

TIPO DI OPERAZIONE

16.1.01 – Gruppi operativi del partenariato europeo per la produttività e la sostenibilità dell'agricoltura

DELIBERAZIONE DELLA GIUNTA REGIONALE N. 2144 DEL 10/12/2018

FOCUS AREA 3A

RELAZIONE TECNICA FINALE

DOMANDA DI SOSTEGNO 5116572

DOMANDA DI PAGAMENTO 5499670

Titolo Piano	BIANCOSEME – Innovazione organizzativa e di processo della filiera per la produzione sostenibile di seme sano di aglio bianco piacentino
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	COOPERATIVA PRODUTTORI AGLIO PIACENTINO SOCIETA' COOPERATIVA AGRICOLA

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	30 MESI
Data inizio attività	30/09/2019
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	30/03/2022

Relazione relativa al periodo di attività dal	30/09/2019	al	30/03/2022
Data rilascio relazione	25/05/2022		

Autore della relazione	PIVA CLAUDIO – AGRISILVA SCTP		
telefono		email	c.piva@agrisilva.it

Sommario

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

1 - Descrizione dello stato di avanzamento del Piano

Descrivere brevemente il quadro di insieme relativo alla realizzazione del piano.

Il Piano è stato completamente realizzato.
Tutti gli obiettivi sono stati raggiunti.

1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

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	COPAP – SATURI – IL GERMOGLIO – GRUPPI – ORTO MIO – UCSC – BLUMEN – TADINI - AGRISILVA	Coordinamento delle attività	Ottobre 2019	Ottobre 2019	Marzo 2022	Marzo 2022
WP1 - Valutazione del seme prodotto con le attuali macchine e procedure	COPAP ed UCSC	Valutazione del danno meccanico ai bulbilli ed individuazione delle metodiche per la sua riduzione	Ottobre 2019	Ottobre 2019	Giugno 2020	Giugno 2020
WP2 – Sanificazione dei bulbi	COPAP ed UCSC	Ottimizzare gli interventi di disinfezione dei bulbilli prediligendo metodi a basso impatto	Ottobre 2019	Marzo 2020	Settembre 2021	Maggio 2021
WP3 – Valutazione dell'efficacia di trattamenti di concia del seme	COPAP – SATURI – IL GERMOGLIO – GRUPPI – ORTO MIO – UCSC – BLUMEN – AZ. AGR. RASTELLI	Valutare l'efficacia di sostanze di origine chimica o microbiologica applicate al bulbillo mediante pellicolatura	Ottobre 2019	Ottobre 2020	Marzo 2022	Marzo 2022
Divulgazione	COPAP - UCSC	N. 2 seminari, n. 2 visite guidate, pubblicazioni, podcast, sito web Copap e UCSC	Ottobre 2019	Ottobre 2019	Marzo 2022	Marzo 2022
Formazione	Tadini	N. 2 corsi di cui alla proposta 5356226	Ottobre 2019	Febbraio 2022	Marzo 2022	Marzo 2022

2 - Descrizione per singola azione

Compilare una scheda per ciascuna azione

Allo scopo della più completa descrizione delle azioni si allega relazione scientifica redatta da UCSC.

2.1 Attività e risultati

Azione	ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE
Unità aziendale responsabile	COPAP – UCSC – AGRISILVA – IL GERMOGLIO – GRUPPI – SATURI – BLUMEN
Descrizione delle attività	<p><i>descrizione delle attività svolte per il raggiungimento degli obiettivi previsti dall'azione</i></p> <p>Il Capofila ha espletato gli adempimenti indicati nell'Avviso pubblico, nonché l'esercizio di tutti gli altri poteri conferiti dai partner con specifico mandato con rappresentanza. Ha presentato la documentazione tecnica finale relativa alla realizzazione del P.I. Si è interfacciato con i Partner e con gli Uffici regionali preposti. Il Capofila ed i Partner hanno partecipato agli eventi e/o fornito i dati necessari alla realizzazione delle attività di divulgazione e disseminazione.</p>
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità	<p><i>descrivere in che misura sono stati raggiunti gli obiettivi previsti, giustificando eventuali scostamenti dal progetto originario. Analizzare eventuali criticità tecnicoscientifiche emerse durante l'attività</i></p>
evidenziate	<p>Nonostante il progetto si sia sviluppato in concomitanza con la fase di emergenza della pandemia COVID19 che ha colpito la provincia di Piacenza con particolare intensità da febbraio 2020 sino ad oggi, gli obiettivi sono stati raggiunti.</p> <p>Si evidenziano le seguenti criticità che hanno comportato lievi riflessi sul piano di lavoro, pur non compromettendo, come detto, il raggiungimento degli obiettivi del PI.</p> <p>La limitazione della possibilità di spostamento ha ridotto le occasioni di incontro fisico tra i partner, cui si è fatto fronte con riunioni a distanza; per questo si sono azzerate le spese di trasferta.</p>
Attività ancora da realizzare	<p><i>Solo per relazioni intermedie - descrivere sinteticamente le attività ancora da realizzare</i></p>

Azione	<p>AZIONI SPECIFICHE LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO</p> <p>WP1 Valutazione del seme prodotto con le attuali macchine e procedure</p>
Unità aziendale responsabile	<p>COPAP - UCSC</p>
Descrizione delle attività	<p><i>descrizione delle attività svolte per il raggiungimento degli obiettivi previsti dall'azione</i></p> <p>I tecnici di COPAP hanno eseguito un'operazione di spicchiatura- sgranatura dei bulbi di aglio, ricavando 2 categorie di seme, classificate come prima e seconda categoria, in base alla dimensione del bulbillo. La spicchiatura è un punto critico della filiera, in quanto la macchina sgranatrice può provocare ai bulbilli lesioni anche piccole che favoriscono l'ingresso di funghi patogeni. L'obiettivo di questa azione è evidenziare le principali lesioni apportate ai semi durante la fase di spicchiatura, al fine di migliorare la meccanica della macchina sgranatrice.</p> <p>I bulbilli sono stati successivamente suddivisi nelle 2 categorie di seme a seconda della loro dimensione. Successivamente, sono stati immersi in una soluzione colorante blu per 10 minuti, al fine di evidenziare le lesioni presenti sugli spicchi, classificate come:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ferite meccaniche (recenti) dovute alle operazioni di spicchiatura; • lesioni precedenti alle operazioni di spicchiatura, dovute a <i>Fusarium</i> spp. o a lesioni meccaniche precedenti. <p>E' emerso che gli spicchi appartenenti alla prima categoria presentavano maggiori lesioni, sia in termini di ferite meccaniche, che in termini di lesioni precedenti dovute a <i>Fusarium</i> spp. o a danni meccanici. Inoltre, le lesioni dovute a ferite precedenti arrivavano fino ad un massimo dell'11,1% del prodotto analizzato, mentre le piccole ferite legate alle operazioni di sgranatura raggiungevano un massimo del 14,4% dei bulbilli-seme.</p>
Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità	<p><i>descrivere in che misura sono stati raggiunti gli obiettivi previsti, giustificando eventuali scostamenti dal progetto originario. Analizzare eventuali criticità tecnicoscientifiche emerse durante l'attività</i></p>
evidenziate	<p>La prova ha confermato che le operazioni di preparazione dei bulbilli per la semina, possono provocare piccole lesioni potenzialmente pericolose, in quanto favoriscono l'ingresso di funghi patogeni, al pari delle lesioni presenti prima delle operazioni di spicchiatura.</p> <p>E' pertanto importante migliorare la meccanica della macchina sgranatrice e, in generale, movimentare le partite di aglio, specie se destinato alla semina, durante tutte le fasi del post-raccolta.</p>
Attività ancora da realizzare	<p><i>Solo per relazioni intermedie - descrivere sinteticamente le attività ancora da realizzare</i></p>

Azione	AZIONI SPECIFICHE LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO WP2 Sanificazione dei bulbi
Unità aziendale responsabile	UCSC - COPAP
Descrizione delle attività	<i>descrizione delle attività svolte per il raggiungimento degli obiettivi previsti dall'azione</i> <p>Questa azione si propone di ottimizzare gli interventi di disinfezione dei bulbilli, prediligendo metodi a basso impatto o ad impatto zero, sia ambientale sia sugli operatori, tra i quali:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ozono gassoso; • Calore secco e umido; • Prodotti disinfettanti. <p><u>Sanificazione con ozono</u></p> <p>L'obiettivo di questo intervento è testare l'efficacia dell'ozono gassoso nel ridurre la contaminazione da <i>Fusarium</i> spp. nei bulbilli di aglio naturalmente infetti.</p> <p>A questo scopo sono state valutate in vitro in apposite camere ad atmosfera controllata diverse concentrazioni di ozono, al fine di individuare le più idonee alla riduzione della vitalità di funghi appartenenti al genere <i>Fusarium</i>.</p> <p>Successivamente, al fine di definire il tempo di trattamento ottimale, i bulbilli di aglio sono stati sottoposti a diversi tempi di esposizione al gas.</p> <p>Scopo della prova è stato evidenziare l'effetto di 4 concentrazioni di ozono (0, 50, 100, 200 ppm) a 3 tempi di esposizione (15, 30, 60 minuti), sia sulla germinazione delle spore, sia sulla crescita del micelio, ponendo a confronto le diverse tesi con un testimone non trattato.</p> <p>I trattamenti hanno mostrato alcune differenze statisticamente significative sia per quanto riguarda la germinazione delle spore, sia per quanto riguarda il diametro della colonia.</p> <p>Germinazione delle spore: La percentuale di spore germinate non è risultata significativamente differente tra i 2 funghi, ma è variata dal 97,00% al 32,28% all'aumentare della concentrazione di ozono, con la massima efficacia a 200 ppm. Per quanto riguarda il fattore tempo, invece, i trattamenti con esposizioni di 30 e 60 minuti sono risultati più efficaci rispetto a quelli a 15 minuti, con una diminuzione di efficacia del 26,29% (tabella 1). Infine, con l'aumentare del tempo di incubazione, la percentuale delle spore germinate è aumentata, dal 33,78% (24h) al 74,39% (48h), mostrando che l'efficacia dei trattamenti diminuisce all'aumentare del tempo di incubazione.</p> <p>Crescita del micelio: Per quanto riguarda la crescita del micelio, i 2 isolati hanno mostrato diverso comportamento. <i>F. proliferatum</i> ha raggiunto un diametro maggiore rispetto a <i>F. oxysporum</i> (rispettivamente 3,35 cm rispetto a 3,14 cm); ciò può essere attribuito ad una maggiore adattabilità alla crescita su GM rispetto a <i>F. oxysporum</i> o ad una seppur minima sensibilità all'ozono. La differenza, anche se significativa, è di scarsa rilevanza pratica, come pure la differenza osservata con diverse concentrazioni di ozono; le concentrazioni di 100 e 200 ppm hanno determinato una riduzione nella densità del micelio rispetto al testimone. Per quanto riguarda il tempo di esposizione, analogamente a quanto osservato per gli altri fattori considerati, le differenze sono significative ma non di rilevanza pratica, variando il diametro della colonia da 3,20 a 3,29 cm. Infine, con l'aumentare delle ore di coltura in piastra, il diametro delle colonie è raddoppiato a partire dal tempo 0 fino al termine delle 48h, mostrando la limitata efficacia del trattamento.</p>

Trattamento dei bulbilli

Dopo la prova *in vitro*, sono stati sottoposti ai trattamenti con l'ozono i bulbilli di aglio, suddivisi nelle 2 categorie. È stato testato un nuovo prototipo di macchina, dotato di una camera cilindrica rotante in cui vengono inseriti i campioni da trattare. La concentrazione di ozono all'interno della camera è pari a 500 ppm e resta costante finché il generatore del gas è acceso, mentre, una volta spento, tale concentrazione si azzerava rapidamente.

Sono stati presi in considerazione diversi tempi di esposizione al gas. In alcuni casi (tesi 1-7 e 9, 10), i bulbilli sono stati esposti direttamente all'ozono per 2,5, 5 o 10 minuti e, una volta spento il generatore di ozono, sono stati lasciati all'interno del cilindro per un ulteriore lasso di tempo (5-40 min). In altri casi invece (tesi 11, 13 e 14), i bulbilli sono stati esposti per più tempo ai 500 ppm di ozono e subito dopo estratti dalla camera.

È possibile confermare che i bulbilli sono comunemente infetti da *Fusarium* spp. e che i bulbilli di prima categoria hanno una maggiore percentuale di germinazione. Alcuni trattamenti con ozono inseriti nella prova, in particolare 9, 10 e 11, hanno permesso di ridurre significativamente la presenza di *Fusarium* spp. senza influenzare in modo significativo sulla germinabilità. Pertanto, è possibile affermare che per l'aglio l'ozono gassoso rappresenta un promettente, anche se non risolutivo metodo di sanificazione a basso impatto, da impiegare come possibile alternativa ad altri trattamenti con fungicidi di sintesi.

Sanificazione con calore

L'obiettivo di questa sotto-azione è testare l'efficacia del calore secco e umido nel ridurre la colonizzazione da *Fusarium* spp. nei bulbilli di aglio naturalmente infetti.

A questo scopo, è stata allestita una prova sui bulbilli-seme, considerando diverse temperature e modalità di applicazione.

I trattamenti sono stati eseguiti sia con calore secco in stufa, sia con vapore. La prova è stata eseguita, come le precedenti, per entrambe le categorie di seme.

Sono emerse differenze statisticamente significative tra alcuni dei trattamenti eseguiti e il controllo non trattato. In nessun caso però, i trattamenti con calore secco si sono differenziati dal testimone. Il trattamento risultato maggiormente efficace è stato quello con calore umido a 49°C per 30 minuti. Risultati simili sono stati ottenuti anche con i trattamenti con calore umido a 49°C per 20 minuti e a 46°C per 60 minuti.

Per quanto riguarda i dati relativi alla germinabilità, solo i trattamenti a secco a temperatura di 49°C per 20 minuti e a 70°C per 10 minuti hanno mostrato valori equiparabili al controllo non trattato, registrando comunque un calo del 15% in termini di germinabilità del seme. Gli altri trattamenti applicati hanno mostrato cali dal 25% al 35%. Inoltre, si è osservato un maggiore vigore germinativo per i bulbilli di prima categoria, rispetto a quelli di seconda categoria, rispettivamente con valori 75,6% rispetto a 65,2%.

Sulla base di questi risultati, per cercare di ridurre la contaminazione da *Fusarium* spp., ma contemporaneamente mantenere buoni valori di germinabilità del seme (almeno >80%), è stata allestita una seconda prova basata sull'utilizzo del calore secco, impiegando il medesimo schema di lavoro della prova precedente.

Sono state applicate ai bulbilli temperature inferiori, ma per tempi di esposizione più lunghi ed è stato mantenuto il trattamento di 49°C per 20 minuti, ovvero l'unico che, nello studio precedente, aveva consentito di mantenere un livello di germinabilità superiore all'80%.

Per quanto riguarda i dati di germinabilità, in tutti i casi sono stati registrati valori superiori all'80%; in particolare, il trattamento di 40°C per 60 minuti ha mostrato valori equiparabili al controllo non trattato ($P < 0,05$). Inoltre, contrariamente a quanto emerso dalla prova precedente, è stato osservato un maggiore vigore germinativo per la seconda categoria, rispetto a quelli della prima categoria, rispettivamente con valori di 95,33% rispetto a 80%. Infine, prendendo in considerazione l'interazione tra i fattori tesi e categoria di seme, sono emerse differenze a livello di germinabilità del seme ($P < 0,05$); in generale gli spicchi di prima categoria sono germinati meno rispetto a quelli di seconda categoria.

Sanificazione con disinfettanti

L'obiettivo di questa sotto-azione è stato quello di testare l'efficacia di prodotti disinfettanti nel ridurre la colonizzazione da *Fusarium* spp. nei bulbilli di aglio naturalmente infetti.

A questo scopo, è stata inizialmente allestita una prova *in vitro*; i prodotti e le concentrazioni risultati più efficaci sono stati successivamente utilizzati in prove sui bulbilli-seme, testando quali tecniche di applicazione, lo *spray* e l'immersione, per tempi diversi di trattamento.

Sono stati presi in considerazione 3 prodotti disinfettanti: acqua ossigenata (H_2O_2), acido peracetico ($C_2H_4O_3$) e D50 (acido peracetico stabilizzato 5% + perossido di idrogeno 20%), impiegando come controllo piastre di terreno non ammendato inoculate al centro con il patogeno. Per ciascun prodotto sono state valutate 3 concentrazioni (0,1%, 0,3%, 0,5 %), in 3 replicati e le piastre sono state incubate a 25°C (12h di fotoperiodo) per 7 giorni.

L'efficacia dei 3 diversi prodotti disinfettanti è stata calcolata in base alla riduzione percentuale di crescita del fungo rispetto al controllo.

Dall'analisi dei dati è emerso che i trattamenti a base di acido peracetico e acqua ossigenata sono risultati più efficaci nella riduzione della crescita del fungo. Per quanto riguarda le concentrazioni, si è osservata, come atteso, una riduzione maggiore alla concentrazione 0,5% e minore alla concentrazione 0,1%. Acido peracetico e acqua ossigenata a concentrazioni dello 0,3% sono stati in grado di inibire totalmente la crescita di *F. proliferatum*.

Al fine di verificare la possibile applicazione sui bulbilli-seme dei prodotti e delle concentrazioni che hanno avuto maggiore efficacia nei trattamenti *in vitro*, è stata allestita una prova sui bulbilli in cui sono state confrontate 2 diverse modalità di applicazione (*spray* e immersione).

Il trattamento risultato maggiormente efficace è stato quello a base di acido peracetico con immersione dei bulbilli per 10 minuti. Risultati simili sono stati ottenuti anche con il trattamento per immersione in acido peracetico per 5 minuti e con quello per immersione in acqua ossigenata per 10 minuti. Per quanto riguarda la germinabilità dei bulbilli, è stato osservato che tutti i trattamenti eseguiti hanno ridotto in modo significativo rispetto al controllo la percentuale di quelli germinati. In particolare, l'immersione in acido peracetico per 10 minuti ha portato ad un drastico calo in termini di germinabilità (26,7% di semi germinati). I trattamenti con acido peracetico applicato per nebulizzazione e quelli con acqua ossigenata applicata tramite *spray* o immersione per 5 minuti hanno invece portato ad un calo medio del 33% in termini di germinabilità rispetto al controllo non trattato.

