



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

DOTTORATO DI RICERCA IN ORTOFLOROFRUTTICOLTURA
XXI ciclo

Settore scientifico-disciplinare: AGR/04

**Aspetti agronomici, morfo-fisiologici, virologici e
caratterizzazione molecolare di cultivar ed ecotipi di
aglio (*Allium sativum* L.) coltivati nel Lazio.**

Tutore

Dott. Olindo Temperini

Coordinatore

Prof. Alberto Graifenberg

Dottorando

Dott. Leonardo Parrano

DEDICA

**.....A tutte le persone
che hanno creduto
in me**

RINGRAZIAMENTI

La stesura di questa tesi di dottorato è stata possibile grazie alla preziosa collaborazione di alcune persone.

Vorrei ringraziare in particolare:

- il tutore Dott. Olindo Temperini dell'Università degli Studi della Tuscia, Facoltà di Agraria, per i suoi preziosi consigli che ho ricevuto durante lo svolgimento delle prove sperimentali; per il grande aiuto durante la stesura del lavoro; ma soprattutto per la sua disponibilità e lealtà;
- il Prof. Francesco Saccardo dell'Università degli Studi della Tuscia, Facoltà di Agraria, per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso;
- il Prof. Alberto Graifenberg e il Sig. Luca Botrini dell'Università di Pisa, Facoltà di Agraria, per i preziosi consigli e l'aiuto ricevuto;
- il Prof. Andrea Mazzucato dell'Università degli Studi della Tuscia e la Dott.ssa Irene Olimpieri, per la loro gentile disponibilità e gli insegnamenti che da loro mi sono stati forniti;
- il Dott. Georgios Vidalakis dell'Università della California Riverside (U.S.A.), per avermi dato la disponibilità di usufruire delle sue strutture, la Dott.ssa Deborah Pagliaccia e il Dott. Mohammad Afunian per l'incoraggiamento che mi è stato da loro offerto durante lo svolgimento delle prove;
- il Prof. Mario Augusto Pagnotta dell'Università degli Studi della Tuscia, Facoltà di Agraria, il Dott. Néstor Alonso Rey Muñoz e la Dott.ssa Linda Mondini per i consigli e gli insegnamenti che essi mi hanno dato;
- la Dott.ssa. Anna Ciancolini per l'incoraggiamento e l'aiuto nella stesura di questa tesi;
- ringrazio tutto il personale dell'Azienda didattico-sperimentale "Nello Lupori" della Facoltà di Agraria per la collaborazione preziosa fornitami in questi tre anni, e in particolare ringrazio la Sig.ra Giovanna Paolocci e la Sig.ra Graziella Giacomi.

Un particolare ringraziamento va a tutte quelle persone che mi hanno dimostrato un costante affetto e amicizia, motivo per me di grande orgoglio e sprone.

	INDICE	3
1	Introduzione generale.....	6
1.1	L'aglio.....	7
1.1.1	Origine.....	7
1.1.2	Diffusione e importanza economica della coltura	7
1.1.3	Caratteri tassonomici.....	11
1.1.4	Caratteri botanici.....	12
1.1.5	Biologia.....	17
1.1.6	Esigenze pedoclimatiche, idriche e nutrizionali.....	18
1.1.7	Tecnica colturale.....	19
1.1.7.1	Avvicendamento.....	19
1.1.7.2	Preparazione del terreno.....	19
1.1.7.3	Fertilizzazione.....	20
1.1.7.4	Impianto.....	20
1.1.7.5	Controllo infestanti.....	22
1.1.7.6	Irrigazione.....	24
1.1.7.7	Eliminazione dello scapo fiorale.....	24
1.1.7.8	Avversità e difesa.....	25
1.1.7.9	Raccolta e produzione.....	28
1.1.7.10	Conservazione dei bulbilli in post-raccolta e utilizzo.....	29
1.1.7.11	Cenni di miglioramento genetico.....	30
1.2	Qualità delle produzioni italiane.....	31
1.2.1	Valorizzazione della tipicità del prodotto italiano.....	31
1.2.2	Panorama varietale italiano.....	31

1.2.3	Caratteristiche organolettiche e nutrizionali.....	35
1.2.4	Caratteristiche commerciali.....	37
2	Studio della biologia riproduttiva di cultivar di aglio (<i>Allium sativum</i> L.).....	39
2.1	Introduzione.....	40
2.2	Materiale e metodi.....	46
2.2.1	Analisi morfologica degli scapi fiorali, fiore e bulbilli.....	46
2.2.2	Analisi al microscopio ottico, fissazione e inclusione del materiale in paraffina.....	47
2.2.3	Sezionamento e colorazione dei tessuti.....	48
2.3	Risultati.....	50
2.3.1	Osservazione morfologica in scapi fiorali, fiori e bulbilli.....	50
2.3.2	Caratterizzazione dello sviluppo maschile in fiori di aglio mediante preparati istantanei.....	56
2.3.3	Caratterizzazione dello sviluppo riproduttivo in aglio mediante sezioni istologiche.....	60
2.4	Discussione e conclusioni.....	66
3	Aspetti agronomici, morfologici e caratterizzazione molecolare di cultivar ed ecotipi di aglio.....	68
3.1	Premessa ed obiettivi del lavoro.....	69
3.2	Materiali e metodi.....	70
3.3	Risultati.....	84
3.4	Discussione e conclusioni.....	118

