l'anno precedente, solo l'azienda 6 ha destinato parte della SAU alla semina della varietà Serena.

I trattamenti fitosanitari sono stati eseguiti secondo quanto previsto dai disciplinari di produzione integrata della regione Emilia Romagna e son riportati in Tabella 8. I trattamenti fungicidi sono stati eseguiti con principi attivi appartenenti alla famiglia dei triazoli, delle strobilurine e dei carbammati, allo scopo di difendere la coltura da Peronospora e Ruggine. Come nell'anno precedente solo le aziende 2 e 6 hanno eseguito un trattamento insetticida con Etofenprox contro la mosca dell'aglio.

**Tabella 5** Ubicazione geografica, SAU, indirizzo produttivo e numero di dipendenti del secondo anno

AZIENDA	n ° COMPONENTI		UBICAZIONE CAMPI		SAU (ha)		INDIRIZZO PRODUTTIVO
	TITOLARI	SALARIATI	Comune e Località	Coordinate Geografiche	Aglio	Aziendale	
1 MELODI GIOVANNI	1	12	Villanova sull'Arda	45°00'06.3"N 10°02'57.4"E	3,81	75	ERBACEO- ORTICOLE
2 MERLI LUIGI E CATTIVELLI M.C.	2	0*	Cortemaggiore- Il segno	45°01'17.2"N 9°51'37.0"E	2,35	31	ERBACEO- ORTICOLE
3 OPIZZI ALBA	1	0*	Monticelli d'Ongina- loc. Busacca	45°04'03.3"N 9°56'24.4"E	1,00	13	ERBACEO- ORTICOLE
4 PEZZA DAVIDE	1	5	Fiorenzuola d'Arda- pod. Calcinaro Paullo	44°56'19.1"N 9°54'16.1"E	2,69	77	ERBACEO- ORTICOLE
5 RASTELLI FRANCESCO	1	12	San Pietro in Cerro	45°00'59.4"N 9°56'56.0"E	2,43	43	ERBACEO- ORTICOLE
6 ZANINONI ALESSANDRO	1	1*	San Pietro in Cerro- Polignano	45°02'03.6"N 9°53'05.9"E	3,85	52,5	ERBACEO- ORTICOLE

\*aziende che si appoggiano alla ditta OM Service per la raccolta.

**Tabella 6** Tessitura del terreno e l'avvicendamento culturale delle sei aziende selezionate nel secondo anno

AZIENDE	ROTAZIONI					TESSITURA*
	2018	2017	2016	2015	2014	
1 Aglio	Grano t.	Barba-bietole	Mais	Grano t.	FLA S:28% L:48% A:24%	
2 Aglio	Grano t.	Mais	Grano t.	Cipolle bianche e gialle	A S:3,6% L:51,1% A:45,3%	
3 Aglio	Grano t.	Mais	Grano t.	Aglio	AL S: 3,1 % L:51,2% A:45,7%	
4 Aglio	Grano t.	Cipolle bianche rosse- gialle	Grano t.	Mais	AL S:26% L:42 % A:32%	
5 Aglio	Grano t.	Pomodoro	Soia	Aglio	A S:4,3% L:39,4% A:56,3%	
6 Aglio	Fagiolo	Mais	Grano t.	Mais	FLA S:5,4% L:63% A:31,6%	

\*FLA= Franco Limoso Argilloso; AL= Argilloso-Limoso; A= Argilla; L=Limo; S=Sabbia

**Tabella 7** Tecniche colturali adottate nel secondo anno

AZIENDE	LAVORAZIONI		SEMINA	IRRIGAZIONI
	<i>Profonde</i>	<i>Superficiali</i>		
1	Aratura	Fresatura Erpicatura	26/10/17	
2	Aratura	Erpicatura Sarchiatura	20/10/17	
3	Aratura	Estirpatura Erpicatura Sarchiatura	07/10/17	
4	Aratura	Erpicatura- sarchiatura	08/10/17	
5	Ripuntatura	Erpicatura-Estirpatura-Sarchiatura	10/10/17	
6	Aratura	Erpicatura Sarchiatura	15/10/17	1

**Tabella 8** Trattamenti fitosanitari eseguiti nel secondo anno

AZIENDE	DISERBO	FUNGICIDI	INSETTICIDI
1	Post Emergenza: STOMP AQUA 2 kg	Tebuconazolo	
2	Pre Emergenza: Pendimentalin ACTIVUS EC 6 L Post Emergenza: AGIL 0,5 L	27/05 Tebuconazolo 0,5 L/Ha 03/06 Tebuconazolo 0,5 L/Ha 10/06 Tebuconazolo 0,5 L/Ha	TREBON UP 0,3 L/Ha
3	Pre Emergenza: Pendimentalin ACTIVUS EC 4 L + TAIFUN MK CL 3 L Post Emergenza: Pendimentalin ACTIVUS EC 1,5 L SHOGUN 1/L	12/05: Azoxystrobin 1L/Ha 27/05: Azoxystrobin 1L/Ha	
4	Pre Emergenza: Pendimentalin- ACTIVUS EC 10 LT	19/05 Tebuconazolo 0,58/Ha 1/06 Tebuconazolo 0,58/Ha	
5	Pre Emergenza: ACTIVUS EC 6,8 L Pendimentalin Post Emergenza: AGIL 1,3 L	16/05 Tebuconazolo 0,5L/Ha 26/05 Tebuconazolo 0,5 L/Ha 07/06 Tebuconazolo 0,58l/Ha	
6	Pre Emergenza: STOMP AQUA 7,56 L Pendimentalin Post Emergenza: RAPSAN 5 L METAZACLOR	7/5 Tebuconazolo 1,85 L 15/05 Tebuconazolo 1,85 L 25/05 Dimetomorf+ Pyraclostrobin 7 L TOT 1/06 Tebuconazolo 1,85 L TOT 09/06 Boscalid+Pyraclostrobin 4 L Tot	31/03 TREBON UP 1 LT

### **Anno 3**

Le aziende coinvolte nello studio sono le medesime degli anni precedenti. La coltura dell'aglio è normalmente inserita in una rotazione quadriennale o quinquennale quindi l'ubicazione degli appezzamenti all'interno dell'azienda varia a seconda della stagione. I dati relativi alla conduzione delle aziende e al numero di salariati sono invariati rispetto all'anno precedente. Tutte le aziende hanno indirizzo erbaceo-orticolo, destinando parte della SAU alla produzione di aglio, cipolle e pomodoro da mensa, mentre la maggior parte della SAU è impiegata per la produzione di colture cerealicole, come mais e frumento, o industriali, come bietola e soia (Tabella 9).

Per quanto riguarda le rotazioni nella stagione 2017-2018 in tutte le aziende in precessione all'aglio era stato seminato grano tenero ad eccezione dell'azienda 6 che aveva seminato mais. Di norma all'interno della rotazione quadriennale sono inserite colture cerealicole e industriali. Fanno eccezione L'azienda 4 e 5, che nel 2017 avevano rispettivamente seminato cipolla e pomodoro da mensa. Essendo la cipolla una specie appartenete alla stessa famiglia dell'aglio, questo fattore va tenuto in considerazione al fine dello sviluppo della fusariosi (Tabella 10).

Prendendo in esame la tessitura del terreno degli appezzamenti 2018-2019 le aziende possono essere classificate in tre categorie secondo il triangolo delle granulometrie USDA. Le aziende 1 e 2 presentano terreni argillosi con percentuali di argilla intorno al 50%, limo tra 30-40% e sabbia tra 0-10%. Le aziende 3 e 6, invece, mostrano tessitura argillosa-limosa, con percentuali di argilla tra 30-50% e limo tra il 30-50%. Infine, le aziende 4 e 6 presentano terreni con tessitura franco-limosa-argillosa, con percentuali di argilla intorno al 30%, limo superiore al 50% e sabbia tra lo 0 e il 30% (Tabella 10).

In tutte le aziende oggetto dello studio il terreno è stato preparato attraverso l'esecuzione di un'aratura profonda o di una ripuntatura, mentre il letto di semina è stato preparato con un intervento di erpicatura. Inoltre, nel mese di aprile sono stati eseguiti interventi di estirpatura e sarchiatura contro le malerbe. Le concimazioni sono state apportate in pre-trapianto e in primavera secondo i titoli previsti dal disciplinare, soltanto l'azienda 1 ha apportato una concimazione organica. Tutte le aziende hanno eseguito almeno un intervento irriguo a metà giugno (

Tabella 11). La semina è stata eseguita a partire dal mese di ottobre utilizzando la varietà Ottolini con una densità di semina di 270000 bulbilli ettaro; come negli anni precedenti, solo L'AZIENDA 6 ha destinato parte della SAU alla semina della varietà Serena.

I trattamenti fitosanitari sono stati eseguiti secondo quanto previsto dai disciplinari di produzione integrata della regione Emilia Romagna e son riportati in Tabella 12. I trattamenti fungicidi sono stati eseguiti con principi attivi appartenenti alla famiglia dei triazoli e delle strobilurine, allo scopo di difendere la coltura da Peronospora e Ruggine. Nessuna azienda nel terzo anno ha eseguito trattamenti insetticidi.

**Tabella 9** Ubicazione geografica, SAU, indirizzo produttivo e numero di dipendenti del terzo anno

AZIENDE	n ° COMPONENTI		UBICAZIONE CAMPI		SAU (ha)		INDIRIZZO PRODUTTIVO
	TITOLARI	SALARIATI	Comune e Località	Coordinate Geografiche	Aglio	Aziendale	
1	1	12	Villanova sull'Arda	45°00'11.2"N 10°03'05.2"E	1,77	75	ERBACEO- ORTICOLE
2	2	0*	Cortemaggiore-II segno	45°01'23.9"N 9°53'18.1"E	2,29	31	ERBACEO- ORTICOLE
3	1	0	Monticelli d'Ongina- loc. Busacca	45°04'04.0"N 9°56'21.5"E	1,00	13	ERBACEO- ORTICOLE
4	1	5	Fiorenzuola d'Arda- pod. Calcinaro Paullo	44°56'30.6"N 9°54'22.4"E	2,29	77	ERBACEO- ORTICOLE
5	1	12	San Pietro in Cerro	45°00'24.7"N 9°56'44.9"E	2,55	43	ERBACEO- ORTICOLE
6	1	1*	San Pietro in Cerro-Polignano	45°02'49.2"N 9°54'26.5"E	3,80	52,5	ERBACEO- ORTICOLE

\*aziende che si appoggiano alla ditta OM Service per la raccolta.

**Tabella 10** Tessitura del terreno e l'avvicendamento culturale delle sei aziende selezionate nel terzo anno

AZIENDE	ROTAZIONI					TESSITURA*
	2019	2018	2017	2016	2015	
1	Aglio	Grano t.	Mais	Grano t.	Erba medica	A S:3,6% L:51,1% A:45,3%
2	Aglio	Grano t.	Mais	Grano t.	Mais	A S:4,3% L:39,4% A:56,3%
3	Aglio	Grano t.	Soia	Grano t.	Aglio	AL S: 3,1 % L:51,2% A:45,7%
4	Aglio	Grano t.	Cipolle rosse	Grano t.	Mais	FLA S:28% L:48% A:24%
5	Aglio	Grano t.	Pomodoro	Grano t.	Barbabietole	FLA S:5,4% L:63% A:31,6%
6	Aglio	Mais	Grano t.	Erba medica	Erba medica	AL S:26% L:42 % A:32%

\*FLA= Franco Limoso Argilloso; AL= Argilloso-Limoso; A= Argilla; L=Limo; S=Sabbia

**Tabella 11** Tecniche colturali adottate nel terzo anno

AZIENDE	LAVORAZIONI		SEMINA	IRRIGAZIONI
	<i>Profonde</i>	<i>Superficiali</i>		
1	Aratura	Fresatura Erpicatura	20/10/18	1
2	Aratura	Erpicatura-coltivatore	25/10/18	2
3	Aratura	Estirpatura Erpicatura Sarchiatura in aprile	13/10/18	1
4	Aratura	Erpicatura	18/10/18	1
5	Aratura	Erpicatura-Estirpatura- Sarchiatura in aprile	15/10/18	1
6	Aratura	Erpicatura 2 giri-coltivatore	20/10/18	1

**Tabella 12** Trattamenti fitosanitari eseguiti nel terzo anno

AZIENDE	DISERBO	FUNGICIDI	INSETTICIDI
1	Pre emergenza: STOMP AQUA Pendimentalin 10 L	20/05 e 05/06 Tebuconazolo	
2	Pre emergenza: ACTIVUS EC Pendimentalin 4 L	20/05 e 05/06 Tebuconazolo 1,5 l	
3	Pre emergenza: Glifosate TAIFUN MK 3 LT+ Pendimentalin ACTIVUS EC 3 L	08/05-20/05: Azoxystrobin 1 l/ha	
4	Pre emergenza: Pendimentalin-ACTIVUS EC 10 L	15/05-30/05-10/06 Tebuconazolo 1,7 l	
5	Pre emergenza: STOMP AQUA 7 L-Pendimentalin	20/05 e 03/06 Tebuconazolo 0,6/ha	
6	Pre emergenza: MOST MICRO Pendimentalin 6 L	15/05 e 05/06 Tebuconazolo 2,5 l	

## Attività prevista nel progetto

### WP 1.2. MONITORAGGIO AMBIENTI DESTINATI AL PRODOTTO IN POST RACCOLTA

Il prodotto nella fase di post-raccolta presso le aziende agricole e presso i locali della Cooperativa, verrà monitorato descrivendo le modalità di conservazione, con particolare attenzione a: i) imballaggi, ii) tempi medi di giacenza e iii) principali parametri ambientali.

Inoltre, verranno valutati i locali di: i) ricezione del prodotto, ii) prima lavorazione, iii) conservazione (celle frigorifere e altri locali) iv) confezionamento e v) spedizione.

In particolare, questi ambienti verranno assoggettati a monitoraggio microbiologico condotto sulle superfici (pareti, pavimenti e macchine impiegate per la lavorazione del prodotto) e in atmosfera.

L'obiettivo primario dei monitoraggi sarà la rilevazione della presenza di *Fusarium* spp., con particolare attenzione per le specie di rilievo per il marciume dell'aglio. Inoltre, verranno evidenziate le specie fungine



*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. ed altre) che in genere non causano problemi fitosanitari ricorrenti all'aglio, ma possono risultare dannose per la salute degli operatori, per contatto e per inalazione, quali agenti di allergie e di infezioni polmonari soprattutto oltre certi valori di concentrazione.

**Anno 1.** L'obiettivo del primo anno è quello di definire la condizione micologica di partenza. Allo scopo verranno impiegati tamponi adesivi per le superfici e campionatori volumetrici per l'atmosfera. Gli esiti dei monitoraggi verranno espressi come unità formanti colonia su grammo, su centimetro quadrato o su metro cubo di aria aspirata.

**Anno 2.** Nel secondo anno del progetto si eseguiranno monitoraggi secondo quanto eseguito nel primo anno al fine di valutare la carica micotica in seguito all'attuazione di alcune misure di controllo descritte in seguito (ad esempio, trattamenti di pulizia e sanitizzazione degli ambienti e del prodotto).

Anno 3. Nel terzo anno del progetto si ripeteranno i monitoraggi con le modalità e le finalità precedentemente descritte.

### **WP 1.3. Sintesi ed elaborazione dei dati raccolti e stesura della relazione finale.**

#### **Anno 1.**

Al termine del primo anno di monitoraggio, tutti i dati raccolti verranno organizzati in un data base opportunamente predisposto. I dati raccolti verranno elaborati con idonee tecniche statistiche al fine di evidenziare gli aspetti comuni e differenti tra le aziende, evidenziando i punti critici. I risultati verranno sintetizzati in un documento da condividere e discutere con tutte le aziende coinvolte al fine di porre le basi per il miglioramento della gestione della filiera.

#### **Anno 2.**

Nel secondo anno del progetto si proseguirà con il salvataggio e l'elaborazione dei dati come per il primo anno. Inoltre, si provvederà all'aggiornamento del documento di sintesi.

#### **Anno 3.**

Nel terzo anno del progetto si proseguirà con il salvataggio e l'elaborazione dei dati come per gli anni precedenti. Al termine del progetto si provvederà alla stesura della relazione finale dalla quale emergerà: i) la situazione microbiologica dei vari ambienti e delle diverse aziende coinvolte, ii) l'evoluzione osservata negli anni, iii) la definizione dei punti critici e iv) i suggerimenti per il miglioramento della gestione della filiera. Queste informazioni saranno supporto cruciale per il **WP4, Stesura delle linee guida**.

## **WP 1.2. MONITORAGGIO AMBIENTI DESTINATI AL PRODOTTO IN POST RACCOLTA**

### **Materiali e metodi**

#### **Anno 1**

#### **Descrizione del prodotto in entrata**

Il prodotto viene conferito alla cooperativa dopo una prima fase di essiccazione in campo (circa una settimana) ed una seconda di essiccazione in azienda in cassoni di rete metallica o di legno (circa un mese). Al conferimento, le piante si presentano intere, dotate di apparato fogliare e radicale e non viene eseguita nessuna pulizia al ricevimento. I cassoni sono momentaneamente depositati sul piazzale della cooperativa (massimo qualche ora) fino all'ingresso del prodotto in cella frigorifera a 5°C. Nell'arco delle due settimane successive, la temperatura viene progressivamente abbassata fino a raggiungere i -4°C. A questo punto l'aglio rimane stoccato e sarà progressivamente lavorato e commercializzato secondo le logiche e le necessità della cooperativa.

## Monitoraggio ambientale

Per quanto riguarda il monitoraggio microbiologico degli ambienti della cooperativa, alla data di avvio del progetto i magazzini erano pieni. Pertanto, per monitorare la situazione di celle vuote è stato necessario attendere l'uscita dell'aglio stoccato. Sono stati eseguiti i campionamenti volumetrici dell'aria e delle superfici mediante tamponi adesivi, per stabilire la condizione micologica di partenza. Gli ambienti che sono stati presi in considerazione per il campionamento volumetrico e delle superfici sono quelli ascrivibili alla linea del fresco: ricevimento, celle frigorifere, pelatura, taglio, confezionamento e spedizione. Di seguito si riporta la metodologia seguita.

### **a) Campionamento volumetrico**

Il campionamento volumetrico era volto all'indagine dei generi fungini presenti nei locali di magazzino, per determinarne la situazione micologica di partenza e il grado di contaminazione ambientale. Gli esiti del monitoraggio sono stati espressi in unità formanti colonia su metro cubo di aria aspirata (UFC/m<sup>3</sup>). Per ciascun ambiente campionato sono state eseguite 5 repliche. Il volume aspirato per ogni campionamento è stato di 30 L/min e il campionamento è durato 1 minuto. I dati ottenuti sono poi stati convertiti in m<sup>3</sup> di aria aspirata. Per eseguire la conta delle unità formanti colonia e consentire l'identificazione delle principali specie si è utilizzato come substrato il Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) (ISO 21527-1), Oxoid Limited (UK).

### **b) Campionamento delle superfici**

Il campionamento delle superfici sono stati impiegati tamponi adesivi con un'area di 3,24 cm<sup>2</sup>. Per ogni superficie campionata sono state eseguite 3 repliche biologiche ed il metodo di analisi applicato è stato quello delle diluizioni seriali (*spread plate*). I tamponi adesivi, una volta eseguito il campionamento, sono stati posti in provette da 10 ml con il tappo a clip e sono stati stoccati in frigorifero a 4°C fino alla successiva lavorazione. Alle provette contenenti i tamponi sono stati poi aggiunti 2 ml di acqua peptonata 0,1%. I campioni così ottenuti sono stati posti in agitazione per 30 minuti e a partire da questi sono state eseguite diluizioni seriali fino a 10<sup>-5</sup>. Le diluizioni da 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup> sono state utilizzate per la posa in piastra. Il substrato utilizzato è stato Potato Dextrose Agar (PDA) ottenuto da brodo di patata (200g patate/L di acqua) agarizzato con 15g/L di agar, con aggiunta di 10g/L di destrosio, ammendato con Streptomina (250 ppm) e Dichloran (50 ppm). Cento µl di ciascuna diluizione sono stati utilizzati per l'inoculo delle piastre, in triplicato. Le piastre inoculate sono state incubate a 25°C per 5-7 giorni al termine dei quali è stata eseguita la conta delle colonie sviluppatesi. Il risultato dell'analisi è stato espresso come Unità Formanti Colonia su centimetro quadrato di superficie monitorata (UFC/cm<sup>2</sup>), quindi tenendo conto della superficie del tampone utilizzato.

Gli ambienti campionati e le superfici prese in considerazione sono elencati di seguito:

- Ricevimento: pavimento, pareti, cassoni, residui.
- Cella 1 (materiale semilavorato): pavimenti, pareti, cassoni, residui.
- Cella 2 (materiale grezzo): pavimenti, pareti, cassoni, residui.
- Pelatura: pavimenti, pareti, macchina.
- Taglio: residui.
- Confezionamento: macchina.
- Spedizione: pavimenti, pareti.

Dopo il conteggio si è provveduto all'identificazione dei principali generi isolati.

## Identificazione delle specie di *Fusarium* isolate

Per le colonie appartenenti al genere *Fusarium*, al fine di identificarne la specie, si è provveduto ad ottenere colture pure eseguite secondo la tecnica elaborata da Hansen e Smith (1932), che consiste nella semina monoconidica di una sospensione di conidi (10 µl) opportunamente diluita in una soluzione composta da 1 ml di acqua+TWEEN 20. La semina è stata eseguita su substrato Water Agar (WA), ottenuto da 1 L di acqua agarizzato con 20 g/L di agar. Trascorse 18-24 ore, i conidi germinati sono stati trasferiti su PDA e lasciati crescere per 7 giorni a 25°C. L'operazione è stata ripetuta 3 volte per assicurarsi che le colonie ottenute fossero in purezza. Successivamente, è stato eseguito il riconoscimento delle specie del genere *Fusarium* con microscopio ottico (Nikon, Eclipse 50 i, Japan) a ingrandimento 500 x secondo le indicazioni di Leslie e Summerell (2006).

Su 18 isolati distribuiti nei diversi gruppi identificati al microscopio ottico sono state eseguite le analisi molecolari a conferma dei risultati ottenuti con l'identificazione morfologica.

Per l'identificazione di *F.oxysporum* si è proceduto utilizzando per la reazione di PCR qualitativa il primer Gycf1 (5'-CTCCGGATTTCTGGAGACTTG-3')/Gycr4c (5'- ACTATCGTGTGCCGGGTTGGC-3') con amplicone di 2270 bp. (Mbfung e Pryor, 2010)

La preparazione della mix di PCR per un volume di 50 µl totali ha seguito il seguente protocollo:

Primer F [10 pmol].....0,3 µl  
Primer R [10 pmol].....0,3 µl  
Buffer 10x .....5 µl  
dNTPs [10 mM].....0,2 µl  
Dream taq.....0,4 µl  
DNA .....3 µl  
Acqua fino a volume

La reazione di PCR, invece, è stata eseguita con i seguenti parametri.

- 94°C 3 min
  - 94°C 30 sec
  - 65°C 2 min 24 sec
  - 72°C 1 min
  - 72°C 10 min
- | 30 cicli

La corsa elettroforetica è stata eseguita su gel di agarosio all' 1% utilizzando il Ladder Gene Ruler 1kb DNA Ladder (#SM0313 Thermo Scientific).

Per la conferma della specie *Fusarium proliferatum*, invece, si è utilizzato il primer F.pro 220 F (5'-CTTCGATCGCGCTCCT-3')/ F.pro 290 R (5'-CACGTTTTCGAATCGCAAGTG-3') in una reazione di PCR Real-Time. (Nicolaisen et al., 2009)

La preparazione della mix di PCR per un volume di 20 µl totali ha seguito il protocollo:

Primer F [10 pmol].....0,4 µl  
Primer R [10 pmol].....0,4 µl  
Kapa 2x .....10 µl  
DNA .....2 µl  
Acqua fino a volume

La reazione di PCR, invece, è stata eseguita con i seguenti parametri in Real-Time.

- 95°C 3 min

- 95°C 3 sec
  - 60°C 30 sec
  - Timer salita 60°C (1 min)  $\xrightarrow{+0,3^\circ\text{C}}$  95°C (16 sec)
- | 40 cicli

## **Anno 2**

Nel secondo anno di attività è stato chiesto alla cooperativa di descrivere gli interventi di pulizia che vengono eseguiti all'interno delle strutture di magazzino.

Si sono evidenziati due punti ritenuti critici dove vengono eseguiti interventi di pulizia saltuari o non vengono eseguiti interventi di pulizia: la spicchiatrice, la macchina di calibrazione dei bulbi e i cassoni in plastica utilizzati per lo stoccaggio del prodotto calibrato. Il disinfettante per alimenti D50 a base di acido perossiacetico e acqua ossigenata (CID Lines, Waterpoortstraat 2, 8900 Ieper) è stato utilizzato a concentrazione 0,3% per pulire le superfici di interesse.

Per monitorare l'efficacia del prodotto di pulizia sono stati eseguiti campionamenti con tamponi adesivi di area pari a 3,24 cm<sup>2</sup> sulla macchina di calibrazione dei bulbi e sui cassoni di plastica utilizzati per lo stoccaggio del prodotto in cella.

Le superfici sono state monitorate in triplo in 3 tempi: prima dell'intervento di pulizia, dopo 20 minuti dall'intervento di pulizia e 18 ore dopo l'intervento di pulizia. I tamponi adesivi sono stati posti in provette da 10 ml con tappo a clip. La conta delle UFC è stata eseguita secondo il metodo delle diluizioni seriali (spread plate) aggiungendo alle provette contenenti i tamponi 2 ml di acqua peptonata 0,1%. I campioni così preparati sono stati posti in agitazione per 30 minuti. Come substrato di isolamento è stato impiegato PDA ammendato con Streptomina (250ppm) e Dichloran (50ppm). Per ogni tampone sono state eseguite 3 repliche tecniche nelle diluizioni -2, -3, -4, -5.

Le piastre inoculate sono state incubate a 25°C per 5-7 giorni al termine dei quali è stata eseguita la conta delle colonie sviluppatesi. Dai tamponi sono state calcolate le UFC/cm<sup>2</sup> di superficie analizza.

## Risultati

### Anno 1

#### **Campionamento volumetrico**

Dal campionamento volumetrico eseguito in data 2 Marzo 2017 sono state ottenute le UFC/m<sup>3</sup> di aria riportate in Tabella 13.

Oltre al genere *Fusarium* spp., altri generi presenti in maniera consistente nei campioni di aria degli ambienti di magazzino sono stati *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Alternaria* spp..

In tutti i locali oggetto dello studio le UFC totali/m<sup>3</sup> di aria aspirata avevano un ordine di grandezza da 10<sup>1</sup> a 10<sup>3</sup>, con valori inferiori nei locali refrigerati (Celle, Spedizione) e nel locale di pelatura, dove al momento del campionamento la macchina non era in uso. I valori di UFC di *Fusarium*/m<sup>3</sup> di aria aspirata sono risultati sempre inferiori di un ordine di grandezza rispetto al corrispettivo valore di UFC totali/m<sup>3</sup> ad eccezione del locale di spedizione che ha fatto registrare un valore di UFC basso. Questo dato potrebbe essere dovuto al fatto che il locale viene utilizzato come luogo di stoccaggio temporaneo prima della consegna ai clienti del prodotto finito. (Tabella 13)

#### **Campionamento delle superfici**

In generale, il campionamento delle superfici ha evidenziato che i locali dove la carica si è rivelata più elevata sono il locale di ricevimento, dove il prodotto proveniente dal campo sosta prima dell'ingresso in cella; il locale di taglio, dove viene eseguita la prima lavorazione dei bulbi e il locale di confezionamento, dove la macchina viene in contatto continuamente con il materiale. Oltre al genere *Fusarium* spp., altri generi presenti in maniera consistente nei tamponi delle superfici degli ambienti di magazzino sono stati: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. (*niger* e *flavus*), *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp, *Trichoderma* spp, *Cladosporium* spp.

Inoltre, il campionamento ha permesso di osservare delle differenze in termini di UFC/cm<sup>2</sup> tra i locali refrigerati e quelli non refrigerati. Infatti, dai dati in tabella 5 si nota che nei locali di ricevimento, pelatura, taglio e confezionamento sono stati registrati valori nell'ordine di grandezza di 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> UFC di *Fusarium*/cm<sup>2</sup>, mentre nelle celle e nel locale di spedizione i valori variavano negli ordini di grandezza di 10<sup>1</sup>-10<sup>2</sup>. Alcune eccezioni riguardano UFC/cm<sup>2</sup> delle pareti del locale di ricevimento, dove non sono state isolate colonie di *Fusarium*, ma ha prevalso il genere *Aspergillus* spp.; dal dato riferito alla carica micotica dei cassoni della cella 2, dove è presente il materiale prima della lavorazione, rispetto alla cella 1, nel quale è presente il materiale che ha subito le operazioni di taglio, e dal dato riferito al UFC/cm<sup>2</sup> del pavimento del locale di spedizione (Tabella 13).

Sia per quanto riguarda il campionamento volumetrico sia per il campionamento con tamponi adesivi si è deciso di individuare le specie di alcuni isolati di *Fusarium* presenti nei locali di magazzino.

Il riconoscimento è stato eseguito sia con microscopio ottico (Nikon, Eclipse 50 i, Japan) a ingrandimento 500 x sia con tecniche molecolari descritte in precedenza. Le due specie maggiormente rappresentate sono la specie *F. oxysporum* e la specie *F. proliferatum*, con prevalenza di quest'ultima rispetto alla prima.