Questa prova ha dimostrato che l'applicazione di disinfettanti per ridurre la presenza di *Fusarium* spp. in bulbilli di aglio non costituisce un approccio promettente in quanto alle riduzioni significative corrisponde anche una riduzione significativa della germinabilità dei semi che scende sotto il 50%. Il trattamento più interessante è quello eseguito con acqua ossigenata al 3% in

	<p>immersione per 5 minuti perché ha permesso una riduzione significativa delle UFC rispetto al testimone con una germinazione pari al 70%.</p>
<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità</p>	<p><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></p>
<p>evidenziate</p>	<p>L'obiettivo da raggiungere in questo <i>Work Package</i> era quello di ridurre la presenza di <i>Fusarium</i> spp. nei bulbilli di aglio utilizzando metodi di disinfezione a basso impatto o a impatto zero, mantenendo elevati i valori di germinabilità dei semi. A questo scopo sono stati valutati l'ozono gassoso, il calore secco e umido e prodotti disinfettanti.</p> <p>L'ozono gassoso ha permesso in alcuni casi di ridurre la contaminazione fungina, rivelandosi pertanto un metodo di sanificazione promettente ma non completamente risolutivo.</p> <p>Alcuni dei trattamenti basati sull'utilizzo del calore umido e di prodotti disinfettanti, pur avendo ridotto la presenza di <i>Fusarium</i> spp., hanno fornito riduzioni significative della germinabilità dei semi.</p> <p>Il calore secco, al contrario, nonostante sia riuscito a mantenere in generale valori di germinabilità equiparabili al controllo non trattato, non si è rivelato efficace nel ridurre il livello di UFC.</p> <p>È possibile, pertanto, concludere che alcuni dei metodi impiegati, in particolare l'ozono gassoso, si sono rivelati interessanti; nessuno di essi però è riuscito a fornire risultati pienamente soddisfacenti.</p>
<p>Attività ancora da realizzare</p>	<p><i>Solo per relazioni intermedie - descrivere sinteticamente le attività ancora da realizzare</i></p>

Azione	AZIONI SPECIFICHE LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO WP3 Valutazione dell'efficacia di trattamenti di concia del seme
Unità aziendale responsabile	UCSC – COPAP- RASTELLI- BLUMEN – SATURI – IL GERMOGLIO – GRUPPI – ORTO MIO
Descrizione delle attività	<p><i>descrizione delle attività svolte per il raggiungimento degli obiettivi previsti dall'azione</i></p> <p>In un precedente progetto, le prove condotte <i>in vitro</i>, in ambiente controllato e in campo, impiegando fungicidi di sintesi e microrganismi antagonisti, hanno fornito risultati incoraggianti in merito al controllo delle specie associate al marciume secco dell'aglio; si è pensato ad ulteriori e sensibili miglioramenti dell'efficacia degli stessi, combinando nuove modalità di applicazione e nuovi prodotti a concentrazioni ottimizzate.</p> <p>L'obiettivo di questa azione è valutare l'efficacia di sostanze di origine chimica o microbiologica che vengono applicate direttamente sul bulbillino in modo molto omogeneo mediante una "pellicolatura", denominata <i>film coating</i>.</p> <p>Questo trattamento, già utilizzato sui semi di orticole professionali, ma mai fino a questo momento sull'aglio, fornisce al seme un rivestimento migliore in termini di omogeneità e adesione. Inoltre, grazie al lento rilascio delle sostanze attive, si presuppone possa offrire maggiori e durature garanzie di protezione soprattutto durante le prime fasi fenologiche in cui la giovane pianta presenta le maggiori criticità ed è più facilmente esposta agli attacchi dei funghi agenti di fusariosi.</p> <p>Sono state effettuate 3 prove distinte: Prova in vaso; Prova in vivaio; Prova in pieno campo.</p> <p>La <u>prova in vaso</u> è stata eseguita in ambiente controllato, in vaso, ponendo a confronto rispetto a un testimone non trattato 4 tesi allestite con: 1 sostanza attiva di sintesi; 3 prodotti a base di microrganismi antagonisti naturali.</p> <p>I bulbillini sono stati prima sottoposti al trattamento di <i>film coating</i>, ove come componenti della pellicola sono state utilizzate formulazioni composte delle sostanze attive di sintesi o di microrganismi antagonisti (nei dosaggi riportati in etichetta), addizionate con adesivante Nutri-elle AMINO ENNE e come colorante ossido di ferro, composto non tossico per la pianta</p> <p>In primavera, trascorsi 7 mesi dall'epoca di semina in terreno, è stata valutata l'efficacia dei trattamenti.</p> <p>il prodotto a base di <i>T. harzianum</i> (Triatum P) ha ricoperto meno gli spicchi rispetto a tutti gli altri prodotti fitosanitari. Inoltre, i semi trattati per 2 volte</p>

presentavano una copertura % statisticamente superiore rispetto a quelli che avevano subito un solo trattamento di *film coating*.

Infine, sono emerse differenze di copertura % dei bulbilli-seme anche per quanto riguarda l'interazione tra le variabili tesi* modalità di trattamento. E' importante eseguire il trattamento di *film coating* per 2 volte consecutive soprattutto quando si applica il prodotto a base di *T. harzianum* (Trianum P).

Dalla prova è emerso che il trattamento di *film coating*, eseguito cercando di simulare in laboratorio processi adottati dall'industria, ha fornito una buona copertura dei bulbilli-seme. La copertura si è rivelata capace di resistere alle manipolazioni subite dal seme fino al caricamento nella seminatrice presso l'azienda agricola, anch'esse simulate in laboratorio.

Inoltre, i semi trattati 2 volte sono risultati essere statisticamente più coperti rispetto a quelli che avevano subito un solo trattamento di *film coating*. Ciononostante, questo maggiore livello di copertura dei semi non si è tradotto al termine della prova in un una maggiore efficacia del trattamento stesso.

Per quanto riguarda i prodotti fitosanitari impiegati, nessuno di essi ha fornito risultati interessanti in termini di riduzione della gravità dei sintomi e di sviluppo di specie fungine.

Dalla prova è emerso un altro aspetto interessante. Il micelio fungino sembra essere distribuito in maniera non uniforme nelle varie porzioni del bulbillio, ma sembra localizzarsi con maggiore frequenza nei tessuti esterni, si è ritenuto pertanto interessante approfondire questo aspetto con ulteriori prove.

La prova è stata svolta presso le 4 imprese vivaistiche partner del progetto (Saturi, Il Germoglio, Gruppi, Orto Mio). I vasi sono stati preparati all'inizio del mese di dicembre 2021 e mantenuti in serra fredda; trascorsi 3 mesi dalla semina, a marzo 2022, le piantine sono state estirpate ed è stata valutata l'efficacia dei trattamenti. E' stata calcolata la percentuale di bulbilli germogliati e le piantine sono state suddivise in 3 classi sulla base del loro sviluppo ed è stata inoltre misurata la lunghezza delle radici. Successivamente, sono state identificate le specie fungine sviluppatesi, prelevando da ciascuna piantina una porzione di bulbillio.

Sono emerse differenze significative tra le tesi confrontate. Trattare i semi con prodotto chimico a base di Tebuconazolo (Mystic) ha portato ad una percentuale di germogliamento dei bulbilli superiore e ad un maggiore sviluppo delle piante e delle loro radici. Al contrario, le piantine provenienti dai semi trattati con *T. harzianum* (Trianum P) erano globalmente meno sviluppate. Confrontando gli altri 2 prodotti biologici, si è notato che quello a base di *B. subtilis* (Serenade Max) ha favorito maggiormente lo sviluppo della pianta e che i suoi effetti erano simili a quelli ottenuti con il prodotto chimico a base di tebuconazolo (Mystic). A livello di incidenza % di specie fungine nei bulbilli germogliati, è stata registrata in particolare la presenza di *F. oxysporum* e *F. proliferatum* e, in percentuali inferiori, *Penicillium* spp. Concentrando l'attenzione su *Fusarium* spp., non sono state riscontrate

differenze tra i trattamenti, mentre, per quanto riguarda *Penicillium* spp., vi erano differenze tra le tesi ($P < 0,01$). L'incidenza di questo genere fungino nei bulbilli provenienti dai semi trattati con il prodotto a base di Tebuconazolo (Mystic) era infatti superiore rispetto agli altri trattamenti. Infine, sono state riscontrate differenze significative anche per quanto riguarda l'interazione tra i fattori vivaio*tesi a livello di % di semi germogliati. In particolare, presso il vivaio Orto Mio, la percentuale di semi germogliati era significativamente inferiore ($P < 0,01$) rispetto agli altri 3 vivai e le piantine e le loro radici erano meno sviluppate ($P < 0,01$). Inoltre, sempre presso questo vivaio, è stata registrata una minore incidenza sia di *F. oxysporum* ($P < 0,01$), sia di *F. proliferatum* ($P < 0,01$). Queste differenze rispetto alle altre 3 imprese sono probabilmente attribuibili alle diverse condizioni in cui sono stati mantenuti i vasi presso i vivai; probabilmente, presso l'azienda Orto Mio, ove i bulbilli sono stati seminati in contenitori alveolati da 48 alveoli/cassa suddivisi in vaschette singole da 6 fori, le piantine sono state assoggettate a irrigazioni molto più frequenti avendo minore autonomia idrica dovuta al volume di torba più contenuto rispetto alla prova in vaso condotta negli altri tre vivai.

Escludendo i dati di Orto Mio ed analizzando i dati relativi solamente alle altre 3 imprese, si è notato che il prodotto a base di *B. subtilis* (Serenade Max) ha avuto effetti simili a quelli ottenuti con il Tebuconazolo (Mystic) soprattutto per quanto riguarda il germogliamento dei semi, il livello di sviluppo della pianta e la lunghezza delle radici. Questo suggerisce che tale prodotto biologico potrebbe essere una valida alternativa all'utilizzo di sostanze chimiche.

I semi trattati alla *Blumen* sono stati utilizzati anche nella prova in pieno campo. Il campo sperimentale era ubicato sui terreni dell'azienda agricola Rastelli in San Pietro in Cerro, Piacenza.

I bulbilli sono stati seminati alla fine di ottobre 2021 e i rilievi sono stati effettuati all'inizio del mese di marzo 2022, quando le piantine si trovavano indicativamente nella fase fenologica BBCH15.

Da una prima osservazione visiva relativa allo sviluppo delle piante, non sono state rilevate evidenti differenze tra le tesi confrontate. Per quanto riguarda la classificazione per scala di gravità dei sintomi, è emerso che nessuna pianta tra quelle campionate presentava sintomi visibili di marciume secco. Questo è abbastanza in linea con quanto era emerso dalla prova in campo del progetto precedente, in cui, in questa fase precoce di sviluppo della pianta, era stato riscontrato un indice medio di gravità dei sintomi molto basso (4,1 %); tale indice aumentava invece molto durante i rilievi successivi, arrivando al 55,9 % alla raccolta. Nonostante non vi fossero sintomi evidenti di marciume secco, è stata riscontrata nella zona della corona di alcune piante la presenza di funghi patogeni, in particolare quella di *F. proliferatum* e quella di *Penicillium* spp. ([tabella 18](#)), a conferma che i bulbi possono essere infetti anche se asintomatici. Confrontando i dati percentuali, si è notato un effetto positivo da parte del prodotto biologico a base di *B. subtilis* (Serenade Max) su tutti i parametri valutati, anche se le differenze tra le tesi non sono in realtà risultate statisticamente significative. Non è stata invece riscontrata la

presenza di *F. oxysporum*, a differenza di quanto era emerso dalla prova di campo del progetto precedente.

In generale, tutte le prove di trattamento dei bulbilli non hanno fornito risultati soddisfacenti in termini di riduzione della presenza di *Fusarium* spp.. Pertanto, è stato ritenuto utile verificare la localizzazione del micelio fungino nei bulbilli per comprendere quale tipo di intervento potrebbe risultare più efficace. **Questa attività non era prevista nel progetto.**

A questo scopo è stata allestita una prova in cui sono state analizzate separatamente 5 diverse porzioni del bulbillo-seme: tegumenti esterni, base, germe, parte superiore e parte centrale.

Dalla prova è emerso che i tegumenti esterni, non sottoposti ad alcun trattamento di disinfezione, risultano sempre colonizzati (100% di incidenza); anche le altre sezioni, in particolare la base, nonostante siano dapprima state disinfettate sono risultate spesso colonizzate. Focalizzando l'attenzione sui germi, si è notato che in quelli maggiormente sviluppati c'è spesso traccia del fungo; invece, in quelli meno sviluppati, il micelio fungino sembra non essere ancora presente. Questa considerazione è importante, in quanto potrebbe indicare che il fungo non si trova già nel germe, ma lo colonizza solo in un secondo momento, durante lo stoccaggio dell'aglio, a partire dalla base e dagli strati più esterni.

Allo scopo di trovare conferma a quanto è emerso dalla prima prova, volendo conoscere con maggiore precisione dove è localizzato il fungo all'interno del bulbillo-seme, le diverse sezioni dello spicchio, in particolare il germe, sono state osservate con lo stereomicroscopio in diverse fasi di sviluppo del seme.

La prova ha confermato quanto era già in parte emerso dalla prova precedente: il micelio fungino non è distribuito uniformemente nelle diverse porzioni del bulbillo- seme.

In particolare, la base e la porzione di spicchio a cui era stata sottratta base e germe sono risultate spesso contaminate, registrando livelli di contaminazione rispettivamente pari a 66,67% e 88,30%. Inoltre, anche in questo caso predomina la presenza di *Fusarium* spp.

Focalizzando l'attenzione sui germi, l'osservazione allo stereomicroscopio non ha evidenziato tracce del micelio fungino. Invece, le analisi svolte in laboratorio, hanno in alcuni casi rivelato la presenza, seppur ridotta, del fungo (16,67% di presenza); ciononostante, non sono emerse differenze significative tra le varie prove, svolte a diverse fasi di sviluppo del seme.

<p>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità</p>	<p><i>descrivere in che misura sono stati raggiunti gli obiettivi previsti, giustificando eventuali scostamenti dal progetto originario. Analizzare eventuali criticità tecnicoscientifiche emerse durante l'attività</i></p>
<p>evidenziate</p>	<p>Complessivamente, il trattamento di <i>film coating</i> ha fornito una buona copertura dei semi, anche se, dalle 3 prove, non sono emerse differenze significative tra i trattamenti dal punto di vista statistico. Ciononostante, confrontando tutti i dati, si è notato che il prodotto a base di <i>B. subtilis</i> e quello a base di Tebuconazolo hanno avuto i migliori effetti soprattutto in termini di germogliamento dei bulbilli-seme e di sviluppo della pianta.</p> <p>I bulbilli-seme sono comunemente infetti da <i>Fusarium spp.</i> che si trova distribuito soprattutto nelle porzioni più esterne del bulbo. La sua presenza nel germe, seppur sporadica, non è però da escludere. Non è stato invece possibile confermare l'ipotesi che il fungo non sia già presente nel germe e che lo colonizzi solamente in un secondo momento, durante lo stoccaggio dell'aglio.</p>
<p>Attività ancora da realizzare</p>	<p><i>Solo per relazioni intermedie - descrivere sinteticamente le attività ancora da realizzare</i></p>

Azione	CONCLUSIONI DELLE WP 1-2-3
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	<p><i>descrivere in che misura sono stati raggiunti gli obiettivi previsti, giustificando eventuali scostamenti dal progetto originario. Analizzare eventuali criticità tecnicocientifiche emerse durante l'attività</i></p> <p>Il progetto era organizzato in tre <i>work package</i>.</p> <p>Dalla prima parte del lavoro, finalizzata alla valutazione dell'integrità del bulbilli-seme, è emerso che i bulbilli presentano spesso piccole lesioni, potenziali vie di ingresso di funghi patogeni, e che la maggior parte di esse è provocata dalle operazioni di spicchiatura. Pertanto, è importante cercare di ridurre queste ferite e apportare piccoli miglioramenti alla meccanica della macchina sgranatrice.</p> <p>L'obiettivo del secondo <i>work package</i> era invece quello di ottenere bulbilli-seme sani con tecniche sostenibili. Tra le soluzioni testate, il calore umido e i prodotti disinfettanti (H₂O₂ e C₂H₄O₃) hanno ridotto la colonizzazione fungina dei semi ma, allo stesso tempo, ne hanno compromesso il germogliamento; il calore secco, al contrario, non si è rivelato particolarmente efficace nei confronti di <i>Fusarium</i> spp.. Con l'O₃ si è invece riusciti ad ottenere una buona riduzione della contaminazione e una percentuale di germogliamento simile al controllo non trattato. Pertanto, pur non essendo risultato completamente risolutivo, questo metodo si è rivelato il più promettente; poiché non altera le caratteristiche dell'aglio e non lascia residui nel prodotto, potrebbe essere applicabile anche dopo la raccolta dei bulbi, nel periodo di stoccaggio dell'aglio, durante il quale il fungo continua a svilupparsi.</p> <p>Nella terza e ultima parte del progetto, è stata valutata l'efficacia di concianti di origine chimica (tebuconazolo) o biologica (<i>B. subtilis</i>, <i>P. chlororaphis</i> e <i>T. harzianum</i>) applicati al seme mediante <i>film coating</i>. Sono state eseguite una prova in vaso, una in vivaio e una in pieno campo, dalle quali è però emerso che nonostante il <i>film coating</i> abbia fornito una buona copertura del seme-</p>

	<p>aglio, i prodotti fitosanitari testati non sono riusciti a ridurre l'incidenza fungina dei bulbilli. Tuttavia, nelle prove in vivaio e in campo in cui è stata data al seme una migliore copertura grazie al trattamento realizzato in azienda specializzata, il prodotto chimico a base di tebuconazolo e quello biologico a base di <i>B. subtilis</i> hanno dato i risultati più promettenti soprattutto in termini di germogliamento e di sviluppo della pianta.</p> <p>Infine, da prove di approfondimento realizzate al di fuori delle attività previste dal progetto, è emerso che <i>Fusarium</i> spp. si trova soprattutto nella porzione esterna del bulbillo-seme ma che può essere presente anche nel germe.</p> <p>In conclusione, pur non essendo stata trovata una strategia completamente risolutiva, dal progetto BIANCOSEME sono emersi numerosi aspetti molto interessanti e utili nella prevenzione della fusariosi dell'aglio.</p>
Attività ancora da realizzare	<i>Solo per relazioni intermedie - descrivere sinteticamente le attività ancora da realizzare</i>

Azione	DIVULGAZIONE
Unità aziendale responsabile	COPAP - UCSC
Descrizione delle attività	<p>descrizione delle attività svolte per il raggiungimento degli obiettivi previsti dall'azione</p> <p>Si premette che le attività di divulgazione, sebbene interamente realizzate, sono state ostacolate e, addirittura, per un notevole periodo praticamente impedito dallo stato emergenziale conseguente all'epidemia COVID19.</p> <p>All'organizzazione degli eventi di divulgazione e/o alla predisposizione del materiale necessario hanno partecipato anche: AGRISILVA – BLUMEN – IL GERMOGLIO.</p> <p>Sono stati realizzati:</p> <p><u>n. 2 seminari divulgativi:</u> il <u>primo</u> si è tenuto in presenza in data 19 dicembre 2019 - in concomitanza con quello di chiusura di un precedente GO COPAP-UCSC; durante questo evento è stata data ampia informazione degli scopi e degli obiettivi del progetto BIANCOSEME quale logica prosecuzione del precedente ed ormai concluso GO; il <u>secondo</u> si è tenuto in modalità webinar in data 30 marzo 2022 con la partecipazione di circa 80 intervenuti; durante i lavori si sono riprese le motivazioni del progetto, si sono esposti i risultati ottenuti e sono stati delineati gli spunti per ulteriori futuri approfondimenti.</p> <p><u>n. 2 visite guidate</u> al campo sperimentale realizzato presso l'azienda agricola Rastelli nelle date 29/3/2022 e 30/3/2022, in cui UCSC hanno evidenziato direttamente in campo gli esiti dei trattamenti di concia del "seme"; alle visite, promosse sia sul sito web sia nel corso del seminario del 30/3/2022, hanno preso parte 22 partecipanti;</p> <p><u>N. 2 pubblicazioni su riviste del settore:</u> "Sanificazione del seme, una priorità nella prevenzione del marciume secco dell'aglio" – In corso di pubblicazione su "Terra e Vita" "Seme sano per prevenire il marciume dell'aglio" – in corso di pubblicazione su "La voce del Coltivatore", numero di luglio 2022</p> <p><u>una serie di n. 3 podcast</u> https://www.youtube.com/channel/UCGDltaiqRFCljz5FYmoIKGw visibili singolarmente ai seguenti indirizzi: https://www.youtube.com/watch?v=U6-4ZIRCPQ4 https://www.youtube.com/watch?v=VtOculULrGE https://www.youtube.com/watch?v=Td6w2tuO7do implementazione del <u>sito web COPAP</u> https://www.copap.it/ oltre che del sito di COPAP dedicato alla fusariosi dell'aglio https://www.fusariosiaglio.it/ implementazione del <u>sito web UNICATT</u> https://dipartimenti.unicatt.it/m/diproves-progetti-di-ricerca-biancoseme</p> <p><u>n. 1 articolo su rivista scientifica:</u> "The effect of physical and chemical treatments applied on seeds in preventing garlic dry rot" (articolo in preparazione, possibile rivista Phytopathologia Mediterranea) <u>Presentazione al Convegno annuale Società Italiana di Patologia Vegetale, Palermo, 21-23 settembre 2022</u></p>

