

SCHEDA DI PROGETTO

Istituzione	CREA- Centro di Ricerca Difesa e Certificazione CREA-DC
--------------------	--

Titolo del progetto	Riqualificazione fitosanitaria dei due varietà laziali di Aglio Rosso - AGLIOSANO
----------------------------	--

Indirizzo	Via Carlo Giuseppe Bertero, 56 – 00156 Roma
------------------	--

Responsabile scientifico e partecipanti	Responsabile: Anna Taglienti Partecipanti: Laura Tomassoli, Alessandro Infantino, Ariana Mangli
--	--

Finanziamento richiesto	€ 35.000,00
--------------------------------	--------------------

1. Competenze Istituzione in relazione al progetto

L'Istituzione proponente CREA-DC svolge attività di ricerca in linea con le esigenze comunitarie, nazionale e regionali per la protezione delle colture nel rispetto dell'ambiente e per il miglioramento quali-quantitativo delle produzioni agricole. Possiede le competenze per sviluppare l'attività proposta in quanto dotata di ricercatori, laboratori e serre preposti allo studio delle diverse malattie delle colture agrarie. Il CREA-DC ha partecipato a diversi Progetti regionali, nazionali ed europei riguardanti gli aspetti fitosanitari delle colture ortive (pomodoro, cucurbitacee, leguminose, carciofo, asparago, ecc.) e ha collaborato con aziende private e ditte sementiere per verificare la resistenza/tolleranza di linee di pomodoro, peperone, zucchini, melone ecc., alle principali malattie sistemiche delle colture oggetto di studio. Ha attuato programmi di ricerca per il risanamento da virus di carciofo, crisantemo, patata, capperi e altre specie ortive e arboree. Ha condotto studi sulle principali patologie trasmissibili attraverso il terreno di numerose specie di interesse agrario.

2. Descrizione della ricerca

2.1. Stato dell'arte specifico

L'aglio (*Allium sativum* L., famiglia *Amaryllidaceae*) è una pianta erbacea monocotiledone la cui coltivazione in Italia copre circa 3500 ha, e con una produzione pari a 300.000 ql/annui (ISTAT 2017). Come molte colture minori, l'aglio in Italia è caratterizzato da un'ampia biodiversità varietale con tipicità organolettica anche in funzione delle caratteristiche pedoclimatiche della regione produttrice. Nel Lazio sono presenti due varietà locali di aglio: 'Aglio Rosso di Proceno' (VT), e 'Aglio Rosso di Castelliri e Isola di Liri' (FR); entrambe sono state

riconosciute risorse genetiche autoctone ed iscritte al Registro Volontario Regionale (RVR) e protette dalla Legge Regionale n. 15 del 01/03/2000 “Tutela delle risorse genetiche di interesse agrario”. Nell’ambito dell’iscrizione al RVR, le due varietà sono state valutate a medio rischio di erosione genetica. Negli ultimi anni gli agricoltori hanno rilevato problemi fitosanitari nelle colture di aglio delle due zone laziali che hanno inciso pesantemente sulla resa quantitativa e qualitativa, apportando un danno economico a tutto l’areale di produzione.

Le malattie dell’aglio nel Lazio

La fusariosi dell’aglio rappresenta una delle più temibili malattie della coltura. Essa si può presentare su piante in pieno campo e sui bulbi in conservazione. Nel primo caso, le piante colpite presentano un aspetto stentato, con foglie ingiallite e con presenza di marciumi alla base della pianta. Nei bulbi in conservazione, sotto la tunica è possibile osservare alcuni bulbilli con necrosi poligonali con centro spugnoso che spesso si evolvono in lesioni depresse di colore nerastro; talvolta il bulbillo appare iscurito con aspetto ammolato, spesso coperto da un micelio biancastro. Tra le diverse specie di *Fusarium* associate alla malattia, *F. proliferatum* è quella riscontrata con maggior frequenza. La fusariosi dell’aglio può causare gravi perdite qualitative e quantitative, soprattutto durante il periodo di conservazione dei bulbi.