4	Diagnosi e caratterizzazione del complesso virale in piante di aglio (<i>Allium sativum</i> L.), derivanti da bulbilli italiani e da bulbi in commercio disponibili sul mercato californiano.....	121
4.1	Introduzione.....	122
4.2	Materiali e metodi.....	129
4.2.1	Sorgente e preparazione del materiale usato.....	129
4.2.2	Indicatori biologici.....	132
4.2.3	Estrazione dell'acido nucleico, RT-PCR e DAS-ELISA.....	134
4.3	Risultati.....	136
4.3.1	Infezioni da virus in aglio italiano.....	136
4.3.2	Infezioni da virus in aglio commerciale.....	136
4.3.3	Sintomatologia.....	140
4.4	Discussione e conclusioni.....	142
5	Bibliografia.....	144
6	Sitografia.....	153

CAPITOLO 1

Introduzione generale

1.1 L'AGLIO

1.1.1 ORIGINE

Esistono ancora diverse ipotesi sull'origine della coltura. L'origine asiatica dell'aglio (*Allium sativum* L.) è accettata da molti Autori che considerano *Allium longicuspis* Regel ($2n = 16$) come suo antenato, largamente diffuso allo stato selvatico nell'Asia centrale nelle zone di montagna del Pamir. Altri ritengono che la patria della pianta sia la Sicilia, altri l'Egitto ma è probabile che nei millenni l'areale di coltivazione si sia esteso dall'originario habitat asiatico al bacino del Mediterraneo, dove la coltura si è molto ben naturalizzata. Il termine aglio sembra derivare, secondo alcuni glottologi, dal celtico “all” che significa bruciante, piccante.

L'aglio si trova in tutti i continenti ed è particolarmente diffuso nell'emisfero boreale; è una specie nota fin dall'antichità che non ha subito grandi cambiamenti nelle odierne coltivazioni.

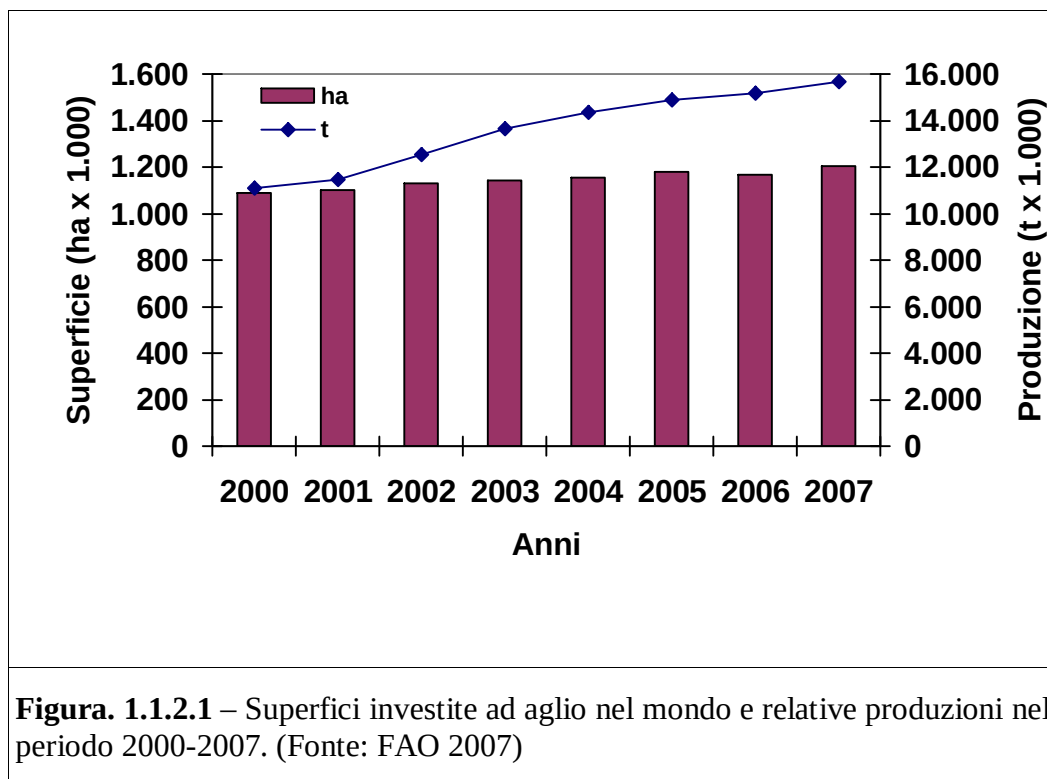
Le prime testimonianze, appartenenti ad un erborista cinese, risalgono al 4000 a.C. Già nel 1550 a.C. il Codex Ebers, un papiro egizio, riporta centinaia di formule terapeutiche di cui una ventina a base di aglio. Nel libro dell'Esodo viene ricordato come “il bene più prezioso lasciato dagli Ebrei durante la fuga dall'Egitto”. Ippocrate (460-377 a.C.) famoso medico greco ne elogiava le proprietà terapeutiche. Lo stesso vale per Plinio il Vecchio, I secolo d.C., nella sua “*Historia Naturalis*” (Borghi, 2004).