	"Seed treatments to prevent garlic dry rot"
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 tecnicoscientifiche emerse durante l'attività</i>
Attività ancora da realizzare	<i>Solo per relazioni intermedie - descrivere sinteticamente le attività ancora da realizzare</i>

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	Ore	Costo
	Impiegata di concetto	Coordinamento della cooperazione	328	8.856,00
	Operaia	Collaborazione alla fase di messa a punto della sgranatrice ed alle relative prove sperimentali	208	5.616,00
COPAP - personale			536	14.472,00
	Imprenditore agricolo	Coordinamento e sperimentazione	34	663,00
	Imprenditore agricolo	Sperimentazione	70	1.365,00
SATURI - personale			104	2.028,00
	quadro	Coordinamento, divulgazione	14	602,00
	quadro	Direttore tecnico	12	516,00
	operaio	Sperimentatore	42	1.134,00
IL GERMOGLIO - personale GRUPPI			68	2.252,00
	Imprenditore agricolo	sperimentatore	110	2.145,00

	quadro	Coordinamento e responsabile prove	20	860,00
	impiegato	Sperimentatore	48	1.296,00
ORTO MIO - personale			68	2.156,00
	Professore 1° fascia ricercatore	Responsabile scientifico sperimentatore	525	38.325,00
	Assegnista di ricerca	sperimentatore	2.570	33.625,84
	Assegnista di ricerca	sperimentatore	930	11.894,82
UCSC - personale				95.625,66
	quadro	Responsabile della prova	38	1.634,00
	impiegato	Sperimentatore	100	2.700,00
BLUMEN - personale			138	4.334,00
			Totale:	123.012,31

2.3 Trasferte

Cognome e nome	Descrizione	Costo
		Totale:

2.4 Materiale consumabile

Fornitore	Descrizione materiale	Costo
		Totale:

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

Complessivamente l'importo maturato con i due corsi realizzati è pari a 26.438,23€ di cui contributo pubblico 23.781,63 €.

L'importo maturato è leggermente superiore rispetto a quanto previsto da progetto 26.146,56 € di cui contributo pubblico 23.531,90 €.

L'obiettivo quantitativo è quindi stato completamente raggiunto.

Anche dal punto di vista qualitativo e di contenuto le iniziative formative hanno raggiunto gli obiettivi previsti.

Le attività formative realizzate si sono articolate su due corsi entrambi afferenti alla proposta **5356226**.

Le attività didattiche si sono svolte nei mesi di febbraio e marzo 2022 coinvolgendo un totale di 37 allievi provenienti prevalentemente dai territori delle province di Piacenza e Ferrara, territori maggiormente interessati dalla produzione di aglio bianco di alta qualità.

Le attività formative oltre ad implementare le conoscenze degli allievi sono state l'occasione per sviluppare importanti relazioni fra i produttori piacentini e il Consorzio produttori aglio di Voghiera. La condivisione delle buone prassi adottate e dei risultati delle ricerche promosse dal GO sono state un elemento molto importante nel percorso di crescita delle due realtà territoriali.

2.8 Collaborazioni, consulenze, altri servizi

CONSULENZE - PERSONE FISICHE

Nominativo del consulente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
COPAP -	2.400,00	attività di esercizio della cooperazione	2.400,00
COPAP -	7.520,00	Consulenza all'attività di sperimentazione di campo e stabilimento, inserimento dati	7.520,00
COPAP -	6.080,00	Consulenza alla sperimentazione di campo e in stabilimento	6.080,00

COPAP - TOTALE			16.000,00
AGRISILVA	1.000,00	Consulenza per l'esercizio della cooperazione	1.000,00
		Totale:	17.000,00

CONSULENZE – SOCIETÀ

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

3 - Criticità incontrate durante la realizzazione dell'attività

Lunghezza max 1 pagina

Criticità tecnicospicifiche	Non si sono riscontrate particolari criticità di questo tipo
Criticità gestionali (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Si segnala la criticità legata alla pandemia COVID19 che si è espressa lungo tutto il tempo di realizzazione del Piano
Criticità finanziarie	Non si sono riscontrate particolari criticità di questo tipo

4 - Altre informazioni

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

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

Si rinvia alla relazione tecnico scientifica rilasciata dal partner UCSC ed allegata alla presente, da intendersi integralmente richiamata in questa sede.

Data 20/05/2022

Innovazione organizzativa e di processo della filiera per la produzione sostenibile di seme sano di aglio bianco piacentino

ACRONIMO: *BIANCOSEME*

Focus area 3A

Relazione

DIPROVES-Università Cattolica del Sacro Cuore

Sommario

Premessa	3
WP1 Valutazione del seme prodotto con le attuali macchine e procedure	4
WP2 Sanificazione dei bulbi.....	7
Sanificazione con ozono.....	8
Sanificazione con calore	16
Sanificazione con disinfettanti.....	20
WP3 Valutazione dell'efficacia di trattamenti di concia del seme.....	25
Prova in vaso	26
Prova in vivaio	36
Prova in campo	42
Studi relativi alla localizzazione del micelio fungino nel bulbillo	44
Conclusioni	50
Bibliografia.....	50

Premessa

Il marciume secco dell'aglio è un problema emergente che determina ingenti perdite di produzione, in particolare durante lo stoccaggio. La malattia si manifesta sui bulbilli con aree necrotiche brune, depresse al centro; nei casi più gravi i bulbi appaiono svuotati e il micelio fungino diventa visibile. Causa della problematica sono i funghi appartenenti al genere *Fusarium*, in particolare *F. proliferatum* e *F. oxysporum*.

Un precedente lavoro (Mondani et al., 2020) ha messo in evidenza la crucialità del seme nella problematica, in quanto comunemente infetto con incidenza prossima al 100%, seppure in assenza di sintomi visibili della patologia. Obiettivo del progetto è cercare di intervenire nei punti critici rilevati nella linea di produzione del seme con interventi che direttamente o indirettamente contribuiranno anche alla sanità del prodotto alla raccolta e durante la conservazione, fino al consumo.

Il progetto si focalizza sui seguenti aspetti:

1. Migliorare la meccanica della macchina sgranatrice, da utilizzare dopo la calibrazione dei bulbi;
2. Ottimizzare gli interventi di disinfezione, con alta priorità per i metodi ad impatto zero, sia ambientale sia sugli operatori;
3. Applicare la concia delle sementi con prodotti a basso impatto, prediligendo quelli biologici ed utilizzando una concia *film coating*.

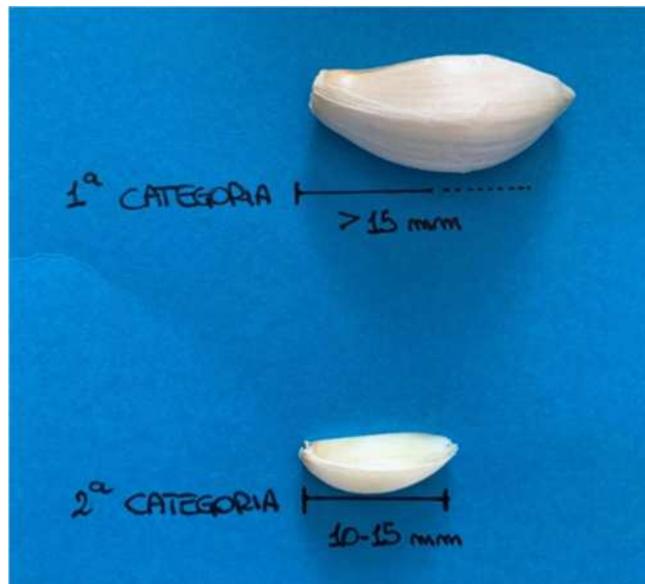
WP1 Valutazione del seme prodotto con le attuali macchine e procedure

I tecnici di Co.P.A.P. (Cooperativa Produttori Aglio Piacentino) eseguono un'operazione di spicchiatura-sgranatura dei bulbi di aglio, dalla quale si ricavano 2 categorie di seme, classificate come prima e seconda categoria, in base alla dimensione del bulbillo ([figura 1](#)). Gli spicchi che non presentano le caratteristiche richieste per la semina vengono destinati all'industria alimentare.

La spicchiatura è un punto critico della filiera, in quanto la macchina sgranatrice può provocare ai bulbilli lesioni anche piccole che favoriscono l'ingresso di funghi patogeni.

L'obiettivo di questa azione è evidenziare le principali lesioni apportate ai semi durante la fase di spicchiatura, al fine di migliorare la meccanica della macchina sgranatrice.

Figura 1: Categorie di seme, individuate in base alla dimensione: prima categoria (bulbilli più grandi, con una lunghezza >15mm) e seconda categoria (bulbilli più piccoli, con una lunghezza 10-15 mm).



Materiali e metodi

Per valutare le operazioni di preparazione del seme e il numero di lesioni causate dalla macchina sgranatrice, sono stati campionati i bulbilli- seme provenienti da 4 partite differenti. Per ogni cassone sono stati prelevati volumi pari a 2 L di seme in 5 repliche.

I bulbilli sono stati successivamente suddivisi nelle 2 categorie di seme a seconda della loro dimensione. Successivamente, sono stati immersi in una soluzione colorante blu per 10 minuti, al fine di evidenziare le lesioni presenti sugli spicchi, classificate come:

- ferite meccaniche (recenti) dovute alle operazioni di spicchiatura;
- lesioni precedenti alle operazioni di spicchiatura, dovute a *Fusarium* spp. o a lesioni meccaniche precedenti.

Risultati

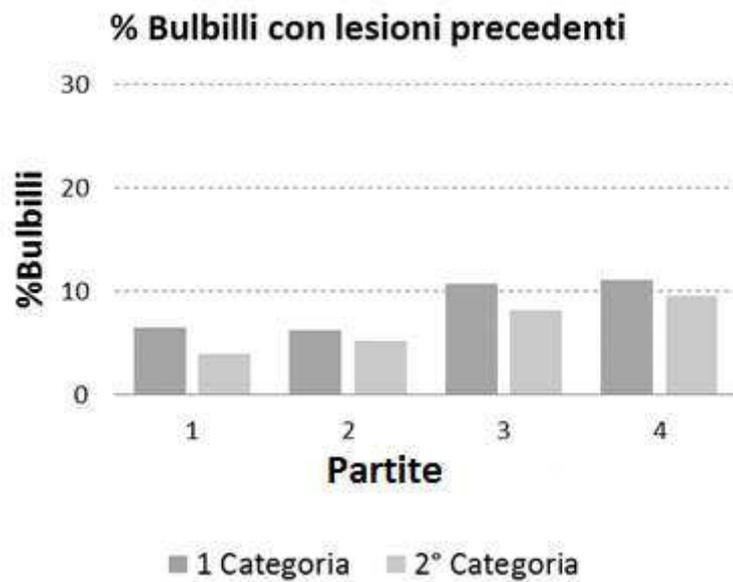
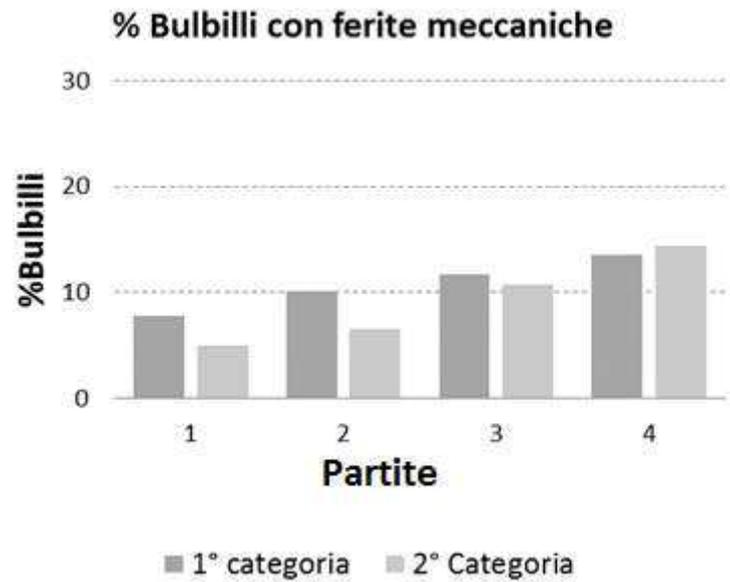
Dall'analisi eseguita sui bulbilli- seme è emerso che gli spicchi appartenenti alla prima categoria presentavano maggiori lesioni, sia in termini di ferite meccaniche, che in termini di lesioni precedenti dovute a *Fusarium* spp. o a danni meccanici. Inoltre, le lesioni dovute a ferite precedenti arrivavano fino ad un massimo dell'11,1% del prodotto analizzato, mentre le piccole ferite legate alle operazioni di sgranatura raggiungevano un massimo del 14,4% dei bulbilli-seme ([figura 2](#)).

Considerazioni finali

La prova ha confermato che le operazioni di preparazione dei bulbilli per la semina, possono provocare piccole lesioni potenzialmente pericolose, in quanto favoriscono l'ingresso di funghi patogeni, al pari delle lesioni presenti prima delle operazioni di spicchiatura.

Sarebbe pertanto importante migliorare la meccanica della macchina sgranatrice e, in generale, movimentare le partite di aglio, specie se destinato alla semina, durante tutte le fasi del post-raccolta.

Figura 2: Percentuale dei bulbilli- seme interessati da lesioni precedenti alle operazioni di spicchiatura e da ferite meccaniche causate dalla macchina spicchiatrice.



WP2 Sanificazione dei bulbi

Questa azione si propone di ottimizzare gli interventi di disinfezione dei bulbilli, prediligendo metodi a basso impatto o ad impatto zero, sia ambientale sia sugli operatori, tra i quali:

- Ozono gassoso;
- Calore secco e umido;
- Prodotti disinfettanti.

Sanificazione con ozono

L'obiettivo di questo intervento è testare l'efficacia dell'ozono gassoso nel ridurre la contaminazione da *Fusarium* spp. nei bulbilli di aglio naturalmente infetti.

A questo scopo sono state valutate *in vitro* in apposite camere ad atmosfera controllata diverse concentrazioni di ozono, al fine di individuare le più idonee alla riduzione della vitalità di funghi appartenenti al genere *Fusarium*. Successivamente, al fine di definire il tempo di trattamento ottimale, i bulbilli di aglio sono stati sottoposti a diversi tempi di esposizione al gas.

Prova *in vitro*

Materiali e metodi

Per testare l'efficacia dell'ozono nella riduzione della crescita delle 2 specie maggiormente isolate dall'aglio, nel corso del precedente progetto PSR (*F. proliferatum*, *F. oxysporum*), è stata allestita una prova *in vitro* su terreno di coltura *Garlic Medium* (GM), composto da: 2% di polvere di aglio, 92 mL glicerolo, 15 g agar disciolti in 1 L di acqua demineralizzata; preparato allo scopo di riprodurre al meglio le caratteristiche del substrato naturale, possiede un contenuto di acqua libera (a_w) di 0.98.

Scopo della prova è stato evidenziare l'effetto di 4 concentrazioni di ozono (0, 50, 100, 200 ppm) a 3 tempi di esposizione (15, 30, 60 minuti), sia sulla germinazione delle spore, sia sulla crescita del micelio, ponendo a confronto le diverse tesi con un testimone non trattato.

Germinazione delle spore: piastre Petri contenenti GM sono state inoculate con 0,1 mL di sospensione conidica con concentrazione pari a 10^6 conidi/ml ed esposte ad ozono nelle concentrazioni e nei tempi sopracitati, mediante l'utilizzo di un generatore di ozono ([figura 3](#)). La prova è stata condotta in triplicato e le piastre sono state incubate a 25°C con 12h di fotoperiodo. Trascorse 24h e 48h, da ogni piastra sono stati prelevati 2 dischetti di agar da 1 cm di diametro, posti poi su vetrini da microscopio e colorati con 1 goccia di blu di lattofenolo, allo scopo di evidenziare le spore presenti e bloccare la germinazione.

Al termine del trattamento, per ogni dischetto si è proceduto alla conta dei conidi geminati secondo la seguente formula:

$$\% \text{ Spore germinate} = (\text{spore germinate} / 25 \text{ spore}) * 100.$$

Riduzione crescita del micelio: piastre Petri contenenti GM sono state inoculate centralmente con un tassello di 5 mm di diametro prelevato dai margini della colonia dei due funghi di interesse (*F. oxysporum*, *F. proliferatum*). Le piastre inoculate sono state incubate per 48h a 25°C con 12h di fotoperiodo e successivamente esposte all'ozono nelle concentrazioni e nei tempi sopracitati. La prova è stata eseguita in triplicato e dopo il trattamento le piastre sono state incubate a 25°C con 12h di fotoperiodo. Trascorse 24h e 48h è stato misurato il diametro delle colonie per verificare l'effetto dei trattamenti sulla crescita dei funghi.

Analisi dei dati. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata alla % di spore germinate, dopo trasformazione arcoseno, e del diametro della colonia utilizzando il pacchetto statistico PASW *statistics* (ver.19, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di *Tukey*.

Figura 3: Generatore di ozono presente presso i laboratori dell'Università di Cranfield (UK).



Risultati

I trattamenti hanno mostrato alcune differenze statisticamente significative sia per quanto riguarda la germinazione delle spore, sia per quanto riguarda il diametro della colonia ([tabella 1](#)).

Germinazione delle spore: La percentuale di spore germinate non è risultata significativamente differente tra i 2 funghi, ma è variata dal 97,00% al 32,28% all'aumentare della concentrazione di ozono, con la massima efficacia a 200 ppm. Per quanto riguarda il fattore tempo, invece, i trattamenti con esposizioni di 30 e 60 minuti sono risultati più efficaci rispetto a quelli a 15 minuti, con una diminuzione di efficacia del 26,29% ([tabella 1](#)). Infine, con l'aumentare del tempo di incubazione, la percentuale delle spore germinate è aumentata, dal 33,78% (24h) al 74,39% (48h), mostrando che l'efficacia dei trattamenti diminuisce all'aumentare del tempo di incubazione.