Le virosi rappresentano un problema fitosanitario endemico per le due aree in quanto la propagazione vegetativa ha aumentato negli anni la loro incidenza mettendo a rischio la qualità e reperibilità di materiale virus-esente. I virus maggiormente trovati nel materiale prelevato nei due areali sono gli stessi riportati in tutto il bacino del Mediterraneo, ed appartengono a tre gruppi tassonomici: *Potyvirus* (Onion yellow dwarf virus – OYDV e Leek yellow stripe virus - LYSV), *Carlavirus* (Garlic common latent virus - GarCLV) e *Allexivirus* (Garlic virus B, -C, -D, -X, Shallot virus X). I due potyvirus causano striature giallo-clorotiche fogliari e sono maggiori responsabili dei danni alla produzione di bulbi, ridotti nelle dimensioni e asimmetrici nella forma, con cali di resa fino al 70%. I carlavirus e allexivirus provocano infezioni latenti, ma in grado di aggravare i sintomi in caso di infezione mista con i potyvirus (nanismo, giallumi e incurvamento delle foglie e un ingente deterioramento quali-quantitativo della coltura). La gravità dello stato fitosanitario è anche dovuta alla trasmissione dei potyvirus e del carlavirus mediante gli afidi, in modo non persistente, pertanto la forma alta nel corso dei voli è in grado di trasmettere i virus alle piante nelle fasi di assaggio senza colonizzare le piante. Gli allexivirus sono trasmessi da acari eriofidi (in particolare *Aceria tulipae*), sia in campo che nelle camere di conservazione dei bulbi.

Dalle prime indagini sullo stato fitosanitario delle coltivazioni di aglio di Proceno e Castelliri avviate nel 2014 dal CREA-DC, su richiesta dell’ARSIAL – Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l’Innovazione dell’Agricoltura del Lazio (Azione 214.9 PSR Lazio 2007-2013) ha fatto emergere un’ampia diffusione di malattie fungine e virali (Infantino et al., 2015). Sono state osservate e campionate piante con sintomi di nanismo e marciume al colletto e alle radici, arricciamento e giallume fogliare. Gli isolamenti da foglie sintomatiche hanno rilevato infezione da *Fusarium* spp. sul 70% dei campioni di Proceno e 38% dei campioni di Castelliri. Mediante le analisi sierologiche (DAS-ELISA) e molecolari (RT-PCR) LYSV è risultato il virus maggiormente presente, in alcune aree anche il 100%, seguito da GarCLV (77%-90%), OYDV (38%-90%) e allexivirus (54%-60%).

Le prime indagini eseguite nel 2017, per individuare un nucleo di materiale vegetativo virus-esente non hanno avuto un riscontro positivo. Sia i bulbi da semina selezionati dagli agricoltori di Proceno, Castelliri e Isola di Liri sia le giovani piantine post emergenza selezionate in campo, sono risultati infetti almeno da un virus.

Pertanto, si è convenuto ad avviare un programma di risanamento delle due varietà mediante da una parte la produzione di materiale virus-esente da mantenere come nucleo base per la moltiplicazione dei bulbi da usare come semente e dall’altra nella sanificazione del terreno verso il *Fusarium* spp.

2.2 Obiettivi

L'obiettivo generale di questo progetto è la riqualificazione delle colture di Aglio Rosso di Proceno e Castelliri dal punto di vista fitopatologico.

Tale obiettivo generale sarà perseguito mirando ai seguenti obiettivi specifici:

- A) Contenimento delle infezioni da fusariosi nelle colture di Aglio Rosso di Proceno e Castelliri;
- B) Caratterizzazione degli isolati di *Fusarium* spp. individuati su aglio nei due areali, al fine di individuarne i connotati di mating type, patogenicità, velocità di accrescimento ed eventuale produzione di micotossine;
- C) Risanamento *in vitro* da virus di materiale vegetativo di 'Aglio Rosso di Proceno' e 'Aglio Rosso di Castelliri';
- D) Messa in campo e produzione *in situ* del materiale risanato in entrambi gli areali, al fine di verificare il mantenimento delle caratteristiche agronomiche di entrambe le varietà locali post-risanamento.

2.3 Piano di attività

A fronte di questi obiettivi, si ritiene necessario proporre, per il loro recupero qualitativo e la valorizzazione di un prodotto conforme nel tempo alle proprietà agro-alimentari, un programma di risanamento ampio spettro, secondo le seguenti modalità.