Oggi la coltura riveste un ruolo d'importanza al consumo nei Paesi asiatici, latino-americani e del bacino del Mediterraneo (Bianco, 1990).

1.1.2 DIFFUSIONE E IMPORTANZA ECONOMICA DELLA COLTURA

Dati produttivi mondiali

La superficie mondiale investita ad aglio è stata nel 2007 pari a 1.204.711 ha, con una produzione complessiva attorno ai 15,68 milioni di tonnellate (Fonte: FAO, 2007). I Paesi principali produttori di aglio sono: la Cina, che fornisce da sola il 75,4% della produzione mondiale totale, l'India, la Corea, gli USA, la Russia, l'Egitto e la Spagna. Nello specifico si riportano in figura 1.1.2.1 i dati mondiali delle superfici investite e delle produzioni di aglio nel periodo 2000-2007.

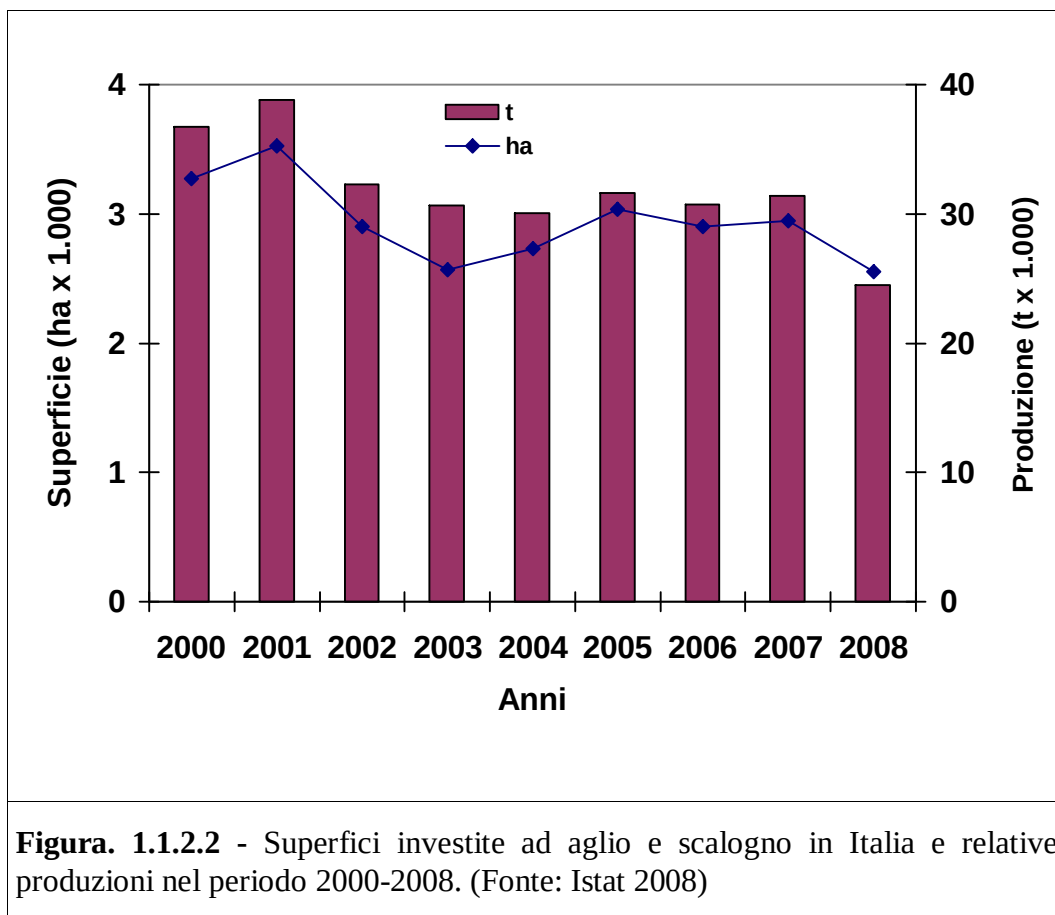


Il “trend” di produzione è fortemente positivo, considerando che dal 2000 al 2007 la produzione è aumentata di circa 4.597.422 t. L'Asia occupa il primo posto nella coltivazione di aglio con una produzione di circa l' 86% del totale. In particolare, come sopra riportato, la Cina è il Paese ove la coltura è maggiormente estesa (circa 692.000 ha), seguita da India (circa 147.000 ha) e Corea (circa 36.000 ha). In Europa la coltura interessa circa 106.719 ha ed è concentrata soprattutto in Russia (28.000 ha), Spagna (16.100 ha), Ucraina (16.000 ha) e Romania (13.100 ha).

Dati produttivi in Italia

Nel panorama orticolo nazionale, l'aglio può essere definito un “prodotto di nicchia”, sia per l'esigua superficie coltivata, che per la localizzazione della produzione e per la diffusione dei consumi (Lunati, 2004).

In Italia, infatti, la superficie investita ad aglio e scalogno, secondo i dati Istat (figura. 1.1.2.2), è risultata nell'anno 2008 pari a 2.448 ha.