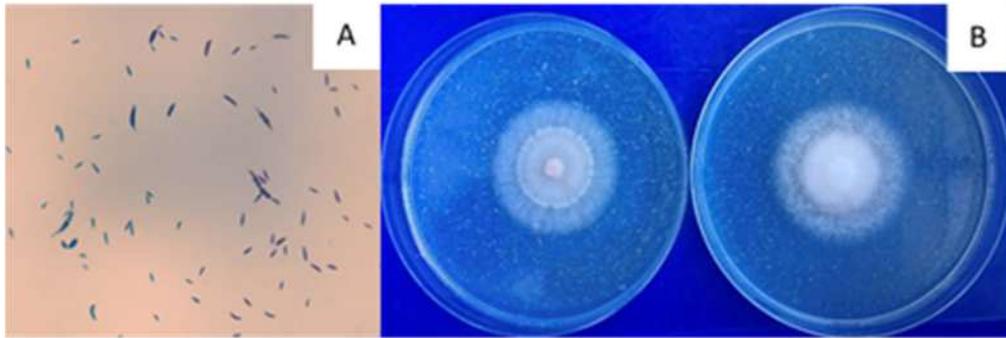
Crescita del micelio: Per quanto riguarda la crescita del micelio, i 2 isolati hanno mostrato diverso comportamento. *F. proliferatum* ha raggiunto un diametro maggiore rispetto a *F. oxysporum* (rispettivamente 3,35 cm rispetto a 3,14 cm); ciò può essere attribuito ad una maggiore adattabilità alla crescita su GM rispetto a *F. oxysporum* o ad una seppur minima sensibilità all'ozono. La differenza, anche se significativa, è di scarsa rilevanza pratica, come pure la differenza osservata con diverse concentrazioni di ozono; le concentrazioni di 100 e 200 ppm hanno determinato una riduzione nella densità del micelio rispetto al testimone, come si nota in [figura 4](#). Per quanto riguarda il tempo di esposizione, analogamente a quanto osservato per gli altri fattori considerati, le differenze sono significative ma non di rilevanza pratica, variando il diametro della colonia da 3,20 a 3,29 cm. Infine, con l'aumentare delle ore di coltura in piastra, il diametro delle colonie è raddoppiato a partire dal tempo 0 fino al termine delle 48h, mostrando la limitata efficacia del trattamento.

Tabella 1: ANOVA dei dati di germinazione delle spore e del diametro delle colonie dopo trattamento con ozono a diverse concentrazioni e tempi di esposizione. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$).

	% Spore germinate	Diametro della colonia (cm)
Isolato fungino	n.s.	**
<i>F. oxysporum</i>	56,47	3,14 a
<i>F. proliferatum</i>	51,69	3,35 b
ppm O₃	**	**
0	97,00 c	3,31 b
50	46,11 b	3,26 b
100	40,94 b	3,20 a
200	32,28 a	3,20 a
Tempo esposizione O₃ (min)	**	**
15	65,58 b	3,29 c
30	51,71 a	3,24 b
60	44,96 a	3,20 a
Tempo di incubazione (h)	**	**
0		2,37 a
24	33,78 a	3,25 b
48	74,39 b	4,11 c
Isolato fungino*ppm O₃	*	*
Isolato fungino*Tempo di incubazione	n.s.	n.s.
Isolato fungino*Tempo esposizione O₃	n.s.	*
Ppm O₃*Tempo di incubazione	**	**
Ppm O₃*Tempo esposizione O₃	**	n.s.
Tempo di incubazione*Tempo esposizione O₃	n.s.	**
Isolato fungino*ppm O₃*Tempo di incubazione	n.s.	**
Isolato fungino*ppm O₃*Tempo esposizione O₃	n.s.	**
Isolato fungino*Tempo di incubazione*Tempo esposizione O₃	n.s.	n.s.
Ppm O₃*Tempo di incubazione*Tempo esposizione O₃	n.s.	*
Isolato fungino*ppm O₃*Tempo di incubazione*Tempo esposizione O₃	n.s.	n.s.

n.s.= non significativo, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Figura 4: A: Spore in germinazione di *F. proliferatum* dopo trattamento con 200 ppm, 15 minuti di esposizione, 48h dopo il trattamento. B: *F. oxysporum* (sx), *F. proliferatum* (dx) morfologia della colonia dopo trattamento con 200 ppm, 60 min di esposizione, 48h dopo il trattamento.



Trattamento dei bulbilli

Materiali e metodi

Scelta del materiale e condizioni di trattamento

Dopo la prova *in vitro*, sono stati sottoposti ai trattamenti con l'ozono i bulbilli di aglio, suddivisi nelle 2 categorie.

È stato testato un nuovo prototipo di macchina, dotato di una camera cilindrica rotante in cui vengono inseriti i campioni da trattare ([figura 5](#)). La concentrazione di ozono all'interno della camera è pari a 500 ppm e resta costante finché il generatore del gas è acceso, mentre, una volta spento, tale concentrazione si azzerava rapidamente.

Sono stati presi in considerazione diversi tempi di esposizione al gas, riportati in [tabella 2](#). In alcuni casi (tesi 1-7 e 9, 10), i bulbilli sono stati esposti direttamente all'ozono per 2,5, 5 o 10 minuti e, una volta spento il generatore di ozono, sono stati lasciati all'interno del cilindro per un ulteriore lasso di tempo (5-40 min). In altri casi invece (tesi 11, 13 e 14), i bulbilli sono stati esposti per più tempo ai 500 ppm di ozono e subito dopo estratti dalla camera.

Alcuni campioni non sono stati sottoposti al trattamento con ozono e sono serviti come controllo non trattato. Poiché l'esecuzione della prova è avvenuta in 3 giornate distinte, in ciascuna delle quali è stato analizzato un lotto differente di aglio, sono stati presi in considerazione 2 campioni-controllo: il primo (tesi 8), come riferimento per i primi 7 trattamenti, il secondo (tesi 12), per gli ultimi 2.

Analisi dei campioni

Per ciascuno dei trattamenti eseguiti, è stata effettuata la conta delle Unità Formanti Colonia (UFC) e sono state allestite prove di germinabilità del seme. Per ogni tesi sono stati analizzati 20 bulbilli di aglio (10 per eseguire la conta UFC, 10 per germinabilità su carta) in 3 repliche (TOT= 60 bulbilli di ciascuna categoria).

La conta delle Unità Formanti Colonia (UFC) è stata eseguita mediante il metodo delle diluizioni seriali (*spread plate*). Prima dell'analisi delle UFC, i campioni sono stati pesati per poter calcolare il dato di contaminazione per grammo di seme di aglio (UFC/g di seme). Dopo il trattamento con l'ozono, gli spicchi sono stati tagliati in piccoli pezzi, a cui sono stati aggiunti 10 mL di acqua peptonata sterile all' 1%; sono stati quindi omogenizzati per 1 minuto e 30 secondi con lo *stomacher* (*Bag Mixer 400, Interscience, Saint Nom, France*). A partire dal campione omogenizzato sono state eseguite le diluizioni seriali fino a 10^{-5} . Le diluizioni da 10^{-2} a 10^{-5} sono state utilizzate per la posa in piastra.

È stato impiegato il terreno selettivo *Nash Snyder* (FSA), selettivo per il genere *Fusarium*, secondo la seguente composizione: 1 g/L di KH_2PO_4 , 0.5 g/L di $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 15 g/L di peptone, 20 g/L di agar tecnico disciolti in 1L di acqua demineralizzata; dopo autoclavaggio, il terreno, in fase di raffreddamento, è stato ammendato con 1 g/L di PCNB, 0.3 g/L di Streptomina solfato e 0.12 g/L di Neomicina solfato, come prescritto da *Nash e Snyder* (1962). Per ciascuna replica biologica sono state effettuate 3 repliche tecniche inoculando le piastre con 1 mL di sospensione e successivamente le piastre sono state incubate a 25°C per 5-7 giorni, al termine dei quali è stata eseguita la conta delle colonie.

Le camere di germinazione sono state allestite con vaschette di alluminio ponendo un foglio di carta bibula sterile sul fondo imbibita con 30 ml di acqua sterile, nelle quali sono stati disposti 10 spicchi di aglio. Le camere così preparate sono state successivamente incubate per 20 giorni a 15°C al buio, al termine dei quali si è proceduto al rilievo dei bulbilli con sviluppo di radichette.

Analisi dei dati. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata ai dati di UFC/g e al numero di spicchi germinati utilizzando il pacchetto statistico PASW *statistics* (ver. 27, SPSS Inc., Chicago, USA, 2021). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il *test* di *Tukey*.

Figura 5: Prototipo di macchina impiegata nella prova.

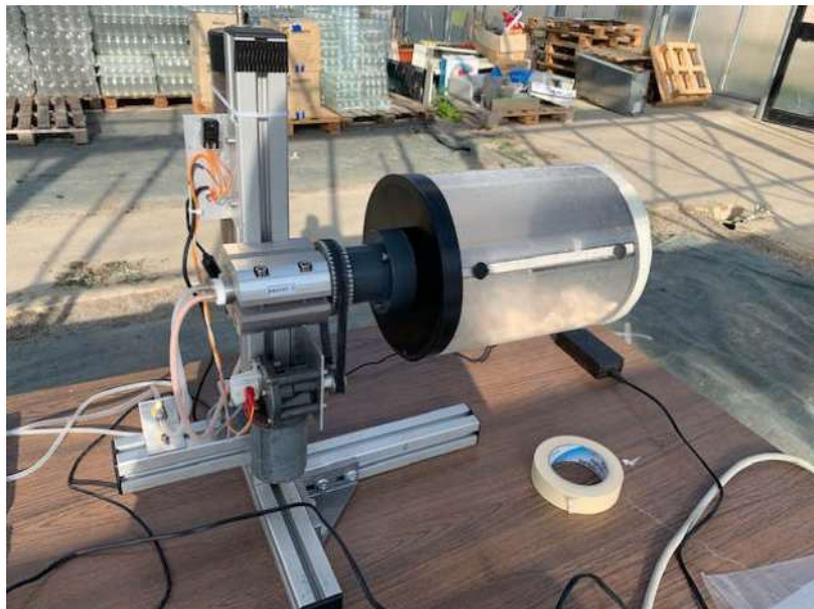


Tabella 2: Tesi di trattamento con ozono applicate ai bulbilli di aglio.

Tesi	Tempo produzione ozono (min)	Tempo esposizione senza produzione di ozono (min)
T1	2,5	10
T2	2,5	30
T3	2,5	60
T4	5	10
T5	5	30
T6	10	5
T7	10	10
T8	Controllo 1	
T9	10	20
T10	10	30
T11	20 min	0
T12	Controllo 2	
T13	30 min	0
T14	40 min	0

Risultati

Sono stati valutati gli effetti dei diversi trattamenti, per ciascuna delle 2 distinte categorie di seme e l'interazione tra questi 2 fattori.

I dati relativi alle UFC/g hanno mostrato differenze statisticamente significative ($p < 0,01$) in relazione alle tesi di trattamento ([tabella 3](#)); non sono invece emerse differenze tra le 2 categorie di seme. Sono risultati particolarmente efficaci i trattamenti in cui i bulbilli sono stati sottoposti alla massima concentrazione del gas per un tempo più lungo (tesi 9, 10, 13 e 14).

Per quanto riguarda la germinabilità, i dati relativi ai trattamenti eseguiti non si discostano in modo significativo da quelli dei rispettivi controlli, mentre sono emerse differenze tra le 2 categorie di seme ($p < 0,05$): i bulbilli di seconda categoria sono tendenzialmente germinati meno rispetto a quelli di prima categoria.

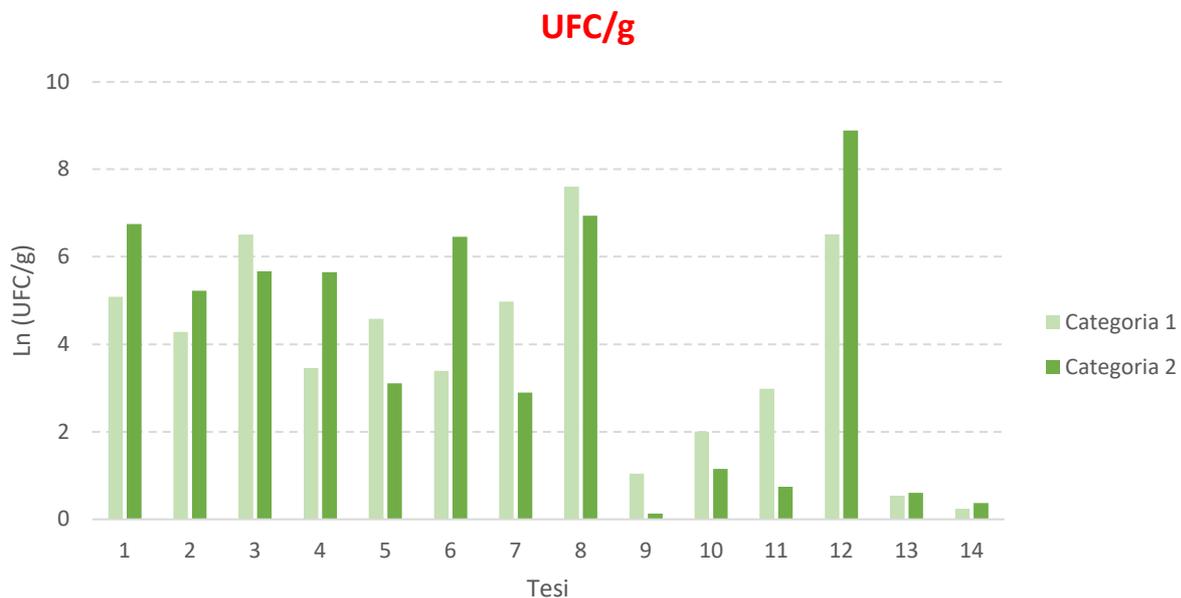
Infine, prendendo in considerazione l'interazione tra i fattori tesi e categoria di seme, sono emerse differenze a livello di UFC/g ($P < 0,05$), che tuttavia non risultano essere riconducibili al tipo di trattamento effettuato ([figura 6](#)).

Tabella 3: ANOVA dei dati di unità formanti colonie di Fusarium spp per g (UFC/g) di seme di aglio dopo trattamento con ozono gassoso e percentuale di bulbilli germinati dopo 20 giorni a 15°C. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$; categoria 1= bulbilli con una lunghezza >15mm; categoria 2= bulbilli con una lunghezza 10-15 mm).

Tesi	Tempo produzione ozono (min)	Tempo esposizione senza produzione di ozono (min)	Ln	% Germinate
			(UFC/g)	
1	2,5	10	5,91 abc	88,33 a
2	2,5	30	4,74 bc	90,00 a
3	2,5	60	6,09 abc	90,00 a
4	5	10	4,52 abc	93,33 a
5	5	30	3,79 cd	93,33 a
6	10	5	4,90 bc	96,67 a
7	10	10	3,90 cd	88,33 ab
8	Controllo 1		7,27 ab	88,33 ab
9	10	30	0,59 e	73,33 abc
10	10	40	1,58 de	76,67 abc
11	20	0	1,86 de	80,00 abc
12	Controllo 2		7,70 a	58,33 bc
13	30	0	0,57 e	50,00 c
14	40	0	0,30 e	46,67 c
Categoria			n.s.	*
1			4,17	85,95 a
2			4,06	73,10 b
Tesi*Categoria			*	n.s.

n.s.= non significativo, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Figure 6: Ln(UFC/g) in base all' interazione tra i fattori tesi e categoria di seme (Tesi 1= 2,5 min per 10 min; tesi 2= 2,5 min per 30 min; tesi 3= 2,5 min per 60 min; tesi 4= 5 min per 10 min; tesi 5= 5 min per 30 min; tesi 6= 10 min per 5 min; tesi 7= 10 min per 10 min; tesi 8= controllo 1; tesi 9= 10 min per 20 min; tesi 10= 10 min per 30 min; tesi 11= 20 min; tesi 12= controllo 2; tesi 13= 30 min; tesi 14= 40 min) (Categoria 1= bulbilli con una lunghezza >15mm; categoria 2= bulbilli con una lunghezza 10-15 mm).



Considerazioni

Sulla base di questi risultati, è possibile confermare che i bulbilli sono comunemente infetti da *Fusarium* spp. e che i bulbilli di prima categoria hanno una maggiore percentuale di germinazione. Alcuni trattamenti con ozono inseriti nella prova, in particolare 9, 10 e 11, hanno permesso di ridurre significativamente la presenza di *Fusarium* spp. senza influenzare in modo significativo sulla germinabilità. Pertanto, è possibile affermare che per l'aglio l'ozono gassoso rappresenta un promettente, anche se non risolutivo metodo di sanificazione a basso impatto, da impiegare come possibile alternativa ad altri trattamenti con fungicidi di sintesi.

Sanificazione con calore

L'obiettivo di questa sotto-azione è testare l'efficacia del calore secco e umido nel ridurre la colonizzazione da *Fusarium* spp. nei bulbilli di aglio naturalmente infetti.

Prima prova: materiali e metodi

A questo scopo, è stata allestita una prova sui bulbilli-seme, considerando diverse temperature e modalità di applicazione.

I trattamenti sono stati eseguiti sia con calore secco in stufa, sia con vapore. In [tabella 4](#) sono riportate le combinazioni tempo-temperatura applicate durante la prova. La prova è stata eseguita, come le precedenti, per entrambe le categorie di seme.

Le analisi eseguite sui bulbilli trattati sono state le medesime impiegate nella prova con ozono gassoso; anche in questo caso, è stata effettuata la conta delle Unità Formanti Colonia (UFC) e sono state allestite prove di germinabilità dei semi.

Tabella 4: Schema tempi-temperature applicati durante la prima prova.

Trattamenti	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Controllo	25	
Secco	49	20
Secco	49	30
Secco	60	15
Secco	70	10
Umido	43	90
Umido	46	60
Umido	49	20
Umido	49	30

Prima prova: risultati

Sono emerse differenze statisticamente significative tra alcuni dei trattamenti eseguiti e il controllo non trattato. In nessun caso però, i trattamenti con calore secco si sono differenziati dal testimone. Il trattamento risultato maggiormente efficace è stato quello con calore umido a 49°C per 30 minuti. Risultati simili sono stati ottenuti anche con i trattamenti con calore umido a 49°C per 20 minuti e a 46°C per 60 minuti ([tabella 5](#)).

Per quanto riguarda i dati relativi alla germinabilità, solo i trattamenti a secco a temperatura di 49°C per 20 minuti e a 70°C per 10 minuti hanno mostrato valori equiparabili al controllo non trattato, registrando comunque un calo del 15% in termini di germinabilità del seme. Gli altri trattamenti applicati hanno mostrato

cali dal 25% al 35%. Inoltre, si è osservato un maggiore vigore germinativo per i bulbilli di prima categoria, rispetto a quelli di seconda categoria, rispettivamente con valori 75,6% rispetto a 65,2%.