Locale	UFC totali						UFC Fusarium					
	Aria	Pareti	Pavimento	Cassoni	Residui	Macchina	Aria	Pareti	Pavimento	Cassoni	Residui	Macchina
Ricevimento	4.47*10 <sup>3</sup>	4.67*10 <sup>4</sup>	6.37*10 <sup>4</sup>	6.00*10 <sup>4</sup>	2.55*10 <sup>5</sup>		4.73*10 <sup>2</sup>	0	3.52*10 <sup>3</sup>	1.87*10 <sup>4</sup>	6.76*10 <sup>4</sup>	
Cella 1	3.73*10 <sup>2</sup>	4.57*10 <sup>1</sup>	3.48*10 <sup>3</sup>	8.23*10 <sup>2</sup>	3.12*10 <sup>4</sup>		5.33*10 <sup>1</sup>	4.57*10 <sup>1</sup>	8.46*10 <sup>2</sup>	6.86*10 <sup>1</sup>	2.29*10 <sup>2</sup>	
Cella 2	1.27*10 <sup>2</sup>	4.57*10 <sup>1</sup>	1.00*10 <sup>4</sup>	9.05*10 <sup>4</sup>	1.19*10 <sup>3</sup>		3.33*10 <sup>1</sup>	2.29*10 <sup>1</sup>	6.17*10 <sup>2</sup>	2.53*10 <sup>4</sup>	8.69*10 <sup>2</sup>	
Pelatura	3.33*10 <sup>1</sup>	2.47*10 <sup>4</sup>	4.50*10 <sup>3</sup>			8.48*10 <sup>3</sup>	0	9.74*10 <sup>3</sup>	2.33*10 <sup>3</sup>			1.28*10 <sup>3</sup>
Taglio/Calibrazione	1.43*10 <sup>3</sup>				7.74*10 <sup>4</sup>		3.40*10 <sup>2</sup>				8.36*10 <sup>4</sup>	
Confezionamento	1.59*10 <sup>3</sup>					3.86*10 <sup>4</sup>	3.07*10 <sup>2</sup>					1.66*10 <sup>4</sup>
Spedizione	1.47*10 <sup>2</sup>	1.14*10 <sup>2</sup>	1.44*10 <sup>4</sup>				6.67	0	2.13*10 <sup>3</sup>			

**Tabella 13** Risultati del campionamento dei locali di magazzino espressi in UFC/m<sup>3</sup> di aria aspirata e UFC/cm<sup>2</sup> di superficie campionata. In grigio le UFC totali, in bianco le UFC di *Fusarium* spp.

## Anno 2

Durante la lavorazione del prodotto, l'aglio attraversa diversi ambienti della cooperativa. In Tabella 14 sono riportati gli interventi di pulizia eseguiti dagli operatori durante il processo produttivo e la loro frequenza. I pavimenti dei locali utilizzati durante il processo produttivo vengono lavati con il prodotto Sirpav (Sanitec, Padova, Italia) a concentrazione indicata in etichetta. I nastri della pelatrice e della macchina di confezionamento, invece, vengono puliti con il prodotto Multi activ (Sanitec, Padova, Italia). Nel locale di taglio e calibrazione viene eseguita una pulizia grossolana con la scopa alla fine di ogni giornata di lavoro. Infine, non è prevista nessuna sanificazione dei cassoni in plastica nei quali viene stoccato l'aglio all'interno delle celle prima di essere confezionato e venduto.

**Tabella 14** Interventi di Pulizia eseguiti in Copap durante la lavorazione del prodotto

	Prodotto usato	Tipo di trattamento	Frequenza
<b>Ricevimento</b>	ACQUA+SIRPAV	Lavapavimenti / Spazzolatrice	Lavapavimenti 3 volte l'anno + Spazzolatrice settimanale
<b>Cella prodotto grezzo</b>	ACQUA+SIRPAV	Lavapavimenti	Inizio campagna
<b>Cella prodotto lavorato</b>	ACQUA+SIRPAV	Lavapavimenti	1 o 2 volte anno
<b>Pelatura</b>	ACQUA+SIRPAV+MULTI ACTIV	Nastri straccio+ Lavapavimenti	A ogni fine lavorazione di pelatura
<b>Taglio/Calibrazione</b>	-----	Scopa	Tutte le volte che si pulisce l'aglio a fine lavorazione
<b>Confezionatrice</b>	MULTI ACTIV PROFESSIONAL X TAVOLI E NASTRI	Spruzzo+ carta e aria compressa	Giornaliera tavoli + settimanale nastri
<b>Cella spedizione</b>	ACQUA	Lavapavimenti Spazzolatrice	Mensile Settimanale

Dai monitoraggi, eseguiti a seguito delle misure di pulizia adottate, è emerso che l'efficacia del prodotto di pulizia si esplica appena dopo l'esecuzione del lavaggio con UFC/cm<sup>2</sup> minori di 2 ordini di grandezza rispetto al campionamento eseguito prima della pulizia. Ciononostante, già dopo 18 ore dall'intervento di pulizia la capacità di contenere le specie di interesse è notevolmente ridotta tornando a valori di 10<sup>4</sup> – 10<sup>5</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. Oltre al genere *Fusarium*, è stato possibile isolare colonie appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. (

Tabella 15)



**Tabella 15** Risultati del campionamento in tre tempi a seguito dell'intervento di pulizia nei locali di magazzino, espressi in UFC/cm<sup>2</sup> di superficie campionata. In grigio le UFC totali, in bianco le UFC di *Fusarium* spp. (Tempo 1= prima dell'intervento di pulizia, Tempo 2= dopo 20 minuti dall'intervento, Tempo 3= dopo 18 ore dall'intervento)

Punto di campionamento	Tempo	UFC <i>Fusarium</i> /cm <sup>2</sup>	UFC Tot /cm <sup>2</sup>
Calibratrice	1	5,50*10 <sup>4</sup>	2,36*10 <sup>5</sup>
Calibratrice	2	4,80*10 <sup>2</sup>	3,16*10 <sup>3</sup>
Calibratrice	3	6,28*10 <sup>4</sup>	7,16*10 <sup>4</sup>
Cassone	1	2,42*10 <sup>5</sup>	4,51*10 <sup>5</sup>
Cassone	2	6,88*10 <sup>3</sup>	1,20*10 <sup>4</sup>
Cassone	3	1,82*10 <sup>4</sup>	4,22*10 <sup>4</sup>
Spicchiatrice	1	2,24*10 <sup>5</sup>	2,80*10 <sup>5</sup>
Spicchiatrice	2	5,93*10 <sup>3</sup>	5,86*10 <sup>3</sup>
Spicchiatrice	3	1,07*10 <sup>5</sup>	1,20*10 <sup>5</sup>

## WP 2. RUOLO DEI PARAMETRI AGRONOMICI E METEOROLOGICI

### Attività prevista nel progetto

#### WP 2.1. Valutazione dell'incidenza di marciumi da *Fusarium*

**Attività preliminare.** Al fine di ottimizzare le attività del triennio, verrà svolta un'analisi critica dei dati disponibili e /o raccolti nel WP1.1 come base per la definizione del programma di lavoro del triennio di ricerca. Saranno individuate 3 aziende con caratteristiche ritenute ottimali riguardo all'applicazione di buone pratiche colturali e che storicamente non abbiano evidenziato particolari problemi di marciume dell'aglio e 3 aziende che abbiano presentato in passato e presentino tuttora situazioni più problematiche riguardo alla malattia oggetto di studio. In queste aziende si studierà in dettaglio la problematica del marciume dell'aglio per l'intera durata della ricerca e i dati ottenuti verranno confrontati con il dato aggregato ottenuto dal resto delle aziende aderenti a COPAP. Saranno individuate opportune fonti di dati meteorologici, in accordo con il servizio meteorologico regionale, in modo da poter disporre per il triennio dei valori di temperatura, umidità relativa e pioggia da associare alle altre informazioni raccolte per una migliore descrizione dei fattori di rilievo per la malattia oggetto di studio.

#### Metodi di analisi

Le analisi fitosanitarie avranno lo scopo principale di isolare le specie di *Fusarium* presenti e quindi acquisire dati sulla reale frequenza di isolamento delle diverse specie e in riferimento ai nematodi della specie *Dytilechus dipsaci*. L'obiettivo è quello di verificare la relazione tra incidenza e gravità dei sintomi osservati e diagnosi condotta su base analitica.

Le analisi verranno condotte sia con tecniche convenzionali, ricorrendo in presenza di sintomi a isolamenti in terreni selettivi e non, e successivo riconoscimento delle colonie ottenute su base morfologica e biometrica, con il supporto di stereo-microscopio e microscopio ottico.

Inoltre, tecniche molecolari verranno impiegate al fine di confermare le diagnosi e/o al fine di verificare la reale presenza delle specie fungine anche in assenza di sintomi tipici, in special modo su partite destinate alla semina.

**Anno 1. Analisi pre-semina:** Sul finire dell'estate, le 6 aziende scelte verranno assoggettate ad analisi fitosanitaria dei terreni destinati alla semina, con lo scopo principale di quantificare il grado di colonizzazione da parte di specie di *Fusarium* responsabili di marciume dell'aglio e ai nematodi. Negli appezzamenti, con

terreno pronto per la semina, saranno raccolti 5 campioni lungo le diagonali dell'appezzamento in seguito sottoposti a specifiche analisi di laboratorio.

I valori di colonizzazione fungina ottenuti verranno espressi come ufc/g di terreno, impiegando per l'isolamento idonei terreni selettivi.

Per il rilievo dei nematodi verranno impiegate le usuali tecniche di diagnosi impiegate per *Dytilenchus dipsaci* e la presenza espressa come numero di nemi/g di terreno.

**Analisi durante la stagione colturale:** Nelle 6 aziende scelte, saranno eseguiti campionamenti di piante in campo sulle quali sarà eseguita una stima dei sintomi di marciume dell'aglio e di eventuali altre alterazioni, calcolando l'incidenza delle stesse. In particolare, saranno campionate 20 piante in 5 punti individuati lungo le diagonali dell'appezzamento, per un totale di 100 piante, ed il campionamento sarà eseguito 3 volte durante la stagione colturale, ad inizio formazione bulbilli, ingrossamento bulbilli e a maturazione di raccolta. Le piante campionate saranno classificate in base ai sintomi osservabili (presenza/assenza e alla tipologia e gravità dei eventuali sintomi presenti). In occasione del terzo campionamento verrà eseguita la misurazione dell'acqua libera ( $a_w$ ) nei bulbi.

**Analisi post raccolta:** Dal conferimento, saranno eseguite ulteriori valutazioni del prodotto, inclusa la misurazione dell' $a_w$ , prima della lavorazione e prima della commercializzazione, prelevando casualmente, in 5 punti di ciascuna partita, sub-campioni costituiti da 20 bulbi ciascuno, per un totale di 100 bulbi. I dati ottenuti verranno poi confrontati con la percentuale di scarto che otterranno gli operatori addetti alla cernita.

Al termine dell'annata sarà costituito un database con tutti i dati raccolti. Inoltre, sarà stilata una relazione con le considerazioni preliminari riguardo a quanto riscontrato in campo e durante il post-raccolta.

Anno 2.

Nel secondo anno dello studio saranno ripetuti i campionamenti come descritto per il primo anno. Inoltre, i risultati ottenuti saranno aggiunti al data base creato nel primo anno e sarà prodotta una seconda relazione tecnica.

Anno 3.

Nel terzo anno dello studio saranno ripetuti i campionamenti come descritto per anni precedenti. Inoltre, sarà aggiornato il database e tutti i dati raccolti nel triennio saranno elaborati con le opportune tecniche statistiche e sarà prodotta una relazione finale.

## **WP 2.1. VALUTAZIONE DELL'INCIDENZA DI MARCIUMI DA *FUSARIUM***

### **Materiali e metodi**

#### **Attività preliminari**

All'interno delle aziende di COPAP sono state individuate 3 aziende (Melodi, Opizzi e Rastelli) con caratteristiche ritenute ottimali riguardo all'applicazione di buone pratiche colturali e che storicamente non avevano presentato particolari problemi di marciume dell'aglio, e 3 aziende (Merli, Pezza e Zaninoni) che in passato avevano presentato situazioni problematiche riguardo alla patologia oggetto di studio. In queste aziende sono state raccolte informazioni dettagliate e il dato ottenuto nel triennio è stato confrontato con il dato aggregato di incidenza del marciume nelle altre aziende aderenti a COPAP. Nell'anno 2017- 2018 e 2019 si è proceduto alla raccolta dei dati meteo dei quadrati numero 450, 491, 530, 531 e 568 del sistema regionale che prevede l'individuazione di quadrati di 5 km di lato per ciascuno dei quali sono disponibili dati orari ottenuti dall'interpolazione di dati da capannine e radar meteorologico. I 5 quadranti individuano il territorio nel quale sono situate le aziende di COPAP.

I dati meteo di temperatura, umidità relativa e pioggia raccolti dal servizio meteorologico regionale sono stati correlati attraverso l'indice di Pearson ai dati ottenuti in merito alla problematica "marciume secco" al termine dei tre anni di progetto per poter evidenziare i fattori di rilievo per lo sviluppo della malattia.

## Analisi in pre-semina

### Anno 1

In data 10-11-2016 è stato effettuato il campionamento dei terreni dei campi dedicati alla coltivazione dell'aglio nelle sei aziende scelte per il progetto. Il campionamento è stato effettuato in 5 punti lungo le diagonali del campo. Ogni sub-campione era costituito da "3 carote di terreno" prelevate in successione partendo dal piano di campagna lungo il profilo del terreno fino ad una profondità massima di 50 cm circa.

Allo scopo di valutare il grado di colonizzazione fungina e l'eventuale presenza di nematodi, prima della semina sono state eseguite sui campioni di terreno due tipi di analisi: la conta del numero di nematodi/grammo (nemi/g) e il conteggio delle UFC/g su terreno selettivo per il genere *Fusarium*.

### Conta del numero di nemi per grammo di terreno

L'estrazione dei nematodi del genere *Ditylenchus* è stata eseguita utilizzando l'imbuto di Baermann (EPPO PM 7/87 e EPPO PM 7/119, 2009). Questo metodo è indicato per nematodi attivi endo-parassiti e forme mobili che a contatto con l'acqua si liberano dai tessuti vegetali e dal terreno depositandosi sul fondo dell'imbuto.

Una volta estratti, i nematodi sono stati contati allo stereoscopio Motic ad ingrandimento 40x. Tuttavia, le forme mobili sono di difficile identificazione per cui si è deciso di ricorrere a metodi molecolari per il riconoscimento. Di seguito sono riportati il metodo di estrazione del DNA e i parametri di amplificazione della reazione di PCR.

### Estrazione del DNA da nematodi

- A partire da una soluzione acquosa di 25 µl contenete almeno 10 nematodi, omogenizzare con 300 µl di tampone di lisi descritto nell' Appendice 4 Eppo PM 7/87.
- Incubare la soluzione per 1 ora a 37 °C vortexando periodicamente.
- Denaturare la soluzione per 5 minuti a 85°C
- Mischiare l'omogenizzato 1:1 con una soluzione di fenolo (pH 8)-cloroformio-alcolisoamilico (25:24:1).
- Vortexare per 15 minuti e centrifugare a 8250 RPM per 10 minuti.
- Trasferire il surnatante in una nuova eppendorf, aggiungere un egual volume di cloroformio e ripetere il passaggio precedente.
- Prelevare il surnatante e lasciar precipitare in un egual volume di isopropanolo per 1 notte a -20°C.
- Centrifugare a 9860 RPM per 10 minuti.
- Eliminare il surnatante e asciugare il pellet per 30 minuti sotto cappa.
- Risospendere il pellet in 50 µl di TE.

### Reazione di amplificazione del DNA

*Ditylenchus dipsaci* è stato ricercato impiegando una reazione di PCR qualitativa in particolare utilizzando i primer PF1 (5'-AAC GGC TCT GTT GGC TTC TAT-3')/PR1 (5'-ATT TAC GAC CCT GAG CCA GAT-3')e PF2 (5'-TCGCGAGAATCAATGAGTACC-3')/PR2 (5'-AAT AGC CGA TCG ATT CCG TCT-3') con ampliconi attesi rispettivamente pari a 327 bp e 396 bp.

I campioni sono stati preparati nel seguente modo:

Primer F [10 pmol].....0,5 µl  
Primer R [10 pmol].....0,5 µl  
Buffer 10x (Fermentas).....2,5 µl  
dNTPs [10 mM].....0,2 µl  
Dream taq (Fermentas).....0,4 µl  
DNA [10ng/ µl].....2,5 µl

Acqua fino a volume di 25 µl

La reazione di PCR, invece, è stata eseguita con i seguenti parametri.

- 94°C 3 min
  - 94°C 2 min
  - 62°C(PF1) o 63°C (PF2) 30 sec
  - 72°C 2 min
  - 72°C 10 min
- | 30 cicli

Al termine della reazione l'evidenziazione dei prodotti di PCR è stata effettuata attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1,2% con ladder GeneRuler 100 bp DNA Ladder (#SM0241 Thermo Scientific).

### **Conta delle Unità Formanti Colonia per grammo di terreno e successiva identificazione delle specie**

Allo scopo di quantificare il grado di colonizzazione da parte delle specie del genere *Fusarium*, sul terreno sono state eseguite le conte delle UFC/g e la successiva identificazione delle specie isolate.

La conta delle unità formanti colonia è stata eseguita mediante il metodo delle diluizioni seriali (*spread plate*) tenendo distinti i 5 sub campioni di terreno raccolti nei 6 campi oggetto dello studio. L'allestimento del campione di analisi è stato effettuato prelevando 5 g di terreno tal quale, i quali e sono stati diluiti in 45 ml di acqua peptonata all'1‰. Le beute contenenti i campioni sono state poste in agitazione per 30 minuti e a partire da queste sono state eseguite le diluizioni seriali fino a 10<sup>-5</sup>. Le diluizioni da 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup> sono state utilizzate per la posa in piastra. *Fusarium Selective Agar (FSA)* è stato il terreno selettivo impiegato per individuare il genere *Fusarium* secondo la composizione riportata da Burgess *et al.* (1988; 1L di acqua agarizzata con 20 g/L di agar con aggiunta di 20 g/L di destrosio, 0.5 g/L di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L di NaNO<sub>3</sub>, 0.5 g/L di MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O, 1 g/L di estratto di lievito, 1ml/L di soluzione 1% FeSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O, ammendato con 5 ml/L di una sospensione di 2,6 Dicloro-4-nitroanilina 1%, 0.1 g/L di Streptomicina solfato e 0.01 g/L di Aureomicina solfato).

Le piastre sono state inoculate con 100 µL di sospensione e successivamente sono state incubate a 25°C per 5-7 giorni al termine dei quali è stata eseguita la conta delle colonie sviluppatesi.

Le colonie effettivamente appartenenti al genere *Fusarium* sono state trasferite su terreno PDA e sottoposte a purificazione attraverso colture monoconidiche ripetute. L'identificazione è stata eseguita al microscopio ottico (Leitz Labor Lux D) ad ingrandimento 500 x secondo i caratteri morfologici riportati da Leslie e Summerell (2006) ed è stata confermata mediante tecniche molecolari secondo i protocolli di Mbfung e Pryor (2010) e Nicolaisen et al. (2009), come descritto in precedenza.

#### **Anno 2**

Le analisi del secondo anno sono state eseguite seguendo i metodi descritti per l'anno 1. I campioni di suolo sono stati raccolti in data 23-11-2017.

#### **Anno 3**

Le analisi del secondo anno sono state eseguite seguendo i metodi descritti per l'anno 1. I campioni di suolo sono stati raccolti in data 15-11-2018.

A conclusione del terzo anno, i dati relativi al numero di nemi/100g di terreno secco e alle UFC rilevate nelle diverse aziende sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e i confronti tra le medie sono stati eseguiti con il test di Tukey. Il livello di significatività usato nelle analisi statistiche è stato P<0.05.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il pacchetto statistico PASW (ver.25, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009).

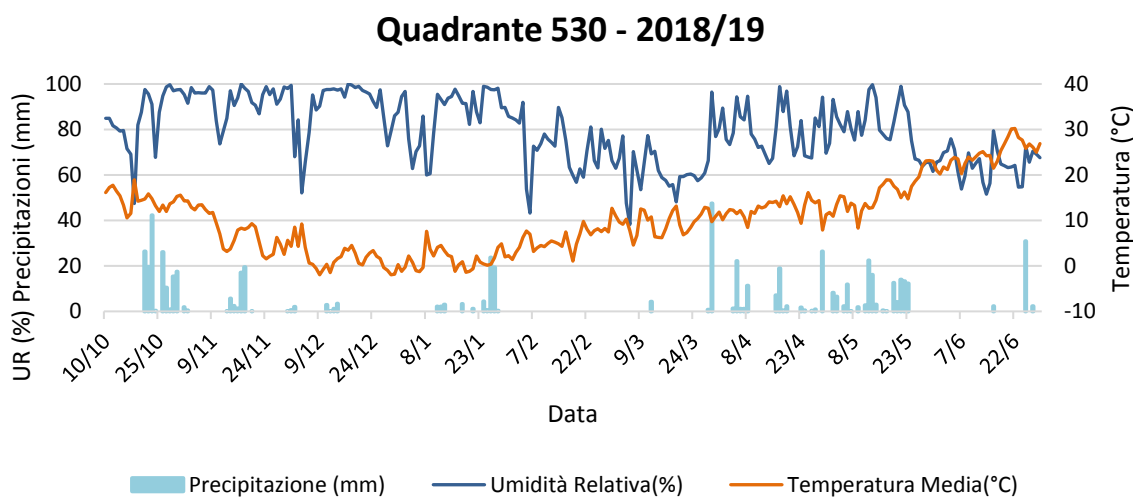
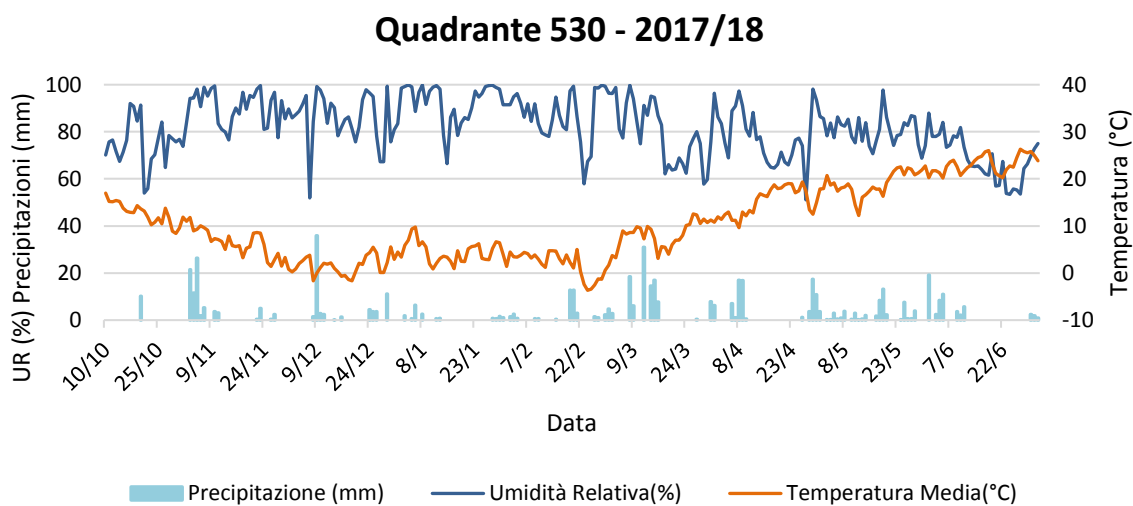
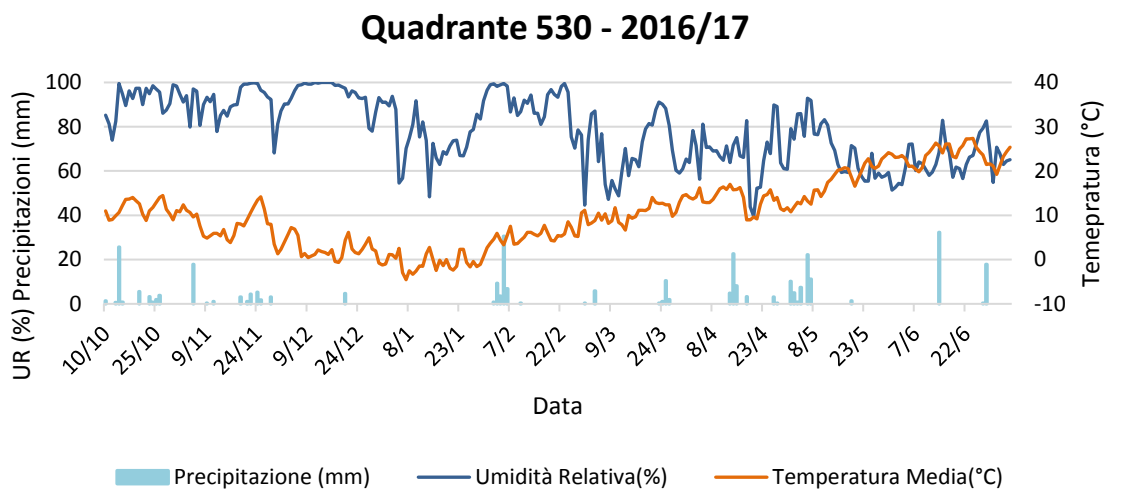
## Risultati delle analisi in pre-semina

### Analisi dei dati meteo

Dai dati ottenuti dai cinque quadranti meteo del servizio regionale (n° 450-491-530-531-568) si è potuto evidenziare l'andamento meteorologico dei tre anni oggetto dello studio e la correlazione tra i parametri meteorologici, la gravità dei sintomi per pianta e l'incidenza del genere *Fusarium*.

In Figura 2 è possibile osservare graficamente l'andamento meteorologico delle stagioni colturali del quadrante 530 nei tre anni oggetto di studio. I dati relativi alla sommatoria dei gradi giorno e delle precipitazioni, alla media delle temperature e dell'umidità relativa, invece, sono stati calcolati dividendo la stagione colturale in 4 periodi. Dalla semina al 31/12 (periodo I), dal 1/01 al 1° campionamento (periodo II), dal 1° campionamento al 2° campionamento (periodo III) e dal 2° campionamento alla maturazione di raccolta (periodo IV). I dati relativi ai diversi quadranti sono riportati in Tabella 16. In tutte le aree oggetto di studio si è osservata una sommatoria dei gradi giorno maggiore nei primi due anni di studio e un calo delle temperature nel terzo anno (dato medio rispettivamente pari a 2115, 2207, 1967 gradi giorno), mentre il dato delle piogge ha evidenziato un aumento della sommatoria delle precipitazioni nel secondo e nel terzo anno di studi rispetto al primo più siccitoso (dato medio rispettivamente pari a 188, 369, 360 mm di pioggia). Inoltre, il terzo anno si discosta dai primi due per l'andamento meteorologico del periodo III corrispondente alla fase di ripresa vegetativa della coltura e di ingrossamento dei bulbi. Nell'anno 2019, infatti, i mesi di aprile e maggio sono stati caratterizzati da abbondanti piogge e temperature medie inferiori rispetto agli anni precedenti (14°C e 239 mm di pioggia). I dati di andamento meteo sono poi stati correlati con la gravità dei sintomi sulle piante, l'incidenza delle specie isolate durante i campionamenti in campo, e il contenuto di acqua libera a maturazione di raccolta.

Dalle correlazioni di Pearson (Tabella 17) è emerso che le due specie *F. proliferatum* e *F. oxysporum* risultano correlate negativamente tra loro, presumibilmente in relazione alle diverse esigenze ecologiche, che porta alla dominanza di una o dell'altra a seconda delle condizioni meteorologiche. Inoltre, *F. proliferatum* è stato rilevato con maggiore incidenza nelle stagioni più piovose, mostrando una correlazione positiva con la sommatoria delle piogge nei campionamenti effettuati durante l'ingrossamento dei bulbi (BBCH45) e alla maturazione di raccolta (BBCH49). *F. oxysporum*, invece, ha mostrato correlazione negativa con la sommatoria delle piogge sia in BBCH45 che in BBCH49, mentre l'incidenza del fungo alla ripresa vegetativa (BBCH15) è risultata correlata positivamente con la sommatoria dei gradi giorno.



**Figura 2** Andamento meteorologico del quadrante 530 nelle stagioni colturali 2016/2017, 2017/18 e 2018/2019 UR : Umidità Relativa .

**Tabella 16** Dati meteo raccolti nei tre anni di studio nei cinque quadranti meteo relativi alle 6 aziende oggetto di studio.