Dalla stessa figura si osserva un “trend” negativo, sia della superficie investita ad aglio e scalogno nel periodo 2000-2008, sia delle relative produzioni.

Accanto a questa tendenza produttiva, c'è da specificare che l'Italia importa quasi la metà del prodotto consumato. L'aglio importato deriva per il 48% dalla Spagna, per il 32% dalla Cina e dalla Turchia, per il 12% dalla Francia e per la restante parte dai paesi UE.

In figura 1.1.2.3 sono riportate le quantità importate dal nostro Paese negli ultimi anni (Fonte: Istat 2007).

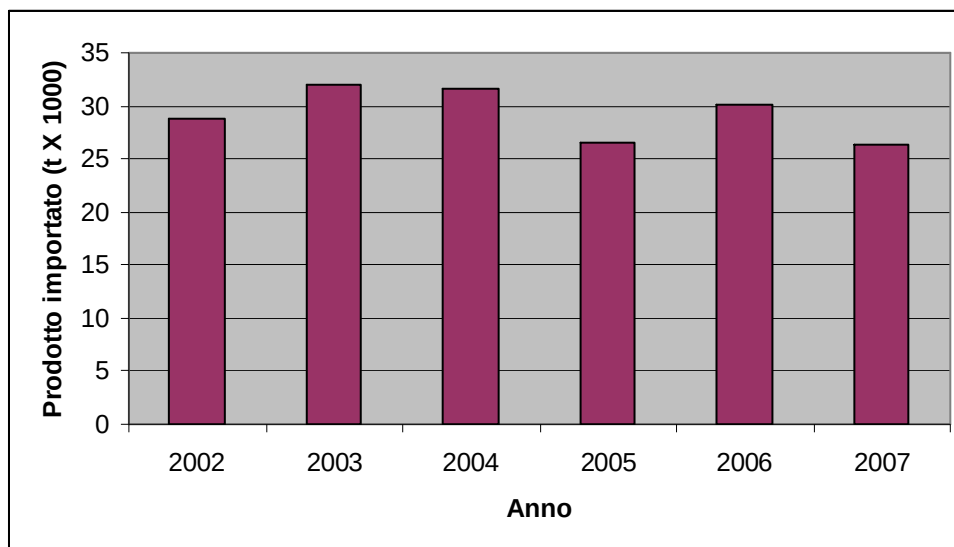
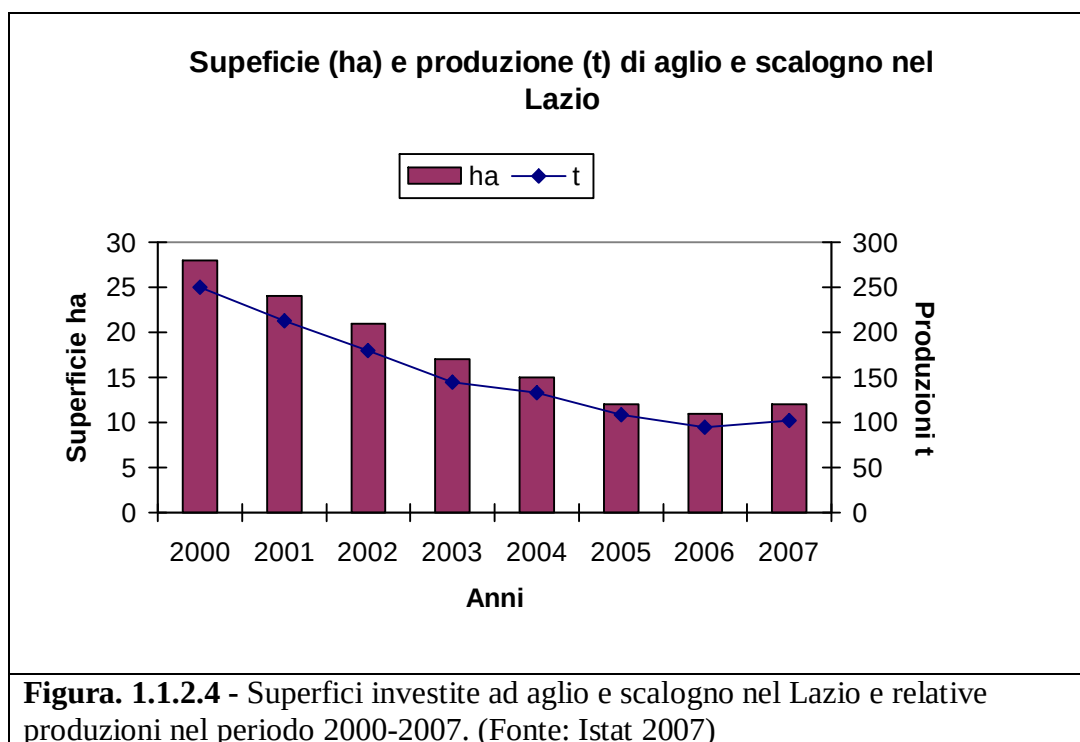


Figura. 1.1.2.3 - Importazioni di aglio (t) in Italia. Periodo di riferimento 2002-2007 (Fonte: Istat 2007).

L'Italia esporta circa 8.500 t di aglio, sia fresco che secco, principalmente verso Germania e Austria (81% del totale).