Infine, prendendo in considerazione l'interazione tra i fattori tesi e categoria di seme, non sono emerse differenze significative a livello di UFC/g e di germinabilità del seme.

Tabella 5: ANOVA dei dati di UFC/g di seme di aglio dopo trattamento con calore secco o umido a diverse temperature e tempi di esposizione e la percentuale di bulbilli germinati dopo 20 giorni a 15°C. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey. (P<0,01; categoria 1= bulbilli con una lunghezza >15mm; categoria 2= bulbilli con una lunghezza 10-15 mm).

			UFC/g		% Germinate	
Tesi	Temperatura (°C)	Tempo (min)	**		**	
Controllo	25		4,20*10 ³	c	95,0	a
Secco	49	20	1,39*10 ³	bc	81,7	ab
Secco	49	30	1,54*10 ³	bc	65,0	b
Secco	60	15	1,41*10 ³	bc	70,0	b
Secco	70	10	1,39*10 ³	bc	78,3	ab
Umido	43	90	1,94*10 ³	bc	60,0	b
Umido	46	60	9,78*10 ²	ab	60,0	b
Umido	49	20	5,68*10 ²	ab	58,3	b
Umido	49	30	3,36*10 ²	a	65,0	b
Categoria			n.s.		**	
1			1,17*10 ³		75,6	a
2			1,83*10 ³		65,2	b
Tesi*Categoria			n.s.		n.s.	

n.s.= non significativo, ** P<0.01.

Seconda prova: materiali e metodi

Nella prova precedente, i trattamenti eseguiti con il calore umido, nonostante siano risultati più efficaci nel ridurre la contaminazione da *Fusarium* spp., hanno evidenziato un calo significativo di germinabilità; solo alcuni trattamenti con calore secco hanno consentito di mantenere valori di germinabilità equiparabili al controllo non trattato.

Pertanto, sulla base di questi risultati, per cercare di ridurre la contaminazione da *Fusarium* spp., ma contemporaneamente mantenere buoni valori di germinabilità del seme (almeno >80%), è stata allestita una seconda prova basata sull'utilizzo del calore secco, impiegando il medesimo schema di lavoro della prova precedente.

Sono state applicate ai bulbilli temperature inferiori, ma per tempi di esposizione più lunghi ed è stato mantenuto il trattamento di 49°C per 20 minuti, ovvero l'unico che, nello studio precedente, aveva consentito di mantenere un livello di germinabilità superiore all'80% ([tabella 6](#)).

Tabella 6: Schema tempi- temperature applicati durante la seconda prova.

Trattamenti	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Controllo	25	
Secco	49	20
Secco	40	60
Secco	40	120
Secco	40	180

Seconda prova: risultati

Dalla lettura dei risultati relativi alle UFC/g, non sono emerse differenze significative tra le 5 tesi e tra le 2 tipologie di seme ([tabella 7](#)).

Per quanto riguarda i dati di germinabilità, in tutti i casi sono stati registrati valori superiori all'80%; in particolare, il trattamento di 40°C per 60 minuti ha mostrato valori equiparabili al controllo non trattato ($P < 0,05$). Inoltre, contrariamente a quanto emerso dalla prova precedente, è stato osservato un maggiore vigore germinativo per la seconda categoria, rispetto a quelli della prima categoria, rispettivamente con valori di 95,33% rispetto a 80%.

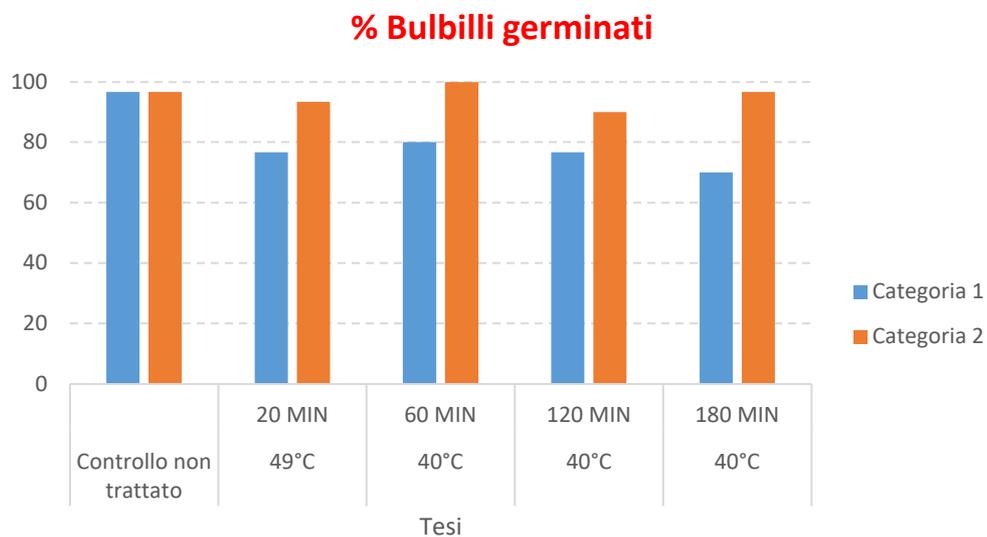
Infine, prendendo in considerazione l'interazione tra i fattori tesi e categoria di seme, sono emerse differenze a livello di germinabilità del seme ($P < 0,05$); in generale gli spicchi di prima categoria sono germinati meno rispetto a quelli di seconda categoria ([figura 7](#)).

Tabella 7: ANOVA dei dati di UFC/g di seme di aglio dopo trattamento con calore secco a diverse temperature e tempi di esposizione e la percentuale di bulbilli germinati dopo 20 giorni a 15°C. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey. (P<0,01; categoria 1= bulbilli con una lunghezza >15mm; categoria 2= bulbilli con una lunghezza 10-15 mm).

			UFC/g	% Germinate
Tesi	Temperatura (°C)	Tempo (min)	n.s.	*
Controllo	25		1,18*10 ⁴	96,67 a
Secco	49	20	6,71*10 ⁴	85,00 b
Secco	40	60	4,67*10 ³	90,00 ab
Secco	40	120	8,23*10 ³	83,33 b
Secco	40	180	6,29*10 ⁴	83,33 b
Categoria			n.s.	**
1			5,25*10 ⁴	80,00 b
2			9,38*10 ³	95,33 a
Tesi*Categoria			n.s.	*

n.s.= non significativo, ** P<0.01, * P<0.05.

Figura 7: % bulbilli germinati in base all' interazione tra i fattori tesi e categoria di seme (Categoria 1= bulbilli con una lunghezza >15mm; categoria 2= bulbilli con una lunghezza 10-15 mm).



Sanificazione con disinfettanti

L'obiettivo di questa sotto-azione è stato quello di testare l'efficacia di prodotti disinfettanti nel ridurre la colonizzazione da *Fusarium* spp. nei bulbilli di aglio naturalmente infetti.

A questo scopo, è stata inizialmente allestita una prova *in vitro*; i prodotti e le concentrazioni risultati più efficaci sono stati successivamente utilizzati in prove sui bulbilli-seme, testando quali tecniche di applicazione, lo *spray* e l'immersione, per tempi diversi di trattamento.

Prova *in vitro*: materiali e metodi

La prova *in vitro* è stata eseguita seguendo le indicazioni di Galvez Patòn *et al.* (2017); pertanto, è stato utilizzato PDA ottenuto da brodo di patata (200 g patate/L di acqua), agarizzato con 15 g/L di agar, con aggiunta di 10 g/L di destrosio e ammendato in fase di raffreddamento con disinfettanti a diverse concentrazioni.

Successivamente, dopo aver dispensato in piastre Petri di 90 mm di diametro, si è inoculato al centro un tassello di 5 mm di diametro, prelevato da una colonia di *F. proliferatum* di 7 giorni di età ottenuta a partire da bulbilli sintomatici.

Sono stati presi in considerazione 3 prodotti disinfettanti: acqua ossigenata (H₂O₂), acido peracetico (C₂H₄O₃) e D50 (acido peracetico stabilizzato 5% + perossido di idrogeno 20%), impiegando come controllo piastre di terreno non ammendato inoculate al centro con il patogeno.

Per ciascun prodotto sono state valutate 3 concentrazioni (0,1%, 0,3%, 0,5 %), in 3 replicati e le piastre sono state incubate a 25°C (12h di fotoperiodo) per 7 giorni. Al termine dell'incubazione sono stati eseguiti i rilievi del diametro delle colture ed è stata calcolata la riduzione % di crescita secondo la formula (Sangdee *et al.*, 2016):

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

PGI: riduzione % di crescita

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

R1: Diametro di crescita del fungo nelle piastre trattate (cm).

Analisi dei dati. I dati di PGI, dopo trasformazione in arcoseno, sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il pacchetto statistico PASW *statistics* (ver.19, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di *Tukey*.

Prova *in vitro*: risultati

L'efficacia dei 3 diversi prodotti disinfettanti è stata calcolata in base alla riduzione percentuale di crescita del fungo rispetto al controllo.

Dall'analisi dei dati è emerso che i trattamenti a base di acido peracetico e acqua ossigenata sono risultati più efficaci nella riduzione della crescita del fungo ($P < 0,01$) ([tabella 8](#)). Per quanto riguarda le concentrazioni, si è osservata, come atteso, una riduzione maggiore alla concentrazione 0,5% e minore alla concentrazione 0,1%.

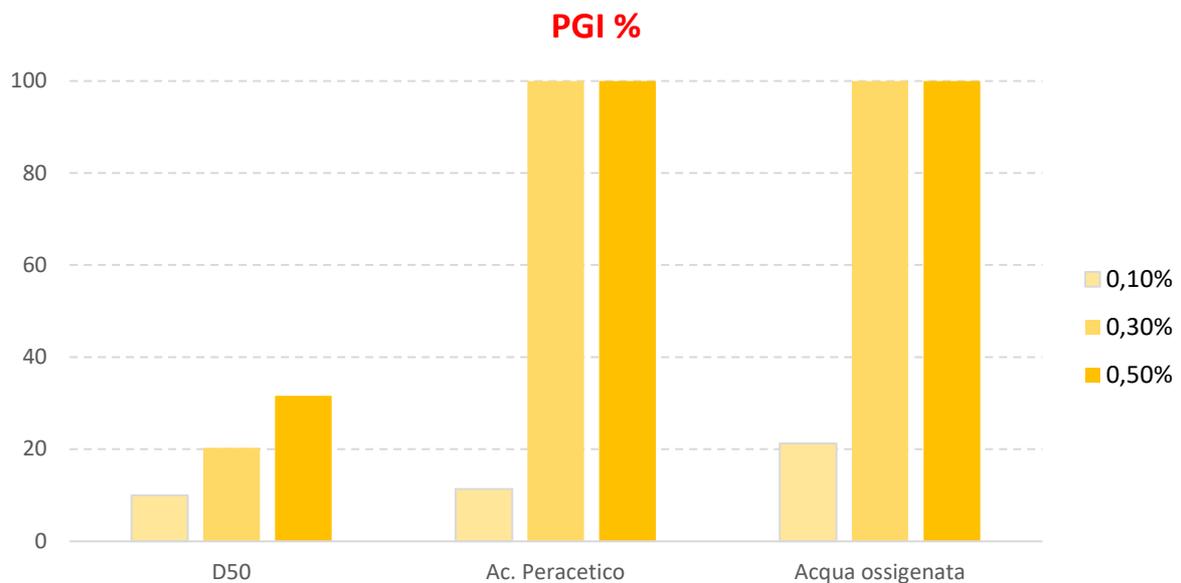
In [figura 8](#) è riportato il comportamento di *F. proliferatum* esposto ai 3 prodotti considerati. Acido peracetico e acqua ossigenata a concentrazioni dello 0,3% sono stati in grado di inibire totalmente la crescita di *F. proliferatum*.

Tabella 8: ANOVA dei dati di riduzione di crescita (PGI) % dopo trattamento con 3 prodotti disinfettanti (D50, ac. peracetico e acqua ossigenata) a 3 diverse concentrazioni (0,1%, 0,3% e 0,5%). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$).

	PGI %
Trattamento	**
D50	20,62 b
Ac. peracetico	70,44 a
Acqua ossigenata	73,75 a
Concentrazione %	**
0,1	14,18 b
0,3	73,43 a
0,5	77,20 a
Trattamento*Concentrazione	**

** $P < 0,01$.

Figura 8: Riduzione % di crescita (PGI%) in piastre ammendate con 3 prodotti disinfettanti (D50, ac. peracetico, acqua ossigenata) a 3 concentrazioni (0,1%; 0,3%; 0,5%).



Prova sui bulbilli: materiali e metodi

Al fine di verificare la possibile applicazione sui bulbilli-seme dei prodotti e delle concentrazioni che hanno avuto maggiore efficacia nei trattamenti *in vitro*, è stata allestita una prova sui bulbilli in cui sono state confrontate 2 diverse modalità di applicazione (*spray* e immersione).

Per ogni trattamento sono stati analizzati 20 bulbilli di aglio (10 per la valutazione delle UFC e 10 per la determinazione della germinabilità su carta), in 3 repliche (TOT= 60 bulbilli). I bulbilli provenienti da ogni singolo bulbo sono stati ripartiti equamente nelle 3 repliche delle combinazioni prodotto-applicazione, al fine di ottenere la maggiore uniformità possibile dei campioni.

L'analisi delle UFC/g di bulbilli e le camere di germinazione sono state allestite secondo i metodi riportati per le prove con trattamenti con il calore, impiegando il terreno di coltura *Nash e Snyder*, prendendo in considerazione le diluizioni da 10^{-1} a 10^{-4} e 3 repliche tecniche per ciascuna di esse. In [tabella 9](#) sono riportati i trattamenti considerati per entrambe le categorie di seme.

Analisi dei dati. L'analisi della varianza delle UFC/g e del numero di spicchi germinati è stata condotta utilizzando il pacchetto statistico PASW *statistics* (ver.19, SPSS Inc., Chicago, USA, 2009). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di *Tukey*.

Tabella 9: Schema dei trattamenti eseguiti.

Prodotto	Applicazione	Tempo (min)
Controllo		
Acqua ossigenata	<i>spray</i>	
Acqua ossigenata	immersione	5
Acqua ossigenata	immersione	10
Ac. peracetico	<i>spray</i>	
Ac. peracetico	immersione	5
Ac. peracetico	immersione	10

Prova sui bulbilli: risultati

Dall'elaborazione statistica dei risultati relativi alle UFC/g, si è osservata una differenza statisticamente significativa tra i trattamenti eseguiti. In particolare, il trattamento risultato maggiormente efficace è stato quello a base di acido peracetico con immersione dei bulbilli per 10 minuti. Risultati simili sono stati ottenuti anche con il trattamento per immersione in acido peracetico per 5 minuti e con quello per immersione in acqua ossigenata per 10 minuti ([tabella 10](#)).

Per quanto riguarda la germinabilità dei bulbilli, è stato osservato che tutti i trattamenti eseguiti hanno ridotto in modo significativo rispetto al controllo la percentuale di quelli germinati. In particolare, l'immersione in acido peracetico per 10 minuti ha portato ad un drastico calo in termini di germinabilità (26,7% di semi germinati). I trattamenti con acido peracetico applicato per nebulizzazione e quelli con acqua

ossigenata applicata tramite *spray* o immersione per 5 minuti hanno invece portato ad un calo medio del 33% in termini di germinabilità rispetto al controllo non trattato.

Tabella 10: ANOVA dei dati di UFC/g di seme di aglio dopo trattamento con prodotti disinfettanti a concentrazione 0,3%, applicati con diverse tecniche e la percentuale di bulbilli germinati dopo 20 giorni a 15°C. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey. (P<0,01; categoria 1= bulbilli con una lunghezza >15mm; categoria 2= bulbilli con una lunghezza 10-15 mm).

Prodotto	Applicazione	Tempo (min)	UFC /g	% Germinate
			**	**
Controllo			1,17*10 ⁴ c	90,0 a
Acqua ossigenata 0,3%	<i>spray</i>		6,79*10 ³ bc	60,0 b
Acqua ossigenata 0,3%	immersione	5	2,08*10 ³ ab	70,0 b
Acqua ossigenata 0,3%	immersione	10	4,60*10 ³ abc	48,3 bc
Ac. peracetico 0,3%	<i>spray</i>		5,04*10 ³ abc	70,0 b
Ac. peracetico 0,3%	immersione	5	2,62*10 ³ ab	48,3 bc
Ac. peracetico 0,3%	immersione	10	1,96*10 ³ a	26,7 c
Categoria			n.s.	n.s.
1			4,82*10 ³	56,7
2			5,09*10 ³	61,4
Trattamento*Categoria			n.s.	n.s.

n.s.= non significativo, ** P<0.01.

Considerazioni

Questa prova ha dimostrato che l'applicazione di disinfettanti per ridurre la presenza di *Fusarium* spp. in bulbilli di aglio non costituisce un approccio promettente in quanto alle riduzioni significative corrisponde anche una riduzione significativa della germinabilità dei semi che scende sotto il 50%. Il trattamento più interessante è quello eseguito con acqua ossigenata al 3% in immersione per 5 minuti perché ha permesso una riduzione significativa delle UFC rispetto al testimone con una germinazione pari al 70%.

Conclusioni generali WP2

L'obiettivo da raggiungere in questo *Work Package* era quello di ridurre la presenza di *Fusarium* spp. nei bulbilli di aglio utilizzando metodi di disinfezione a basso impatto o a impatto zero, mantenendo elevati i valori di germinabilità dei semi. A questo scopo sono stati valutati l'ozono gassoso, il calore secco e umido e prodotti disinfettanti.

L'ozono gassoso ha permesso in alcuni casi di ridurre la contaminazione fungina, rivelandosi pertanto un metodo di sanificazione promettente ma non completamente risolutivo.

Alcuni dei trattamenti basati sull'utilizzo del calore umido e di prodotti disinfettanti, pur avendo ridotto la presenza di *Fusarium* spp., hanno fornito riduzioni significative della germinabilità dei semi.

Il calore secco, al contrario, nonostante sia riuscito a mantenere in generale valori di germinabilità equiparabili al controllo non trattato, non si è rivelato efficace nel ridurre il livello di UFC.

È possibile, pertanto, concludere che alcuni dei metodi impiegati, in particolare l'ozono gassoso, si sono rivelati interessanti; nessuno di essi però è riuscito a fornire risultati pienamente soddisfacenti.

WP3 Valutazione dell'efficacia di trattamenti di concia del seme

In un precedente progetto, le prove condotte *in vitro*, in ambiente controllato e in campo, impiegando fungicidi di sintesi e microrganismi antagonisti, hanno fornito risultati incoraggianti in merito al controllo delle specie associate al marciume secco dell'aglio; si è pensato ad ulteriori e sensibili miglioramenti dell'efficacia degli stessi, combinando nuove modalità di applicazione e nuovi prodotti a concentrazioni ottimizzate.

L'obiettivo di questa azione è valutare l'efficacia di sostanze di origine chimica o microbiologica che vengono applicate direttamente sul bulbillo in modo molto omogeneo mediante una "pellicolatura", denominata *film coating*.