Azienda	2016-2017				2017-2018				2018-2019			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
<b>450-Merli</b>												
ΣT med		753,1	644,2	809,7	599,3	795,9	736,9	723,3	571,0	640,3	815,7	584,0
Σprec.		76,7	62,7	22,3	185,3	216,6	86,4	49,5	221,1	117,7	247,7	6,1
T media		7,3	15,8	24,5	7,4	7,0	18,9	23,3	7,8	6,5	14,8	24,3
UR media		69,6	63,3	54,6	78,0	77,3	71,0	60,4	84,3	66,5	70,8	56,4
Gradi giorno				2207,0				2256,1				2040,0
Tot piogge				161,7				352,5				371,5
<b>491-Pezza</b>												
ΣT med		723,7	634,4	802,0	354,1	771,9	746,4	716,5	560,2	615,3	800,4	578,1
Σprec.		76,2	61,9	27,2	190,6	241,4	82,8	50,0	233,4	126,8	258,3	6,9
T media		7,0	15,5	24,3	5,4	6,8	18,7	23,1	7,7	6,2	14,6	24,1
UR media		73,0	67,0	58,3	82,8	80,8	74,7	64,4	87,4	69,9	75,7	60,5
Gradi giorno				2160,1				2234,8				1993,8
Tot piogge				165,3				374,2				392,0
<b>530-Rastelli Zaninoni</b>												
ΣT med	567,8	659,2	621,6	782,2	518,7	724,4	714,0	709,9	609,8	534,7	777,2	568,5
Σprec.	86,8	76,2	114,3	32,3	147,0	226,4	89,8	52,4	217,3	112,1	227,3	2,3
T media	6,8	6,4	15,2	23,7	6,5	6,4	18,3	22,9	7,9	5,4	14,1	23,7
UR media	92,7	76,8	69,7	63,0	84,1	85,1	79,7	68,2	90,2	75,1	80,7	64,8
Gradi giorno				2063,1				2148,3				1880,4
Tot piogge				222,8				368,6				341,7
<b>531-Melodi</b>												
ΣT med		659,2	621,6	782,2	400,9	765,8	702,7	713,4	479,4	570,2	789,1	573,9
Σprec.		76,2	95,6	32,3	147,0	240,6	81,6	50,9	225,3	118,3	242,9	5,7
T media		6,4	15,2	23,7	5,6	6,7	18,5	23,0	7,0	5,8	14,3	23,9
UR media		76,8	69,7	63,0	85,6	83,1	77,8	66,6	90,8	72,9	78,5	62,8
Gradi giorno				2063,1				2181,8				1933,1
Tot piogge				204,1				373,1				366,9
<b>568-Opizzi</b>												
ΣT med		672,1	624,7	786,2	594,2	748,8	738,8	723,7	675,3	577,9	816,8	590,4
Σprec.		59,9	95,1	28,5	160,3	214,2	97,1	66,4	226,8	106,4	216,5	3,3
T media		6,5	15,2	23,8	7,1	6,6	18,9	23,3	8,4	5,8	14,9	24,6
UR media		75,7	69,2	61,8	82,9	83,0	75,5	65,7	87,7	72,4	76,0	60,7
Gradi giorno				2082,9				2211,2				1985,1
Tot piogge				183,5				377,7				326,2

**Tabella 17** Correlazioni di Pearson dei dati raccolti durante il triennio di studio nelle sei aziende interessate dall'indagine. Gravità/PIANTA: gravità rilevata a BBCH49 (raccolta). inc. FP 4: incidenza di *F. proliferatum* a BBCH49 (raccolta). inc. FO 4: incidenza di *F. oxysporum* a BBCH49 (raccolta). inc. PE 4: incidenza di *Penicillium* BBCH49 (raccolta). FBs (ppb): Fumonisine totali. aw: acqua libera. inc. FP 2: incidenza di *F. proliferatum* a BBCH15 (1° campionamento). inc. FP 3: incidenza di *F. proliferatum* a BBCH45 (2° campionamento). inc. FO 2: incidenza di *F. oxysporum* a BBCH15 (1° campionamento). inc. FO3: incidenza di *F. oxysporum* a BBCH45 (2° campionamento). SumDD: sommatoria dei gradi giorno. SumR: sommatoria delle piogge. N=18

	Gravità/ pianta	inc. FP 2	inc. FP 3	inc. FP 4	inc. FO 2	inc. FO3	inc. FO 4	inc. PE 4	aw	SumDD	SumR
<b>Gravità/pianta</b>	1,000	0,020	0,100	-0,215	0,102	0,216	0,285	0,215	-0,423	-0,061	-0,413
<b>inc. FP 2</b>		1,000	,512*	0,245	0,082	-0,094	-0,055	-0,261	-0,362	-0,018	0,205
<b>inc. FP 3</b>			1,000	,737**	-0,255	-,766**	-,666**	0,322	-0,190	-0,220	,773**
<b>inc. FP 4</b>				1,000	-,569*	-,837**	-,694**	0,034	0,086	-0,154	,765**
<b>inc. FO 2</b>					1,000	0,467	0,336	0,267	-0,459	,575*	-0,261
<b>inc. FO3</b>						1,000	,854**	-0,274	-0,175	0,041	-,876**
<b>inc. FO 4</b>							1,000	-0,380	-0,085	0,085	-,886**
<b>inc. PE 4</b>								1,000	-0,335	0,147	0,300
<b>aw</b>									1,000	-0,185	0,066
<b>SumDD</b>										1,000	-0,101
<b>SumR</b>											1,000

\*\* . La correlazione è significativa a livello 0,01 (a due code). \* . La correlazione è significativa a livello 0,05 (a due code).



## Conta del numero di nemi per grammo di terreno e successiva identificazione

### Anno 1

Nelle 6 aziende considerate sono stati raccolti i dati del numero di nematodi/g di terreno (Tabella 18), nel 2016 non è stato rilevato un numero contenuto di nematodi; infatti, i valori sono variati da 6 a 45 nematodi/100g di terreno essiccato in stufa.

Il campionamento era stato eseguito in Novembre quando le temperature erano già piuttosto basse, questo potrebbe aver portato ad un approfondimento lungo il profilo pedologico dei nematodi presenti. Inoltre, la specie di interesse *Ditylenchus dipsaci*, sverna come forma giovanile di quarto stadio, rendendone difficile il riconoscimento al bioculare su base morfologica. Dalle estrazioni del DNA e dalle successive reazioni di PCR è stato possibile evidenziare un solo amplicone ottenuto impiegando i primers PF1-PR1 nel campione 6.1. Il dato però non è stato confermato con i primers PF2-PR2.

A conferma delle osservazioni eseguite ad inizio stagione sul terreno, anche durante la stagione colturale non sono stati osservati sintomi riconducibili ad un attacco da parte dei nematodi sulle piante oggetto dello studio.

Tabella 18 Conta dei nematodi

AZIENDA	N°NEMATODI/ 100 g di terreno tq	Peso terreno secco (g)	% umidità terreno	nemi/100g
1	10	78,36	21,65	13
2	37	73,94	26,06	45
3	20	75,86	24,15	26
4	5	80,38	19,62	7
5	20	80,10	19,90	26
6	15	75,34	24,66	20

### Anno 2

Nel secondo anno di analisi il numero di nematodi presenti nel terreno era inferiore all'anno precedente con valori compresi tra 3 e 13 nematodi per 100g di terreno essiccato in stufa. Il dato inferiore all'anno precedente è presumibilmente legato sia alla stagione estiva molto secca che ha caratterizzato l'annata 2017, sia alla tessitura maggiormente argillosa dei suoli destinati alla coltivazione dell'aglio nell'annata 2017-2018. (Tabella 19)

Tabella 19 Conta dei nematodi nel secondo anno di analisi

AZIENDA	N°NEMATODI/ 100 g di terreno tq	Peso terreno secco (g)	% umidità terreno	nemi/100g
1	3	78,37	21,64	3
2	3	74,60	25,40	4
3	8	79,40	20,96	10
4	7	80,78	19,22	8
5	11	79,84	20,16	14
6	4	79,96	20,05	5

### Anno 3

Nel terzo anno di studio il numero di nematodi rilevati durante le analisi ha espresso valori simili agli anni precedenti con valori compresi tra 7 e 49 nematodi per 100g di terreno essiccato in stufa. (Tabella 20)

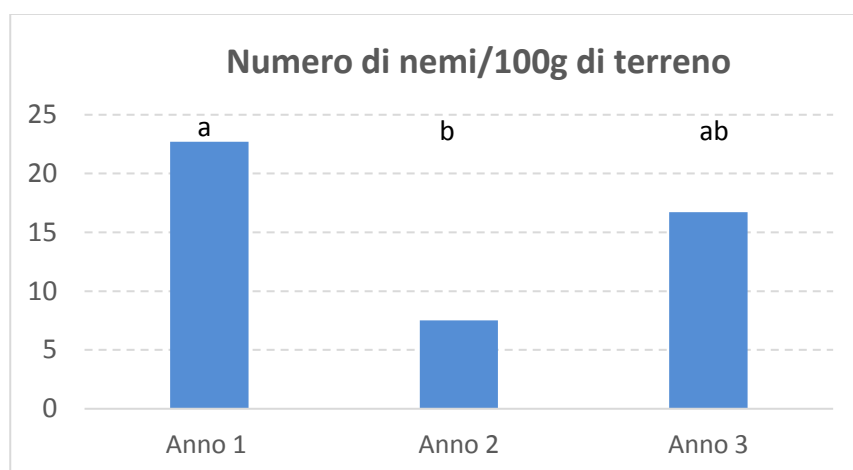
Dall'analisi ANOVA eseguita con livello di significatività  $P \leq 0,05$  è emersa una differenza significativa nell'andamento annuale del numero di nematodi isolati, mentre non sono risultate significative le differenze tra le aziende prese in esame e l'interazione tra i due fattori principali. Dai dati riportati in Figura 3 si evince che l'anno 1 e 2 del progetto sono risultati statisticamente diversi tra loro (rispettivamente 23 nemi/100 g e 8 nemi/100 g di terreno), mentre l'anno 3 si colloca in una posizione intermedia tra le osservazioni del primo e del secondo anno con un numero di nematodi su 100 g di terreno pari a 17.

La bassa frequenza di isolamento dell'anno 2 probabilmente è riconducibile alla una stagione estiva molto secca registrata nel 2017. Inoltre, il numero di nematodi osservati varia negli anni all'interno della medesima azienda, questo fattore, oltre che all'andamento climatico stagionale, potrebbe essere legato alla tessitura del suolo dell'appezzamento interessato alla coltura dell'aglio nei diversi anni.

Le estrazioni del DNA e le successive reazioni di PCR non hanno evidenziato ampliconi, quindi si esclude la presenza di nematodi della specie *Ditylenchus dipsaci* all'interno dei suoli dei campi interessati dallo studio.

**Tabella 20** Conta dei nematodi nel terzo anno di analisi

AZIENDA	N°NEMATODI/ 100 g di terreno tq	Peso terreno secco (g)	%umidità terreno	nemi/100g
1	5	38,45	23,10	13
2	5	40,69	18,62	11
3	3	38,16	23,68	9
4	20	40,26	19,48	49
5	3	41,05	17,91	7
6	5	39,47	21,06	12



**Figura 3** Numero di nematodi/100g di terreno nei 3 anni di analisi

## Conta delle Unità Formanti Colonia per grammo di terreno e successiva identificazione delle specie

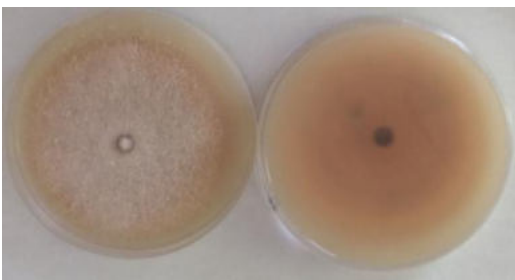
### Anno 1

Dalla conta delle unità formanti colonia non è emersa nessuna differenza in termini di concentrazione inoculo tra le aziende considerate. Infatti, i valori di UFC di *Fusarium*/g terreno secco sono risultati compresi nell'intervallo da  $10^1$  a  $10^2$ , con il numero di colonie più basso riscontrato nelle aziende 2 e 3. Valori più elevati sono stati riscontrati per tutte le specie fungine nel loro complesso; la conta UFC è rientrata in un intervallo compreso tra  $10^3$  e  $10^4$  UFC/g, con i valori più elevati nelle aziende 1 e 2 (Tabella 21).

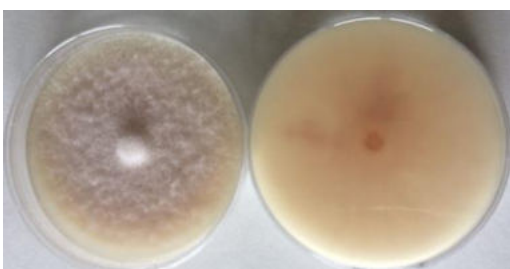
**Tabella 21** Conta delle unità formanti colonia su grammo di terreno secco del primo anno di analisi

Azienda	Grado di infezione anni precedenti	UFC tot/g terreno secco	UFC <i>Fusarium</i> /g terreno secco
1	-	$1,22 \cdot 10^4$	$2,96 \cdot 10^2$
2	+	$1,26 \cdot 10^4$	$9,20 \cdot 10^1$
3	-	$4,34 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^1$
4	+	$7,90 \cdot 10^3$	$5,68 \cdot 10^2$
5	-	$8,46 \cdot 10^3$	$4,60 \cdot 10^2$
6	+	$1,89 \cdot 10^3$	$1,77 \cdot 10^2$

A seguito di purificazioni attraverso ripetute colture monoconidiche gli isolati appartenenti al genere *Fusarium* sono stati identificati al microscopio ottico considerando i caratteri morfologici riportati da Leslie e Summerell (2006); si è poi proceduto alla conferma molecolare secondo i protocolli riportati da Mbfung e Pryor (2010) e Nicolaisen *et al.* (2009). Gli isolati del genere *Fusarium* analizzati erano riconducibili prevalentemente alle specie *F. proliferatum*, *F. oxysporum* e *F. solani*. (Figura 4, Figura 5)



**Figura 4** Colonia di *Fusarium proliferatum* di 10 giorni a 25°C su terreno di coltura PDA



**Figura 5** Colonia di *Fusarium oxysporum* su terreno di coltura PDA

## Anno 2

Nel secondo anno è stata rilevata una maggiore presenza del genere *Fusarium* con valori nell'intervallo di  $10^2$ - $10^3$  UFC/g, mentre i valori di UFC totali oscillavano tra  $10^3$  e  $10^6$  UFC/g di terreno secco (Tabella 22). Come nell'anno precedente, non si è evidenziata una differenza significativa tra l'inoculo in campo delle aziende che storicamente avevano registrato maggiori problemi di fusariosi e quelle che in passato avevano produzioni più sane. A seguito di purificazioni attraverso ripetute colture monoconidiche gli isolati appartenenti al genere *Fusarium* sono stati identificati al microscopio ottico considerando i caratteri morfologici riportati da Leslie e Summerell (2006), si è poi proceduto alla conferma molecolare secondo i protocolli riportati da Mbfung e Pryor (2010) e Nicolaisen *et al.* (2009). Gli isolati del genere *Fusarium* analizzati erano riconducibili prevalentemente alle specie *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. culmorum* e *F. proliferatum*.

**Tabella 22** Conta delle unità formanti colonia su grammo di terreno secco del secondo anno di analisi

Azienda	Grado di infezione anni precedenti	UFC tot/g terreno secco	UFC <i>Fusarium</i> /g terreno secco
1	-	$2,51 \cdot 10^3$	$1,11 \cdot 10^3$
2	+	$2,88 \cdot 10^6$	$1,53 \cdot 10^3$
3	-	$9,62 \cdot 10^5$	$1,34 \cdot 10^3$
4	+	$1,85 \cdot 10^5$	$7,42 \cdot 10^2$
5	-	$3,61 \cdot 10^4$	$1,44 \cdot 10^3$
6	+	$2,24 \cdot 10^3$	$1,28 \cdot 10^3$

## Anno 3

Dalla conta delle unità formanti colonia non è emersa nessuna differenza in termini di concentrazione inoculo tra le aziende considerate. Infatti, i valori di UFC di *Fusarium*/g terreno secco sono risultati compresi nell'intervallo da  $10^2$  a  $10^3$ , con il numero di colonie più basso riscontrato nelle aziende 1, 2 e 5. La conta delle UFC totali ha fatto registrare valori di ordine di grandezza  $10^3$  e i valori più elevati si sono riscontrati nelle aziende 3 e 4 (Tabella 23).

A seguito di purificazioni attraverso ripetute colture monoconidiche gli isolati appartenenti al genere *Fusarium* sono stati identificati al microscopio ottico considerando i caratteri morfologici riportati da Leslie e Summerell (2006). Gli isolati del genere *Fusarium* analizzati erano riconducibili prevalentemente alle specie *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, e *F. culmorum*.

**Tabella 23** Conta delle unità formanti colonia su grammo di terreno secco del terzo anno di analisi

Azienda	Grado di infezione anni precedenti	UFC tot/g terreno secco	UFC <i>Fusarium</i> /g terreno secco
1	-	$1,93 \cdot 10^3$	$9,35 \cdot 10^2$
2	+	$2,27 \cdot 10^3$	$6,52 \cdot 10^2$
3	-	$7,55 \cdot 10^3$	$3,30 \cdot 10^3$
4	+	$4,52 \cdot 10^3$	$1,84 \cdot 10^3$
5	-	$2,10 \cdot 10^3$	$9,48 \cdot 10^2$
6	+	$2,08 \cdot 10^3$	$1,01 \cdot 10^3$

L'analisi complessiva dei dati raccolti nei 3 anni di studio ha fatto rilevare come preponderante la colonizzazione del terreno da parte del genere *Fusarium*, seguito dai generi *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Penicillium*. Dall'ANOVA eseguita con livello di significatività  $P \leq 0,05$  è emersa una differenza significativa nell'andamento annuale delle UFC Totali/g terreno, mentre non sono risultate significative le differenze tra

le aziende prese in esame e l'interazione tra i due fattori principali. Per quanto riguarda i valori rilevati per le UFC del genere *Fusarium* non sono state rilevate differenze significative in nessuno dei fattori presi in considerazione. Dai risultati riportati in Tabella 24 emerge che nel primo anno il valore di UFC totali per grammo di terreno era maggiore ( $4.90 \cdot 10^4$  UFC/g) rispetto al secondo ed al terzo anno ( $1.66 \cdot 10^4$  UFC/g,  $1.70 \cdot 10^4$  UFC/g). Non è stato possibile evidenziare una differenza tra le aziende in termini di colonizzazione fungina del terreno sia per quanto riguarda il totale delle specie isolate, sia per il dato relativo al solo genere *Fusarium*. Concludendo si potrebbe perciò pensare che sia la presenza di nematodi, che la colonizzazione fungina del terreno non siano fattori preponderanti nello sviluppo della fusariosi in aglio, ma che la contaminazione da parte di questo fungo provenga da altre fonti di inoculo, in particolare dai bulbilli seme.

**Tabella 24** UFC calcolate per grammo di terreno nei 3 anni di analisi nelle 6 aziende oggetto di studio  $P \leq 0,05$ .

Fattori	UFC TOT/g terreno	UFC <i>Fusarium</i> /g terreno
<b>Anno</b>	*	<i>n.s.</i>
1	$9,81 \cdot 10^3$ <i>b</i>	$2,83 \cdot 10^3$
2	$3,32 \cdot 10^3$ <i>a</i>	$1,40 \cdot 10^3$
3	$3,41 \cdot 10^3$ <i>a</i>	$1,45 \cdot 10^3$
<b>Azienda</b>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
1	$7,40 \cdot 10^3$	$3,24 \cdot 10^3$
2	$4,23 \cdot 10^3$	$1,47 \cdot 10^3$
3	$6,29 \cdot 10^3$	$1,64 \cdot 10^3$
4	$6,76 \cdot 10^3$	$2,65 \cdot 10^3$
5	$5,78 \cdot 10^3$	$1,43 \cdot 10^3$
6	$2,61 \cdot 10^3$	$9,27 \cdot 10^2$

## Materiali e metodi delle analisi durante la stagione colturale

### Analisi micologiche da campionamenti effettuati sulla coltura in atto

#### Anno 1

Al fine di seguire l'eziologia della malattia durante il ciclo colturale sono state raccolte 20 piante in 5 punti del campo distribuiti lungo le diagonali ad inizio formazione dei bulbilli (5° foglia) BBCH 15 (13-04-2017), a metà dell'ingrossamento dei bulbilli BBCH 45 (24-05-2017) e a maturazione di raccolta BBCH 49 (26-06-2017).

Le osservazioni dei sintomi hanno permesso di dividere le piante in asintomatiche e sintomatiche. Le piante sintomatiche presentavano le tuniche esterne con venature dal rosa al viola (il carattere se associato a piante asintomatiche è una caratteristica fenotipica accettata nella varietà), lesioni vicino alla corona, segni di marciume sul bulbillo in formazione e/o crescita di bulbi secondari. I sintomi sono stati successivamente divisi in 5 classi di gravità.

Tabella 25) (Figura 6, Figura 7, Figura 8).

**Tabella 25** Classi di gravità utilizzate durante il campionamento.

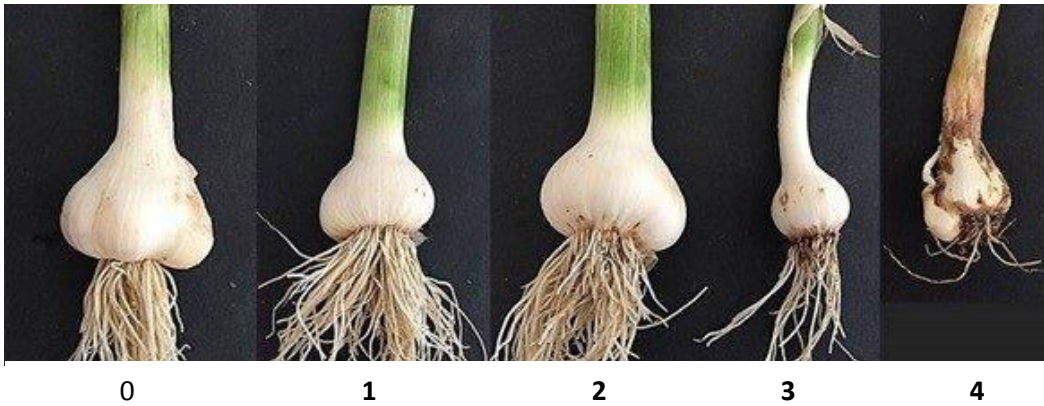
Tipo di sintomo	Classe
Asintomatico	0
Piccole lesioni visibili nella zona della corona	1
Lesioni su metà del perimetro della corona	2
Lesioni sull'intero perimetro della corona e micelio visibile	3
Lesioni molto estese anche sul bulbo, radici secche, corona necrotizzata e in alcuni punti comparsa di micelio bianco	4

Per ciascun sub campione sono state poste in piastra 5 mezze corone asintomatiche e 5 per ogni classe di gravità rilevata. Prima della posa in piastra, i campioni sono stati sottoposti a lavaggio in acqua corrente per 30 minuti, seguito da 3 minuti in ipoclorito all'1% e successivo risciacquo in 3 cambi di acqua sterile; infine, i frammenti sono stati asciugati sotto cappa a flusso laminare. La prima fase dell'isolamento è stata eseguita su substrato Water Agar (WA) ottenuto da 1 L di acqua agarizzata con 20 g/L di agar e successiva aggiunta di 250 ppm di streptomicina solfato in fase di raffreddamento.

Le colonie isolate su WA+streptomicina sono state successivamente trasferite in PDA al fine di procedere per l'identificazione della specie. Ad ogni campionamento 2 colonie di *Fusarium proliferatum* e 2 colonie di *Fusarium oxysporum* per ciascun campo di provenienza sono state sottoposte a purificazione tramite semine monoconidiche al fine di procedere alle conferme molecolari e alla conservazione dei ceppi.



**Figura 6** Piante prelevate durante il 1° campionamento



**Figura 7** Classi di gravità dei sintomi da 0 a 4



**Figura 8** Classe sintomatica 3 e 4 osservate durante il terzo campionamento. Contrassegnato dal cerchio arancione tracce di micelio bianco sulla corona.

### **Misurazione dell'Acqua Libera ( $a_w$ )**

Alla maturazione di raccolta in due punti di campionamento del campo sono state eseguite le misure del valore di acqua libera delle piante. Il campione di analisi è stato costituito prelevando da 5 bulbi di aglio i bulbilli centrali, distribuendoli in modo omogeneo all'interno delle apposite vaschette dello strumento Aqualab Pre (Meter Group Inc., USA); la misurazione è stata ripetuta 3 volte.

### **Anno 2**

Le analisi del secondo anno sono state eseguite seguendo i metodi descritti per l'anno 1. I campionamenti sono stati eseguiti ad inizio formazione dei bulbilli (5° foglia) BBCH 15 (20-04-2018), a metà dell'ingrossamento dei bulbilli BBCH 45 (1-06-2018) e a maturazione di raccolta BBCH 49 (2-07-2018).

### **Anno 3**

Le analisi del terzo anno sono state eseguite seguendo i metodi descritti per l'anno 1. I campionamenti sono stati eseguiti ad inizio formazione dei bulbilli (5° foglia) BBCH 15 (9-04-2019), a metà dell'ingrossamento dei bulbilli BBCH 45 (3-06-2019) e a maturazione di raccolta BBCH 49 (27-06-2019).

Al termine del terzo anno tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti ad ANOVA e i confronti tra le medie sono stati eseguiti con test di Tukey. Il livello di significatività usato nelle analisi statistiche è stato  $P < 0.01$ . L'indice di gravità della malattia/pianta è stato calcolato moltiplicando il numero di piante appartenenti a ciascuna classe per un valore corrispondente al livello di infezione che andava ad interessare la pianta (classe 0=0, classe 1=10, classe 2=35, classe 3=65, classe 4=90) e dividendo il risultato per il numero di piante prelevate in ogni sampling point (20). I dati relativi alla gravità/pianta e all'incidenza delle specie isolate sono stati trasformati in arcoseno per omogenizzare la varianza. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il pacchetto statistico PASW (ver.25, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009).

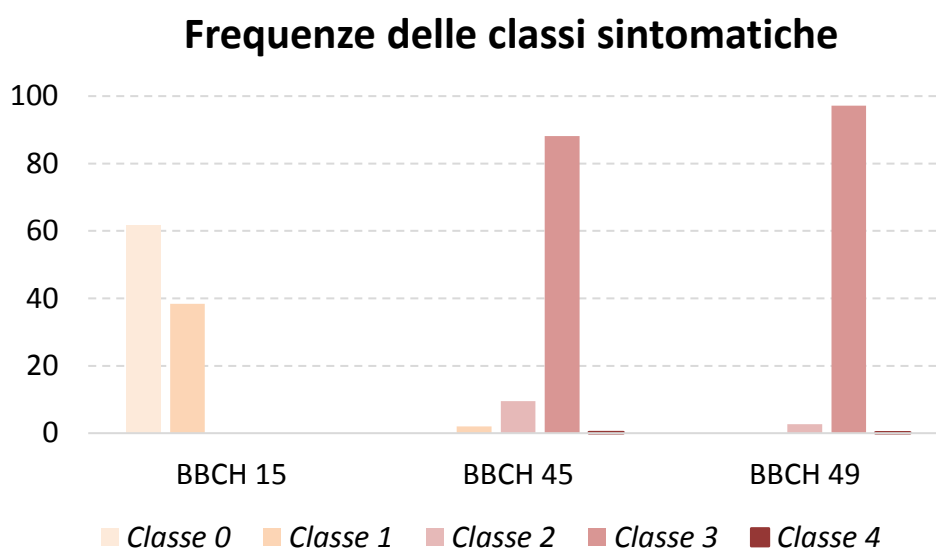
## Risultati delle analisi durante la stagione colturale

### Anno 1

I campionamenti nelle tre fasi fenologiche hanno permesso di calcolare la frequenza di ciascuna classe di gravità e di valutare la progressione della malattia durante la stagione.

Durante il primo campionamento sono stati rilevati bulbi asintomatici e bulbi con sintomi tipici della classe 1. Con prevalenza delle piante asintomatiche (62%) rispetto a quelle sintomatiche (38%).

Come si osserva in Figura 9, la malattia è progredita con l'avanzare della stagione colturale, tanto che, a partire dal secondo campionamento, tutte le piante presentavano lesioni nella zona della corona, ove la maggior frequenza è stata rilevata per la classe 3, mentre le altre classi hanno fatto rilevare bassa frequenza.



**Figura 9** Frequenza delle classi sintomatiche di marciume dell'aglio (.).

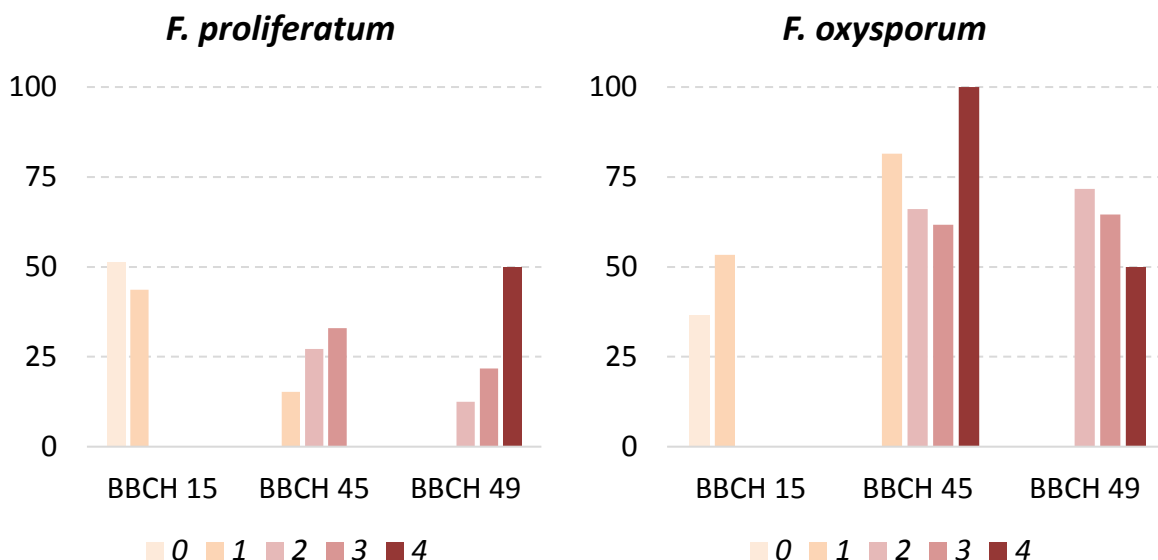
**Tabella 25)** nei 3 campionamenti.

Tutte le specie fungine isolate dalle corone nel corso dei 3 campionamenti sono caratterizzate dalla loro stretta associazione con i suoli.