Nel Lazio le superfici investite ad aglio e scalogno e relative produzioni hanno subito, nel periodo che va dal 2000 al 2007, una forte contrazione, come è possibile notare dai dati riportati in figura 1.1.2.4 (Fonte: Istat 2007).



1.1.3 CARATTERI TASSONOMICI

Tassonomicamente l'aglio è così classificato (Judd *et al.*, 2007) :

REGNO: *Eukaryota*

PHYLUM: *Anthophyta*

CLASSE: *Liliopsida*

SOTTOCLASSE: *Liliidae*

ORDINE: *Asparagales*

FAMIGLIA: *Alliaceae*

GENERE: *Allium*

SPECIE: *Allium sativum* L.

La specie coltivata *Allium sativum* L. ha corredo cromosomico $2n = 16$ e non si conoscono poliploidi.

Con il nome volgare “aglio” si usa indicare anche altre specie che differiscono da *Allium sativum* L. per molti caratteri:

A. scorodoprasum (aglio di Spagna) usato come l'aglio comune, ha stelo a spirale e fiori violacei frammisti a bulbilli, foglie dentellate sui bordi e bulbo molto piccolo, composto da bulbetti pedicellati;

A. ampeloprasum (aglio orientale o porrandello) ha foglie simili al porro, grosso bulbo e ombrella di fiori porporini;

A. ascalonicum (aglio scalogno) con bulbi rossastri, oblunghi, aromatici, scapo cilindrico e foglie arrotondate;

A. victorialis (aglio serpentino), diffuso soprattutto in zone di montagna, presenta un rizoma e porta fiori bianchi;

A. ursinum (aglio orsino) presente in luoghi freschi e umidi ha bulbo intero;

A. vineale (aglio selvatico o pippolino) si trova comunemente nei campi, ha foglie cilindriche, ombrelle con fiori violacei frammisti a bulbilli e bulbo ovale aggregato con numerosi bulbetti.

1.1.4 CARATTERI BOTANICI

L'aglio coltivato (*Allium sativum* L.) è una pianta erbacea, bulbosa, perennante, annuale in coltura (Tesi, 1994).

Radice

Le radici, in numero di 40-60, sono cordiformi, fascicolate, superficiali, il cui maggior volume è concentrato nei primi 30 cm di terreno, non superano i 60 cm di profondità e i 30-40 cm di sviluppo orizzontale (figura 1.1.4.1).

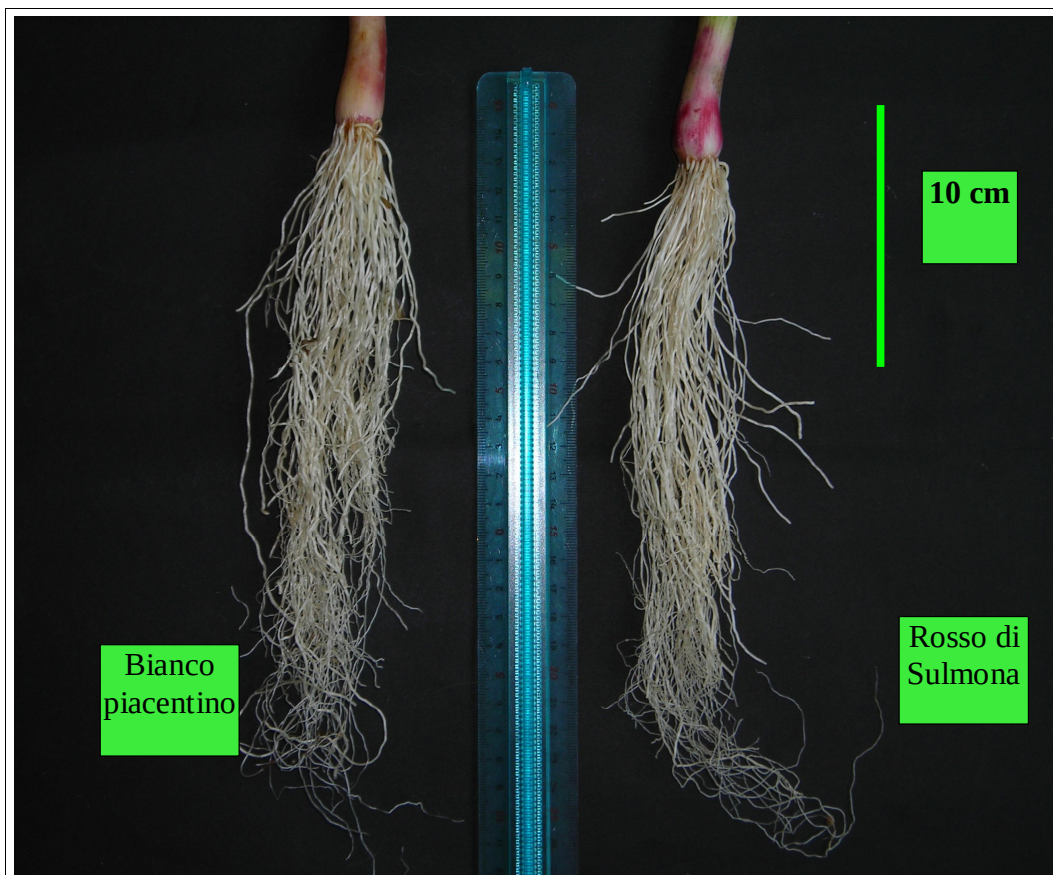


Figura. 1.1.4.1 - Radici di aglio.