Questo trattamento, già utilizzato sui semi di orticole professionali, ma mai fino a questo momento sull'aglio, fornisce al seme un rivestimento migliore in termini di omogeneità e adesione. Inoltre, grazie al lento rilascio delle sostanze attive, si presuppone possa offrire maggiori e durature garanzie di protezione soprattutto durante le prime fasi fenologiche in cui la giovane pianta presenta le maggiori criticità ed è più facilmente esposta agli attacchi dei funghi agenti di fusariosi.

Sono state effettuate 3 prove distinte:

- Prova in vaso;
- Prova in vivaio;
- Prova in pieno campo.

Prova in vaso

Materiali e metodi:

La prova è stata eseguita in ambiente controllato, in vaso, ponendo a confronto rispetto a un testimone non trattato 4 tesi allestite con:

- 1 sostanza attiva di sintesi;
- 3 prodotti a base di microrganismi antagonisti naturali.

Sono stati posti a dimora 5 spicchi di aglio in ciascun vaso contenente il *potting mix* (terriccio Completo Vigorplant + *field soil*, in rapporto 1:1) ([figura 9](#)). È stato utilizzato il terriccio Completo Vigorplant in quanto presenta caratteristiche, in termini di pH e composizione, che ben si adattano alla crescita dell'aglio. Il *field soil* era costituito da 43% limo, 37% argilla, 20% sabbia e 2,2% sostanza organica. I bulbilli sono stati prima sottoposti al trattamento di *film coating*, ove come componenti della pellicola sono state utilizzate formulazioni composte delle sostanze attive di sintesi o di microrganismi antagonisti (nei dosaggi riportati in etichetta), addizionate con adesivante Nutri-elle AMINO ENNE e come colorante ossido di ferro, composto non tossico per la pianta ([tabella 11](#)).

Ciascuna delle 5 tesi (= 4 trattamenti + 1 controllo) era costituita da 4 repliche di 5 bulbilli.

Il trattamento di *film coating* era stato previsto con un partner di progetto (BLUMEN S.p.A), ma per questa prova non è stato possibile a causa delle restrizioni COVID. Il trattamento di *film coating* è stato eseguito ponendo i bulbilli da trattare (100 bulbilli i = 5 tesi* 4 repliche* 5 bulbilli/vaso) in una scatola chiusa contenente la miscela da applicare (prodotto fitosanitario + adesivante + colorante + acqua sterile) e agitando ripetutamente la scatola per 3 minuti ([figura 10](#)) al fine di ottenere la migliore distribuzione del prodotto sulla superficie dei bulbilli. I bulbilli, prima di essere seminati nei vasi, sono stati asciugati in stufa a ventilazione forzata alla temperatura di 30 °C, ponendoli dopo il trattamento su reti metalliche precedentemente sanificate in autoclave.

Altri 100 bulbilli (= 5 tesi* 4 repliche* 5 bulbilli/vaso) sono stati sottoposti al medesimo trattamento per 2 volte consecutive, al fine di ottenere una copertura maggiore.

Verifica della persistenza della copertura

Allo scopo di verificare la persistenza della copertura, sono state simulate le manipolazioni subite dal seme fino al caricamento nella seminatrice presso l'azienda agricola, rovesciando in contenitore per 5 volte 10 bulbilli per ciascuna delle 5 tesi da testare con entrambe le modalità di trattamento.

Gli spicchi sono stati suddivisi sulla base della superficie coperta, sia prima sia dopo le manipolazioni, in 3 categorie ([figura 11](#)):

1. 0%-20% = copertura scarsa (valore medio = 10%);
2. 20%- 80% = copertura media (valore medio = 50%);
3. 80%- 100% = copertura alta (valore medio = 90%).

Verifica dell'efficacia dei trattamenti di film coating

In primavera, trascorsi 7 mesi dall'epoca di semina in terreno, è stata valutata l'efficacia dei trattamenti.

Le piantine, ottenute indicativamente nella fase BBCH fenologica 26 (Lopez-Bellido et al., 2016), sono state estirpate e classificate secondo una scala di gravità dei sintomi (Mondani et al., 2021) ([figura 12](#)).

In seguito, si è proceduto ad identificare le specie fungine sviluppatesi, analizzando separatamente la porzione più interna e quella più esterna dei bulbilli, i quali sono stati dapprima disinfettati per 1 minuto in NaOCl all'1 % di cloro attivo, risciacquati 3 volte in acqua sterile e asciugati in condizioni di sterilità. Una volta disinfettati, di ciascun bulbillo sono state prelevate la porzione più interna e quella più esterna e sono state poste su piastre Petri contenenti *Water Agar* (WA; preparato dissolvendo 15 g di agar in 1 L di acqua bidistillata). Le piastre sono state incubate 7 giorni a 25°C e le colonie sviluppatesi sono state successivamente trasferite su *Potato Dextrose Agar* (PDA); il terreno è stato preparato aggiungendo 15 g di agar e 10 g di destrosio a 1 L di brodo di patata preparato con 200 g di patata/L acqua. Si è poi proceduto al riconoscimento al microscopio ottico delle colonie ottenute.

Analisi dei dati. Al termine dell'acquisizione dei risultati, i dati raccolti sono stati elaborati utilizzando il pacchetto statistico *PASW statistics* (ver. 27, SPSS Inc., Chicago, USA, 2021) al fine di verificare la significatività dei risultati ottenuti. I dati di percentuale di copertura e di gravità dei sintomi sono stati trasformati in arcoseno, quindi sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di *Tukey*.

Figura 9: Vasi contenenti il potting mix in cui sono stati piantati i bulbilli-seme.



Tabella 11: Prodotti impiegati per il trattamento di film coating.

PRODOTTO	PRINCIPIO ATTIVO	AZIENDA	DOSAGGIO RIPORTATO IN ETICHETTA	DOSAGGIO IMPIEGATO NELLA PROVA
Chemicals				
Mystic 430SC	Tebuconazolo 250 g/L	Nufarm Italia, Bologna, Italy	500 mL/ha	0,50 mL/L
Biological control agents				
Serenade Max	<i>Bacillus subtilis</i> (5.13*10 ¹⁰ UFC/g)	Bayer Crop Science, Milan, Italy	2500 g	5,00 g/L
Cerall	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA 342	Koppert, Holland	500-750 mL /100 kg seme	1,00 mL/L
Triatum-P	<i>Trichoderma harzianum</i> T22 (1*10 ⁹ UFC/g)	Koppert, Holland	2,50 kg/ha	5,00 g/L

Figura 10: Prova di esecuzione del trattamento di film coating.



Figura 11: Categorie di copertura degli spicchi: 0%-20% = copertura scarsa (valore medio = 10%); 20%- 80% = copertura media (valore medio = 50%); 80%- 100% = copertura alta (valore medio = 90%).



Figura 12: Scala di gravità dei sintomi: 0%= bulbillo asintomatico; 3%=piccole lesioni sul bulbo, sulla corona o sulle radici; 10%= piccole lesioni su due degli organi considerati; 35%= piccole lesioni su tutti e tre gli organi considerati; 65%= lesioni più estese sul bulbo, sulla corona o sulle radici; 90%= lesioni più estese su due degli organi considerati; 100%= lesioni più estese su tutti e tre gli organi considerati, con sviluppo dell'apparato radicale molto limitato.



Risultati e discussione:

Verifica persistenza della copertura

Dall'analisi dei risultati è emerso che i bulbilli di aglio testati presentavano differenze statisticamente significative ($P < 0,01$) di copertura % fra le tesi e le modalità di trattamento; non sono invece emerse differenze tra il tempo 0 (prima della prova di movimentazione in contenitore) e 1 (dopo la prova) ([tabella 12](#)).

Entrando nel dettaglio, tra le diverse tesi, il prodotto a base di *T. harzianum* (Trianum P) ha ricoperto meno gli spicchi rispetto a tutti gli altri prodotti fitosanitari. Inoltre, i semi trattati per 2 volte presentavano una copertura % statisticamente superiore rispetto a quelli che avevano subito un solo trattamento di *film coating*.

Infine, sono emerse differenze di copertura % dei bulbilli-seme anche per quanto riguarda l'interazione tra le variabili tesi* modalità di trattamento. Come è possibile dedurre dal grafico ([figura 13](#)), è importante eseguire il trattamento di *film coating* per 2 volte consecutive soprattutto quando si applica il prodotto a base di *T. harzianum* (Trianum P).

Verifica dell'efficacia dei trattamenti di film coating

Dall'analisi statistica dei risultati relativi alla prova in vaso, eseguita seminando i bulbilli trattati, non sono emerse differenze significative per la gravità dei sintomi tra le 5 tesi e tra le 2 modalità di trattamento ([tabella 13](#)).

Per quanto riguarda lo sviluppo di specie fungine, non sono emerse differenze tra le tesi e tra le modalità di trattamento, invece, è stata rilevata una differenza significativa ($P < 0,01$) nella percentuale di funghi isolati nelle 2 porzioni del bulbillo; la parte esterna è risultata infatti significativamente più contaminata di quella centrale ([tabella 14](#)).

Tra le specie, è stata riscontrata la presenza di *F. proliferatum* ([figura 14](#)) e quella di *F. oxysporum* ([figura 15](#)) ed è stata calcolata la percentuale delle due specie sul numero totale di spicchi per vaso (5 spicchi/vaso). In entrambi i casi, come per gli isolamenti totali, non vi erano differenze tra le tesi e tra le modalità di trattamento, mentre vi erano differenze ($P < 0,01$) tra le 2 porzioni di bulbillo.

Infine, sono emerse differenze significative anche per quanto riguarda l'interazione tra le variabili tesi * modalità di trattamento a livello sia di scala di gravità dei sintomi ([figura 16](#)), sia di identificazione delle specie fungine isolate ([figura 17](#)), sia di percentuale di isolamenti di *F. proliferatum* ([figura 18](#)).

Tabella 12: ANOVA dei dati di copertura % degli spicchi. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey. ($P < 0,01$; tempo 0= prima della prova di movimentazione in contenitore; tempo 1= dopo la prova).

Copertura %	
Tesi	**
Controllo	79,0 a
Mystic	80,0 a
Serenade Max	79,0 a
Cerall	85,0 a
Trianum P	65,0 b
Tempo	n.s.
0	80,4
1	74,8
Trattamento	**
1	72,0 b
2	83,2 a
Tesi*Tempo	n.s.
Tesi*Trattamento	**
Tempo*Trattamento	n.s.
Tesi*Tempo*Trattamento	n.s.

n.s.= non significativo, ** $P < 0.01$.

Figura 13: Copertura % media degli spicchi in base all'interazione tesi* trattamento (trattamento 1= bulbilli che hanno subito 1 solo trattamento di film coating; trattamento 2= bulbilli che hanno subito 2 trattamenti di film coating).

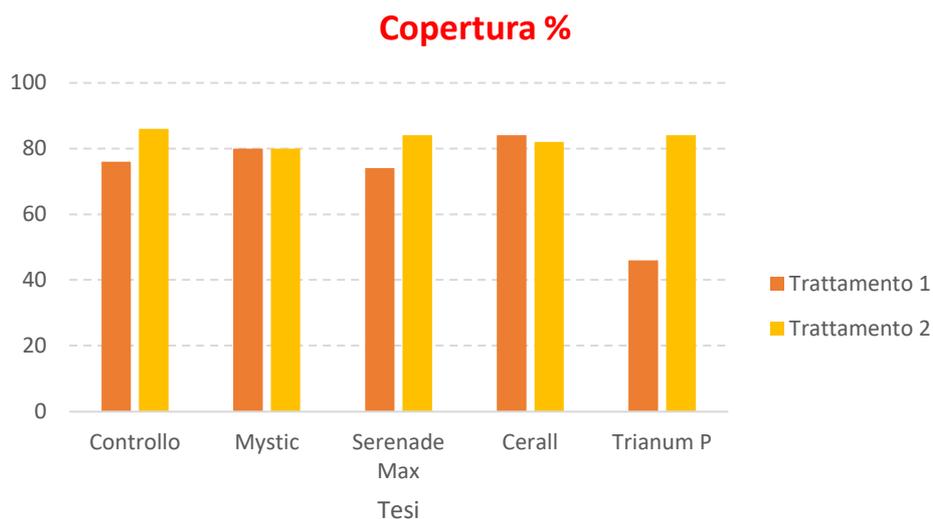


Tabella 13: ANOVA dei dati di classe % media di gravità dei sintomi tra le 5 tesi e tra le 2 modalità di trattamento (trattamento 1= bulbilli che hanno subito 1 solo trattamento di film coating; trattamento 2= bulbilli che hanno subito 2 trattamenti di film coating). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$).

Classe %	
Tesi	n.s.
Controllo	29,55
Mystic	27,90
Serenade Max	21,15
Cerall	25,30
Trianum P	30,60
Trattamento	n.s.
1	29,44
2	24,36
Tesi*Trattamento	**

n.s.= non significativo, ** $P < 0,01$.

Tabella 14: ANOVA dei dati di incidenza % di funghi totali isolati, di *F. oxysporum* e di *F. proliferatum* nelle 5 diverse tesi, nelle 2 modalità di trattamento (trattamento 1= bulbilli che hanno subito 1 solo trattamento di film coating; trattamento 2= bulbilli che hanno subito 2 trattamenti di film coating) e nelle 2 porzioni del bulbillio analizzate. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$). Le percentuali di *F. oxysporum* e di *F. proliferatum* sono state calcolate sul numero totale di spicchi per vaso (5 spicchi/vaso).

	Incidenza %	<i>F. oxysporum</i> %	<i>F. proliferatum</i> %
Tesi	n.s.	n.s.	n.s.
Controllo	32,50	13,75	13,75
Mystic	27,50	3,75	18,75
Serenade Max	20,00	1,25	16,25
Cerall	26,25	5,00	21,25
Trianum P	36,25	7,50	12,50
Trattamento	n.s.	n.s.	n.s.
1	28,50	6,50	14,50
2	28,50	6,00	18,50
Porzione	**	**	**
Esterno	51,00 a	12,50 a	31,50 a
Interno	6,00 b	0,00 b	1,50 b
Tesi*Trattamento	*	n.s.	**
Tesi*Porzione	n.s.	n.s.	n.s.
Trattamento*Porzione	n.s.	n.s.	n.s.
Tesi*Trattamento*Porzione	n.s.	n.s.	n.s.

n.s.= non significativo, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Figura 14: Colonia di F.proliferatum.



Figura 15: Colonia di F.oxysporum.

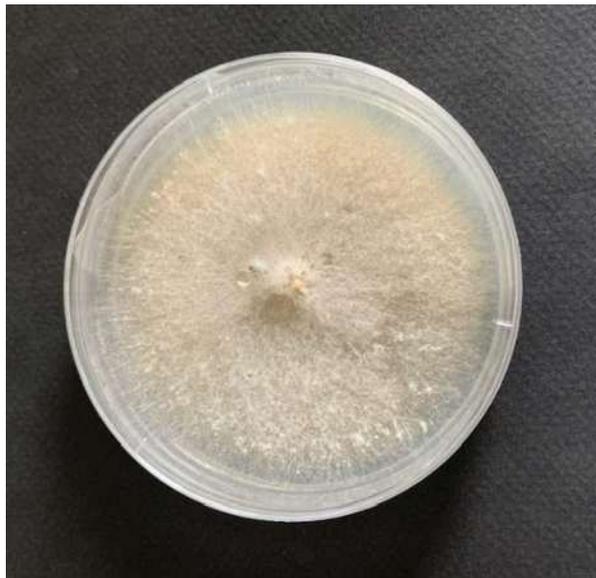


Figura 16: Classe % di gravità dei sintomi in base all'interazione tra le variabili Tesi*Trattamento (trattamento 1= bulbilli che hanno subito 1 solo trattamento di film coating; trattamento 2= bulbilli che hanno subito 2 trattamenti di film coating).

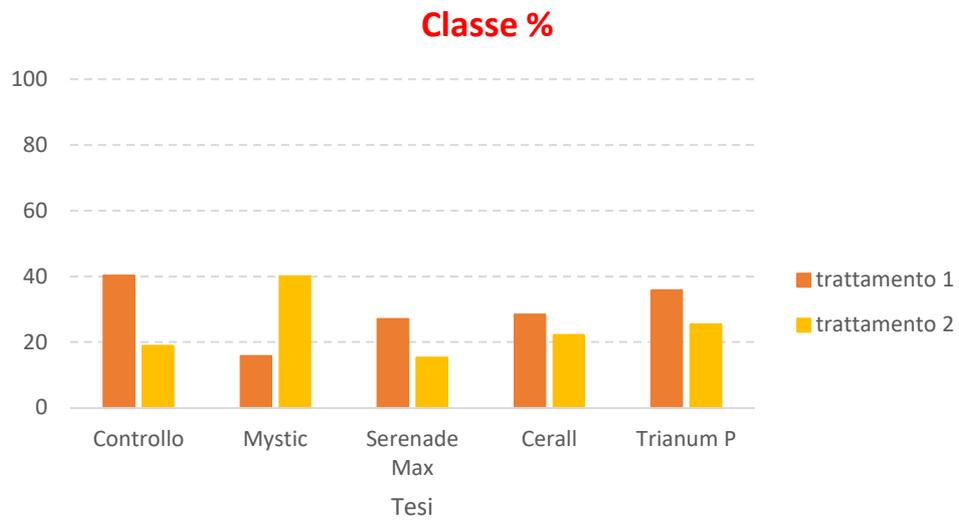


Figura 17: Incidenza % di specie fungine in base all'interazione tra le variabili Tesi*Trattamento (trattamento 1= bulbilli che hanno subito 1 solo trattamento di film coating; trattamento 2= bulbilli che hanno subito 2 trattamenti di film coating).

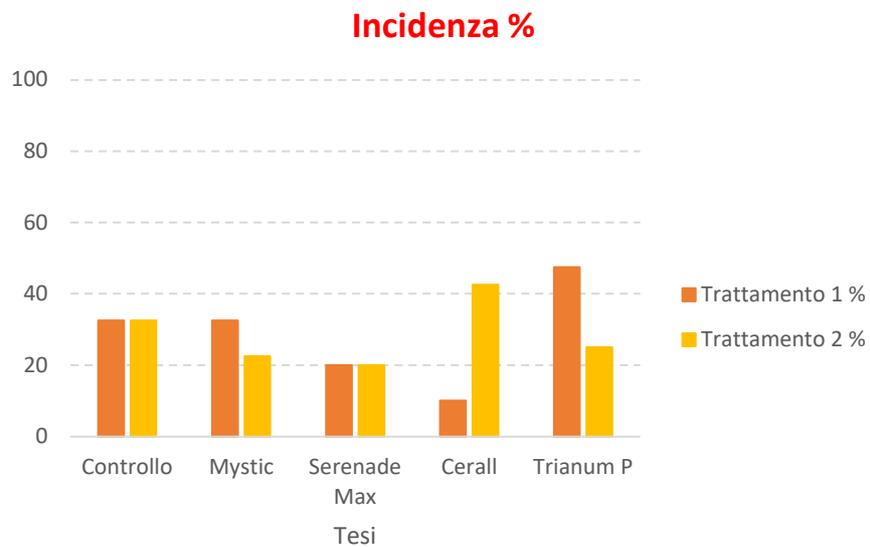
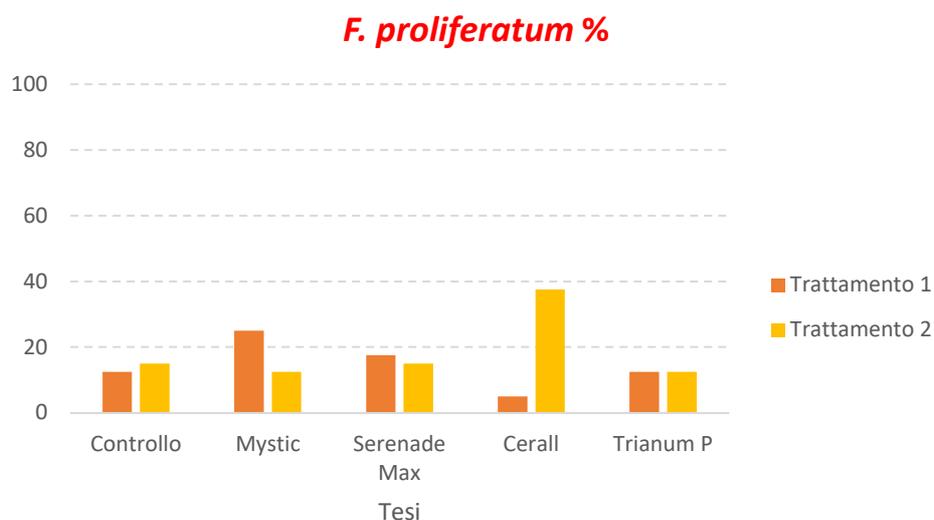


Figura 18: Incidenza % di *F. proliferatum* in base all'interazione tra le variabili Tesi*Trattamento (trattamento 1= bulbilli che hanno subito 1 solo trattamento di film coating; trattamento 2= bulbilli che hanno subito 2 trattamenti di film coating).