Si è osservato un netto prevalere delle specie appartenenti al genere *Fusarium* (*F. oxysporum* e *F. proliferatum*) in tutte le classi sintomatiche. In Figura 10 sono riportate le distribuzioni delle due specie sui campioni raccolti nelle tre fasi fenologiche considerate. Inoltre, è stato possibile osservare come nel primo campionamento i due generi nei campioni sintomatici comparissero in maniera pressoché equivalente con un prevalere di *F. oxysporum*. Il dato è stato poi confermato nel secondo e nel terzo campionamento, dove si è osservato il prevalere della specie *F. oxysporum* sulla specie *F. proliferatum* in tutte le classi sintomatiche.



Colonie appartenenti ai generi *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* e *Trichoderma*, sono risultate associate ai campioni analizzati con incidenza sempre inferiore al 10%.



**Figura 10** Distribuzioni delle due specie di *Fusarium* nelle classi sintomatiche alle diverse fasi fenologiche.

Le medie delle misurazioni del contenuto di acqua libera ( $a_w$ ) nei bulbi delle 6 aziende campionate hanno valori compresi tra 0,971 e 0,991 (Tabella 26); tutti i valori sono risultati superiori a 0,90, limite indicato in letteratura per la crescita ottimale della specie *F. proliferatum* su mais e frumento. (Samapundo *et al.*, 2005; Cendoya *et al.*, 2014)

**Tabella 26** Contenuto medio di  $a_w$  nei bulbilli a maturazione di raccolta.

AZIENDA	$a_w$ raccolta
1	0,983
2	0,972
3	0,991
4	0,971
5	0,975
6	0,975

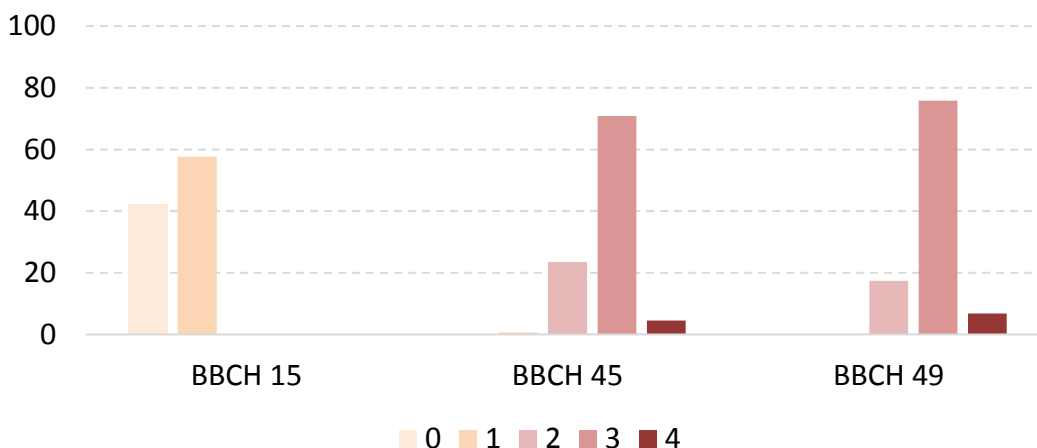
## Anno 2

I campionamenti nelle tre fasi fenologiche hanno permesso di calcolare la frequenza di ciascuna classe di gravità e di valutare la progressione della malattia durante la stagione.

Durante il primo campionamento sono stati rilevati bulbi asintomatici e bulbi con sintomi tipici della classe 1. Con prevalenza delle piante sintomatiche (58%) rispetto a quelle asintomatiche (42%). Il diverso andamento rispetto all'anno precedente potrebbe essere legato alla stagione più piovosa.

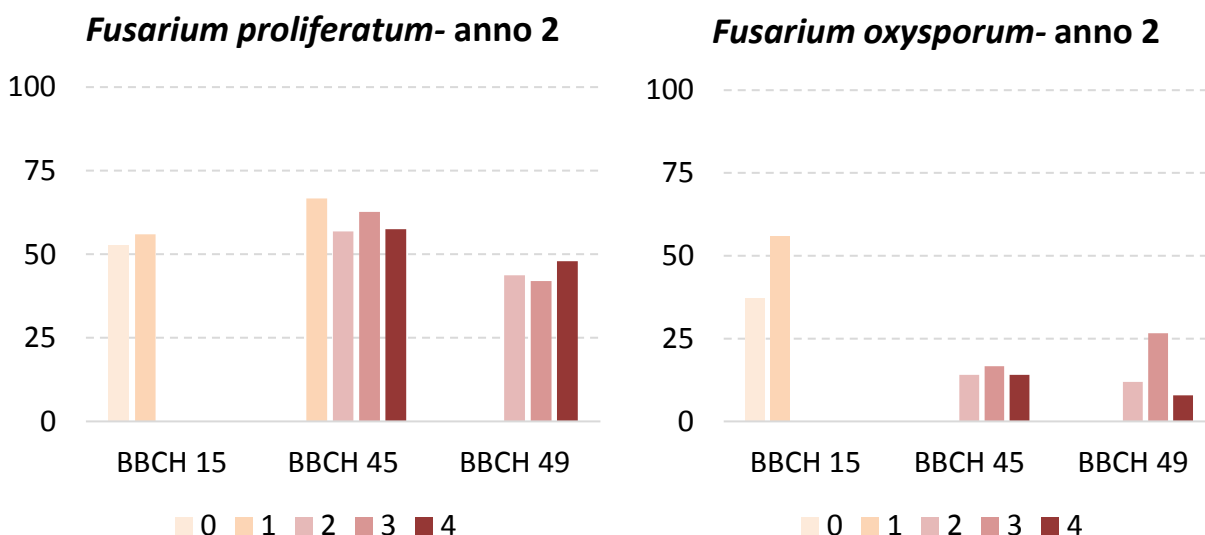
Come si osserva in Figura 11, la malattia è progredita con l'avanzare della stagione colturale, tanto che, a partire dal secondo campionamento, tutte le piante presentavano lesioni nella zona della corona e la maggior frequenza è stata rilevata per la classe 3. A differenza dell'anno precedente, nel corso della stagione l'incidenza della classe 3 è stata inferiore, con una maggiore distribuzione delle piante nelle classi sintomatiche osservate.

### Incidenza classi sintomatiche anno 2



**Figura 11** Frequenza delle classi sintomatiche di marciume dell'aglio (. Tabella 25) nei 3 campionamenti.

Anche nel secondo anno di analisi si è osservato un netto prevalere delle specie appartenenti al genere *Fusarium* (*F. proliferatum* e *F. oxysporum*) in tutte le classi sintomatiche. In Figura 12 sono riportate le distribuzioni delle due specie sui campioni raccolti nelle tre fasi fenologiche considerate. Inoltre, è stato possibile osservare come nel primo campionamento i due generi nei campioni sintomatici comparissero in maniera equivalente. Mentre nel secondo e nel terzo campionamento, dove si è osservato il prevalere della specie *F. proliferatum* sulla specie *F. oxysporum* in tutte le classi sintomatiche. Questo dato è in accordo con gli studi riportati in letteratura, ma in contrasto con quanto osservato nella stagione colturale precedente. Il diverso andamento climatico stagionale potrebbe anche in questo caso aver giocato un ruolo decisivo.



Colonie appartenenti ai generi *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Alternaria* sono risultate associate ai campioni analizzati con incidenza sempre inferiore al 10%.

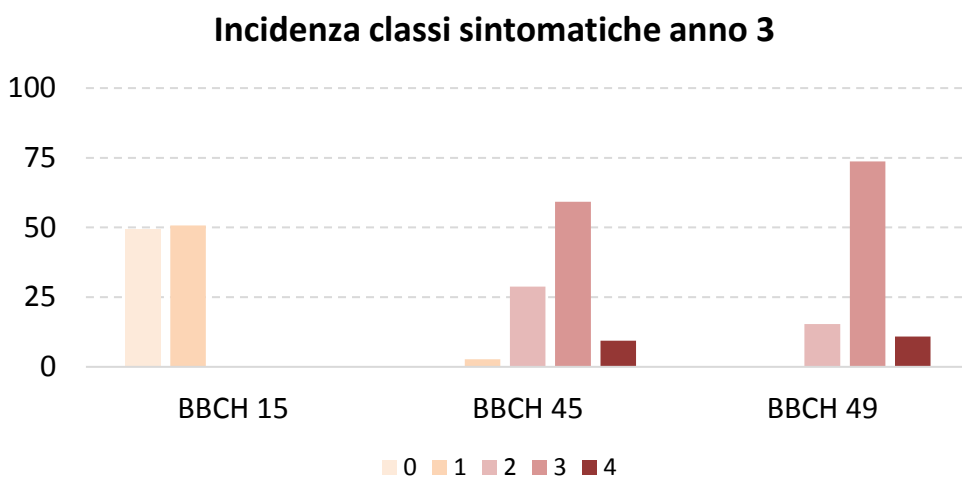
**Figura 12** Distribuzioni delle due specie di *Fusarium* nelle classi sintomatiche alle diverse fasi fenologiche.

### Anno 3

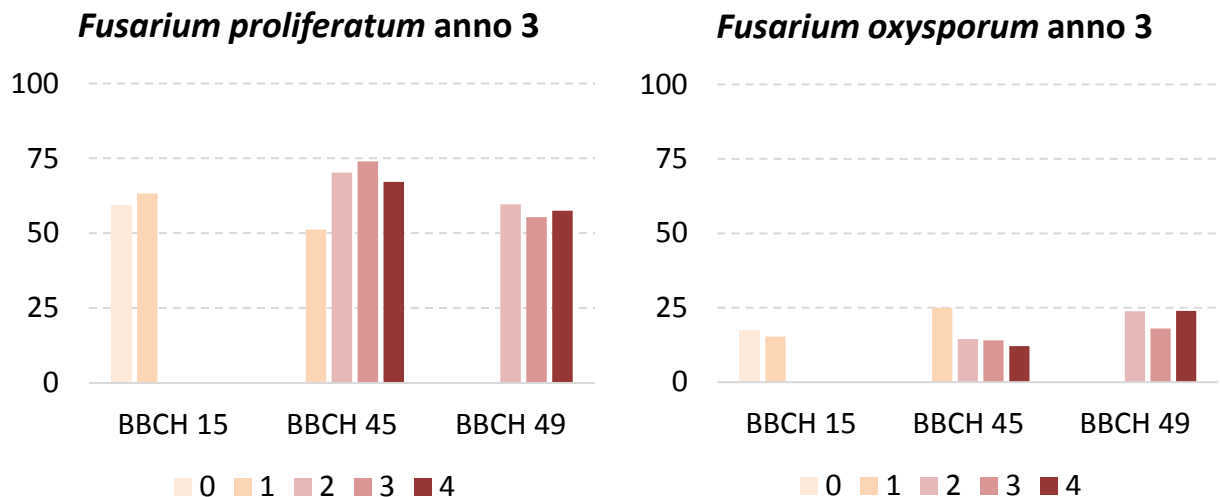
Nel terzo anno di attività i campionamenti sono stati eseguiti in tre fasi fenologiche secondo quanto fatto negli anni precedenti e hanno permesso di calcolare la frequenza di ciascuna classe di gravità e di valutare la progressione della malattia durante la stagione.

Durante il primo campionamento sono stati rilevati bulbi asintomatici e bulbi con sintomi tipici della classe 1 con prevalenza delle piante sintomatiche (51%) rispetto a quelle asintomatiche (49%). In questo anno le due classi sintomatiche erano distribuite in modo equivalente (Figura 13). L'andamento della stagione invernale è stato caratterizzato da temperature superiori alle stagioni precedenti nel periodo di semina, con periodi piovosi nel mese di novembre, che potrebbero aver favorito l'instaurarsi delle infezioni fungine.

Come si osserva in Figura 13, la malattia è progredita con l'avanzare della stagione colturale, tanto che, a partire dal secondo campionamento, tutte le piante presentavano lesioni nella zona della corona e la maggior frequenza è stata rilevata per la classe 3. A differenza degli anni precedenti, nel secondo campionamento il 25 % delle piante ricadeva nella classe di gravità 2, ma prevalevano comunque le piante appartenenti alla classe 3. Anche in questo anno, come nell'anno 2, si è osservata una maggiore distribuzione delle piante nelle classi sintomatiche osservate.



**Figura 13** Frequenza delle classi sintomatiche di marciume dell'aglio (. Tabella 25) nei 3 campionamenti.



**Figura 14** Distribuzioni delle due specie di *Fusarium* nelle classi sintomatiche alle diverse fasi fenologiche.

Nel terzo anno di analisi, come negli anni precedenti, le specie fungine isolate dalle corone appartenevano a generi associati al marciume dell'aglio e a generi che colonizzano i suoli dei nostri areali. Si è osservato un netto prevalere delle specie appartenenti al genere *Fusarium* (*F. proliferatum* e *F. oxysporum*) in tutte le classi sintomatiche. In Figura 14 sono riportate le distribuzioni delle due specie sui campioni raccolti nelle tre fasi fenologiche considerate. A differenza degli anni precedenti è stato possibile osservare un'incidenza più elevata del genere *F. proliferatum* in tutte le epoche di campionamento. Questo dato è in accordo con gli studi riportati in letteratura e le osservazioni eseguite nell'anno 2017-2018, ma in contrasto con quanto osservato nella stagione colturale 2016-2017. Il diverso andamento climatico stagionale potrebbe anche in questo caso aver giocato un ruolo decisivo. Colonie appartenenti ai generi *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Alternaria* sono risultate associate ai campioni analizzati con incidenza sempre inferiore al 10%.

In Tabella 27 sono riportati i livelli di significatività dall'ANOVA. Per quanto riguarda il genere *Fusarium* e la specie *F. proliferatum* tutti i fattori principali e le loro interazioni sono risultati significativi. La specie *F. oxysporum*, invece, non ha riportato differenze statisticamente significative per l'interazione dei tre fattori principali. Il genere *Penicillium* è stato isolato in egual misura in tutte le aziende prese in esame, ma si sono rilevate differenze significative rispetto al fattore tempo e al fattore anno. Infine la Gravità calcolata sulla base dei sintomi osservati sulle piante è risultata significativa per il fattore azienda e il fattore tempo. Non è stato possibile rilevare un'associazione tra il tipo di sintomo osservato durante la classificazione delle piante e l'incidenza delle diverse specie fungine isolate.

Andando ad analizzare nel dettaglio i dati emersi da ciascun fattore principale emergono differenze significative in termini di incidenza delle specie di *Fusarium* nelle aziende oggetto dello studio. L'azienda 3 e 6 nei tre anni di studio hanno registrato la minore incidenza del genere *Fusarium* (63 e 71 %) e delle due specie maggiormente isolate. Le aziende 1, 2 e 4, invece, sono quelle dove è stata rilevata una maggiore incidenza del patogeno durante la stagione colturale (max 85%). Per quanto riguarda il fattore principale anno, si è evidenziata una distribuzione differente delle specie a seconda della stagione colturale analizzata. Per il genere *Fusarium* nel suo complesso il secondo anno di analisi ha fatto registrare valori inferiori rispetto al primo e al terzo (72%), mentre *F. proliferatum* e *F. oxysporum* hanno evidenziato un andamento complementare. Per quanto riguarda il fattore tempo di campionamento, si è osservata una diminuzione dell'incidenza delle specie di *Fusarium* andando verso la maturazione di raccolta con un aumento

dell'incidenza delle specie isolate con minore frequenza (dati non soggetti ad ANOVA). La gravità dei sintomi rilevati sulle piante è risultata del tutto simile nei 3 anni dello studio ed è andata aumentando da inizio stagione colturale alla raccolta (4-63 gravità/pianta). L'azienda 1 e 6 si sono distinte per una minore gravità dei sintomi rilevati sulle corone durante la stagione colturale, mentre le aziende 2 e 3 hanno fatto registrare un indice di gravità per pianta maggiore (44%).

**Tabella 27** ANOVA della gravità della malattia e delle incidenze delle principali specie isolate nei campionamenti di campo nei 3 anni di analisi.

	<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>Penicillium</i>	Gravità /pianta
<b>A Azienda</b>	**	**	**	n.s.	**
1	82,27 <i>c</i>	33,86 <i>b</i>	54,39 <i>bc</i>	1,26 <i>a</i>	40,41 <i>a</i>
2	84,48 <i>c</i>	32,35 <i>b</i>	56,65 <i>bc</i>	0,97 <i>a</i>	42,23 <i>bc</i>
3	62,78 <i>a</i>	16,34 <i>a</i>	47,49 <i>ab</i>	1,76 <i>a</i>	43,39 <i>c</i>
4	84,78 <i>c</i>	31,22 <i>b</i>	62,14 <i>c</i>	2,90 <i>a</i>	43,66 <i>c</i>
5	78,15 <i>bc</i>	34,65 <i>b</i>	50,13 <i>ab</i>	1,74 <i>a</i>	42,74 <i>bc</i>
6	70,68 <i>ab</i>	33,63 <i>b</i>	39,27 <i>a</i>	3,22 <i>a</i>	41,04 <i>ab</i>
<b>B Anno</b>	**	**	**	**	n.s.
Anno 1	80,29 <i>b</i>	57,00 <i>c</i>	33,79 <i>a</i>	3,93 <i>b</i>	43,07
Anno 2	71,53 <i>a</i>	23,96 <i>b</i>	53,57 <i>b</i>	1,79 <i>a</i>	41,89
Anno 3	80,87 <i>b</i>	17,45 <i>a</i>	62,98 <i>c</i>	0,76 <i>a</i>	41,78
<b>C Tempo</b>	**	*	**	**	**
BBCH15	77,61 <i>b</i>	36,00 <i>b</i>	54,39 <i>b</i>	3,92 <i>b</i>	4,89 <i>a</i>
BBCH45	82,45 <i>b</i>	27,33 <i>a</i>	55,68 <i>b</i>	0,79 <i>a</i>	58,91 <i>b</i>
BBCH49	71,44 <i>a</i>	28,38 <i>a</i>	44,87 <i>a</i>	1,41 <i>a</i>	62,94 <i>c</i>
<b>Interazioni</b>					
AxB	**	**	**	*	**
BxC	**	**	**	*	*
AxC	**	**	**	**	**
AxBxC	**		**	*	**

## Materiali metodi delle analisi post raccolta

### Anno 2

Dal conferimento in cooperativa le partite di aglio sono stoccate in cella frigorifera a -4°C e ad umidità costante del 90%. Per analizzare lo sviluppo di sintomi e l'incidenza fungina durante il periodo di conservazione sono stati campionati 100 bulbi per azienda al momento della commercializzazione e 100 dopo 6 mesi di stoccaggio in magazzino (Febbraio 2018). La fase di lavorazione che precede la commercializzazione prevede il taglio della corona, l'eliminazione delle tuniche esterne, dei bulbilli secondari detti "denti" e dell'apparato fogliare. Fa eccezione l'aglio destinato alla produzione delle trecce dove le foglie vengono mantenute per consentire l'intreccio da parte degli operatori.

Ogni campione di 100 teste è stato suddiviso in 5 sub-campioni di 20 piante prelevate casualmente all'interno della partita senza considerare il calibro del bulbo.

Nelle analisi effettuate i cosiddetti "denti" non sono stati considerati, poiché durante la lavorazione vengono scartati. I bulbi in media erano composti da 12 bulbilli e ad essere maggiormente colpiti dalla malattia erano i bulbi di calibro maggiore, con presenza di sintomi sui bulbilli più interni. I sintomi si presentavano prevalentemente come piccole macchie necrotiche, solo pochi evidenziavano sintomi più estesi che interessavano l'intero bulbillo. I bulbilli asintomatici, invece, spesso avevano le tuniche di colore rosato o violaceo. Inoltre, alcune teste presentavano bulbilli svuotati, colpiti dalla mosca dell'aglio (*Suillia univitata*) con presenza di larve e uova.

Le piantine di ogni sub-campione sono state suddivise riferendosi alle 5 classi sintomatiche evidenziate sulla zona della corona durante i campionamenti in campo, per poter avere un confronto con i dati ottenuti in precedenza. Da queste classi i bulbi sono stati divisi in 4 categorie: piante che presentavano solo bulbilli asintomatici (Asintomatiche), piante che presentavano sintomi evidenti sul 25% dei bulbilli (Sintomo 1), piante che presentavano sintomi evidenti su circa metà dei bulbilli (Sintomo 2) e piante che presentavano sintomi su più del 75% dei bulbilli (Sintomo 3). Per ciascun sub-campione della partita sono stati prelevati 10 bulbilli sani e 10 bulbilli con sintomi. In totale sono state posate in piastra 50 porzioni di bulbilli sani e 50 porzioni di bulbilli sintomatici per ciascuna azienda. Inoltre, sono state posate in piastra 5 porzioni di corona per ciascuna classe sintomatica individuata all'interno del sub-campione.

Prima della posa in piastra le corone sono state sottoposte al trattamento di lavaggio e disinfezione descritto nel capitolo "Analisi micologiche da campionamenti effettuati sulla coltura in atto". I bulbilli, invece, sono stati lavati in acqua per 20 minuti, immersi in ipoclorito all' 1% per 1 minuto, risciacquati in acqua sterile e lasciati asciugare per 2 ore in condizioni di sterilità. La posa in piastra e le successive identificazioni sono state svolte come descritto in precedenza nel capitolo "Identificazione delle specie di *Fusarium* isolate".

Al fine di monitorare l'andamento della malattia in riferimento al contenuto di acqua libera ( $a_w$ ) anche nelle fasi di post raccolta, alla consegna del prodotto in magazzino e al momento dei campionamenti dal magazzino (commercializzazione delle partite e dopo 6 mesi di stoccaggio), si è proceduto con il rilievo del valore di acqua libera ( $a_w$ ). I campioni sono stati preparati come descritto in precedenza nel WP 2.1 Analisi durante la stagione colturale.

### **Anno 3**

Le analisi del 2019 sono state eseguite seguendo i metodi descritti per l'anno 2.

I dati relativi agli isolamenti sono stati trasformati in arcoseno per omogenizzare la varianza. Sono stati eseguiti l'ANOVA e i confronti tra le medie con il test di Tukey. Il livello di significatività usato nelle analisi statistiche è stato  $P < 0.01$ . L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il pacchetto statistico PASW (ver.25, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009).

## **Risultati delle analisi di post raccolta**

### **Anno 2**

I campionamenti durante il post raccolta sono stati eseguiti in due tempi: al momento della lavorazione prima della commercializzazione e dopo 6 mesi di stoccaggio delle partite. Ciò ha permesso di calcolare la frequenza delle classi sintomatiche riferite ai sintomi sulla corona, già evidenziati durante la stagione di campo, e ai sintomi sull'intero bulbo.

Per quanto riguarda i sintomi rilevati sulle corone in Figura 15 si nota che nella fase di post raccolta non sono presenti piante appartenenti alla classe 0 e alla classe 1, in accordo con le osservazioni di campo. Inoltre, le piante appartenenti alla classe 4 vengono scartate direttamente in campo, senza raggiungere la fase di stoccaggio.

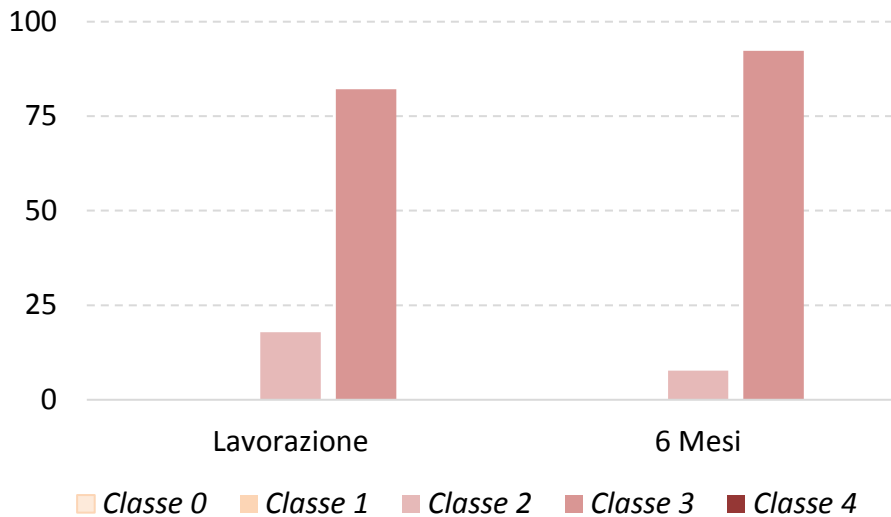
Con riferimento ai sintomi evidenziati sui bulbi, invece, è stato osservato il prevalere di piante che presentavano 1-2 bulbilli sintomatici sull'intera testa in entrambi i tempi di campionamento, mentre i bulbi completamente svuotati dalla fusariosi sono aumentati dal 1% al 5% durante o stoccaggio, evidenziando il progredire della malattia durante la conservazione (Figura 16).

Per quanto riguarda gli isolamenti in piastra è stato osservato un netto prevalere delle specie appartenenti al genere *Fusarium* (*F. proliferatum* e *F. oxysporum*) sia sui bulbi asintomatici che in quelli sintomatici. In Figura 17 è riportata la distribuzione delle due specie per i due tempi di stoccaggio analizzati. Nonostante la presenza di macchie necrotiche sui bulbilli, la frequenza di reisolamento del genere *Fusarium* è stata intorno al 20%. Nel post raccolta comunque si è osservato il prevalere della specie *F. proliferatum* sulla specie *F.*

*oxysporum* in tutte le classi sintomatiche, in accordo con quanto trovato in lavori scientifici eseguiti in precedenza (Figura 17).

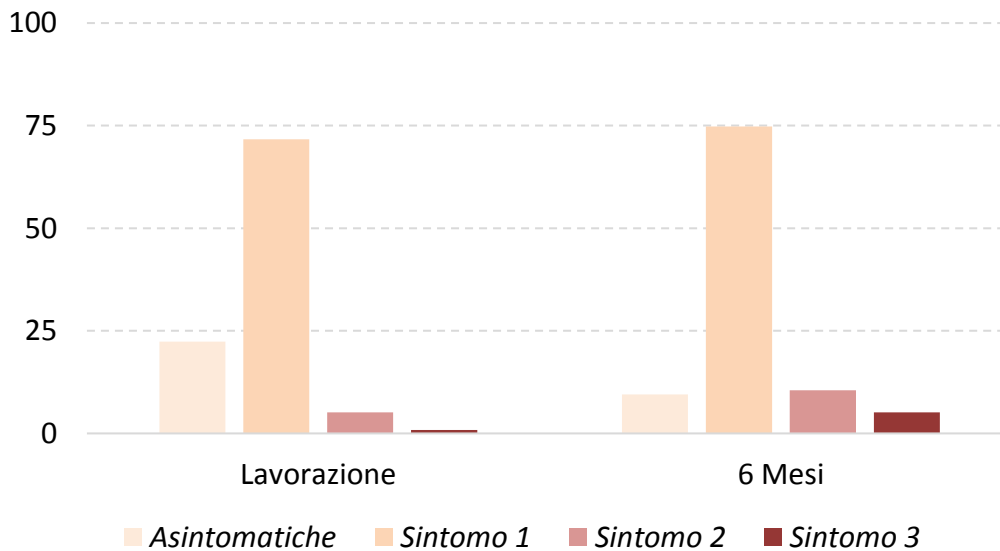
Colonie appartenenti ai generi *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria*, sono risultate sporadicamente associate ai campioni analizzati, con valori medi di incidenza inferiori al 5 %.

### Frequenza classi sintomatiche Corone

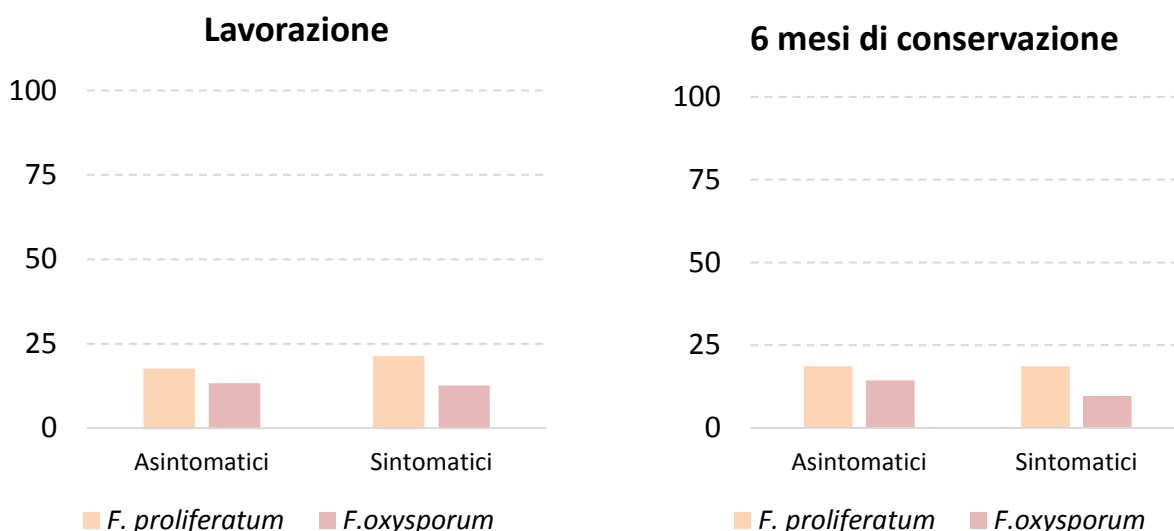


**Figura 15** Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.

### Frequenza classi sintomatiche bulbi



**Figura 16** Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.



**Figura 17** Distribuzioni media delle due specie di *Fusarium* nelle classi sintomatiche dei bulbi durante lo stoccaggio

La misurazione del contenuto di  $a_w$  al momento della consegna in magazzino ha evidenziato in quasi tutte le aziende un netto calo dei valori, come atteso, essendo i bulbi soggetti a processo di essiccazione naturale di circa un mese prima dell'ingresso in cella. Inoltre, sono riportati i dati di  $a_w$  delle sei partite oggetto dello studio dopo sei mesi di stoccaggio. Dai dati in Tabella 28 si nota una ripresa del contenuto di  $a_w$  durante la conservazione. L'andamento di questo dato dipende dal livello di umidità all'interno delle celle frigorifere, che viene mantenuto volutamente intorno al 90% al fine di evitare l'eccessiva disidratazione del prodotto.