Fusto

Il fusto, detto “corno” o “girello” è ridotto ad un dischetto, di spessore 5-6 mm e diametro 1-2 cm; è costituito da cellule parenchimatiche, da tessuto vascolare e dai rudimenti delle radici. Dalla zona sottostante di questo si originano le radici, mentre sulla parte superiore si forma il bulbo (figura 1.1.4.2).

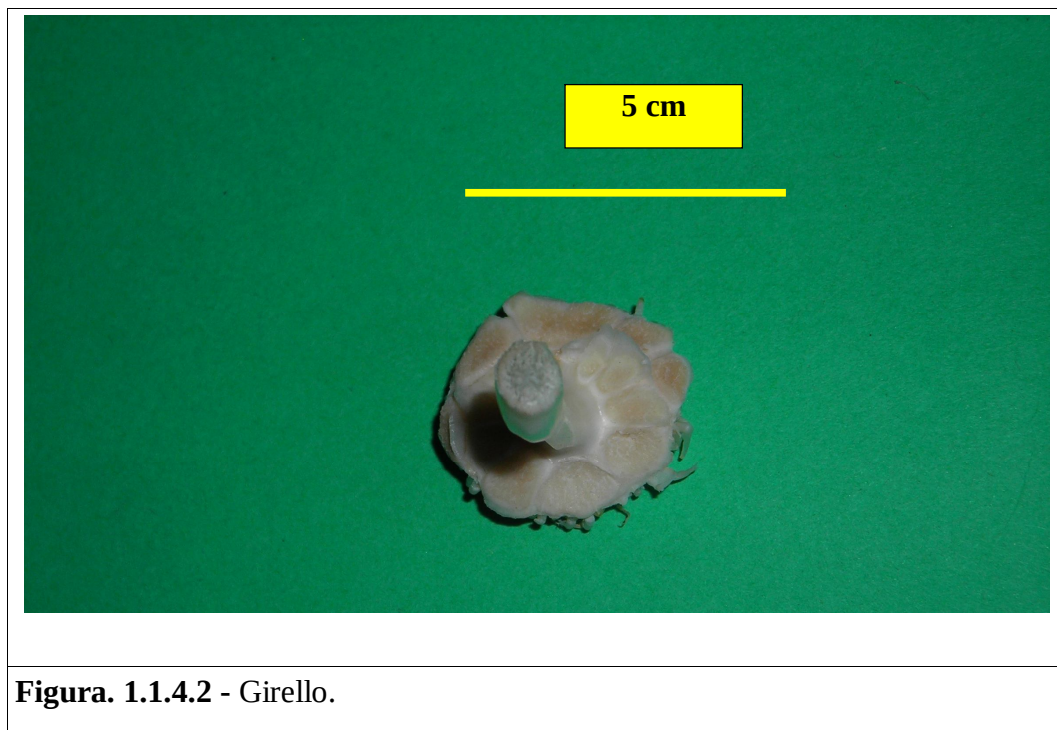


Figura. 1.1.4.2 - Girello.

Foglia

Le foglie, in numero variabile (anche oltre 14), sono guainanti alla base, amplessicaule e non fungono, come nella cipolla, da organi di riserva. La foglia più esterna avvolge la successiva per circa 10 cm e le altre più interne per una lunghezza sempre maggiore, fino a formare, già dalla settima foglia, un falso stelo cilindrico, abbastanza consistente e alto 25-30 cm. Nella porzione non amplessicaule, le foglie sono lineari-nastriformi, acuminate, leggermente carenate, lunghe fino a 50 cm e larghe alla base anche 3 cm, di colore verde-grigiastro glaucescente, con pagina inferiore più chiara; carnose, tenere, ricoperte di un materiale ceroso, con stomi in entrambe le pagine e portamento più o meno eretto (Bianco, 1990).

Infiorescenza

Lo scapo florale, emesso raramente e solo da alcune cultivar, è cilindrico, ricurvo in età giovanile, mentre in piena fioritura è eretto e può raggiungere un'altezza di 60-80 cm. Porta apicalmente un'infiorescenza ad ombrella avvolta da una spatula univalve appuntita, lungamente rostrata, che si fende da un lato rimanendo però attaccata allo scapo (figura 1.1.4.3). I fiori presenti nell'ombrella sono variabili in numero e nel colore; infatti passano dal bianco, al rosa, al porporino, spesso non si aprono, ma avvizziscono e abortiscono quando sono ancora in boccio. Sono piccoli, portati da un esile pedicello, frammisti molto spesso a bulbilli (viviparia), che derivano dalla trasformazione di gemme fiorali e che possono essere

impiegati per la propagazione dell'aglio. I fiori sono costituiti da 6 tepali lanceolato-acuminati; l'androceo presenta 6 stami con antere dorsifisse incluse nel tubo del perigonio; l'ovario è supero, triloculare, con stilo dritto, filiforme e stigma intero (Bianco, 1990).