Considerazioni finali

Dalla prova è emerso che il trattamento di *film coating*, eseguito cercando di simulare in laboratorio processi adottati dall'industria, ha fornito una buona copertura dei bulbilli-seme. La copertura si è rivelata capace di resistere alle manipolazioni subite dal seme fino al caricamento nella seminatrice presso l'azienda agricola, anch'esse simulate in laboratorio.

Inoltre, i semi trattati 2 volte sono risultati essere statisticamente più coperti rispetto a quelli che avevano subito un solo trattamento di *film coating*. Ciononostante, questo maggiore livello di copertura dei semi non si è tradotto al termine della prova in una maggiore efficacia del trattamento stesso.

Per quanto riguarda i prodotti fitosanitari impiegati, nessuno di essi ha fornito risultati interessanti in termini di riduzione della gravità dei sintomi e di sviluppo di specie fungine.

Dalla prova è emerso un altro aspetto interessante. Il micelio fungino sembra essere distribuito in maniera non uniforme nelle varie porzioni del bulbillo, ma sembra localizzarsi con maggiore frequenza nei tessuti esterni, si è ritenuto pertanto interessante approfondire questo aspetto con ulteriori prove.

Gli stessi prodotti della prova in vaso ([tabella 11](#)) sono stati utilizzati per una successiva prova in vivaio e una in pieno campo. In questo caso, invece, nonostante le restrizioni COVID, il trattamento di *film coating* dei bulbilli è stato effettuato presso *Blumen S.p.A.*, azienda specializzata nella produzione e distribuzione di semi di specie orticole professionali e non. I semi sono stati collocati e agitati all'interno di una macchina contenente la sostanza attiva da applicare, costituita dal prodotto fitosanitario (non presente nel caso del campione controllo), l'adesivante NU FILM P (Pinolene, Miller), il colorante Sepiret® 9290 Red e acqua sterile. I semi trattati sono stati messi in essiccatore per 60 minuti (a 40-45 °C) e successivamente sono stati lasciati 12 h in ambiente ventilato.

Prova in vivaio

Materiali e metodi

La prova è stata svolta presso le 4 imprese vivaistiche partner del progetto (Saturi, Il Germoglio, Gruppi, Orto Mio). Per 3 di esse (Saturi, Il Germoglio e Gruppi), le tesi erano costituite da 4 repliche (vasi), ciascuna da 5 bulbilli (totale 20 bulbilli per tesi). Per quanto riguarda la prova eseguita presso il vivaio Orto Mio, le tesi erano costituite da 8 repliche (vasi), ciascuna da 6 semi (totale 48 semi per tesi).

I vasi sono stati preparati all'inizio del mese di dicembre 2021 e mantenuti in serra fredda; trascorsi 3 mesi dalla semina, a marzo 2022, le piantine sono state estirpate ed è stata valutata l'efficacia dei trattamenti.

Per ogni replica di ciascuna tesi, è stata calcolata la percentuale di bulbilli germogliati e le piantine sono state suddivise in 3 classi sulla base del loro sviluppo ([figura 19](#)) ed è stata inoltre misurata la lunghezza delle radici.

Successivamente, sono state identificate le specie fungine sviluppatesi, prelevando da ciascuna piantina una porzione di bulbillo, le quali, disinfettate per 20 secondi in una soluzione di NaOCl all'1 % di cloro attivo, sono state sciacquate per 3 volte in acqua sterile e lasciate asciugare sotto cappa sterile. Successivamente, sono state poste su piastre di WA e incubate 7 giorni a 25 °C e le colonie sviluppatesi sono state trasferite su terreno PDA per il riconoscimento al microscopio ottico.

Analisi dei dati. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata ai dati di % di piante germogliate, % di sviluppo della pianta, incidenza % di specie fungine, dopo trasformazione in arcoseno e cm delle radici, utilizzando il pacchetto statistico PASW *statistics* (ver. 27, SPSS Inc., Chicago, USA, 2021). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il *test* di Tukey.

Figura 19: Classificazione delle piantine germogliate nella prova in vivaio sulla base del loro sviluppo: piantina poco sviluppata (media= 25 % di sviluppo, a sinistra); piantina sviluppo medio (media= 50 % di sviluppo, al centro); piantina più sviluppata (media= 75 % di sviluppo, a destra).



Risultati

Dall'elaborazione statistica dei risultati relativi alle 4 imprese vivaistiche, sono emerse differenze significative tra le tesi confrontate. Trattare i semi con prodotto chimico a base di Tebuconazolo (Mystic) ha portato ad una percentuale di germogliamento dei bulbilli superiore e ad un maggiore sviluppo delle piante e delle loro radici ($P < 0,01$; [tabella 15](#)). Al contrario, le piantine provenienti dai semi trattati con *T. harzianum* (Trianum P) erano globalmente meno sviluppate. Confrontando gli altri 2 prodotti biologici, si è notato che quello a base di *B. subtilis* (Serenade Max) ha favorito maggiormente lo sviluppo della pianta e che i suoi effetti erano simili a quelli ottenuti con il prodotto chimico a base di tebuconazolo (Mystic).

A livello di incidenza % di specie fungine nei bulbilli germogliati, è stata registrata in particolare la presenza di *F. oxysporum* e *F. proliferatum* e, in percentuali inferiori, *Penicillium* spp. ([tabella 16](#)). Concentrando l'attenzione su *Fusarium* spp., non sono state riscontrate differenze tra i trattamenti, mentre, per quanto riguarda *Penicillium* spp., vi erano differenze tra le tesi ($P < 0,01$). L'incidenza di questo genere fungino nei bulbilli provenienti dai semi trattati con il prodotto a base di Tebuconazolo (Mystic) era infatti superiore rispetto agli altri trattamenti.

Infine, sono state riscontrate differenze significative anche per quanto riguarda l'interazione tra i fattori vivaio*tesi a livello di % di semi germogliati ($P < 0,01$; [figura 20](#)), di classi di sviluppo della pianta ($P < 0,01$; [figura 21](#)), di lunghezza delle radici ($P < 0,01$; [figura 22](#)) e di incidenza % di *F. proliferatum* ($P < 0,05$; [figura 23](#)).

Facendo un confronto tra i vivai, sono emerse differenze significative tra le 4 imprese. In particolare, presso il vivaio Orto Mio, la percentuale di semi germogliati era significativamente inferiore ($P < 0,01$) rispetto agli altri 3 vivai e le piantine e le loro radici erano meno sviluppate ($P < 0,01$). Inoltre, sempre presso questo vivaio, è stata registrata una minore incidenza sia di *F. oxysporum* ($P < 0,01$), sia di *F. proliferatum* ($P < 0,01$). Queste differenze rispetto alle altre 3 imprese sono probabilmente attribuibili alle diverse condizioni in cui sono stati

mantenuti i vasi presso i vivai; probabilmente, presso l'azienda Orto Mio, ove i bulbilli sono stati seminati in contenitori alveolati da 48 alveoli/cassa suddivisi in vaschette singole da 6 fori, le piantine sono state assoggettate a irrigazioni molto più frequenti avendo minore autonomia idrica dovuta al volume di torba più contenuto rispetto alla prova in vaso condotta negli altri tre vivai.

Date queste evidenti differenze, si è provato a ripetere le analisi escludendo i dati di Orto Mio. Analizzando quindi i dati relativi solamente a queste 3 imprese, si è notato che il prodotto a base di *B. subtilis* (Serenade Max) ha avuto effetti simili a quelli ottenuti con il Tebuconazolo (Mystic) soprattutto per quanto riguarda il germogliamento dei semi ($P<0,05$), il livello di sviluppo della pianta ($P<0,01$) e la lunghezza delle radici ($P<0,01$; [tabella 17](#)). Questo, che non era emerso in modo così evidente dall'elaborazione statistica dei dati relativi a tutte e 4 le imprese vivaistiche, suggerisce che tale prodotto biologico potrebbe essere una valida alternativa all'utilizzo di sostanze chimiche.

Tabella 15: ANOVA dei dati di % di semi germogliati, classi di sviluppo della pianta e lunghezza delle radici nei 4 vivai, nelle 5 tesi. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P<0,01$).

	% Semi germogliati		Classi di sviluppo %		Lunghezza radici (cm)	
Vivaio	**		**		**	
Saturi	71,8	a	46,1	A	12,6	a
Il Germoglio	65,5	a	44,1	a	14,2	a
Gruppi	70,0	a	48,2	a	14,2	a
Orto Mio	38,3	b	24,6	b	4,2	b
Tesi	**		**		**	
Controllo	46,3	b	29,7	bc	8,3	bc
Mystic	92,0	a	62,0	a	15,3	a
Serenade Max	57,5	b	37,7	ab	10,1	bc
Cerall	52,0	b	33,1	bc	8,5	bc
Trianum P	43,0	b	24,8	c	6,5	c
Vivaio*Tesi	**		**		n.s.	

n.s.= non significativo, ** $P<0.01$.

Tabella 16: ANOVA dei dati di incidenza % di *F. oxysporum*, *F. proliferatum* e *Penicillium spp.* nei 4 vivaia, nelle 5 tesi. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$). Le percentuali sono state calcolate sul numero di bulbilli germogliati in ciascuna replica (vaso).

	F. oxysporum %	F. proliferatum %	Penicillium spp. %
Vivaio	**	**	n.s.
Saturi	39,5 a	38,5 a	13,0
Il Germoglio	53,0 a	24,8 ab	18,0
Gruppi	53,1 a	37,1 a	9,9
Orto Mio	0,4 b	16,5 b	7,2
Tesi	n.s.	n.s.	**
Controllo	35,2	22,6	6,9 b
Mystic	21,4	39,3	26,8 a
Serenade Max	27,3	27,9	10,6 b
Cerall	31,2	25,5	6,7 b
Trianum P	35,3	21,3	5,8 b
Vivaio*Tesi	n.s.	*	n.s.

n.s.= non significativo, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Figura 20: % di bulbilli germogliati in base all'interazione tra le variabili vivaio*tesi.

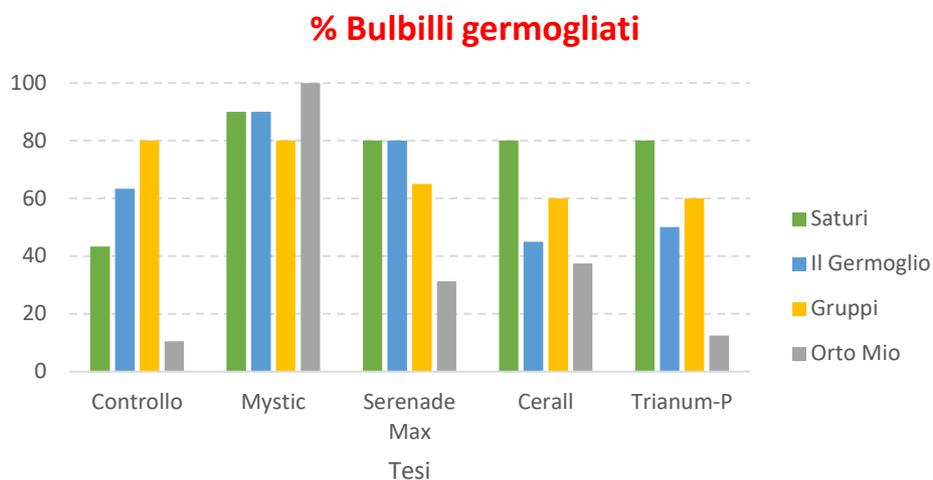


Figura 21: Classi di sviluppo della pianta % in base all'interazione tra le variabili vivaio*tesi.

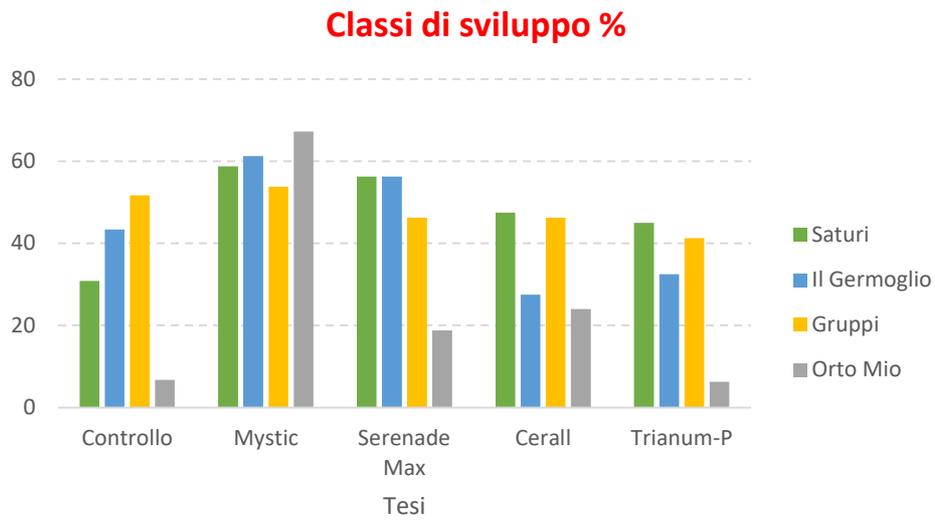


Figura 22: Lunghezza delle radici in base all'interazione tra le variabili vivaio*tesi.

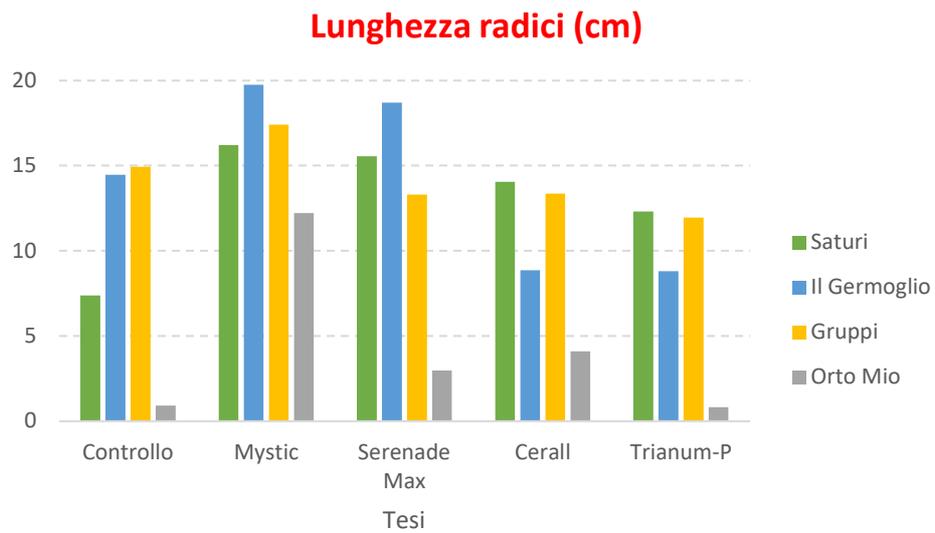


Figura 23: Incidenza % di *F. proliferatum* in base all'interazione tra le variabili vivaio*tesi.

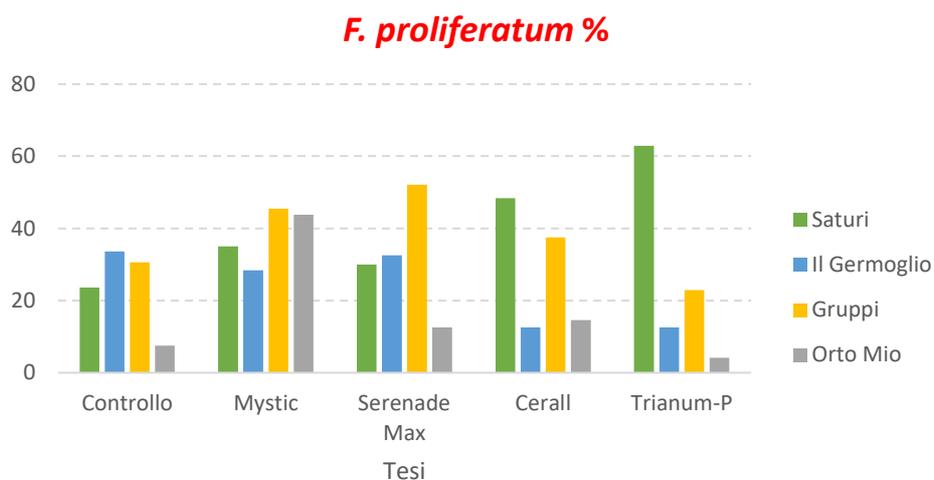


Tabella 17: ANOVA dei dati di % di semi germogliati, classi di sviluppo della pianta e lunghezza delle radici nelle 5 tesi nella prova svolta presso i vivai Saturi, Il Germoglio e Gruppi. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$).

	% Semi germogliati		Classi di sviluppo %		Lunghezza radici (cm)	
Vivaio	n.s.		n.s.		n.s.	
Saturi	71,8		46,1		12,6	
Il Germoglio	65,5		44,1		14,2	
Gruppi	70,0		48,2		14,2	
Tesi	*		**		**	
Controllo	62,2	b	41,9	b	12,3	bc
Mystic	86,7	a	57,9	a	17,8	a
Serenade Max	75,0	ab	52,9	ab	15,9	ab
Cerall	61,7	b	40,4	b	12,1	bc
Trianum P	63,3	b	39,6	b	11,0	c
Vivaio*Tesi	*		*		*	

n.s.= non significativo, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Prova in campo

Materiali e metodi

I semi trattati alla *Blumen* sono stati utilizzati anche nella prova in pieno campo. Il campo sperimentale era collocato a San Pietro in Cerro, Piacenza (Emilia-Romagna, 45.01 N, 9.94 E; [figura 24](#)). Per ciascuna tesi, i semi sono stati disposti su 4 file in 2 parcelle separate, ciascuna di superficie pari a 7,5*1,5 m.