**Tabella 28** Contenuto di acqua libera ( $a_w$ ) alla raccolta, al momento della consegna, e dopo 6 mesi di stoccaggio delle partite di aglio oggetto dello studio.

AZIENDA	$a_w$ raccolta	$a_w$ consegna	$a_w$ 6 mesi
1	0,983	0,834	0,901
2	0,972	0,963	0,893
3	0,991	0,637	0,904
4	0,971	0,842	0,893
5	0,975	0,856	0,903
6	0,975	0,692	0,899

### Anno 3

Le piante raccolte nell'estate 2018 sono state campionate durante lo stoccaggio in magazzino in due tempi: al momento della lavorazione prima della commercializzazione e dopo 6 mesi di stoccaggio delle partite (02-2019). Ciò ha permesso di calcolare la frequenza delle classi sintomatiche riferite ai sintomi sulla corona, già evidenziati durante la stagione di campo, e ai sintomi sull'intero bulbo.

Come per l'anno precedente, in Figura 18 si nota che sulle corone nella fase di post raccolta non è stato possibile osservare piante appartenenti alla classe 0 e alla classe 1, in accordo con i rilievi di campo. Inoltre, le piante appartenenti alla classe 4 vengono scartate direttamente in campo, senza raggiungere la fase di stoccaggio. A differenza dell'anno precedente, dopo 6 mesi di stoccaggio in cella l'apparato radicale dei bulbi osservati era maggiormente deteriorato e sono state osservate solo piante appartenenti alla classe sintomatica 3.

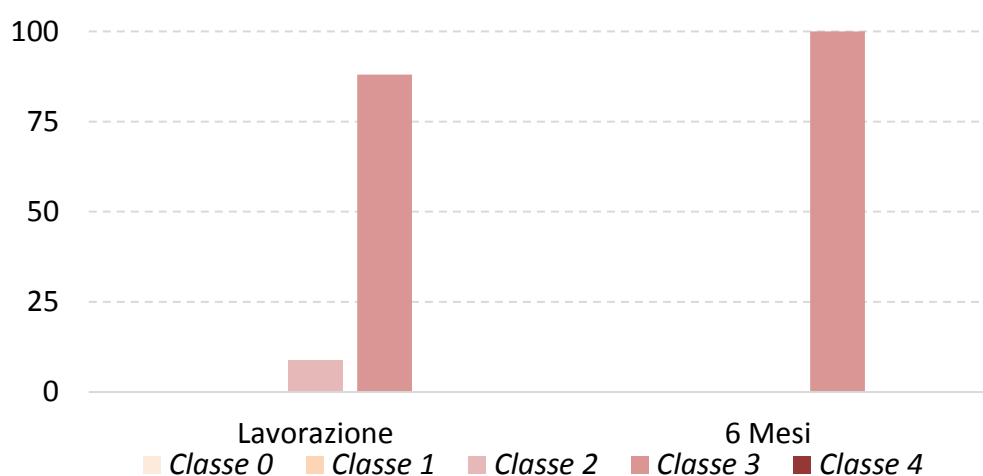


Per quanto riguarda i sintomi evidenziati sui bulbi, invece, si è osservato il prevalere di piante che presentavano 1-2 bulbilli sintomatici sull'intera testa in entrambi i tempi di campionamento, mentre i bulbi completamente svuotati dalla fusariosi sono aumentati dal 1% al 2% durante lo stoccaggio (Figura 19)

Anche nel 2019 dagli isolamenti in piastra è emerso un netto prevalere delle specie appartenenti al genere *Fusarium* (*F. proliferatum* e *F. oxysporum*) sia per i bulbilli asintomatici che per quelli sintomatici. In figura 21 sono riportate le distribuzioni delle due specie per i due tempi di stoccaggio analizzati. La frequenza di reisolamento del genere *Fusarium* è stata maggiore rispetto all'anno precedente per i bulbilli sintomatici (50%). Nel post raccolta si è osservato il prevalere della specie *F. proliferatum* sulla specie *F. oxysporum* in tutte le classi sintomatiche, in accordo con quanto trovato in lavori scientifici eseguiti in precedenza (Figura 20).

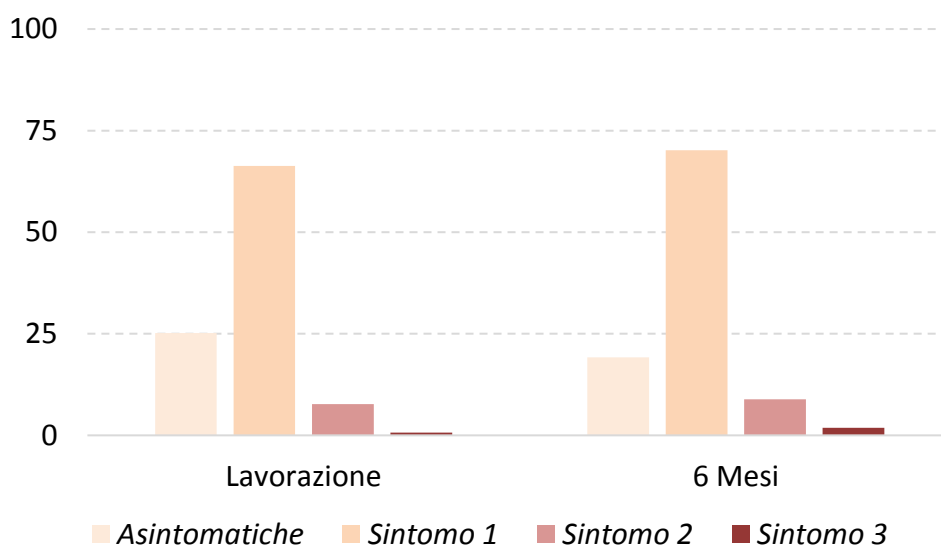
Colonie appartenenti ai generi *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, e *Alternaria*, sono risultate sporadicamente associate ai campioni analizzati con valori medi di incidenza inferiori al 3%.

### Frequenza classi sintomatiche corone 2019

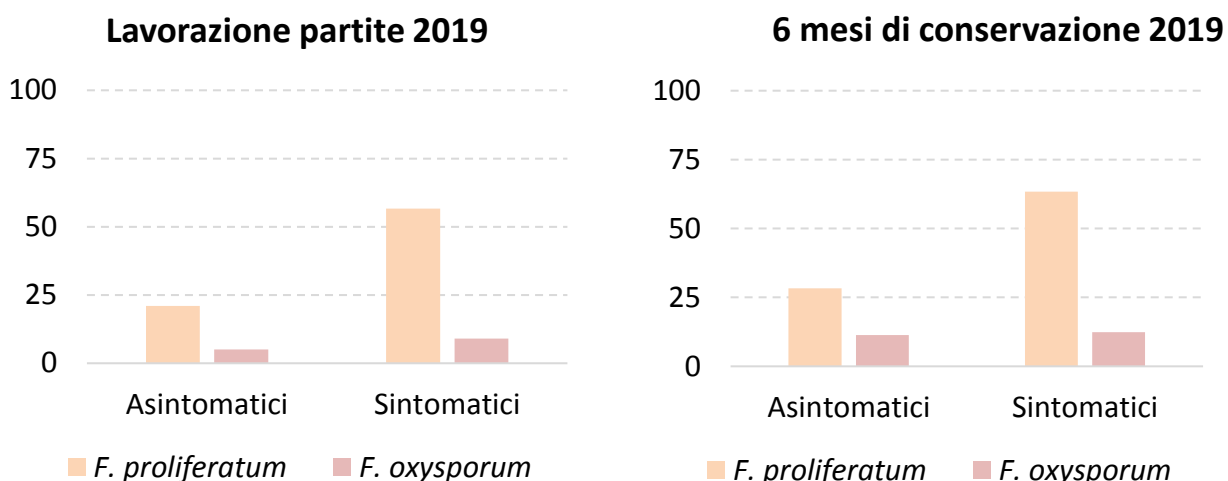


**Figura 18** Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.

### Frequenza classi sintomatiche bulbi 2019



**Figura 19** Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.



**Figura 20** Distribuzioni delle due specie di *Fusarium* nelle classi sintomatiche durante lo stoccaggio 0: asintomatico; 1: sintomatico

La misurazione del contenuto di  $a_w$  al momento della consegna in magazzino ha confermato un netto calo dei valori; infatti, come nella stagione precedente i bulbi sono stati sottoposti a processo di essiccazione naturale di circa un mese prima dell'ingresso in cella. Inoltre, sono riportati i dati dell' $a_w$  delle sei partite oggetto dello studio dopo sei mesi di stoccaggio. Anche nel 2019, come riportato in Tabella 29 si è evidenziata una ripresa del contenuto di  $a_w$  probabilmente dovuto all'umidità mantenuta all'interno delle celle frigorifere.

**Tabella 29** Contenuto di acqua libera ( $a_w$ ) alla raccolta, al momento della consegna, e dopo 6 mesi di stoccaggio delle partite di aglio oggetto dello studio.

AZIENDA	$a_w$ raccolta	$a_w$ consegna	$a_w$ 6 mesi
1	0,977	0,864	0,934
2	0,971	0,790	0,959
3	0,981	0,882	0,963
4	0,976	0,853	0,963
5	0,981	0,887	0,955
6	0,981	0,834	0,948

I dati di gravità/pianta e di incidenza media delle principali specie isolate dalle corone e dai bulbilli durante il periodo di conservazione, nei due anni di analisi, sono stati sottoposti ad ANOVA. Per i fattori principali analizzati sono emerse differenze significative in termini di gravità/pianta, incidenza del genere *Fusarium* e delle relative specie per i fattori azienda e anno, sia per le corone che per i bulbilli. Il fattore tempo di conservazione, non è risultato significativo, confermando la capacità nel contenimento dello sviluppo di *Fusarium* con conservazione a basse temperature in cella di conservazione (-4°C) (Tabella 30, Tabella 31).

Per quanto riguarda la gravità/pianta rilevata sulle corone, l'azienda che ha fatto registrare valori minori è stata la numero 3, mentre quella con gravità maggiore la numero 1. Andando ad analizzare l'incidenza delle specie isolate dalle corone, *F. oxysporum* ha mostrato differenze significative per tutti e tre i principali fattori analizzati. Le aziende 3 e 6 hanno fatto registrare i minori valori di incidenza, mentre le aziende 2 e 4 hanno mostrato incidenza maggiore della specie *F. oxysporum* rispetto alle altre aziende selezionate. *F. proliferatum*, invece, è stato isolato con minore frequenza dalle corone dell'azienda 5, mentre valori di incidenza intorno al 45% sono stati rilevati per le corone dell'azienda 1, 2 e 3. L'andamento degli isolamenti

delle due specie rispecchia quanto osservato in precedenza durante la stagione colturale, mostrando un'inversione di tendenza tra le due annate (Tabella 30).

**Tabella 30** ANOVA delle incidenze dei funghi isolati dalle corone in post raccolta. \*\*\*P ≤ 0,01; \*P ≤ 0,05

		<b>Gravità</b>		<b>Fusarium</b>		<b>F. oxysporum</b>		<b>F. proliferatum</b>		<b>Penicillium</b>
<b>A Azienda</b>		**		**		**		**		<b>n.s.</b>
	1	64,19	c	81,40	c	39,39	ab	45,33	b	0,00
	2	63,60	c	87,88	c	49,04	b	43,58	b	1,33
	3	58,92	a	67,93	ab	26,50	a	44,46	b	0,00
	4	63,78	c	76,44	bc	38,22	ab	40,50	ab	0,74
	5	61,44	b	78,57	c	51,37	b	26,40	a	0,40
	6	63,58	c	62,06	a	28,96	a	34,24	ab	2,33
<b>B Anno</b>		*		**		**		**		<b>n.s.</b>
	2017-2018	62,20	a	73,31	a	56,74	b	22,74	a	0,10
	2018-2019	62,97	b	77,00	b	23,81	a	52,01	b	1,36
<b>C Tempo</b>		**		**		*		<b>n.s.</b>		<b>n.s.</b>
	BBCH49	62,88	b	66,95	a	32,62	a	37,40		1,80
	Lavorazione	61,03	a	83,45	b	43,27	b	39,70		0,00
	6 Mesi	63,85	c	79,70	b	43,94	b	39,70		0,00
<b>Interazioni</b>										
	<b>AxB</b>	**		**		**				
	<b>AxC</b>	**		**		**				
	<b>BxC</b>	**		**		**				
	<b>AxBxC</b>	**				**				

Dalle analisi eseguite sui bulbilli, è stato possibile rilevare differenze significative tra le diverse partite in termini di gravità/pianta. L'azienda 1 è risultata la meno colpita dal marciume secco con valori di gravità/pianta intorno al 12%, mentre l'azienda 6 è stata quella per la quale sono stati rilevati maggiori sintomi sui bulbi (20%). Dai valori di incidenza delle specie isolate sui bulbilli durante la conservazione si è osservato che l'azienda 1 presentava valori di incidenza del genere *Fusarium* e delle due specie di maggiore interesse inferiori alle altre partite prese in esame. *F. proliferatum* è stato anche isolato in egual misura nelle aziende 1, 2, 5, mentre valori di incidenza del 38% sono stati rilevati sui bulbilli provenienti dall'azienda 4. L'azienda 5, però, ha fatto registrare livelli di incidenza della specie *F. oxysporum* maggiori rispetto a tutte le altre aziende analizzate. Nei due anni presi in esame durante lo studio sono stati registrati valori di incidenza maggiori nell'anno 2 rispetto all'anno 1 per la specie *F. proliferatum*, mentre *F. oxysporum* è rimasto costante. Inoltre, *F. proliferatum* è stato isolato maggiormente nei bulbilli sintomatici, rispetto a quelli asintomatici, andando a confermare il suo ruolo primario nello sviluppo del marciume secco durante il post raccolta. (Tabella 31). Bisogna comunque sottolineare che è stato possibile isolare le specie del genere *Fusarium* sia da spicchi asintomatici che da spicchi sintomatici con incidenza sempre maggiore del 10%.

**Tabella 31** ANOVA delle incidenze dei funghi isolati dai bulbilli in post raccolta . \*\*P ≤ 0,01; \*P ≤ 0,05

	<b>Gravità</b>	<b>Fusarium</b>	<b>F. oxysporum</b>	<b>F. proliferatum</b>	<b>Penicillium</b>
<b>A Azienda</b>	**	**	**	**	**
1	12,89 <i>a</i>	32,75 <i>a</i>	5,00 <i>ab</i>	28,00 <i>a</i>	1,75 <i>b</i>
2	15,16 <i>ab</i>	38,50 <i>ab</i>	11,50 <i>b</i>	27,25 <i>a</i>	0,00 <i>a</i>
3	14,50 <i>ab</i>	43,25 <i>b</i>	12,00 <i>b</i>	32,00 <i>ab</i>	0,00 <i>a</i>
4	18,96 <i>cd</i>	48,50 <i>b</i>	10,25 <i>b</i>	38,25 <i>b</i>	0,00 <i>a</i>
5	16,33 <i>bc</i>	48,00 <i>b</i>	20,75 <i>c</i>	26,75 <i>a</i>	0,25 <i>a</i>
6	20,20 <i>d</i>	38,25 <i>ab</i>	4,00 <i>a</i>	34,75 <i>ab</i>	0,50 <i>a</i>
<b>B Anno</b>	*	**	<i>n.s.</i>	**	<i>n.s.</i>
2017-2018	17,30 <i>b</i>	31,33 <i>a</i>	11,75	20,00 <i>a</i>	0,17
2018-2019	15,37 <i>a</i>	51,75 <i>b</i>	9,42	42,33 <i>b</i>	0,67
<b>C Tempo</b>	**	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Lavorazione	14,17 <i>a</i>	43,08	10,83	32,50	0,25
6 Mesi	18,51 <i>b</i>	40,00	10,33	29,83	0,58
<b>D Sintomi</b>		**	<i>n.s.</i>	**	<i>n.s.</i>
Asintomatico		32,50 <i>a</i>	10,83	21,58 <i>a</i>	0,33
Sintomatico		50,58 <i>b</i>	10,33	40,75 <i>b</i>	0,50
<b>Interazioni</b>					
<b>a*b</b>	*	**	**	**	
<b>a*c</b>			*		
<b>a*d</b>					
<b>b*c</b>	**				*
<b>b*d</b>		**		**	
<b>c*d</b>					
<b>a*b*c</b>	**	**	*	*	**
<b>a*b*d</b>					
<b>b*c*d</b>					
<b>a*b*c*d</b>		*			

## Misure del contenuto di $a_w$

Dall'ANOVA eseguita sul contenuto di  $a_w$  all'interno dei bulbi raccolti nelle 6 aziende oggetto di studio, sono emerse differenze significative per i tre fattori principali considerati (azienda, anno e tempo di campionamento). In particolare, è stato osservato che il contenuto di  $a_w$  cala dalla maturazione di raccolta (BBCH49) all'ingresso dei campioni in magazzino, per poi risalire durante la conservazione in cella frigorifera, mantenendo livelli costanti durante lo stoccaggio a temperature controllate (-4°C). Inoltre, sono state osservate differenze tra le diverse aziende oggetto di studio. L'azienda 6 ha fatto registrare i più bassi livelli di  $a_w$ , mentre l'azienda 2 quelli più elevati. Le altre partite analizzate hanno evidenziato livelli di  $a_w$  intermedi. Infine, è stato possibile evidenziare livelli di  $a_w$  minori nell'anno 1 rispetto agli anni 2 e 3 (Tabella 32).

La ripresa del contenuto di  $a_w$  dopo l'ingresso dei campioni all'interno della cella è presumibilmente causata dalla regolazione dell'umidità relativa intorno al 90%. Questo è però un fattore importante da tenere in considerazione, in quanto valori di  $a_w$  superiori a 0.90 sono utili per la crescita del fungo.

**Tabella 32** ANOVA dei valori di acqua libera rilevati a maturazione di raccolta, alla consegna in magazzino, alla lavorazione delle partite e dopo 6 mesi di stoccaggio nelle 6 aziende oggetto di studio.

Fattori	$a_w$	
<b>A Azienda</b>		*
1	0,918	ab
2	0,936	c
3	0,915	ab
4	0,917	ab
5	0,930	bc
6	0,907	a
<b>B Anno</b>		**
1	0,899	a
2	0,933	b
3	0,937	b
<b>C Tempo</b>		**
BBCH49	0,978	c
Consegna al magazzino	0,849	a
Lavorazione	0,936	b
6 mesi di stoccaggio	0,927	b
<b>Interazioni</b>		
AxB		**
AxC		**
BxC		**
AxBxC		**

\*\*P ≤ 0,01; \*P ≤ 0,05

## WP 2.2 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI FUMONISINE

### Attività prevista nel progetto

Questa fase del progetto si prefigge l'obiettivo di individuare la concentrazione di metaboliti secondari di *F. proliferatum*, le fumonisine, ritenuti tra i più dannosi alla specie umana. Le fumonisine sono state riportate in diverse matrici sia in concomitanza con sintomi di infezione da parte del fungo sia in loro assenza.

#### Anno 1.

Al fine di valutare il rischio igienico sanitario dell'aglio, una selezione dei campioni raccolti nel WP2.1 sarà analizzato anche per la presenza di fumonisine, al fine di studiare la dinamica di accumulo della tossina durante il ciclo produttivo e di lavorazione conservazione. Inoltre, nelle partite destinate al consumo, saranno eseguiti campionamenti ad hoc al fine di determinare la contaminazione da fumonisine, sia in campioni

sintomatici che asintomatici. Le analisi verranno condotte su circa 60 campioni con strumentazione HPLC-MS\_MS con rilevatore a fluorescenza (Bertuzzi et al., 2014)

Anno 2.

Nel secondo anno dello studio si procederà al campionamento e alle analisi delle fumonisine come descritto per il primo anno, nonché all'integrazione del data base.

Anno 3.

Nel terzo anno dello studio si procederà al campionamento e alle analisi delle fumonisine come descritto per gli anni precedenti, nonché all'integrazione del data base. Inoltre, si procederà alla stesura di una relazione di sintesi dei dati raccolti nel triennio.

## **WP 2.2 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI FUMONISINE**

### **Materiali e metodi**

#### **Anno 1**

##### **Analisi del contenuto di Fumonisine**

Per l'analisi delle fumonisine è stata utilizzata la strumentazione HPLC-MS\_MS con rilevatore di fluorescenza seguendo il metodo descritto da Bertuzzi *et al.* (2014).

Per ciascuna epoca di campionamento sono stati analizzati 6 campioni, uno per azienda, per un totale di 18 campioni. I campioni, del peso di 100 g, sono stati preparati prelevando 10 piante per ciascuna delle sei aziende. Nel primo campionamento (BBCH 15) i campioni erano costituiti dalle porzioni basali della pianta dalle quali si sarebbero poi originati i bulbilli; mentre nel secondo e nel terzo (BBCH 45, BBCH 49) i campioni sono stati preparati prelevando un egual numero di bulbilli racchiusi nelle tuniche.

I campioni sono stati seccati in stufa a 65°C e macinati fino a ridurli in polvere. 20g di campione sono stati posti in un pallone da 500 ml, con aggiunta di 200 ml di tampone fosfato 0.4 M (pH 7.5) e sono stati posti in agitazione per un'ora per il passaggio di estrazione. 2 ml del filtrato, ottenuto mediante filtro di carta, sono stati caricati su colonnine di immunoaffinità, le quali sono state sottoposte a lavaggio con 2 ml di Tampone Fosfato salino (PBS) ed eluite con 6 ml di CH<sub>3</sub>OH. Successivamente, la quantificazione delle fumonisine è stata eseguita con HPLC liquido/massa (LC/MS).

Inoltre, sono state eseguite analisi sulle partite destinate al consumo trascorsi 6 mesi di stoccaggio. In questo caso i campioni erano costituiti da una aliquota di 20 grammi di prodotto secco ridotto in polvere come descritto in precedenza. Per ogni partita sono stati analizzati sia bulbilli asintomatici, che bulbilli sintomatici in 3 repliche, per un totale di 36 campioni.

#### **Anno 2**

Le analisi del secondo anno sono state eseguite seguendo i metodi descritti per l'anno 1.

#### **Anno 3**

Le analisi del secondo anno sono state eseguite seguendo i metodi descritti per l'anno 1.

## Risultati

### Anno 1

#### Analisi sulle Fumonisine

Le analisi delle fumonisine eseguite sui campioni di campo non hanno evidenziato accumulo di tossina durante la stagione di campo.

Invece, per quanto riguarda le analisi eseguite sui campioni dopo sei mesi di stoccaggio (02/2018) è stato possibile evidenziare un incremento del contenuto di fumonisine.

I campioni sintomatici presentavano un contenuto di fumonisine maggiore rispetto a quelli asintomatici. Il range ottenuto nei campioni asintomatici variava da 28 a 155 ppb; nei campioni sintomatici, invece, il range di valori variava da 96 a 521 ppb. Il dato medio del rapporto tra FB2 e FB1 è stato del 16% (Tabella 33).

**Tabella 33** Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato.

Stoccaggio	Sintomo Bulbo	Aziende					
		1	2	3	4	5	6
		FBs (ppb)					
6 mesi	Asintomatico	39	155	12	28	28	96
6 mesi	Sintomatico	126	96	146	394	102	521
		UR					
6 mesi	Asintomatico	62,88	60,80	59,16	60,41	63,28	60,59
6 mesi	Sintomatico	62,40	61,98	63,02	61,41	62,91	62,28

### Anno 2

Per quanto riguarda i campioni relativi alla stagione colturale 2018-2019 non si è quasi mai rilevata la presenza di fumonisine nei campioni provenienti dal campo. Come si può osservare in Tabella 34 fa eccezione solo il campione della prima fase fenologica dell'azienda Merli con un valore di 23 ppb.

**Tabella 34** Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato.

Fase fenologica	Sintomo Bulbo	Aziende					
		1	2	3	4	5	6
		FBs (ppb)					
BBCH 15	Asintomatico	0	23	0	0	0	0
BBCH 45	Asintomatico	0	0	0	0	0	0
BBCH 49	Asintomatico	0	0	0	0	0	0
		UR					
BBCH 15	Asintomatico	89,02	88,18	85,90	87,87	89,72	76,39
BBCH 45	Asintomatico	70,87	77,48	73,57	78,75	78,26	75,79
BBCH 49	Asintomatico	61,38	63,92	62,56	71,14	63,99	65,59

Le analisi eseguite sui campioni dopo sei mesi di stoccaggio (02/2019) hanno evidenziato un aumento del contenuto di fumonisine sia in campioni asintomatici che i campioni sintomatici.



Nei campioni sintomatici è stato possibile evidenziare un contenuto di fumonisine maggiore rispetto a quelli asintomatici. Il range ottenuto in assenza di sintomi variava da 2 a 108 ppb; mentre in presenza di sintomi il range di valori variava da 76 a 1784 ppb. Il dato medio del rapporto tra FB2 e FB1 è stato del 9% (Tabella 35).

**Tabella 35** Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato.

Stoccaggio	Sintomo Bulbo	Aziende					
		1	2	3	4	5	6
		<b>FBs (ppb)</b>					
6 mesi	Asintomatico	1,7	12,5	6,4	108,5	31,2	12,1
6 mesi	Sintomatico	1783,6	804,3	75,8	509,3	141,9	159,3
		<b>UR</b>					
6 mesi	Asintomatico	48,0	50,5	49,4	50,3	52,7	50,6
6 mesi	Sintomatico	48,5	56,2	46,2	47,8	44,7	45,0

### Anno 3

Nel terzo anno di analisi, durante la stagione colturale 2018-2019 non si rilevata presenza di fumonisine, come si può osservare in Tabella 36.

**Tabella 36** Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato.

Fase fenologica	Sintomo Bulbo	Aziende					
		1	2	3	4	5	6
		<b>FBs (ppb)</b>					
BBCH 15	Asintomatico	0	0	0	0	0	0
BBCH 45	Asintomatico	0	0	0	0	0	0
BBCH 49	Asintomatico	0	0	0	0	0	0
		<b>UR</b>					
BBCH 15	Asintomatico	80,8	80,3	80,5	80,4	79,6	80,2
BBCH 45	Asintomatico	67,9	70,0	67,4	68,5	69,8	73,3
BBCH 49	Asintomatico	60,7	62,5	57,8	58,4	55,5	58,0

## Attività prevista nel progetto

### WP 3.1 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI FUNGICIDI E DI ANTAGONISTI NATURALI

**Anno 1. Prove in vitro.** Nel primo anno di attività, si procederà alla valutazione preliminare in vitro di alcune sostanze attive sia di sintesi, sia a base di antagonisti microbici anche di recente introduzione, da impiegare i) nella concia dei bulbilli da seme ed eventualmente, in base ai risultati ottenuti, anche per trattamenti in campo o ii) per la sanificazione degli ambienti.

Allo scopo, le specie appartenenti al genere *Fusarium*, in particolare *F. proliferatum* e quelle associate in modo ricorrente al marciume, in base ai risultati del progetto, verranno allevate su substrato avvelenato, considerando alcune concentrazioni (da 3 a 6) di prodotto, addizionato ai terreni di coltura. Saranno considerati almeno 6 prodotti e almeno 3 specie fungine, incluso *F. proliferatum*. Le prove saranno eseguite in condizioni ecologiche che riproducano quelle in cui i funghi si possono trovare in pieno campo. Sarà eseguito un idoneo numero di ripetizioni (almeno 3) per garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti.

#### **Anno 2.**

*Prove in vitro.* Nel secondo anno del progetto, si procederà con il completamento di eventuali prove in vitro. Queste prove riguarderanno in particolare eventuali specie di *Fusarium* non considerate, ma evidenziate come rilevanti, o eventuali nuove sostanze attive.

*Trattamento dei bulbilli in presemina.* I risultati ottenuti in vitro saranno impiegati per la preparazione di soluzioni a diversa concentrazione per trattamenti di concia dei bulbilli selezionati per la semina. Le soluzioni così preparate verranno impiegate allestendo per la semina in azienda, un campo sperimentale a blocchi randomizzati con 4 repliche per ciascuna tesi a confronto.

In ciascuna parcella si procederà alla raccolta di campioni di 20 piante e alla stima del marciume secondo quanto descritto nel WP2.1.

*Sanificazione degli ambienti.* Sulla base dei risultati ottenuti in vitro, verranno impiegati composti o miscele di composti a varie concentrazioni per la sanificazione degli ambienti di stoccaggio/lavorazione dei bulbi. In particolare, verranno scelte 3 magazzini Co.P.A.P. nei quali saranno eseguite prove alle quali seguiranno i monitoraggi, come descritto nel WP1.2, al fine di valutare l'efficacia.

#### **Anno 3.**

*Prove in vitro.* Nel terzo anno del progetto, si procederà con ulteriori prove in vitro solo nel caso in cui siano intervenuti nuovi elementi che suggeriscano ulteriori approfondimenti.

*Trattamento dei bulbilli in campo.* Nel terzo anno del progetto saranno ripetute le prove in campo secondo l'approccio seguito nel primo anno.

*Sanificazione degli ambienti.* Nel terzo anno del progetto saranno ripetute le prove in campo secondo l'approccio seguito nel primo anno.

*Relazione finale, definizione dei possibili mezzi preventivi/di sanificazione.* Al termine del triennio di prove, i risultati ottenuti in vitro e nelle prove di trattamento ai bulbilli e agli ambienti, saranno oggetto di elaborazione statistica e successivamente discussi in una relazione conclusiva che evidenzierà l'efficacia delle sostanze attive testate, in particolare quanto utilizzate nella filiera produttiva. Inoltre, saranno definite ne saranno definite le modalità di applicazione.