Figura. 1.1.4.3 - Infiorescenza di “Rosso di Sulmona” ancora avvolta dalla spata.

Frutto

Il frutto, che si forma molto difficilmente, è una capsula contenente uno o due semi per loggia, difficilmente germinabile. Solo con particolari trattamenti si riesce ad aumentare la germinabilità dei semi; ma il loro impiego nella pratica agricola è ancora molto lontano (Tesi, 1994).

Bulbo

Il bulbo, detto anche volgarmente “capo” o “testa”, ha un peso che varia dai 20 fino ai 150 g. E' composto da 6-20 bulbetti, denominati anche spicchi, strettamente appressati, arcuati, sessili, con la faccia dorsale convessa, inseriti direttamente sul girello. Il bulbo è una struttura adattata alla riproduzione agamica ed è rivestito da foglie metamorfosate denominate tuniche. Quelle esterne (8-14) hanno una consistenza papiracea e, avendo una funzione prettamente protettiva, sono anche dette “tuniche sterili”; mentre le più interne (7-8), disposte concentricamente, sono dette “fertili”, poiché portano alla loro ascella una gemma da cui si originerà il bulbetto (Tesi, 1994). Ogni singolo bulbetto è composto da più pellicole metamorfosate: la più esterna, detta “foglia protettiva” (bianca, rosa o rossa a seconda della cultivar), è coriacea, al cui interno vi è una “foglia di riserva” carnosa (costituisce l'80% del

peso del bulbetto). Ancora più internamente vi è una “foglia di protezione” degli assi fogliari (1-2): in ultimo, la 4° e la 5° pellicola costituiscono gli assi fogliari da cui si originerà la nuova pianta (Bianco, 2001). I bulbetti sono inseriti sul disco in ordine spiraliforme; presentano alla base 20-40 primordi radicali e aumentano in grandezza dall'interno all'esterno (figura 1.1.4.4). I bulbilli appena raccolti sono in dormienza, per questo non sono in grado di emettere radici né di germogliare, per farlo hanno bisogno di passare attraverso alcuni stadi fisiologici successivi, legati alle condizioni climatiche (Bianco, 2001).