Attività malattie fungine

a) Risanamento del terreno

In considerazione del fatto che la fusariosi dell'aglio può essere propagata attraverso la presenza del/i funghi fitopatogeni nel terreno, si è deciso di intraprendere un percorso di risanamento del terreno infetto a mezzo della biofumigazione con piante di *Brassica juncea*. Tale tecnica si basa sul principio che l'idrolisi di particolari sostanze, i glucosinolati presenti in abbondanza nelle radici e nei tessuti di alcune specie di Brassicacee, quali colza (*Brassica napus*) e mostarda (*Brassica nigra*, *B. juncea*) da parte dell'enzima mirosinasi, anch'esso presente nelle radici, determina il rilascio di isotiocianati (ITC), composti volatili che presentano una notevole azione fungicida, nematocida, battericida ed erbicida. Al fine di contribuire al risanamento fitopatologico dell'aglio rosso, si propone di introdurre il sovescio con *Brassica juncea* nella coltivazione della specie. Verrà reperita una adeguata quantità di seme che verrà ripartita tra i coltivatori che aderiranno alla sperimentazione; una parte del seme sarà concia con un agente di biocontrollo, *Trichoderma harzianum*, al fine di migliorare le performances della Brassica e di favorire l'insediamento del *Trichoderma* attraverso il seme. Saranno effettuati sopralluoghi durante la coltivazione della Brassica sino al suo interrimento. Successivamente saranno seguite le coltivazioni dal punto di vista fitopatologico, mediante ispezioni visive e analisi di laboratorio, fino alla raccolta dei bulbi.

b) Caratterizzazione di isolati di *Fusarium* spp.

In seguito ad attività svolte in precedenti collaborazioni con ARSIAL, è stata allestita una collezione di una ventina di isolati di *Fusarium* spp, tra i quali predomina la specie *F. proliferatum*. Tutti gli isolati saranno identificati molecolarmente mediante saggio di PCR con primers specifici. La collezione sarà arricchita con isolati di *F. proliferatum* provenienti da altre matrici (riso, palma da dattero, mais, frumento) al fine di verificarne la patogenicità su aglio. Sarà inoltre valutato il mating type sempre mediante saggio PCR con primers specifici. Saranno allestite prove di patogenicità in laboratorio mediante inoculazione artificiale di bulbilli con ferita e senza. Sarà

stabilita una scala di valutazione dei sintomi in relazione all'ampiezza della necrosi formata. Saranno valutate differenze di velocità di accrescimento tra i diversi isolati. Inoltre, sarà valutata la capacità di ciascun isolato di produrre micotossine caratteristiche della specie *F. proliferatum* (fumonisine, moniliformine, acido fusarico, beauvericina, fusaproliferine).

Attività malattie virali

c) Risanamento *in vitro* da virus

Data l'impossibilità di reperire materiale virus-esente da utilizzare come stock di partenza per le semine dei prossimi anni, l'unica via praticabile per ottenere colture sane è rappresentata dal risanamento *in vitro*; si propone di sottoporre il germoplasma a metodologie di termoterapia associato a coltura di meristema, tecniche già ampiamente documentate in letteratura e di comprovata efficacia sulla specie (Verbeek et al., 1995; Torres et al., 2000; Soliman et al., 2012). Utilizzando materiale fornito dagli agricoltori, in base alla loro selezione agronomica, fenotipica e genomica, i bulbilli verranno sottoposti a un trattamento termoterapico a 37°C per 15-30-45 giorni. Successivamente, dal materiale termotrattato e sterilizzato verranno espuntati meristemi delle dimensioni di circa 0.2-0.4 mm, che saranno poi posti in coltura su opportuno terreno di rigenerazione in camera di crescita a 23°C, fotoperiodo di 16 ore luce e luminosità 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dopo rigenerazione delle piantine dal meristema, e alla luce dei risultati della diagnosi pre- e post-trattamento, verranno calcolati i tassi di rigenerazione e risanamento ottenuti. Le piantine verranno successivamente trasferite su terreno idoneo e moltiplicate con 4-5 cicli di subcoltura. Ottenuto un numero sufficiente di piantine *in vitro* (circa 10-15) esse verranno poste a radicare su opportuno terreno e successivamente acclimatate in vaso *in vivo*. Attraverso tale procedura si auspica di ottenere stocks virus-esenti delle due varietà locali che verranno consegnati all'Arsial per avviare poi un programma tecnico-agronomico pluriennale per la produzione di bulbi sani da semina, da utilizzare annualmente per gli impianti.

d) Test diagnostici

Le analisi per la diagnosi virologica verranno effettuate tramite RT-PCR secondo protocolli già sviluppati e in uso presso CREA-DC (Mohammed et al., 2012). Esse verranno svolte preventivamente sul materiale iniziale (bulbilli) fornito dagli agricoltori; successivamente, l'analisi sarà ripetuta sul materiale fogliare proveniente dalle piantine rigenerate, per una prima rilevazione degli individui risanati. Successivamente, le piantine verranno testate ancora una volta *in vitro* dopo 3-4 subcolture e una volta dopo l'acclimatazione *in vivo*. Il materiale che avrà dato risultati negativi a tutte le analisi verrà considerato virus-esente e avviato alla conservazione in ambiente controllato e al processo di moltiplicazione del seme. 5) Moltiplicazione del seme certificato "virus esente"