## WP 3 INTERVENTI DI CONTROLLO E SANITAZIONE

### WP 3.1 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI FUNGICIDI E DI ANTAGONISTI NATURALI

#### Materiali e Metodi

##### Anno 1

##### Prove *in vitro* con antagonisti naturali.

Per verificare quale antagonista naturale fosse più efficace contro il patogeno *Fusarium proliferatum* si è deciso di intraprendere una prova di coltura duale a 3 diverse temperature (10°C-15°C-25°C). Le tre temperature sono state scelte perché rappresentative delle temperature del terreno durante il ciclo dell'aglio, dalla semina alla raccolta. Per ciascuna tesi sono state eseguite 6 repliche utilizzando come substrato di crescita Potato Dextrose Agar (PDA). I rilievi sono stati eseguiti a 7, 14 e 21 giorni misurando il raggio di crescita del patogeno in direzione dell'antagonista e il raggio del controllo.

Gli antagonisti sono stati scelti in modo da differenziare il più possibile i meccanismi di antagonismo da analizzare. Per questo motivo sono stati presi in considerazione *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseoviridis*, *Trichoderma* spp e *Fusarium oxysporum*, nei rispettivi formulati commerciali riportati in Tabella 37.

*Bacillus subtilis* è riportato in letteratura per la capacità di produrre un'ampia varietà di composti attivi contro i patogeni delle piante ed di indurre nelle stesse risposte sistemiche contro il patogeno (Stein et al., 2005). *Streptomyces griseoviridis*, invece, è in grado di: produrre enzimi che idrolizzano le pareti cellulari del fungo, di produrre antibiotici e di stimolare nelle piante resistenze sistemiche ai patogeni (Zhao et al., 2013). Gli antagonisti fungini, *Trichoderma* spp e *Fusarium oxysporum*, utilizzano meccanismi di competizione per i nutrienti e per lo spazio, andando anche a parassitizzare il patogeno (Kubickek C.P. et al., 2001; Postma J. et al., 1992).

**Tabella 37** Formulati commerciali utilizzati nella prova di antagonismo

PRODOTTI	PRINCIPIO ATTIVO	PRODUTTORE
IF23	<i>F. oxysporum</i> IF23 (1*10 <sup>7</sup> UFC/g)	Xeda Italia, Forlì, Italy
Patriot dry	<i>Trichoderma</i> spp. (3*10 <sup>7</sup> UFC/g)	Isagro, Milan, Italy
Serenade Max	<i>Bacillus subtilis</i> (5.13*10 <sup>10</sup> UFC/g)	Bayer Crop Science, Milan, Italy
Mycostop	<i>Streptomyces</i> K61 (5*10 <sup>8</sup> UFC/g)	Verdera Oy, Kurjenkellontie, Finland

L'isolato di *F. proliferatum* utilizzato per la prova è stato ottenuto da bulbi infetti durante il periodo di conservazione, seguendo la tecnica di isolamento e riconoscimento precedentemente descritta nel capitolo "Identificazione delle specie di *Fusarium* isolate".

Le colture duali antagonista/patogeno sono state allestite ponendo in piastra due dischetti di 5 mm di diametro provenienti uno da una colonia dell'antagonista di 7 giorni (*Trichoderma* spp. e *F. oxysporum*) e l'altro da una colonia di 5 giorni del patogeno *F. proliferatum*. L'inoculo è stato eseguito ponendoli ai poli opposti di una piastra da 90 mm contenete Potato Dextrose Agar (PDA) a circa 20 mm di distanza dal bordo. (Kavitha e Nelson, 2013)

Per gli antagonisti batterici, invece, 40 µl di sospensione cellulare (1g di prodotto in 10 ml di acqua sterile) sono stati inoculati con una ansa da 10 µl in 4 linee su metà della superficie di una piastra Petri da 90 mm di diametro. Dopo 5 giorni a 25 °C, un dischetto da 5mm di diametro proveniente dal margine di una colonia di 5 giorni di *F. proliferatum* è stato inoculato a 30 mm di distanza sul lato opposto della piastra (Sangdee et al., 2016). Il controllo è stato preparato inoculando centralmente il patogeno in piastre Petri di PDA da 90 mm, incubate poi alle stesse temperature e tempi descritti in precedenza.

Per poter mettere a confronto l'efficacia dei diversi antagonisti si è scelto di calcolare la riduzione % della crescita rispetto alla crescita del solo patogeno in piastra secondo la formula (Sangdee *et al.*, 2016):

$$PGI (\%) = KR-R1/KR \times 100$$

PGI: Percentage of Growth Reduction

KR: raggio di crescita del fungo nel controllo (cm)

R1: raggio di crescita del fungo nella direzione dell'antagonista (cm)

### Prove *in vitro* con fungicidi

Allo scopo di verificarne l'efficacia per un possibile utilizzo durante nella concia dei bulbilli da seme, è stata allestita una prova *in vitro* con fungicidi. La scelta è ricaduta sulla famiglia dei triazoli che, secondo le attuali conoscenze e gli usi in altre realtà produttive, sono sostanze attive note per l'efficacia contro il genere *Fusarium*.

La prova *in vitro* è stata eseguita secondo i materiali e metodi riportati da Galvez Patòn *et al.* (2017). Nella prova è stato utilizzato PDA, ottenuto da brodo di patata (200g patate/L di acqua) agarizzato con 15g/L di agar, con aggiunta di 10g/L di destrosio, ammendato con fungicidi a diverse concentrazioni. Si è inoculato al centro di una piastra di 90 mm di diametro un tassello di 5 mm di diametro prelevato da una colonia di *Fusarium proliferatum* di 7 giorni di età, ottenuto a partire da bulbilli sintomatici come descritto in precedenza.

Inizialmente, sono stati presi in considerazione 6 formulati commerciali contenenti Tebuconazolo e Propiconazolo ed alcune loro miscele, i prodotti sono riportati in Tabella 38.

Per ciascun prodotto sono state valutate 4 concentrazioni (1, 10, 100, 1000 ppm) e tre diverse temperature (10°-15°-25°C) in 4 replicati. Dopo l'incubazione sono stati eseguiti i rilievi del raggio della coltura a 7, 14 e 21 giorni.

Il controllo era costituito da piastre Petri di PDA da 90 mm inoculate centralmente con il patogeno e incubate secondo le temperature e tempi descritti in precedenza.

Per poter mettere a confronto l'efficacia dei diversi prodotti si è scelto di calcolare la riduzione % della crescita rispetto alla crescita del solo patogeno in piastra secondo la formula riportata da Sangdee *et al.*, 2016.

Tabella 38 **Prodotti commerciali utilizzati durante la prova *in vitro***

PRODOTTO	SOSTANZE ATTIVE	PRODUTTORE
OPINION ECNA	Propiconazolo 250 g/L	ADAMA Italia, Grassobio, Italy
MYSTIC 430SC	Tebuconazolo 250g/L	Nufarm Italia, Bologna, Italy
CUSTODIA	Tebuconazolo 200 g/L+ Azoxystrobin 120 g/L	ADAMA Italia, Grassobio, Italy
LUNA EXPERIENCE	Fluopyram 200 g/L+ Tebuconazolo 200 g/L	Bayer Crop Science, Milano, Italy
QUILT XCEL	Propiconazolo 122,4 g/L+ Azoxystrobin 141,4 g/L	Syngenta Italia, Milano, Italy
BUMPER P	Propiconazolo 90 g/L+ Procloraz 400 g/L	ADAMA Italia, Grassobio, Italy

## Anno 2

### Prove *in vitro* con antagonisti naturali e fungicidi

Nel secondo anno di attività sono state eseguite ulteriori prove *in vitro* con 3 isolati di *Fusarium* (*Fusarium proliferatum* MPVPG29, *F. oxysporum* MPVPG152, *F. proliferatum* ITEM7595). I primi due isolati durante la stagione colturale, il terzo un isolato proveniente dalla micoteca ufficiale dell'ISPA di Bari. La prova è stata replicata utilizzando i materiali e metodi eseguiti nell'anno 1. Le analisi statistiche sono state eseguite con il

pacchetto PASW statistics (ver.19, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009). I dati sono stati analizzati mediante ANOVA. Le medie sono state comparate con il test di Tukey.

### **Prove *in vitro* con detergenti e disinfettanti**

Allo scopo di verificare l'efficacia di prodotti di pulizia contenenti diversi principi attivi è stata allestita una prova *in vitro* con 3 prodotti: Sirpav Sanitech a base di ammoniaca, D50 a base di acido peracetico e perossido di idrogeno, e Ipoclorito al 5%.

La prova è stata eseguita su terreno avvelenato (PDA addizionato dei prodotti sopra elencati), in 4 repliche. Le piastre di 90 mm di diametro sono state inoculate centralmente con un tassello di 5 mm di diametro prelevato da una colonia di *Fusarium proliferatum* (MPVPG29) di 7 giorni di età. Il controllo era costituito da una piastra di PDA inoculata centralmente dal medesimo fungo. Le piastre sono state incubate a 25°C. Ogni prodotto è stato testato alle concentrazioni: 0,3%, 0,5 % e 1%.

L'efficacia dei prodotti è stata calcolata in base alla riduzione percentuale della crescita delle colonie trattate rispetto al controllo (PGI).

Le misure sono state registrate a 3, 4 e 7 giorni dall'inizio dell'incubazione.

L'ANOVA di PGI a 7 giorni è stata condotta utilizzando il pacchetto statistico PASW statistics (ver.19, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009). I contrasti tra le medie sono stati eseguiti con il test di Tukey.

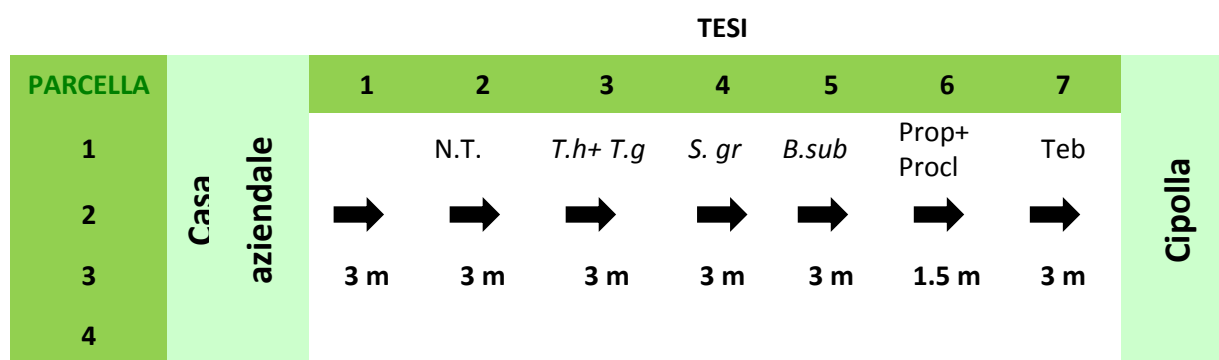
### **Prova di campo**

Allo scopo di fornire dati oggettivi sull'impegno di prodotti concianti utili per il controllo della malattia, il 7 Novembre 2017 è stato allestito un campo sperimentale ubicato nel comune di San Pietro in Cerro (45°01'00.5"N 9°56'55.5"E). Dopo le prove condotte *in vitro* sono stati scelti 5 prodotti commerciali: 3 antagonisti naturali (Patriot Dry®, Serenade Max®, Mycostop®) e 2 prodotti chimici (Bumper P®, Mystic 430 SC®)(Tabella 39), risultati tra i più efficaci. Le specifiche dei prodotti impiegati sono riportate in tabella 15. Nel disegno sperimentale sono state considerati 5 trattamenti e 2 controlli (non trattato e trattamento aziendale con promotore di crescita a base di *Trichoderma* e *B.subtilis*) con 4 ripetizioni ciascuna. Per ciascun trattamento sono state testate le dosi di impiego riportate in etichetta (Figura 21).

La valutazione della gravità dei sintomi sulle piante e gli isolamenti delle specie fungine presenti durante la stagione colturale sono stati seguiti i materiali e metodi riportati nel WP 2.1. Nelle tre fasi fenologiche (BBCH15, BBCH45, BBCH49) sono state campionate 20 piante per tesi distribuite in 4 parcelle individuate all'interno del campo prova. Per ciascuna pianta si è proceduto all'osservazione dei sintomi presenti sulla corona e alla loro classificazione secondo la scala di gravità riportata in precedenza nel WP 2.1. Per ciascuna tesi sono state posate in piastre di WA 20 porzioni di corona mantenendo separate tra loro le classi sintomatiche rilevate e i punti di campionamento. Prima della posa in piastra le porzioni di corona sono state lavate in acqua corrente per 20 minuti, disinfettate in ipoclorito 1% per 3 minuti, sciacquate in 3 ricambi di acqua sterile e lasciate asciugare sotto cappa a flusso laminare per 12 ore. Le piastre sono state incubate a 25°C per 5 giorni e le colonie emerse sono state trasferite su PDA per la successiva identificazione morfologica con microscopio ottico Leitz Labor, come descritto in precedenza nel WP2.1. In occasione del terzo campionamento e del conferimento della partita in magazzino si è proceduto alla misurazione del contenuto di  $a_w$  nelle teste di aglio delle diverse tesi. Per ciascuna tesi il campione di analisi è stato costituito prelevando da due parcelle 5 bulbi di aglio. I bulbilli centrali, sono stati distribuiti in modo omogeneo all'interno delle apposite vaschette dello strumento Aqualab Pre (Meter Group Inc., USA); la misurazione è stata ripetuta 3 volte.

**Tabella 39** Prodotti impiegati nella prova di concia dei bulbilli in campo.

PRODOTTO	PRINCIPIO ATTIVO	PRODUTTORE	DOSE DI ETICHETTA
MYSTIC 430SC	Tebuconazolo 250g/L	Nufarm Italia, Bologna, Italy	580 (ml/ha)
BUMPER P	Propiconazolo 90 g/L+ Procloraz 400 g/L	ADAMA Italia, Grassobio, Italy	1100 (ml/ha)
Patriot Dry	<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>T. gamsii</i> (3*10 <sup>7</sup> UFC/g)	Isagro, Milano, Italy	10 g /L+ 250 g/1000m <sup>2</sup>
Serenade Max	<i>Bacillus subtilis</i> (5.13*10 <sup>10</sup> UFC/g)	Bayer Crop Science, Milano, Italy	2.5 kg /500 L
Mycostop	<i>Streptomyces</i> K61 (5*10 <sup>8</sup> UFC/g)	Verdera Oy, Kurjenkellontie, Finland	1 g/10 L o 100 g/100 L



**Figura 21** Schema prova di concia dei bulbilli e foto aerea dell'area. N.T. = non trattato, T.h+T.g= *Trichoderma harzianum e gamsii*- Patriot Dry®, St. gr= *Streptomyces griseoviridis* -Mycostop®, B.sub= *Bacillus subtilis*-Serenade Max®, Prop+Procl= Propiconazolo+Procloraz-Bumper P®, Teb= Tebuconazolo-Mystic 430 SC®

### **Anno 3**

#### **Prova in vaso**

Allo scopo di verificare l'efficacia dei prodotti utilizzati nella prova di campo nelle prime fasi del ciclo vegetativo è stata allestita una prova di concia in vaso. La scelta dei prodotti è stata basata sui risultati ottenuti precedentemente *in vitro*. Quindi, cinque principi attivi, 2 chimici (Propiconazolo+Procloraz e Tebuconazolo) e tre BCAs (*T. harzianum*+ *T. gamsii.*, *B. subtilis*, *S. griseoviridis*), sono stati testati nell'esperimento.

I bulbilli di aglio utilizzati nello studio sono stati seminati in vasi di plastica (14x14x16 cm) contenuti torba e terreno argilloso pastorizzato in rapporto 2:1. Prima della semina i bulbilli sono stati lavati per 20 minuti in acqua corrente, disinfettati per 3 minuti in ipoclorito all' 1% e sciacquati in acqua sterile per 3 volte. L'applicazione dei prodotti di concia è stata eseguita lasciando i bulbilli per 15 minuti in immersione nelle soluzioni a concentrazione di etichetta dei prodotti sopracitati. Infine, i bulbilli sono stati inoculati con 3 diversi isolati di *Fusarium*: *F. oxysporum* MPVPG152 (FO), *F. proliferatum* MPVPG29 (FP1), e *F. proliferatum* ITEM7595 (FP2). I ceppi MPVP sono stati isolati da aglio nel corso del PSR e sono conservati nella collezione dell'istituto DIPROVES dell'Università Cattolica, mentre il ceppo ITEM proviene dalla collezione dell'ISPA-CNR di Bari ed è stato isolato da mais. L'inoculo dei bulbilli è stato eseguito per immersione in sospensione conidica a concentrazione 10<sup>5</sup> conidi/ml per i 3 isolati presi in considerazione.

Per ciascuna tesi sono stati seminati 8 bulbilli per vaso in 4 repliche (in totale 36 bulbilli). I principi attivi sono stati provati in combinazione con gli isolati fungini in modo che ciascun trattamento fosse la combinazione di un principio attivo e un ceppo di *Fusarium*. I controlli erano costituiti da bulbilli non inoculati e non trattati con nessun conciante e da bulbilli seminati dopo l'operazione di inoculo, ma senza ricevere trattamenti di concia.

I vasi sono stati lasciati all'aperto in condizioni ambientali dal 2 di Ottobre 2018 al 7 Gennaio 2019, seguendo un disegno sperimentale randomizzato. I dati metereologici sono stati raccolti su base giornaliera dalla capannina meteo situata presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza. I parametri analizzati sono stati: temperatura (°C), umidità relativa e pioggia (mm).

Alla fine della prova le piante sono state classificate in 7 classi di gravità secondo i sintomi dati da *Fusarium* (0= asintomatiche; 1=piccole macchie brune sul bulbillo, sulla corona o sulle radici; 2=piccole macchie brune su 2 degli organi considerati, 3= piccole macchie brune sui tre organi considerati; 4= estese macchie brune sul bulbillo, sulla corona o sulle radici; 5= estese macchie brune su 2 degli organi considerati; 6= estese macchie brune sui tre organi considerati; Figura 22) ed è stata misurata la lunghezza delle radici.



**Figura 22** Classi di gravità utilizzate durante il rilievo dei sintomi della prova di concia in vaso. 0=asintomatiche; 1=piccole lesioni sul bulbillo, sulla corona o sulle radici; 2=piccole lesioni su 2 degli organi considerati, 3= piccole lesioni sui tre organi considerati; 4= estese lesioni sul bulbillo, sulla corona o sulle radici; 5= estese lesioni su 2 degli organi considerati; 6= estese lesioni sui tre organi considerati.

### Prova di campo

In data 19 Ottobre 2018 è stato allestito un campo sperimentale ubicato nel comune di San Pietro in Cerro (45°00'85.91"N 9°94'50,58"E) seguendo lo schema adottato nell'anno 2. Sono stati utilizzati i medesimi prodotti e le medesime concentrazioni impiegate l'anno precedente.

Inoltre, le piante raccolte a luglio 2018 sono state campionate in 4 tempi lungo il periodo di conservazione in cella a -4°C per valutare i possibili effetti residuali del trattamento di concia eseguito prima della semina. Le piante sono state valutate nelle date 24 Ottobre 2018, 31 Gennaio 2019, 14 Maggio 2019 e 31 Maggio 2019. Le piante oggetto di studio sono state conservate in celle frigorifera fino al 14 maggio, dal 14 al 31 maggio le piante sono state lasciate a temperatura ambiente per simulare l'uscita dal magazzino e l'arrivo alla grande distribuzione e al consumatore finale. In tutti i campionamenti la valutazione è stata eseguita in modo non distruttivo valutando al tatto il grado di svuotamento delle teste di aglio attribuendo un valore da 0 a 100%. Inoltre, i due campionamenti eseguiti nel mese di maggio hanno previsto analisi distruttive volte a valutare il grado di infezione sui bulbilli e l'isolamento diretto di specie fungine da piante sane e malate. Per ciascuna delle 7 tesi sono state prelevate 4 repliche di 3 teste di aglio per le due categorie commercializzate da COPAP (diametro maggiore di 46 mm e diametro compreso tra 36 e 45 mm). Per ciascuna categoria commercializzata sono state posate in piastra 3 porzioni di corona, 5 porzioni di bulbilli sintomatici e 5 di bulbilli asintomatici. Per gli isolamenti sono stati seguiti i protocolli utilizzati in precedenza per l'analisi dei campioni provenienti dal campo, come descritto nel WP 2.1.



## Risultati

### Anno 1

#### Prove *in vitro* con antagonisti naturali.

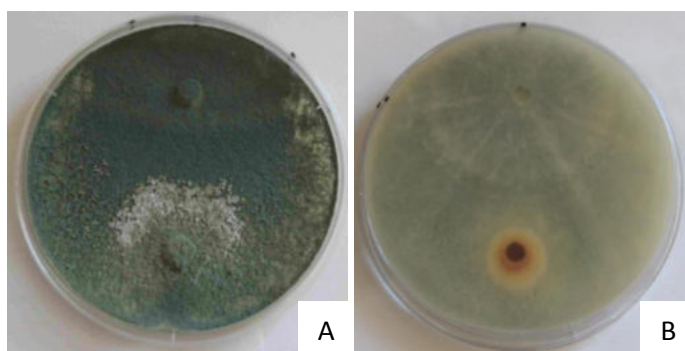
La prova di antagonismo è stata eseguita per valutare l'efficacia di 4 diversi organismi antagonisti, due di origine batterica e due di origine fungina, a tre diverse temperature.

**Tabella 40** Risultati della prova di antagonismo trascorsi 21 giorni

Antagonista	10°C	15°C	25°C	Totale
<i>Trichoderma spp.</i>	2	4	4	10
<i>S. griseoviridis</i>	4	2	3	9
<i>B. subtilis</i>	3	3	2	8
<i>F. oxysporum</i>	1	1	1	3

In Tabella 40 sono riportati i risultati ottenuti attribuendo a ciascun agente di biocontrollo un punteggio crescente a seconda dell'antagonismo dimostrato *in vitro* a 21 giorni dall'inoculazione. Per ciascuna temperatura è stato attribuito un punteggio 4 all'agente di biocontrollo che aveva dimostrato maggiore efficacia, un punteggio di 3 al secondo maggiormente efficace e così via fino a 1.

L'organismo che in piastra si è rivelato più efficace trascorsi i 21 gg di durata della prova è stato *Trichoderma spp.* Questo organismo compete molto bene con il patogeno anche da un punto di vista di competizione per lo spazio. Secondo la classificazione di Magan e Lacey (1984) il *Trichoderma* ha dimostrato una capacità inibitoria per contatto continuando a crescere invariato attraverso la colonia inibita. (Figura 23)



**Figura 23** *Trichoderma spp.* (in alto) e *F. proliferatum* (in basso) al termine della prova di antagonismo (21 giorni) a 10°C. A: fronte, B: retro.

#### Prove *in vitro* con fungicidi

Nella prova l'efficacia dei 6 diversi prodotti è stata valutata in base alla riduzione percentuale di crescita impiegando come parametro la media dei diametri della colonia.

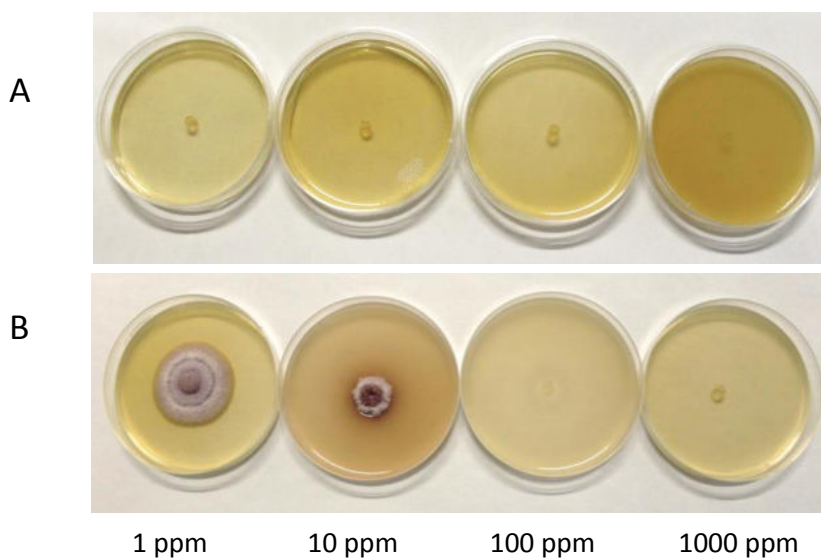
In Tabella 41 sono riportati i risultati ottenuti attribuendo a ciascun principio attivo alla dose di 1 ppm un punteggio crescente a seconda della capacità inibitoria dimostrata *in vitro* a 21 giorni dall'inoculazione. Per ciascuna temperatura è stato attribuito un punteggio 6 al principio attivo che aveva dimostrato maggiore efficacia, un punteggio di 5 al secondo maggiormente efficace e così via fino ad 1.

Il prodotto commerciale che ha avuto maggiore effetto nella riduzione della crescita del patogeno è stato la miscela di Procloraz e Propiconazolo anche a basse concentrazioni (1ppm). Si è inoltre osservato che tutti i

prodotti commerciali hanno inibito totalmente la crescita del fungo a concentrazioni di 100 e 1000 ppm. (Figura 24)

**Tabella 41** Risultati prova in vitro a concentrazione di 1 ppm trascorsi 21 giorni.

Principio Attivo	10	15	25	Totale
PROPICONAZOLO+PROCLORAZ	6	6	6	18
TEBUCONAZOLO	5	5	5	15
PROPICONAZOLO	3	4	3	11
TEBUCONAZOLO+ AZOXYSTROBIN	4	3	4	10
PROPICONAZOLO+AZOXYSTROBIN	2	2	2	6
TEBUCONAZOLO+FLUOPYRAM	1	1	1	3



**Figura 24** Prova in vitro con Propiconazolo+Procloraz (A) e Tebuconazolo (B) a 21 giorni a 15°C alle concentrazioni di 1-10-100-1000 ppm.

## Anno 2

### Prove *in vitro* con antagonisti e fungicidi

Dalle analisi *in vitro* eseguite nel secondo anno è emerso che i tre isolati si comportavano in maniera simile nei confronti dei trattamenti a cui erano stati sottoposti, ma che i trattamenti differivano tra di loro per efficacia nei confronti del patogeno. Inoltre, l'effetto della temperatura è risultato significativo (Tabella 42).

Per quanto riguarda l'efficacia degli antagonisti naturali nel ridurre la crescita dei patogeni è stato confermato che il prodotto a base di *Trichoderma* è risultato il più efficace (79,99%), seguito da *B. subtilis* (70,80%), *S. griseoviridis* (59,72%) e *F. oxysporum* (47,67%). Invece, per quanto riguarda il fattore temperatura la maggiore riduzione di crescita si è registrata a 15°C (68,24%). Il dato è da considerarsi in relazione alla capacità di adattamento alle temperature delle diverse specie antagoniste (Tabella 42).

**Tabella 42** ANOVA dei dati di riduzione percentuale della crescita dei tre isolati considerati nella prova e sottoposti a coltura duale con antagonisti naturali. Confronto tra le medie eseguito con il test di Tukey ( $P>0,01$ ). \* ( $P>0,05$ ); \*\* ( $P>0,01$ )

Fattori		Riduzione %	
<b>A</b>	Isolato	n.s.	
		<i>F. oxysporum</i> MPVPG152	64,12
		<i>F. proliferatum</i> ITEM7595	64,64
		<i>F. proliferatum</i> MPVPG29	64,87
<b>B</b>	Trattamento	**	
		<i>S. griseoviridis</i>	59,72 c
		<i>B. subtilis</i>	70,80 b
		<i>F. oxysporum</i>	47,67 d
		<i>T. harzianum</i> + <i>T. gamsii</i>	79,99 a
<b>C</b>	Temperatura °C	**	
		10	64,28 b
		15	68,24 a
		25	61,11 c
<b>Interazioni</b>			
<b>A*B</b>		**	
<b>B*C</b>		**	
<b>A*C</b>		**	
<b>A*B*C</b>		**	

Dalla prova eseguita con fungicidi a base di triazoli e loro miscele è emerso che il comportamento di ciascun isolato nei confronti dei principi attivi era statisticamente significativo, a differenza di quanto osservato nella prova con gli antagonisti naturali. Inoltre, anche gli altri fattori presi in considerazione sono risultati statisticamente significativi (Tabella 43).

Per quanto riguarda la capacità dei singoli prodotti di ridurre la crescita del patogeno in piastra è stato confermato che il prodotto a base di Propiconazolo+Procloraz ha ridotto del 99,85% la crescita di *Fusarium* dimostrandosi il più efficace tra quelli presi in esame. Ottimi risultati in termini di contenimento della crescita del patogeno sono stati ottenuti anche con il prodotto a base di Tebuconazolo. Va sottolineato anche che i prodotti in miscela generalmente hanno dimostrato minore efficacia rispetto ai principi attivi in purezza. Questo fattore è sicuramente legato alla percentuale di ciascun principio attivo all'interno dei prodotti utilizzati. Inoltre, è stato osservato come all'aumentare della concentrazione (da 1 a 1000 ppm) aumenti la capacità del principio attivo nell'inibire la crescita del fungo. Infine, per quanto riguarda il fattore temperatura si è osservata una maggiore riduzione di crescita del patogeno alla temperatura di 10°C (89,14%) (Tabella 43).