I bulbilli sono stati seminati alla fine di ottobre 2021 e i rilievi sono stati effettuati quando le piantine si trovavano indicativamente nella fase fenologica BBCH15 (quinta foglia visibile; Lopez-Bellido et al., 2016), campionando, per ciascuna tesi, 5 piante in 4 repliche (tot= 20 piante/tesi), in accordo con le modalità di campionamento seguite in un precedente progetto (Mondani et al., 2022).

Dopo una prima osservazione generale relativa allo sviluppo di ciascuna pianta campionata, è stata condotta un'analisi delle piantine concentrando l'attenzione sulla zona della corona, particolarmente rilevante in quanto costituisce una potenziale via di ingresso del fungo patogeno nel bulbo. Basandosi su un'ispezione visiva, i sintomi sono stati attribuiti a 5 classi di gravità: 0 %, corona asintomatica; 10 %, piccole aree brune nella zona della corona; 35 %, aree brune nella metà della corona; 65 %, aree brune nell'intero perimetro della corona; e 90 %, aree brune sulle corone e sul bulbo e micelio fungino visibile.

Terminata la classificazione delle piantine, si è proceduto al prelievamento da ciascuna pianta di un piccolo espianto di tessuto in prossimità della corona seguendo il medesimo procedimento utilizzato nella prova in vivaio nonché al riconoscimento delle specie fungine sviluppatesi.

Analisi dei dati. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata ai dati % di gravità dei sintomi alle corone, incidenza % di specie fungine, dopo trasformazione in arcoseno, utilizzando il pacchetto statistico PASW *statistics* (ver. 27, SPSS Inc., Chicago, USA, 2021). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il *test* di Tukey.

Figura 24: Campo sperimentale.



Risultati

Da una prima osservazione visiva relativa allo sviluppo delle piante, non sono state rilevate evidenti differenze tra le tesi confrontate. Per quanto riguarda la classificazione per scala di gravità dei sintomi, è emerso che nessuna pianta tra quelle campionate presentava sintomi visibili di marciume secco. Questo è abbastanza in linea con quanto era emerso dalla prova in campo del progetto precedente, in cui, in questa fase precoce di sviluppo della pianta, era stato riscontrato un indice medio di gravità dei sintomi molto basso (4,1 %); tale indice aumentava invece molto durante i rilievi successivi, arrivando al 55,9 % alla raccolta (Mondani et al., 2022; Mondani et al., 2021b).

Nonostante non vi fossero sintomi evidenti di marciume secco, è stata riscontrata nella zona della corona di alcune piante la presenza di funghi patogeni, in particolare quella di *F. proliferatum* e quella di *Penicillium* spp. (tabella 18), a conferma che i bulbi possono essere infetti anche se asintomatici. Confrontando i dati percentuali, si è notato un effetto positivo da parte del prodotto biologico a base di *B. subtilis* (Serenade Max) su tutti i parametri valutati, anche se le differenze tra le tesi non sono in realtà risultate statisticamente significative. Non è stata invece riscontrata la presenza di *F. oxysporum*, a differenza di quanto era emerso dalla prova di campo del progetto precedente, in cui, in questa fase di sviluppo della pianta, era stata registrata un'incidenza del fungo del 38,2 % (Mondani et al., 2022; Mondani et al., 2021b).

Tabella 18: ANOVA dei dati di incidenza % di funghi totali isolati, di *F. proliferatum* e di *Penicillium* spp. nelle 5 diverse tesi. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$). Le percentuali di *F. proliferatum* e di *Penicillium* spp. sono state calcolate sia sul numero totale di piante per ogni replica di ciascuna tesi (5 piante/replica), sia sul numero totale di specie fungine isolate in ogni replica di ciascuna tesi.

Tesi	Incidenza %	<i>F. proliferatum</i> % (sul totale)	<i>F. Proliferatum</i> % (sugli isolamenti)	<i>Penicillium</i> spp. % (sul totale)	<i>Penicillium</i> spp. % (sugli isolamenti)
Controllo	40,0	10,0	33,3	10,0	33,3
Mystic	40,0	5,0	12,5	15,0	42,5
Serenade Max	20,0	5,0	8,3	5,0	8,3
Cerall	45,0	20,0	23,3	15,0	41,7
Trianum P	55,0	35,0	60,4	10,0	18,8

n.s.= non significativo.

Considerazioni finali

Complessivamente, il trattamento di *film coating* ha fornito una buona copertura dei semi, anche se, dalle 3 prove, non sono emerse differenze significative tra i trattamenti dal punto di vista statistico. Ciononostante, confrontando tutti i dati, si è notato che il prodotto a base di *B. subtilis* e quello a base di Tebuconazolo hanno avuto i migliori effetti soprattutto in termini di germogliamento dei bulbilli-seme e di sviluppo della pianta.

Studi relativi alla localizzazione del micelio fungino nel bulbillio

In generale, tutte le prove di trattamento dei bulbilli non hanno fornito risultati soddisfacenti in termini di riduzione della presenza di *Fusarium* spp.. Pertanto, è stato ritenuto utile verificare la localizzazione del micelio fungino nei bulbilli per comprendere quale tipo di intervento potrebbe risultare più efficace.

Questa attività non era prevista nel progetto.

Prima prova: materiali e metodi

A questo scopo è stata allestita una prova in cui sono state analizzate separatamente 5 diverse porzioni del bulbillio-seme: tegumenti esterni, base, germe, parte superiore e parte centrale.

Sono state prese in considerazione 4 bulbi di aglio, da cui sono stati separati 40 pezzi di tunica (= 10 pezzi * 4 repliche) e 40 spicchi (= 10 spicchi * 4 repliche).

I pezzetti di tunica sono stati posti direttamente su piastre di WA (5 pezzetti di tunica/ piastra) e incubati a 7 giorni a 25°C ([Figura 25, B](#)); le colonie ottenute sono state successivamente trasferite su terreno PDA per il riconoscimento al microscopio ottico.

Gli spicchi, privati delle tuniche esterne e suddivisi in 4 repliche, chiuse all'interno di sacchetti di garza sterile, sono stati lavati 15 minuti sotto acqua corrente, disinfettati 1 minuto in una soluzione di ipoclorito 1%, sciacquati 3 volte in acqua sterile e lasciati asciugare per 2 ore sotto cappa a flusso laminare sterile. Successivamente è stata separata la base e il germe interno e sono stati suddivisi trasversalmente in 2 parti. Base, germe, parte superiore e parte centrale-bassa di ciascuno spicchio sono stati posti su piastre di WA (5 pezzetti di ciascuna sezione/piastra) e lasciati 7 giorni a 25°C ([figura 25, A](#)). Le colonie sviluppatesi sono state successivamente trasferite su terreno PDA per il riconoscimento al microscopio ottico.

Analisi dei dati. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata ai dati di presenza % utilizzando il pacchetto statistico PASW *statistics* (ver. 27, SPSS Inc., Chicago, USA, 2021). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il *test* di *Tukey*.

Figura 25: Piastre di WA in cui sono stati posizionati 5 pezzetti delle tuniche esterne (B) e 5 pezzi di ciascuna delle 4 porzioni in cui sono stati suddivisi gli spicchi (A).



Prima prova: risultati

Dalla prova è emerso che i tegumenti esterni, non sottoposti ad alcun trattamento di disinfezione, risultano sempre colonizzati (100% di incidenza); anche le altre sezioni, in particolare la base, nonostante siano dapprima state disinfettate sono risultate spesso colonizzate (tabella 19).

Tra le specie fungine rilevate predomina *Fusarium* spp., in particolare *F. proliferatum*. È stata altresì registrata la presenza di *F. oxysporum*, *Penicillium* spp. e *Alternaria* spp. (figura 26).

Focalizzando l'attenzione sui germi, si è notato che in quelli maggiormente sviluppati c'è spesso traccia del fungo (figura 27); invece, in quelli meno sviluppati, il micelio fungino sembra non essere ancora presente (figura 28). Questa considerazione è importante, in quanto potrebbe indicare che il fungo non si trova già nel germe, ma lo colonizza solo in un secondo momento, durante lo stoccaggio dell'aglio, a partire dalla base e dagli strati più esterni.

Tabella 89: ANOVA dei dati di presenza % di specie fungine nelle porzioni di aglio analizzate. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$).

	Incidenza %	
Porzione	**	
Tunica esterna	100	a
Porzione superiore	40	b
Porzione centrale	40	b
Base	75	ab
Germe	30	b

** $P < 0.01$.

Figura 26: Incidenza % delle diverse specie fungine nelle porzioni di aglio analizzate.

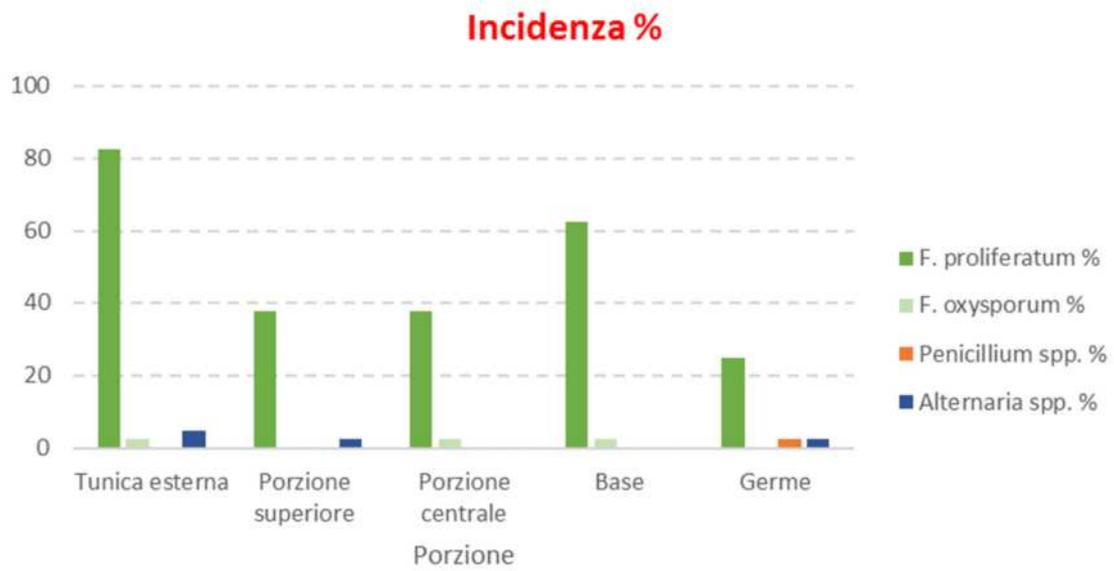


Figura 27: Piastra di WA con germi più sviluppati, nei quali è stata rilevata la presenza di funghi.



Figura 28: Piastra di WA con germi meno sviluppati, nei quali non è stata rilevata la presenza di funghi.



Seconda prova: materiali e metodi

Allo scopo di trovare conferma a quanto è emerso dalla prima prova, volendo conoscere con maggiore precisione dove è localizzato il fungo all'interno del bulbillo-seme, le diverse sezioni dello spicchio, in particolare il germe, sono state osservate con lo stereomicroscopio in diverse fasi di sviluppo del seme.

Per questa seconda prova, sono state prese in considerazione 3 bulbi di aglio stoccati 2 mesi in cella frigorifera (-4°C), da ciascuna delle quali sono stati separati 4 spicchi (TOT= 12 spicchi). 3 spicchi (= 1 spicchio di ciascuna testa) sono stati subito esaminati, quando ancora il germe interno era poco sviluppato. Gli altri 9 spicchi sono stati stoccati al buio a 25°C per far sviluppare maggiormente il germe. 3 di essi (= 1 spicchio di ciascuna testa) sono stati trattati dopo 1 settimana, altri 3 dopo 2 settimane e i restanti 3 dopo 5 settimane.

Al termine del periodo di conservazione prefissato, sono stati disinfettati come descritto in precedenza; successivamente, sono stati accuratamente tagliati trasversalmente in 2 parti; la sezione centrale è stata osservata allo stereomicroscopio, focalizzando l'attenzione sul germe interno.

Dopo l'analisi allo stereomicroscopio, è stata separata la base e il germe. La base, il germe e la restante porzione di ciascuno dei 3 spicchi sono stati posti su piastre di WA e lasciati 7 giorni a 25°C (figura 29). Le colonie sviluppatesi sono state trasferite su terreno PDA per il riconoscimento al microscopio ottico.

Analisi dei dati. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata applicata ai dati di presenza % di specie fungine e di presenza % di *Fusarium* spp. utilizzando il pacchetto statistico PASW statistics (ver. 27, SPSS Inc., Chicago, USA, 2021). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey.

Figura 29: Sezioni di bulbillo su piastre di WA: A Porzione di spicchio a cui è stata tolta la base e il germe, B germe, C base.



Seconda prova: risultati

La prova ha confermato quanto era già in parte emerso dalla prova precedente: il micelio fungino non è distribuito uniformemente nelle diverse porzioni del bulbillo- seme.

In particolare, la base e la porzione di spicchio a cui era stata sottratta base e germe sono risultate spesso contaminate, registrando livelli di contaminazione rispettivamente pari a 66,67% e 88,30%. Inoltre, anche in questo caso predomina la presenza di *Fusarium spp.* (tabella 20).

Focalizzando l'attenzione sui germi, l'osservazione allo stereomicroscopio non ha evidenziato tracce del micelio fungino (figura 30). Invece, le analisi svolte in laboratorio, hanno in alcuni casi rivelato la presenza, seppur ridotta, del fungo (16,67% di presenza); ciononostante, non sono emerse differenze significative tra le varie prove, svolte a diverse fasi di sviluppo del seme (tabella 21).

Tabella 20: ANOVA dei dati di incidenza % di specie fungine e di % di *Fusarium spp.* nelle diverse porzioni di aglio analizzate. Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$).

Porzione	Incidenza %		<i>Fusarium spp.</i> %	
	**		**	
Base	66,67	a	66,67	a
Germe	16,67	b	16,67	b
Porzione di spicchio rimanente	83,33	a	75,00	a

** $P < 0,01$.

Figura 30: Porzione del bulbillo osservata allo stereomicroscopio.



Tabella 21: ANOVA dei dati di incidenza % e di *Fusarium* spp. % nel germe nelle diverse prove (prova 1= eseguita su spicchi trattati subito; prova 2= su spicchi trattati dopo 1 settimana; prova 3= su spicchi trattati dopo 2 settimane; prova 4= su spicchi trattati dopo 5 settimane). Per la separazione delle medie è stato utilizzato il test di Tukey ($P < 0,01$).

	Incidenza %	<i>Fusarium</i> spp. %
Prova	n.s.	n.s.
1	33,33	33,33
2	33,33	33,33
3	0,00	0,00
4	0,00	0,00

n.s.= non significativo.

È possibile, pertanto, concludere che i bulbilli-seme sono comunemente infetti da *Fusarium* spp. e che quest'ultimo si trova distribuito soprattutto nelle porzioni più esterne del bulbo. La sua presenza nel germe, seppur sporadica, non è però da escludere. Non è stato invece possibile confermare l'ipotesi che il fungo non sia già presente nel germe e che lo colonizzi solamente in un secondo momento, durante lo stoccaggio dell'aglio.

Conclusioni

Il progetto era organizzato in tre *work package*.

Dalla prima parte del lavoro, finalizzata alla valutazione dell'integrità del bulbillino-seme, è emerso che i bulbilli presentano spesso piccole lesioni, potenziali vie di ingresso di funghi patogeni, e che la maggior parte di esse è provocata dalle operazioni di spicchiatura. Pertanto, è importante cercare di ridurre queste ferite e apportare piccoli miglioramenti alla meccanica della macchina sgranatrice.

L'obiettivo del secondo *work package* era invece quello di ottenere bulbilli-seme sani con tecniche sostenibili. Tra le soluzioni testate, il calore umido e i prodotti disinfettanti (H_2O_2 e $C_2H_4O_3$) hanno ridotto la colonizzazione fungina dei semi ma, allo stesso tempo, ne hanno compromesso il germogliamento; il calore secco, al contrario, non si è rivelato particolarmente efficace nei confronti di *Fusarium* spp.. Con l' O_3 si è invece riusciti ad ottenere una buona riduzione della contaminazione e una percentuale di germogliamento simile al controllo non trattato. Pertanto, pur non essendo risultato completamente risolutivo, questo metodo si è rivelato il più promettente; poiché non altera le caratteristiche dell'aglio e non lascia residui nel prodotto, potrebbe essere applicabile anche dopo la raccolta dei bulbi, nel periodo di stoccaggio dell'aglio, durante il quale il fungo continua a svilupparsi.

Nella terza e ultima parte del progetto, è stata valutata l'efficacia di concianti di origine chimica (tebuconazolo) o biologica (*B. subtilis*, *P. chlororaphis* e *T. harzianum*) applicati al seme mediante *film coating*. Sono state eseguite una prova in vaso, una in vivaio e una in pieno campo, dalle quali è però emerso che nonostante il *film coating* abbia fornito una buona copertura del seme-aglio, i prodotti fitosanitari testati non sono riusciti a ridurre l'incidenza fungina dei bulbilli. Tuttavia, nelle prove in vivaio e in campo in cui è stata data al seme una migliore copertura grazie al trattamento realizzato in azienda specializzata, il prodotto chimico a base di tebuconazolo e quello biologico a base di *B. subtilis* hanno dato i risultati più promettenti soprattutto in termini di germogliamento e di sviluppo della pianta.

Infine, da prove di approfondimento realizzate al di fuori delle attività previste dal progetto, è emerso che *Fusarium* spp. si trova soprattutto nella porzione esterna del bulbillino-seme ma che può essere presente anche nel germe.

In conclusione, pur non essendo stata trovata una strategia completamente risolutiva, dal progetto BIANCOSEME sono emersi numerosi aspetti molto interessanti e utili nella prevenzione della fusariosi dell'aglio.

Bibliografia

Jaihan, P., Sangdee, K. & Sangdee, A. 2016. Selection of entomopathogenic fungus for biological control of chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp.. *European Journal of Plant Pathology* 146, 551–564. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0941-7>

Lopez-Bellido, F.J., Lopez-Bellido, R.J., Muñoz-Romero, V., Fernandez-Garcia, P. & López-Bellido, L. 2016. New phenological growth stages of garlic (*Allium sativum*). *Annals of Applied Biology* 169, 423-439. <https://doi.org/10.1111/aab.12312>

Mondani, L., Chiusa, G. & Battilani, P. 2021a. Chemical and biological control of *Fusarium* species involved in garlic dry rot at early crop stages. *European Journal of Plant Pathology* 160, 575–587. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02265-0>

Mondani, L., Chiusa, G. & Battilani, P. 2021b. Fungi associated with garlic during the cropping season, with focus on *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum*. *Plant Health Prog.* 22, 1, 37-46. <https://doi.org/10.1094/PHP-06-20-0054-RS>

Mondani, L., Chiusa, G. & Battilani, P. 2022. Efficacy of chemical and biological spray seed treatments in preventing garlic dry rot. *Phytopathologia Mediterranea* 61, 1.