Tutto il materiale vegetativo riprodotto *in vitro*, risultato virus esente e acclimatato, denominato "nucleo pre-base" verrà trasferito all'Arsial ed agricoltori per la moltiplicazione in ambienti idonei a tutelare la sanità, monitorato nel corso del ciclo colturale ed analizzato a fine ciclo su una percentuale di bulbi per definire il valore di infezione nel materiale "nucleo base" destinato ad essere distribuito come seme per la nuova campagna agraria. Per l'attuazione di questo programma verranno valutati gli ambienti colturali idonei alla moltiplicazione del seme: aree più sfavorevoli ai vettori (afidi e acari) per altitudine ed isolate dalle zone produttive contaminate dai virus delle agliacee; possibilità di creare delle greenhouse dotate di reti antinsetto per la produzione del nucleo pre-base.

2.4 Articolazione temporale delle attività

Primo anno

a) Risanamento del terreno

a.1 Reperimento di seme di *Brassica juncea* ed distribuzione di idonee quantità ad aziende interessate ad effettuare la biofumigazione. Semina di *B. juncea* ed interrimento in fase di inizio fioritura.

a.2 Coltivazione dell'aglio e controlli sulla coltura in atto e al raccolto, mediante osservazioni visive dei sintomi ed analisi fitopatologiche per l'individuazione delle specie fungine associate alla malattia

b) Caratterizzazione di isolati di *Fusarium* spp.

b.1 Su isolati della collezione presente presso il CREA-DC di Roma sarà condotta l'identificazione molecolare mediante uso di primer specifici.

b.2 Sarà effettuata una prova di accrescimento a 25°C per evidenziare eventuali differenze tra gli isolati.

b.3 Sarà messo a punto un metodo di inoculazione artificiale mediante infezione di bulbilli privati della tunica, con e senza ferita

c) Risanamento *in vitro* da virus

- Reperimento di bulbi di varie accessioni presso gli agricoltori di Proceno e Castelliri: verranno prescelte orientativamente 2/3 accessioni per areale, sulla base delle indicazioni fornite dalle analisi genetiche già eseguite, e saranno raccolti circa 10 bulbi per accessione.

- Avvio dei trattamenti di termoterapia e coltura di meristema.

- Prima valutazione sul tasso di ricrescita dei meristemi espianati.

- Prima analisi molecolare per diagnosi virologica sulle piantine ricresciute dopo espianto del meristema.

- Espianto dei meristemi provenienti da bulbi termotrattati.

d) Analisi molecolare (RT-PCR) per verificare lo stato di infezione di ogni bulbo rispetto a OYDV, LYSV, GarLCV e Allexivirus.

Secondo anno

a) Risanamento del terreno

a.3 Saranno ripetuti i sovesci di *B. juncea* sugli stessi appezzamenti dell'anno precedente e saranno effettuati confronti con terreni non trattati

b) Caratterizzazione di isolati di *Fusarium* spp.

b.4 Saranno effettuate infezioni artificiali di bulbilli con il metodo messo a punto al punto b.3, Saranno utilizzati isolati fungini isolati da aglio e da altre matrici;

b.5 sarà valutata la distribuzione degli isolati nei due Mating type mediante utilizzo di primers specifici

b.6 sarà valutata la capacità di ciascun isolato di produrre micotossine caratteristiche della specie *F. proliferatum* (fumonisine, moniliformine, acido fusarico, beauvericina, fusaproliferine).

c) Risanamento *in vitro* da virus

- Ripetizione delle analisi molecolari per diagnosi virologica sulle piantine ricresciute dopo espianto del meristema.

- Prima analisi molecolare per diagnosi virologica sulle piantine ricresciute dopo termoterapia ed espianto del meristema.

- Ripetizione delle analisi molecolari per diagnosi virologica sulle piantine ricresciute dopo termoterapia ed espianto del meristema.

- Valutazione del tasso di risanamento.

- Ambientamento in vivo delle piantine risanate, produzione di bulbo seme (?)

2.5 Ostacoli prevedibili ed azioni correttive

Qualora le analisi iniziali rilevino individui sani, i corrispondenti bulbi saranno in parte restituiti agli agricoltori insieme a un protocollo per la semina in ambiente controllato e in parte seminati in serra presso CREA-DC Sede di Roma in modo da conservare il materiale, moltiplicarlo e prevenire la reinfezione.