**Tabella 43** ANOVA dei dati di riduzione percentuale della crescita dei tre isolati considerati nella prova e sottoposti al trattamento con diversi triazoli e loro miscele. Confronto tra le medie eseguito con il test di Tukey (P>0,01)

Fattori	Riduzione %
<b>A Isolato</b>	**
<i>F. oxysporum</i> MPVPG152	81,25 c
<i>F. proliferatum</i> ITEM7595	88,58 a
<i>F. proliferatum</i> MPVPG29	84,92 b
<b>B Trattamento</b>	**
Propiconazolo	76,36 d
Propiconazolo + Azoxystrobin	73,17 e
Propiconazolo+ Procloraz	99,85 a
Tebuconazolo	88,81 b
Tebuconazolo+ Azoxystrobin	85,65 c
Tebuconazolo+Fluopyram	85,65 c
<b>C Concentrazione PPM</b>	**
1	62,82 d
10	84,01 c
100	93,68 b
1000	99,15 a
<b>D Temperatura °C</b>	**
10	89,14 a
15	88,80 b
25	76,81 c
<b>Interazioni</b>	
A*B	**
A*C	**
A*D	**
B*C	**
B*D	**
C*D	**
A*B*C	**
A*B*D	**
A*C*D	**
B*C*D	**
A*B*C*D	**

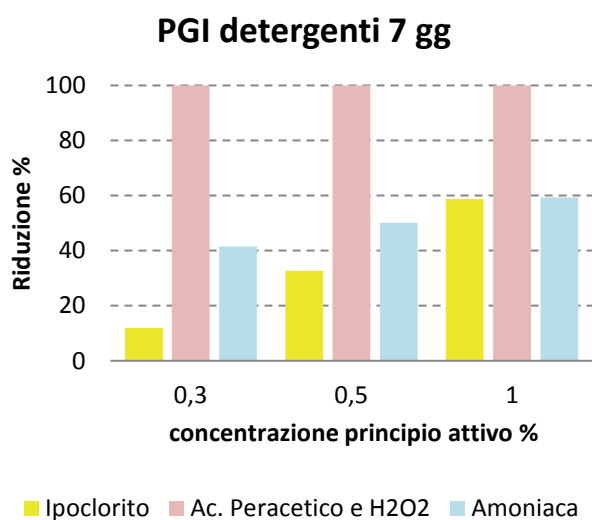
### Prove *in vitro* con detergenti e disinfettanti

Nella prova *in vitro* l'efficacia di 3 diversi prodotti per la pulizia delle superfici (Sirpav Sanitech, D50, Ipoclorito) è stata calcolata in base alla riduzione percentuale di crescita del fungo rispetto al controllo in terreni addizionati con i diversi principi attivi. Sia la concentrazione del prodotto che il tipo di trattamento sono risultati significativi nel ridurre la crescita di *F. proliferatum* a 25°C (Tabella 44).

Il prodotto maggiormente efficace a tutte le concentrazioni è stato il D50 a base di Acido Peracetico e Acqua Ossigenata (riduzione=90%). Per quanto riguarda le concentrazioni si è osservata una scalarità con riduzione maggiore alla concentrazione 1% e minore alla concentrazione 0,3% (Tabella 44). Il comportamento dei tre prodotti alle diverse concentrazioni è rappresentato in Figura 25.

**Tabella 44** ANOVA dei dati di riduzione percentuale della crescita del patogeno sottoposto al trattamento con detersivi e disinfettanti. Confronto tra le medie eseguito con il test di Tukey ( $P>0,01$ ). \*\*  $P>0,01$

Fattori	Riduzione %
<b>Trattamento</b>	**
Ipoclorito	34,97 c
Ac. Peracetico+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	90,00 a
Ammoniaca	45,21 b
<b>Concentrazione</b>	**
0,3%	50,06 c
0,5%	56,64 b
1%	63,48 a
<b>Interazioni</b>	
A*B	**



**Figura 25** Riduzione % (PGI) dei 3 prodotti utilizzati nella prova con detersivi e disinfettanti a 3 concentrazioni (0,3%; 0,5%; 1%).

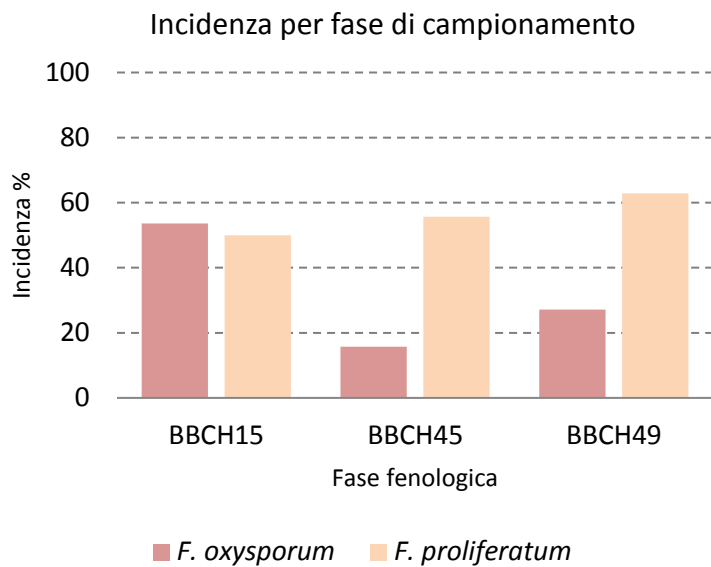
### Prova di campo 2018

Dal primo anno di analisi durante la stagione colturale nella prova di concia con prodotti chimici e a base di antagonisti è stato possibile evidenziare differenze statisticamente significative tra i diversi trattamenti con un aumento della gravità dei sintomi sulle corone con l'avanzare della stagione colturale. L'interazione tra i due fattori, invece, non è risultata statisticamente significativa (Tabella 45). In Figura 26 è possibile osservare come con l'avanzare della stagione colturale sia andata ad aumentare l'incidenza della specie *F. proliferatum* rispetto a *F. oxysporum*. *F. proliferatum* dall'analisi della letteratura e dai risultati ottenuti finora sembra essere l'agente causale del marciume secco dell'aglio in post raccolta, con infezioni che iniziano già nella fase di campo.

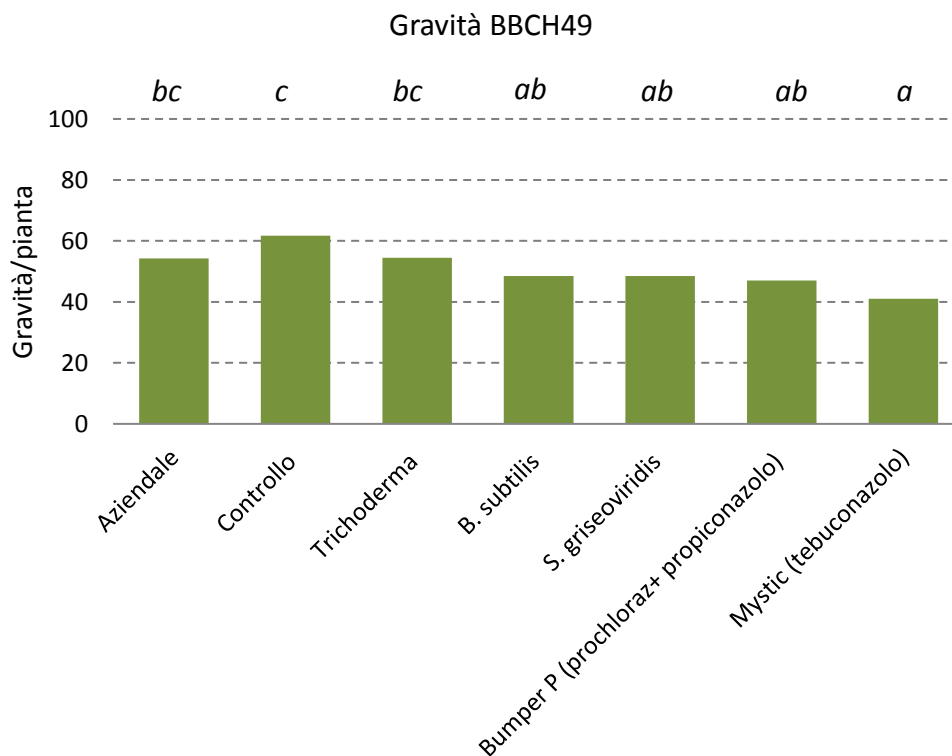
Il trattamento che ha fatto registrare i livelli di gravità minori è stato quello a base di Tebuconazolo, seguito da quello a base di Propiconazolo+Prochloraz, da *B. subtilis* e *S. griseoviridis*. In Figura 27 sono rappresentati gli indici di gravità rilevati a maturazione di raccolta (BBCH49) per i diversi trattamenti e le differenze statisticamente significative tra di essi.

**Tabella 45** Significatività ottenute dall'ANOVA della prova di concia in campo ( $P > 0,01$ )

Fattori	Gravità
Trattamento	0,001
Tempo	0,000
Trattamento*Tempo	0,666



**Figura 26** Incidenza delle specie di *Fusarium* nei tre campionamenti eseguiti durante la stagione coltrale 2017-2018

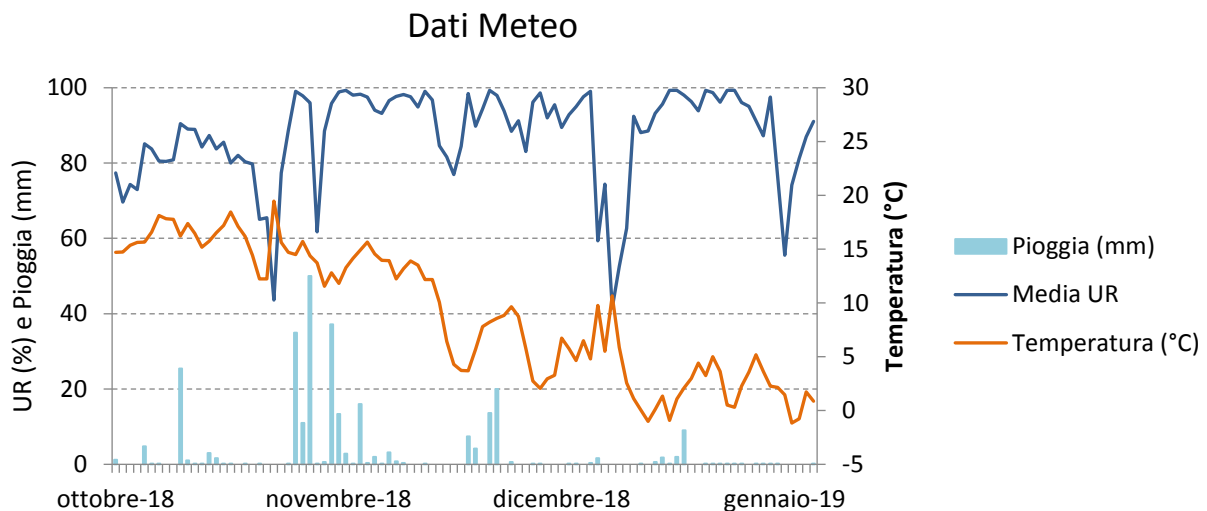


**Figura 27** Efficacia dei prodotti testati a maturazione di raccolta (BBCH49) espressi in indice di gravità dei sintomi rilevati sulla pianta secondo la scala riportata in

## Anno 3

### Prova in vaso

La verifica dell'efficacia in vaso di 5 composti fungicidi, due chimici e tre BCAs, aveva lo scopo di testare i prodotti utilizzati nella prova di campo nelle prime fasi del ciclo vegetativo. I vasi sono stati esposti alle condizioni climatiche naturali del periodo della prova, compreso tra Ottobre e Gennaio. I dati dell'andamento climatico del periodo sono riportati in Figura 28. Le temperature minima e massima rilevate durante la prova corrispondevano rispettivamente a -6.3 °C e 28.7°C. Sono state calcolate la sommatoria dei gradi giorno, pari a 884.1, e la media dell'umidità relativa pari a 87.3 %. Le piogge totali del periodo oggetto di studio sono state pari a 227 mm e concentrate per lo più nel mese di Novembre.



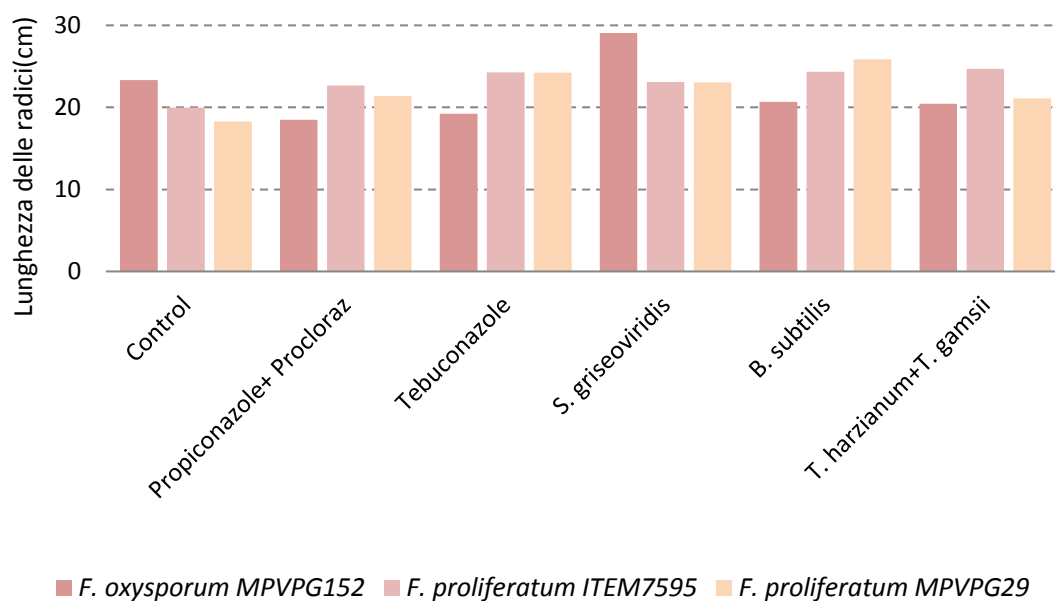
**Figura 28** Andamento meteo del periodo compreso tra ottobre 2018 e gennaio 2019. I dati sono stati rilevati da una capannina meteo posizionata nei pressi dell'Università Cattolica del Sacro Cuore sede di Piacenza. (UR= umidità relativa)

Dall'analisi statistica dell'indice di gravità sono risultati significativi sia i fattori principali isolato utilizzato per l'inoculo che il trattamento di concia applicato, ma non è risultata significativa l'interazione fra i due fattori. Invece, per quanto riguarda la misura della lunghezza delle radici sono risultati significativi entrambi i fattori analizzati e l'interazione tra il fattore isolato e quello trattamento. Andando ad analizzare i dati relativi ai singoli inoculi, è stato evidenziato che: *F. proliferatum* ha fatto registrare il maggiore indice di gravità sulle piante analizzate, mentre le radici hanno subito maggiore riduzione di crescita nelle piante inoculate con *F. oxysporum* rispetto agli altri due isolati. E' inoltre stata registrata una differenza significativa in termini di gravità tra le piante controllo non trattato e quelle che hanno subito trattamenti di concia. In generale si è registrata una maggiore efficacia dei trattamenti chimici (Propiconazolo+Procloraz=1,5; Tebuconazolo=1,6) rispetto a quelli biologici, anche se i risultati ottenuti dai trattamenti con *B. subtilis* (1,88) e *S. griseoviridis* (1,97) sono equiparabili a quelli dei trattamenti chimici. *T. harzianum*+*T. gamsii*, invece ha mostrato un indice di gravità superiore agli altri trattamenti, ma comunque inferiore al controllo inoculato (Tabella 46).

Per quanto riguarda il fattore lunghezza delle radici, invece, è stata osservata una forte riduzione di crescita nel trattamento con Propiconazol+Procloraz (21,09 cm) rispetto alle piante trattate con Tebuconazolo (25,85 cm) e con BCAs. La riduzione di crescita delle radici potrebbe essere causata da fitotossicità del principio attivo nei confronti dell'aglio e potrebbe portare ad uno svantaggio competitivo della pianta con il proseguire della stagione colturale. Tutti i trattamenti, comunque, hanno fatto registrare valori di lunghezza delle radici superiori a quelli del controllo inoculato (Tabella 46, Figura 29).

**Tabella 46** ANOVA dei dati di gravità e lunghezza delle radici rilevati al termine della prova in vaso. \*\*( $P>0,01$ ) \* ( $P>0,05$ )

Fattori	Gravità	Lunghezza delle radici (cm)
<b>Isolato</b>	**	*
<i>F. oxysporum</i> MPVPG152	2,16 <i>b</i>	21,53 <i>b</i>
<i>F. proliferatum</i> ITEM7595	1,88 <i>b</i>	23,17 <i>a</i>
<i>F. proliferatum</i> MPVPG29	2,64 <i>a</i>	22,32 <i>ab</i>
<b>Trattamento</b>	**	**
Controllo	4,10 <i>a</i>	18,93 <i>d</i>
Propiconazolo+ Procloraz	1,50 <i>c</i>	21,09 <i>c</i>
Tebuconazolo	1,60 <i>c</i>	25,85 <i>a</i>
<i>S. griseoviridis</i>	1,97 <i>bc</i>	22,28 <i>bc</i>
<i>B. subtilis</i>	1,88 <i>bc</i>	23,55 <i>b</i>
<i>T. harzianum</i> + <i>T. gamsii</i>	2,30 <i>b</i>	22,34 <i>bc</i>



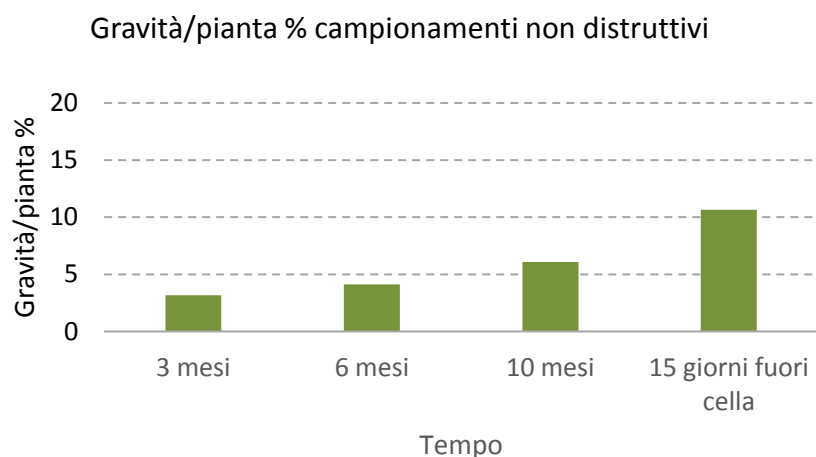
**Figura 29** Lunghezza delle radici (cm) dei tre isolati testati in vaso con 7 trattamenti. *F. oxysporum* MPVPG152 (FO), *F. proliferatum* MPVPG29 (FP1), *F. proliferatum* ITEM7595 (FP2)

### Post raccolta prova di campo

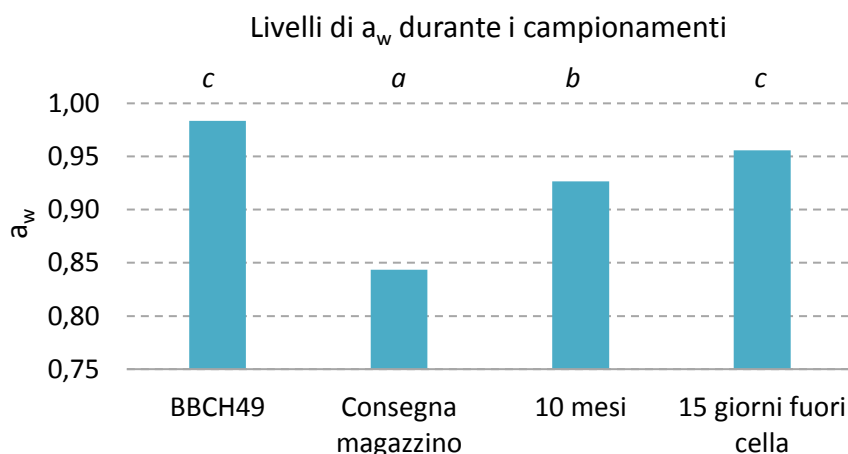
Durante il periodo stoccaggio le piante delle sette tesi, seminate a Ottobre 2017, sono state valutate in 4 tempi da Ottobre 2018 a Maggio 2019. I campioni sono stati soggetti alle tecniche di conservazione previste per le partite di aglio conferite alla cooperativa, con stoccaggio in cella frigorifera a -4°C fino a Maggio 2019. Dal 14 al 31 Maggio le piante sono state lasciate a temperatura ambiente per simulare l'uscita dal magazzino e l'arrivo alla grande distribuzione e al consumatore.



In tutte le tesi è stato osservato un aumento significativo del grado di svuotamento delle teste dall'inizio del periodo di conservazione fino al termine nel mese di maggio (Figura 30). Inoltre, si è osservata una correlazione positiva tra la valutazione non distruttiva e la % spicchi sintomatici rilevata durante i campionamenti distruttivi ( $R= 0,836$ ). In termini di gravità/pianta sono emerse differenze significative tra le tesi prese in considerazione. *B. subtilis* è risultato il migliore agente nel controllo dello svuotamento dei bulbi, seguito dal trattamento aziendale a base di *Trichoderma* e *B. subtilis*. Dati confermati anche dal calcolo della percentuale di spicchi sintomatici per testa calcolata durante i campionamenti distruttivi, dove il migliore risultato è stato ottenuto dal trattamento aziendale. Inoltre, tutte le tesi si discostavano in maniera significativa dal controllo non trattato sia nei campionamenti distruttivi che in quelli non distruttivi (Tabella 47). Per quanto riguarda gli isolamenti delle specie in esame sia sulle corone che sui bulbilli, non sono state rilevate differenze significative tra le diverse tesi; è però emerso che le teste di diametro maggiore tendono ad essere maggiormente colpite da *Fusarium* e che una volta uscite dalla cella l'incidenza di *F. proliferatum* sui bulbi aumenta in modo significativo raddoppiando il suo valore (Tabella 47). L'aumento dell'incidenza di *F. proliferatum* potrebbe essere favorito dall'andamento dei valori di  $a_w$  che si abbassano durante il periodo di essiccazione in campo prima della consegna in magazzino (0,84), ma tornano a valori superiori a 0,90 durante la conservazione e raggiungono valori di 0,96 dopo l'uscita delle partite dalla cella (Figura 31). Questo dato è da tenere in considerazione in relazione all'aumento della gravità dei sintomi rilevati durante l'ultimo campionamento e alle condizioni ecologiche favorevoli alla ripresa delle infezioni da parte del patogeno



**Figura 30** Gravità rilevata durante il periodo di conservazione per le 7 tesi analizzate nella prova di concia. 3 mesi= 24 Ottobre 2018, 6 mesi=31 Gennaio 2019, 10 mesi =14 Maggio 2019, 15 giorni fuori cella=31 Maggio 2019



**Figura 31** Valori medi di acqua libera rilevati a maturazione di raccolta, alla consegna in magazzino, dopo 10 mesi di stoccaggio in cella e dopo 15 giorni fuori cella nelle 7 tesi oggetto della prova.

**Tabella 47** ANOVA dei dati di gravità e incidenza delle specie fungine isolate durante il periodo di conservazione della prova di concia in campo. \*\* (P>0,01) \* ( P>0,05)

	<i>Gravità/ pianta %</i>	<i>% spicchi sintomatici</i>	CORONE				BULBILLI			
			<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>Penicillium</i>
	NON DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI	DISTRUTTIVI
<b>A Tesi</b>	**	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1 Aziendale	4,33 <i>ab</i>	31,91 <i>a</i>	79,17	22,92	56,25	0	36,46	14,17	22,29	0,78
2 Controllo non trattato	8,44 <i>d</i>	49,92 <i>b</i>	68,75	22,92	43,75	0	37,42	11,61	25,81	0,65
3 <i>T. harzianum</i> + <i>T. gamsii</i>	6,61 <i>cd</i>	36,12 <i>ab</i>	77,08	18,75	58,33	0	36,88	3,75	33,13	0,00
4 <i>S. griseoviridis</i>	5,65 <i>bc</i>	41,67 <i>ab</i>	87,50	29,17	58,33	0	39,38	4,38	35,00	0,00
5 <i>B. subtilis</i>	3,87 <i>a</i>	36,67 <i>ab</i>	79,17	29,17	47,92	0	24,38	1,88	22,50	0,63
6 Prochloraz+ Propiconazolo	7,60 <i>cd</i>	40,36 <i>ab</i>	93,75	18,75	75,00	0	39,38	5,63	33,75	0,63
7 Tebuconazolo	5,52 <i>bc</i>	35,44 <i>ab</i>	75,00	18,75	54,17	0	23,13	5,63	17,50	1,25
<b>B Tempo</b>	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**	n.s.
5 3 mesi	3,16 <i>a</i>									
6 6 mesi	4,13 <i>a</i>									
7 10 mesi	6,09 <i>b</i>	37,34	76,19	24,40	50,60	0	24,33 <i>a</i>	6,07	18,26 <i>a</i>	0,40
8 15 giorni fuori cella	10,64 <i>c</i>	40,22	83,93	21,43	61,90	0	43,44 <i>b</i>	7,33	36,11 <i>b</i>	0,72
<b>C Categoria</b>		**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	n.s.	n.s.
diámetro bulbo >46mm		45,15 <i>b</i>	80,95	25,00	55,95	0	39,64 <i>b</i>	10,09 <i>b</i>	29,55	0,77
diámetro bulbo 36mm-45mm		32,51 <i>a</i>	79,17	20,83	56,55	0	28,10 <i>a</i>	3,33 <i>a</i>	24,76	0,36
<b>D Sintomo</b>							n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Asintomatico							34,29	8,39	25,89	0,36
Sintomatico							33,39	4,98	28,41	0,77

## Prova di campo

A partire da Aprile 2019 sono stati eseguiti campionamenti in 3 fasi fenologiche seguendo lo schema di lavoro riportato per l'anno 2018. In Figura 32 è stato possibile osservare il netto prevalere della specie *F. proliferatum* rispetto alla specie *F. oxysporum* in tutte le fasi di campionamento. Il dato è in accordo con i risultati ottenuti dalle analisi svolte nelle aziende coinvolte nel progetto. Inoltre, va a confermare ulteriormente quanto finora riportato in letteratura come agente causale del marciume secco dell'aglio in post raccolta, con infezioni che partono già durante la stagione di campo. Confrontando le tesi prese in esame, il trattamento che ha fatto registrare i livelli di gravità minori nella stagione colturale 2019 è stato quello a base di Tebuconazolo, seguito da *B. subtilis*. In Figura 33 sono rappresentati gli indici di gravità rilevati a maturazione di raccolta (BBCH49) per i diversi trattamenti analizzati.

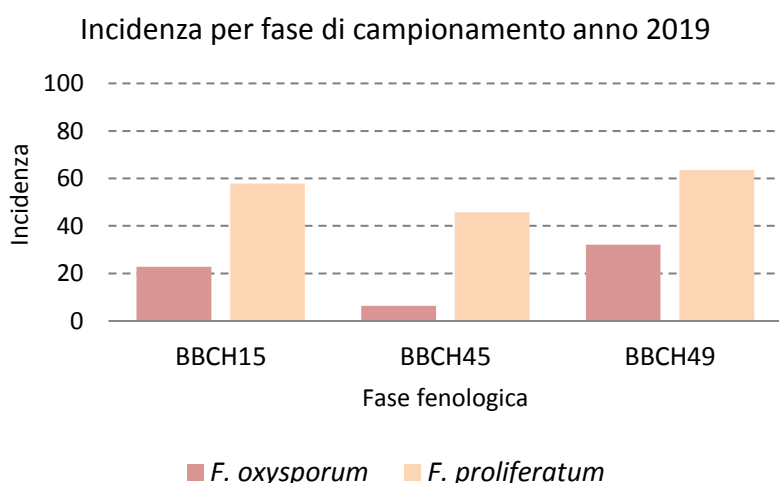


Figura 32 Incidenza delle specie *F. oxysporum* e *F. proliferatum* nelle 3 fasi fenologiche prese in considerazione durante la prova

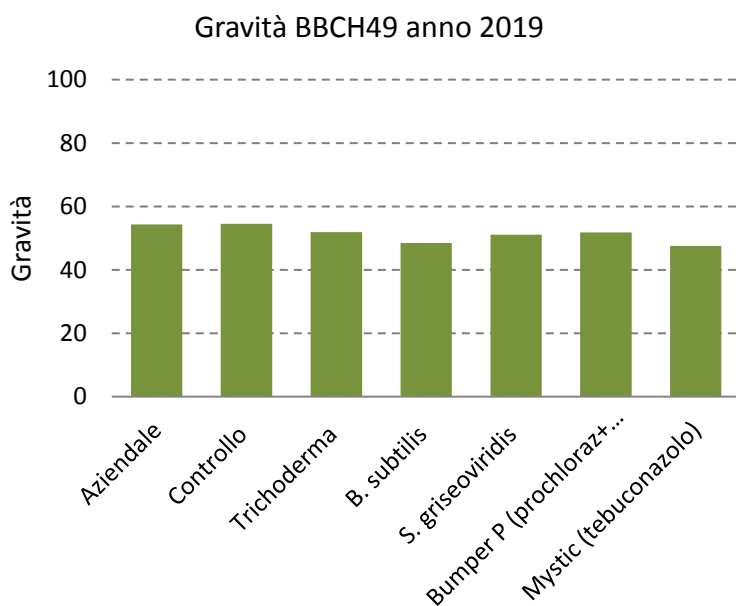


Figura 33 Gravità dei sintomi rilevata alla fase fenologica BBCH49 (maturazione di raccolta), per le tesi prese in esame durante la prova

A conclusione del secondo anno di prova in campo i dati raccolti sono stati sottoposti ad ANOVA e il confronto tra le medie è stato eseguito mediante il test di Tukey. Dall'analisi sono emerse differenze significative in termini di gravità/pianta rilevata nelle diverse tesi. Il controllo non trattato presentava piante con maggiore gravità dei sintomi a livello della corona, mentre il prodotto più efficace è risultato essere Tebuconazolo. Risultati simili a quelli ottenuti con Tebuconazolo sono stati osservati per il prodotto a base di Prochloraz+Propiconazolo e per i due antagonisti microbici. A conferma di quanto rilevato durante la stagione di campo, risultati comparabili erano stati ottenuti anche nella prova in vaso eseguita durante l'inverno 2019. Inoltre, si è osservato un aumento della gravità dei sintomi sulle piante analizzate nell'anno 2 rispetto all'anno 1 e un aumento dei sintomi comparsi sulle corone col progredire della stagione colturale. Per quanto riguarda gli isolamenti eseguiti a partire dalle piante raccolte in campo, il genere maggiormente isolato è stato *Fusarium*, rappresentato dalle specie *F. proliferatum* e *F. oxysporum*. Dalle analisi non sono emerse differenze statisticamente significative in termini di incidenza delle due specie tra le diverse tesi prese in esame. Inoltre, *F. proliferatum* è stato isolato in egual misura in entrambi gli anni di studio, mentre l'incidenza di *F. oxysporum* è calata nel secondo anno di analisi. L'andamento dell'incidenza delle due specie durante la stagione colturale non è lineare, con valori maggiori nel primo campionamento e a maturazione di raccolta, rispetto al campionamento effettuato ad ingrossamento del bulbo (Tabella 48).

**Tabella 48** ANOVA dei dati di gravità e incidenza delle specie fungine isolate durante la stagione colturale nei campionamenti della prova di concia in campo. \*\* (P>0,01) \* (P>0,05)

	<i>Gravità/ pianta</i>		<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>Penicillium</i>			
<b>A Tesi</b>	**		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.			
Aziendale	39,79	cd	85,00	28,33	58,33	0,83			
Controllo non trattato	43,67	d	80,00	21,67	58,33	1,67			
<i>T. harzianum</i> + <i>T. gamsii</i>	37,92	bc	81,67	30,00	50,83	0,00			
<i>S. griseoviridis</i>	34,88	abc	75,00	25,83	53,33	0,83			
<i>B. subtilis</i>	35,75	abc	85,00	23,33	65,00	0,00			
Prochloraz+ Propiconazolo	34,96	ab	73,33	25,83	51,67	0,00			
Tebuconazolo	32,13	a	77,50	29,17	54,17	2,50			
<b>B Anno</b>	**		**	**	n.s.	*			
<b>1</b>	34,46	a	83,33	b	32,14	b	56,19	0,00	a
<b>2</b>	39,56	b	75,95	a	20,48	a	55,71	1,67	b
<b>C Tempo</b>	**		**	**	**	n.s.			
<b>BBCH15</b>	4,14	a	85,00	b	38,21	b	53,93	ab	0,71
<b>BBCH45</b>	51,04	b	60,36	a	11,07	a	50,71	a	1,79
<b>BBCH49</b>	55,86	c	93,57	c	29,64	b	63,21	b	0,00
<b>Interazioni</b>									
<b>A*B</b>									
<b>A*C</b>									
<b>B*C</b>	*		**	**	**				
<b>A*B*C</b>									

## Risultati in pillole

### IN CAMPO

#### Indagini sul terreno:

- Bassa carica di nematodi, ed assenza di *Ditylenchus dipsaci*
- La carica micotica varia negli anni, mentre quella di *Fusarium* rimane costante con valori pari a  $10^3$

#### Indagini condotte sulla coltura:

- La zona di abscissione è il punto preferenziale di penetrazione del fungo
- La gravità dei sintomi sulle corone aumenta durante la stagione colturale
- Nell'anno 1 *F. oxysporum* ha prevalso rispetto a *F. proliferatum*
- Le due specie assumono andamento contrapposto, all'aumentare dell'una diminuisce l'altra
- Stagioni piovose favoriscono *F. proliferatum*, stagioni siccitose *F. oxysporum*
- Durante la stagione colturale non si osserva accumulo di fumonisine nelle piante

#### Tecniche colturali:

- Aziende storicamente più colpite:
  - Applicano una concimazione azotata più abbondante
  - Hanno maggiore produzione unitaria

### IN POST- RACCOLTA

#### Sulle corone:

- L'incidenza di *F. oxysporum* aumenta dalla raccolta allo stoccaggio
- *F. proliferatum* rimane costante nel tempo dalla raccolta all'uscita dalla cella frigorifera

#### Sui bulbilli:

- *F. proliferatum* è correlato alla gravità dei sintomi sugli spicchi
- *F. proliferatum* è stato isolato sia negli spicchi sintomatici che in quelli asintomatici
- Lo stoccaggio in cella contiene il patogeno, ma una volta che il prodotto viene riportato a temperatura ambiente l'incidenza di *F. proliferatum* aumenta
- L'acqua libera ( $a_w$ ) diminuisce durante il periodo di essiccazione in campo e aumenta dall'ingresso in cella frigo
- Le fumonisine sono state rilevate al di sotto dei limiti di legge normati per il mais

## LINEE GUIDE

### Disciplinare di produzione della regione Emilia Romagna 2019

Il disciplinare della Regione Emilia Romagna, di recente integrato con ulteriori indicazioni per la corretta gestione della coltura in campo e nel post raccolta, riporta valide indicazioni, ma necessita di alcune specificazioni. Dai risultati ottenuti durante il progetto sono emerse alcune criticità che riportiamo come testo in arancione all'interno del testo del disciplinare.

#### Norme Tecniche Agronomiche:

- L'aglio è una coltura a ciclo lungo.
- Nella coltivazione non sono ammessi: l'utilizzo di materiale geneticamente modificato e di bulbilli denominati "denti".
- La rotazione deve essere di almeno 3 anni e in precessione e successione non deve prevedere piante della famiglia delle *Liliaceae*. (Si consigliano rotazioni ampie (4-5 anni) evitando per l'intero periodo specie della famiglia delle *Liliaceae*)

- È consentita la semina delle varietà registrate (Ottolini, Serena, ecotipo aglio di Voghiera e aglio precoce), con densità di impianto tra 250000 e 270000 piante/ha. Si consiglia la scelta della data di semina sulla base del principio della sfuggenza: evitando semine troppo precoci (fine settembre inizio ottobre) o troppo tardive (fine Novembre)
- È consentita l'irrigazione per aspersione con volumi massimi 300-350 m<sup>3</sup>/ha nel periodo da metà maggio a fine giugno se si verifica assenza di piogge, ponendo attenzione all'evitare ristagni idrici superficiali e sub-superficiali.
- Sono ammesse concimazioni con dosi standard di 110 unità di azoto, 75 di fosforo e 130 di potassio. L'azienda è tenuta a frazionare la concimazione azotata in almeno due interventi (all'emergenza e a ripresa vegetativa, 5°-6° foglia). Porre attenzione alle concimazioni azotate e alle produzioni elevate, perché legate ad una maggiore incidenza delle patologie crittogamiche.

#### Norme di difesa da crittogame in campo:

- Ruggine: interventi agronomici - lunghe rotazioni; interventi chimici alla comparsa dei sintomi – prodotti rameici, Zolfo, Azoxystrobin+Pyraclostrobin, Mancozeb, Tebuconazolo
- Peronospora: interventi chimici se le condizioni termoisometriche risultano favorevoli – Pyraclostrobin+Dimetomorf, Zoxamide
- Botrite: interventi chimici alla comparsa dei primi sintomi – Fludioxinil+Cyprodinil
- Marciumi dei bulbi (*Fusarium*, *Helminthosporium*, *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium*): interventi agronomici – evitare i ristagni idrici, lunghe rotazioni, sarchiatura tra le file, utilizzare aglio “da seme” sano, impiego di bulbi concitati, evitare ferite durante la sgranatura dei bulbi, disinfezione secca o umida dei bulbi

Data l'elevata incidenza di *Fusarium* anche in bulbilli asintomatici destinati al seme, sarebbe auspicabile individuare prodotti e trattamenti di concia efficaci a contenere la malattia e garantire una maggiore sanità dei bulbilli seme. A tal proposito, a partire da fine 2019 è iniziato il progetto PSR 2014-2020 (2019-2022) FOCUS AREA 3A dall'acronimo BIANCOSEME con lo scopo di individuare strategie per il miglioramento della filiera produttiva del seme di aglio.

#### Norme di difesa da fitofagi in campo:

- Nematodi (*Ditylenchus dipsaci*): interventi agronomici – rotazioni quinquennali con piante che non sono attaccate dal nematode (cereali, barbabietola, soia, ecc.) ed evitare avvicendamenti con erba medica, fragola, spinacio, cipolla, lattuga, fava, pisello e sedano.

#### Norme per la raccolta:

- Per il “Bianco Piacentino” ed il “Cristo”, che possono essere conservati in frigorifero per parecchi mesi, la maturazione fisiologica inizia durante la prima settimana di luglio e conseguentemente viene effettuata la raccolta che si conclude, di regola, verso la metà del mese
- La raccolta meccanica o semi-meccanica è una pratica già da molti anni utilizzata. Attualmente si consiglia l'utilizzo di attrezzature trainate che, a mezzo di girelli, dispongono le piantine su file continue diminuendo così la mano d'opera occorrente o altre macchine di recente collaudo, le quali, dopo aver tolto le piante di aglio dal terreno, le legano in mazzi, pronti per essere asportati dal campo. Durante le operazioni di raccolta sarà necessario prestare attenzione per evitare danni meccanici ai bulbi.

#### Procedure per la lavorazione del prodotto fresco:

- L'essiccazione rappresenta la “chiave di volta” per la conservazione e per la prevenzione delle alterazioni dell'aglio. Essa viene effettuata in campo disponendo il prodotto in andane, lasciandolo essiccare al sole per 10-15 giorni a seconda delle condizioni climatiche prevalenti. Una essiccazione incompleta o prolungata nel tempo a causa della pioggia, determina un aumento dei marciumi causati da funghi patogeni. Inoltre si evidenziano imbrunimenti e imbrattamenti delle tuniche. La

essiccazione può essere completata, dopo la raccolta del prodotto da terra, all'interno delle cassette lasciate stazionare per qualche tempo sotto tettoie.

- Al fine di conseguire la qualità globale e la più elevata serbevolezza, dopo la necessaria valutazione qualitativa al momento del confezionamento, si consiglia, almeno su una parte del prodotto essiccato in campo, la pre-lavorazione al fine di separare i bulbi in classi di calibro. Ciò al fine di realizzare un piano di conservazione e commercializzazione nel tempo, rapportato alle caratteristiche del prodotto.

#### *Difesa in post raccolta:*

Le più frequenti ed importanti cause di alterazione post-raccolta sono la muffa verde-azzurra (*Penicillium* spp.), il *Fusarium* spp., l'*Aspergillus niger*. E talora la muffa grigia (*Botrytis* spp.); a queste si aggiungono la germogliazione e radicazione, le contusioni e ferite, la detunicazione, il decadimento ceroso; la prevenzione delle alterazioni sopra elencate deve essere attuata in post-raccolta senza l'impiego di agenti chimici, ma tramite un oculato utilizzo di mezzi fisico-biologici quali ad esempio una manipolazione attenta, l'essiccazione, la conservazione a bassa temperatura e bassa igrometria.

#### *Conservazione:*

La serbevolezza dell'aglio è influenzata dalle pratiche colturali e soprattutto, come è stato sottolineato in precedenza, dalle tecniche adottate dopo l'estirpazione. Risultano determinanti: una essiccazione idonea, la cultivar, la pezzatura, la sostanza secca e/o il grado rifrattometrico. Si consiglia di realizzare la conservazione dei bulbi con le seguenti tecniche:

- Conservazione a temperatura ambiente: Realizzata in magazzini meglio se dotati di ventilazione forzata per poter regolare, indipendentemente dalle condizioni meteorologiche esterne, la temperatura e l'umidità relativa. Per rallentare il processo di germogliazione è opportuno che la temperatura nei magazzini risulti superiore ai 25°C o prossima a 0°C, con u.r. inferiore al 75%. Il principale fattore limitante la conservazione, oltre la germogliazione, è rappresentato dallo sviluppo di funghi soprattutto il *Penicillium* spp. Le cultivar più serbevoli possono essere conservate per 2-3 mesi.
- Conservazione in magazzino frigorifero: Viene attuata in appositi magazzini frigoriferi con bulbi stivati in casse o pallet-box di rete metallica. La conservazione refrigerata, è quella che meglio di ogni altra consente il mantenimento nel tempo della qualità, si consiglia di attuarla a -3 ÷ -4°C, con u.r. compresa tra 70÷75%. Si richiama l'attenzione sull'opportunità di conservare il prodotto a -3 ÷ -4°C in quanto risulta impedita la crescita di miceti, quali il *Penicillium* spp., ed inibita la crescita dei germogli. È inoltre importante mantenere i tenori igrometrici indicati tramite gli opportuni accorgimenti impiantistici o ricorrendo a sistemi di deumidificazione. Di altrettanto rilievo, nel caso dei pallet-box, è la realizzazione della uniformità della temperatura tramite un accatastamento compatto e razionale. È consigliabile, al termine della conservazione, un innalzamento lento della temperatura, trasferendo il prodotto in celle a temperatura intermedia per evitare condensazione di umidità che favorisce gli attacchi dei patogeni e la emissione di radici.

#### *Selezione e confezionamento:*

- Durante le operazioni di selezione e confezionamento è necessario curare la gestione dei residui di lavorazione asportandoli tempestivamente al termine del turno di lavoro.
- Prevedere interventi di pulizia con detersivi, specialmente sulle attrezzature utilizzate durante il taglio e sulla spicchiatrice.

## Indice delle Tabelle

Tabella 1 Ubicazione geografica, SAU, indirizzo produttivo e numero di dipendenti.....	8
Tabella 2 Tessitura del terreno e l'avvicendamento colturale delle sei aziende selezionate .....	8
Tabella 3 Tecniche colturali adottate. ....	9
Tabella 4 Trattamenti fitosanitari eseguiti .....	9
Tabella 5 Ubicazione geografica, SAU, indirizzo produttivo e numero di dipendenti del secondo anno .....	11
Tabella 6 Tessitura del terreno e l'avvicendamento colturale delle sei aziende selezionate nel secondo anno .....	11
Tabella 7 Tecniche colturali adottate nel secondo anno.....	12
Tabella 8 Trattamenti fitosanitari eseguiti nel secondo anno.....	12
Tabella 9 Ubicazione geografica, SAU, indirizzo produttivo e numero di dipendenti del terzo anno .....	15
Tabella 10 Tessitura del terreno e l'avvicendamento colturale delle sei aziende selezionate nel terzo anno.....	15
Tabella 11 Tecniche colturali adottate nel terzo anno.....	16
Tabella 12 Trattamenti fitosanitari eseguiti nel terzo anno .....	16
Tabella 13 Risultati del campionamento dei locali di magazzino espressi in UFC/m <sup>3</sup> di aria aspirata e UFC/cm <sup>2</sup> di superficie campionata. In grigio le UFC totali, in bianco le UFC di <i>Fusarium</i> spp.....	22
Tabella 14 Interventi di Pulizia eseguiti in Copap durante la lavorazione del prodotto .....	23
Tabella 15 Risultati del campionamento in tre tempi a seguito dell'intervento di pulizia nei locali di magazzino, espressi in UFC/cm <sup>2</sup> di superficie campionata. In grigio le UFC totali, in bianco le UFC di <i>Fusarium</i> spp. ( Tempo 1= prima dell'intervento di pulizia, Tempo 2= dopo 20 minuti dall'intervento, Tempo 3= dopo 18 ore dall'intervento) .....	24
Tabella 16 Dati meteo raccolti nei tre anni di studio nei cinque quadranti meteo relativi alle 6 aziende oggetto di studio. ....	30
Tabella 17 Correlazioni di Pearson dei dati raccolti durante il triennio di studio nelle sei aziende interessate dall'indagine. Gravità/PIANTA: gravità rilevata a BBCH49 (raccolta). inc. FP 4: incidenza di <i>F. proliferatum</i> a BBCH49 (raccolta). inc. FO 4: incidenza di <i>F. oxysporum</i> a BBCH49 (raccolta). inc. PE 4: incidenza di <i>Penicillium</i> BBCH49 (raccolta). FBs (ppb): Fumonisine totali. aw: acqua libera. inc. FP 2: incidenza di <i>F. proliferatum</i> a BBCH15 (1° campionamento). inc. FP 3: incidenza di <i>F. proliferatum</i> a BBCH45 (2° campionamento). inc. FO 2: incidenza di <i>F. oxysporum</i> a BBCH15 (1° campionamento). inc. FO3: incidenza di <i>F. oxysporum</i> a BBCH45 (2° campionamento). SumDD: sommatoria dei gradi giorno. SumR: sommatoria delle piogge. N=18.....	31
Tabella 18 Conta dei nematodi .....	32
Tabella 19 Conta dei nematodi nel secondo anno di analisi .....	32
Tabella 20 Conta dei nematodi nel terzo anno di analisi .....	33
Tabella 21 Conta delle unità formanti colonia su grammo di terreno secco del primo anno di analisi.....	34
Tabella 22 Conta delle unità formanti colonia su grammo di terreno secco del secondo anno di analisi.....	35
Tabella 23 Conta delle unità formanti colonia su grammo di terreno secco del terzo anno di analisi.....	35
Tabella 24 UFC calcolate per grammo di terreno nei 3 anni di analisi nelle 6 aziende oggetto di studio P≤0,05.....	36
Tabella 25 Classi di gravità utilizzate durante il campionamento. ....	37
Tabella 26 Contenuto medio di a <sub>w</sub> nei bulbilli a maturazione di raccolta.....	40
Tabella 27 ANOVA della gravità della malattia e delle incidenze delle principali specie isolate nei campionamenti di campo nei 3 anni di analisi. ....	44



Tabella 28 Contenuto di acqua libera ( $a_w$ ) alla raccolta, al momento della consegna, e dopo 6 mesi di stoccaggio delle partite di aglio oggetto dello studio. ....	47
Tabella 29 Contenuto di acqua libera ( $a_w$ ) alla raccolta, al momento della consegna, e dopo 6 mesi di stoccaggio delle partite di aglio oggetto dello studio. ....	49
Tabella 30 ANOVA delle incidenze dei funghi isolati dalle corone in post raccolta. $**P \leq 0,01$ ; $*P \leq 0,05$ .....	50
Tabella 31 ANOVA delle incidenze dei funghi isolati dai bulbilli in post raccolta. $**P \leq 0,01$ ; $*P \leq 0,05$ .....	52
Tabella 32 ANOVA dei valori di acqua libera rilevati a maturazione di raccolta, alla consegna in magazzino, alla lavorazione delle partite e dopo 6 mesi di stoccaggio nelle 6 aziende oggetto di studio. ....	53
Tabella 33 Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato. ....	55
Tabella 34 Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato. ....	55
Tabella 35 Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato. ....	56
Tabella 36 Risultati delle analisi delle fumonisine B1 e B2 espressi in parti per bilione (ppb) del peso del campione secco. UR: valore di umidità del campione analizzato. ....	56
Tabella 37 Formulati commerciali utilizzati nella prova di antagonismo .....	58
Tabella 38 <b>Prodotti commerciali utilizzati durante la prova in vitro</b> .....	59
Tabella 39 Prodotti impiegati nella prova di concia dei bulbilli in campo .....	61
Tabella 40 Risultati della prova di antagonismo trascorsi 21 giorni .....	64
Tabella 41 Risultati prova in vitro a concentrazione di 1 ppm trascorsi 21 giorni. ....	65
Tabella 42 ANOVA dei dati di riduzione percentuale della crescita dei tre isolati considerati nella prova e sottoposti a coltura duale con antagonisti naturali. Confronto tra le medie eseguito con il test di Tukey ( $P > 0,01$ ). $*(P > 0,05)$ ; $** (P > 0,01)$ .....	66
Tabella 43 ANOVA dei dati di riduzione percentuale della crescita dei tre isolati considerati nella prova e sottoposti al trattamento con diversi triazoli e loro miscele. Confronto tra le medie eseguito con il test di Tukey ( $P > 0,01$ ) .....	67
Tabella 44 ANOVA dei dati di riduzione percentuale della crescita del patogeno sottoposto al trattamento con detergenti e disinfettanti. Confronto tra le medie eseguito con il test di Tukey ( $P > 0,01$ ). $** P > 0,01$ .....	68
Tabella 45 Significatività ottenute dall'ANOVA della prova di concia in campo ( $P > 0,01$ ) .....	69
Tabella 46 ANOVA dei dati di gravità e lunghezza delle radici rilevati al termine della prova in vaso. $** (P > 0,01)$ $*( P > 0,05)$ .....	71
Tabella 47 ANOVA dei dati di gravità e incidenza delle specie fungine isolate durante il periodo di conservazione della prova di concia in campo. $** (P > 0,01)$ $*( P > 0,05)$ .....	73
Tabella 48 ANOVA dei dati di gravità e incidenza delle specie fungine isolate durante la stagione colturale nei campionamenti della prova di concia in campo. $** (P > 0,01)$ $*( P > 0,05)$ .....	75

## Indice delle Figure

Figura 1 Dislocazione delle aziende scelte: 1=Melodi; 2=Merli; 3=Opizzi; 4=Pezza; 5=Rastelli; 6=Zaninoni. In rosso le aziende più colpite negli anni passati. Scala visibile in alto a sinistra.....	7
Figura 2 Andamento meteorologico del quadrante 530 nelle stagioni colturali 2016/2017, 2017/18 e 2018/2019 UR : Umidità Relativa .....	29
Figura 3 Numero di nematodi/100g di terreno nei 3 anni di analisi .....	33
Figura 4 Colonia di <i>Fusarium proliferatum</i> di 10 giorni a 25°C su terreno di coltura PDA .....	34
Figura 5 Colonia di <i>Fusarium oxysporum</i> su terreno di coltura PDA.....	34
Figura 6 Piante prelevate durante il 1° campionamento .....	37
Figura 7 Classi di gravità dei sintomi da 0 a 4.....	38
Figura 8 Classe sintomatica 3 e 4 osservate durante il terzo campionamento. Contrassegnato dal cerchio arancione tracce di micelio bianco sulla corona. ....	38
Figura 9 Frequenza delle classi sintomatiche di marciume dell'aglio (Tabella 25) nei 3 campionamenti. ....	39
Figura 10 Distribuzioni delle due specie di <i>Fusarium</i> nelle classi sintomatiche alle diverse fasi fenologiche. ....	40
Figura 11 Frequenza delle classi sintomatiche di marciume dell'aglio (Tabella 25) nei 3 campionamenti. ...	41
Figura 12 Distribuzioni delle due specie di <i>Fusarium</i> nelle classi sintomatiche alle diverse fasi fenologiche. ....	42
Figura 13 Frequenza delle classi sintomatiche di marciume dell'aglio (Tabella 25) nei 3 campionamenti. ...	42
Figura 14 Distribuzioni delle due specie di <i>Fusarium</i> nelle classi sintomatiche alle diverse fasi fenologiche. ....	43
Figura 15 Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.....	46
Figura 16 Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.....	46
Figura 17 Distribuzioni media delle due specie di <i>Fusarium</i> nelle classi sintomatiche dei bulbi durante lo stoccaggio.....	47
Figura 18 Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.....	48
Figura 19 Frequenza media delle classi sintomatiche alla lavorazione prima della commercializzazione e dopo sei mesi di stoccaggio.....	48
Figura 20 Distribuzioni delle due specie di <i>Fusarium</i> nelle classi sintomatiche durante lo stoccaggio 0: asintomatico; 1: sintomatico.....	49
Figura 21 Schema prova di concia dei bulbilli e foto aerea dell'area. N.T. = non trattato, T.h+T.g= <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>gamsii</i> - Patriot Dry®, St. gr= <i>Streptomyces griseoviridis</i> -Mycostop®, B.sub= <i>Bacillus subtilis</i> -Serenade Max®, Prop+Procl= Propiconazolo+Procloraz-Bumper P®, Teb= Tebuconazolo-Mystic 430 SC® .....	61
Figura 22 Classi di gravità utilizzate durante il rilievo dei sintomi della prova di concia in vaso. 0=asintomatiche; 1=piccole lesioni sul bulbillo, sulla corona o sulle radici; 2=piccole lesioni su 2 degli organi considerati, 3= piccole lesioni sui tre organi considerati; 4= estese lesioni sul bulbillo, sulla corona o sulle radici; 5= estese lesioni su 2 degli organi considerati; 6= estese lesioni sui tre organi considerati. ....	63
Figura 23 <i>Trichoderma spp.</i> (in alto) e <i>F. proliferatum</i> (in basso) al termine della prova di antagonismo (21 giorni) a 10°C. A: fronte, B: retro.....	64
Figura 24 Prova in vitro con Propiconazolo+Procloraz (A) e Tebuconazolo (B) a 21 giorni a 15°C alle concentrazioni di 1-10-100-1000 ppm. ....	65
Figura 25 Riduzione %(PGI) dei 3 prodotti utilizzati nella prova con detergenti e disinfettanti a 3 concentrazioni (0,3%; 0,5%; 1%). ....	68

Figura 26 Incidenza delle specie di <i>Fusarium</i> nei tre campionamenti eseguiti durante la stagione coltrale 2017-2018.....	69
Figura 27 Efficacia dei prodotti testati a maturazione di raccolta (BBCH49) espressi in indice di gravità dei sintomi rilevati sulla pianta secondo la scala riportata in .....	69
Figura 28 Andamento meteo del periodo compreso tra ottobre 2018 e gennaio 2019. I dati sono stati rilevati da una capannina meteo posizionata nei pressi dell'Università Cattolica del Sacro Cuore sede di Piacenza. (UR= umidità relativa).....	70
Figura 29 Lunghezza delle radici (cm) dei tre isolati testati in vaso con 7 trattamenti. <i>F. oxysporum</i> MPVPG152 (FO), <i>F. proliferatum</i> MPVPG29 (FP1), <i>F. proliferatum</i> ITEM7595 (FP2).....	71
Figura 30 Gravità rilevata durante il periodo di conservazione per le 7 tesi analizzate nella prova di concia. 3 mesi= 24 Ottobre 2018, 6 mesi=31 Gennaio 2019, 10 mesi =14 Maggio 2019, 15 giorni fuori cella=31 Maggio 2019 .....	72
Figura 31 Valori medi di acqua libera rilevati a maturazione di raccolta, alla consegna in magazzino, dopo 10 mesi di stoccaggio in cella e dopo 15 giorni fuori cella nelle 7 tesi oggetto della prova. ....	72
Figura 32 Incidenza delle specie <i>F. oxysporum</i> e <i>F. proliferatum</i> nell 3 fasi fenologiche perse in considerazione durante la prova .....	74
Figura 33 Gravità dei sintomi rilevata alla fase fenologica BBCH49 (maturazione di raccolta), per le tesi prese in esame durante la prova.....	74

## Bibliografía

- Burgess L., Liddell C.M., Summerell B.A., 1988, Laboratory manual for fusarium research
- Cendoya E., Monge M.P., S.A. Palacios, S.M. Chiacchiera, A.M. Torres, M.C. Farnochi, M.L. Ramirez, 2014, Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina, Food Control, Vol. 37:56-61
- EPPO PM7/119 Nematode extraction, 2013, 43, 471-495
- EPPO PM7/87 *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*, 2009, Vol. 38:363-373
- Gálvez Patón L., Redondas Marrero M.D., Palmero Llamas D., 2017, In vitro and field efficacy of three fungicides against Fusarium, European Journal of Plant Pathology, Vol. 148:321–328
- Hansen H.N., Smith R.E., 1932, *The mechanism of variation in imperfect fungi: Botrytis cinerea*, Phytopathology, Vol 37:369-371
- Kavitha, T.; Nelson, R., 2013, Exploiting the biocontrol activity of Trichoderma spp. against root rot causing phytopathogens, ARPN Journal of Agricultural and Biological Science, Vol. 8 (7):571-574
- Kubickek C.P., Mach R.L., Peterbaur C.K., Lorito M., 2001, *Trichoderma: from genes to biocontrol*, Journal of Plant Pathology, Vol 83:11-24.
- Leslie J.F., Summerell B.A., 2006, *The Fusarium laboratory manual*
- Magan N., Lacey J., 1984, Effect of water activity, temperature and substrate on interaction between field fungi and storage fungi, British Mycological Society, Vol. 82:83-93
- Mbofung G.C.Y., Pryor B.M., 2010, A PCR-Based Assay for Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* in Lettuce Seed, Plant Disease, Vol. 94(7): 860-866
- Nicolaisen M., Supronienė S., Kærgaard Nielsen L., Lazzaro I., Spliid N.H., Fejer Justesen a., 2009, Real-time PCR for quantification of eleven individual Fusarium species in cereals, Journal of microbiological methods, Vol. 76:234-240
- Postma J., Rattink H., 1992, *Biological control of fusarium wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of Fusarium oxysporum*, Canadian Journal of Botany, Vol 70:1199-1205.
- Samapundo S., Devlieghere F., De Meulenaer B., Debevere J., 2005, The Effect of Water Activity and Temperature on Growth and the Relationship between Fumonisin Production and the Radial Growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on Corn, Journal of Food Protection, Vol. 68(6):123-128
- Sangdee, A., Kornphachara, S, Srisawat, N., 2016, In vitro screening of antagonistic activity of soil Streptomyces against plant pathogenic fungi and assessment of its characters, Journal of Agricultural Technology, Vol. 12(1):173-185
- Stein, T., 2005, *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, Vol:56:845-857.
- Zhao J., Xue Q. H., Niu G. G., Xue L., Shen G. H., Du J. Z., 2013, Extracellular enzyme production and fungal mycelia degradation of antagonistic *Streptomyces* induced by fungal mycelia preparation of cucurbit plant pathogens, Annals of Microbiology, Vol 63: 809-812.