2.6 Risultati attesi

I risultati di queste attività comporteranno una prima fase di produzione di bulbi-seme in condizioni ambientali controllate, anche per avviare l'iscrizione al Registro nazionale come varietà da conservazione; successivamente si avvierà una fase produttiva da effettuare in ciascun areale in situ, anche al fine di verificare il mantenimento delle caratteristiche di entrambe le varietà locali. Per la realizzazione di questo progetto appare necessario anche uno sviluppo associativo delle due realtà agricole, al fine di preservare le varietà locali di Aglio Rosso laziale e l'economia locale.

2.7 Ricadute e benefici

In questo progetto le aziende agricole di Aglio Rosso di Proceno e Castelliri sono considerate le fruitrici delle informazioni e dei risultati ottenuti e ogni elemento fondante del progetto, dalla scelta della coltura e dei patogeni in esame all'individuazione degli obiettivi e al disegno del piano sperimentale, è stato concepito per tale fine ed in base a reali esigenze espresse dalle aziende stesse e rilevate nel tempo sul territorio.

L'allestimento di colture sane porterà a immediati benefici sulla resa quantitativa e qualitativa delle coltivazioni e, nel tempo, ad una più profonda consapevolezza dell'importanza dello stato sanitarmente qualificato da parte delle aziende, che potranno beneficiare delle informazioni ricevute per essere sostenute in un processo di miglioramento produttivo finalizzato alla qualità complessiva dei prodotti. La caratterizzazione degli agenti nocivi e la conoscenza degli effetti sulla coltura in esame consentiranno di valutare possibili strategie di prevenzione, con conseguente razionalizzazione e riduzione dei costi della gestione fitosanitaria. Inoltre, tali conoscenze permetteranno di limitare possibili cali di resa e/o un decremento di alcune caratteristiche

qualitative (sia nutraceutiche che sensoriali). L'utilità dei risultati ottenuti si evidenzia, oltre che in un contesto scientifico, in aspetti pratici per le imprese produttive, e da qui al consumatore, nel breve e medio periodo. Tutto ciò porterà ad una immediata valorizzazione e tipizzazione commerciale del prodotto con effetti di maggiore competizione e stabilità di approvvigionamento nei mercati e ritorno economico per il comparto locale.

Attraverso il trasferimento, divulgazione e pubblicità dei risultati di questo progetto si giungerà a capire l'importanza di applicare un sistema di 'certificazione volontaria' del materiale di propagazione nell'ambito di associazioni o consorzi che si sono costituiti per la produzione del determinato prodotto tipico laziale. Nella fase di trasferimento dei risultati di questo progetto verrà fornito uno schema di propagazione per filiazione e commercializzazione di materiale vegetale certificato virus-esente da applicare in futuro nelle aziende interessate.

Tutta l'attività svolta ed i risultati acquisiti, sia in termini di sanità e qualità delle colture sia in termini di trasferimento di know-how agli agricoltori, favoriranno lo sviluppo economico del comparto produttivo di riferimento nei rispettivi areali, nonché una più ampia consapevolezza dell'importanza, presso le aziende agricole, dello stato sanitario delle colture per qualità dei prodotti. Il miglioramento della qualità del prodotto avrà una valenza economica, salutistica, sociale e ambientale di rilevanza notevole. La riqualificazione delle colture di Aglio Rosso laziali contribuirà inoltre alla maggiore diversificazione della destinazione delle produzioni, dando nuovo impulso a colture "di nicchia" su uno scenario di commercializzazione più vasto rispetto ai soli mercati locali. La ricchezza e la varietà dei prodotti agroalimentari autoctoni e a marchio di origine possono costituire una riserva a cui attingere per la rivitalizzazione di aree marginali oggi ritenute scarsamente o per nulla produttive.

Inoltre, tali colture di pregio tipiche del territorio laziale potranno essere preservate dalla diffusione di agenti patogeni e valorizzate in modo concreto e immediatamente comprensibile al consumatore; infatti la sensibilizzazione ed il sostegno alle aziende agricole nell'uso sistematico di materiale di propagazione sano per l'allestimento degli impianti annuali porteranno nel tempo a una minore diffusione delle virosi non solo nei campi agricoli direttamente coinvolti ma in tutto il territorio laziale, con benefici a livello economico e qualitativo e recupero di competitività.

Costi e richiesta finanziamento

	Costo (€)			Totale
	I anno	II anno		
<i>Missioni in territorio laziale per prelievo campioni</i>	370	360		730
Materiale di consumo	13.000	12.850		25.850
Manutenzione attrezzature tecniche utilizzate nell'ambito del progetto (es. cappe, pipette, bilance, termociclatore)	3.150	3.000		6.150
Disseminazione (iscrizione a convegni, pubblicazioni su riviste peer-reviewed)	420	1.850		2.270
TOTALE EURO	16.940	18.060		35.000