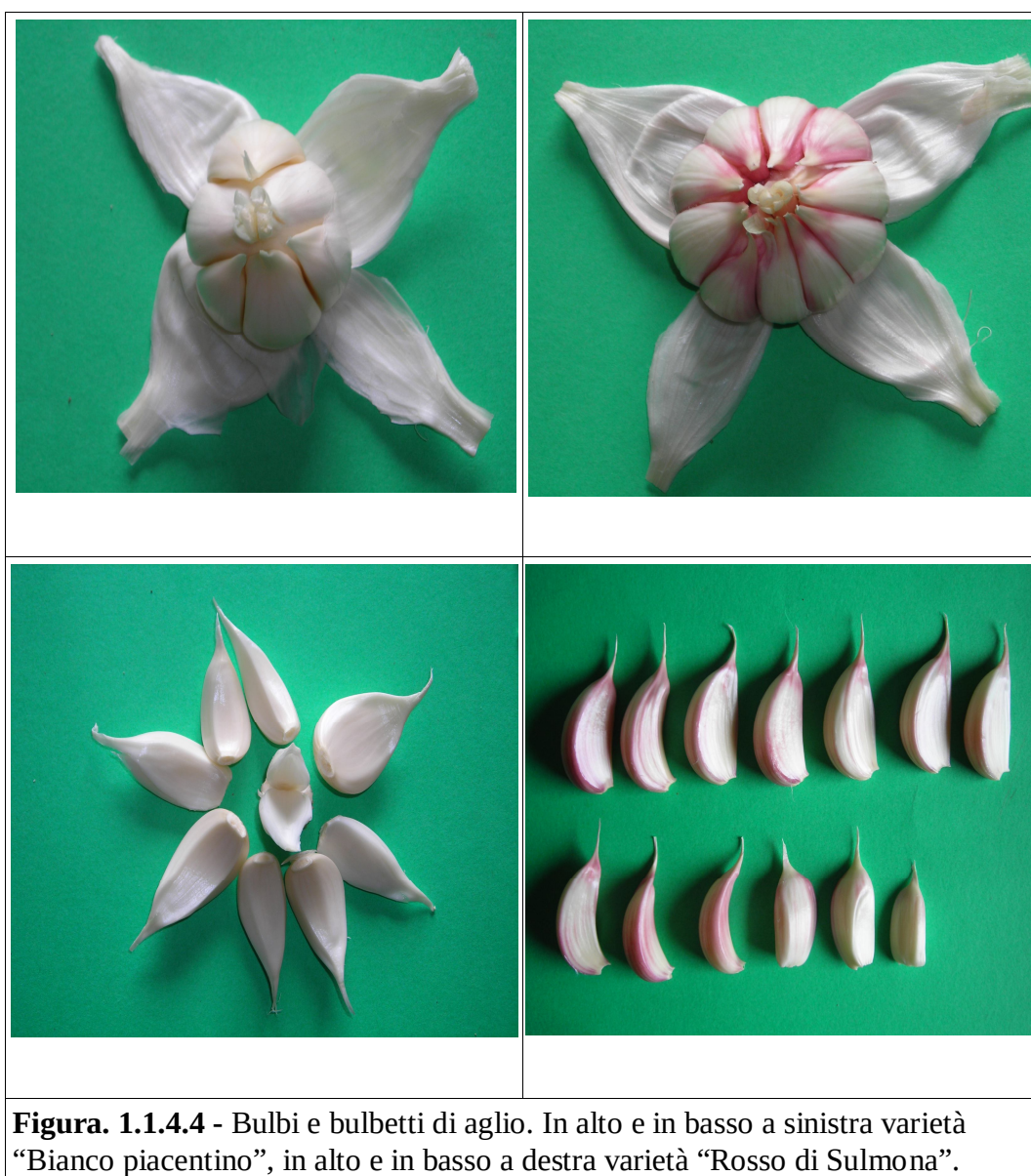


Figura. 1.1.4.4 - Bulbi e bulbetti di aglio. In alto e in basso a sinistra varietà “Bianco piacentino”, in alto e in basso a destra varietà “Rosso di Sulmona”.

1.1.5 BIOLOGIA

L'aglio viene propagato vegetativamente mediante i bulbetti. Il ciclo biologico nei nostri ambienti può durare dagli otto mesi, negli impianti autunnali, a quattro, in quelli effettuati a febbraio-marzo (Rapparini *et al.*, 2004). Il germogliamento avviene già a temperature di 5 °C, ma temperature di 15-20 °C sono considerate ottimali. A tali livelli termici, infatti, vengono subito emesse le radici, le quali si allungano rapidamente e vanno a soddisfare le esigenze idriche e nutritive della piantina in crescita. Dalla porzione di girello che rimane attaccata al bulbetto, sviluppano le radici avventizie. La parte epigea della nuova piantina avrà origine dalle foglie modificate preformate nel bulbetto. La terza foglia, più interna di queste, inizia a germogliare terminata la dormienza, mentre la quarta e la quinta costituiscono le foglie vere e proprie. I bulbetti, una volta raccolti, sono dormienti e incapaci di germogliare o emettere radici; per farlo necessitano di un periodo di vernalizzazione, importante per la propagazione vegetativa dell'aglio. Per interrompere la dormienza si devono sottoporre i bulbetti, separati dal bulbo, a temperature che non superino i 7° C e ad alta umidità relativa, per circa trenta giorni (tale periodo varia all'interno delle cultivar e delle popolazioni). Nella pratica agricola si usa interrompere il periodo di dormienza conservando i bulbetti a 4° C per circa 20 giorni; tale tipo di trattamento permette di ridurre il ciclo colturale di circa un mese. Una volta soddisfatto il fabbisogno in freddo dei bulbetti, vengono subito da questi emesse radici e germogli. La dormienza è un fenomeno finemente regolato da ormoni. Alcune ricerche mostrano come nei 50 giorni successivi dall'impianto, sia molto elevata l'attività delle gibberelline e allo stesso tempo molto bassa quella degli ormoni inibitori e auxino-simili. Dai 55 ai 69 giorni dalla "semina", il contenuto di gibberelline si abbassa e, in concomitanza della differenziazione dei meristemi dei bulbilli ascellari, risulta elevata l'attività dell'acido abscissico. Dai 69 ai 139 giorni dall'impianto, si assiste ad un graduale aumento dell'attività delle gibberelline e in tale periodo comincia proprio l'ingrossamento del bulbo. Dal 139° giorno dall'impianto fino alla raccolta, cessa l'attività delle gibberelline, mentre rimane una lieve attività degli inibitori. E' stato ipotizzato che, proprio la cessata attività delle gibberelline a fine ciclo colturale sia la principale causa della dormienza nell'aglio (Bianco, 1990). Il germogliamento dei bulbetti impiantati in autunno avviene comunque dopo 40-60 giorni, mentre di quelli primaverili avviene solo dopo pochi giorni. I bulbetti, che vengono solitamente piantati nei nostri ambienti in autunno, esauriscono le sostanze di riserva a inizio primavera (marzo) in concomitanza dell'emissione della 6° foglia. Il nuovo bulbo si svilupperà assieme al completamento dell'apparato fogliare, quando si verificheranno

condizioni di fotoperiodo lungo e valori termici compresi tra i 10 e i 15 °C. Alcuni Autori utilizzano il rapporto fra il diametro del “falso fusto” e quello del bulbo come indice per valutare la bulbificazione della pianta. Tale indice parte da valori prossimi a 0,8 e raggiunge valori di 0,2 a fine ciclo colturale (Bianco, 1990).

Nelle cultivar di aglio della “tipologia rosso” in Italia (Rosso di Sulmona, Rosso di Procono, ecc.) lo scapo florale compare generalmente nel mese di maggio e la fioritura completa avviene a fine giugno. I fiori di queste cultivar abortiscono quando sono ancora in boccio, per cui non si assiste alla formazione del seme.

1.1.6 ESIGENZE PEDOCLIMATICHE, IDRICHE E NUTRIZIONALI

L'aglio è una specie con basse esigenze termiche, resiste bene al freddo anche se predilige climi temperati. La soglia termica è valutata essere di 0 °C e la comparsa di ogni foglia necessita di circa 100 gradi giorno (Bianco, 1990). Soddisfatto il fabbisogno in freddo, il germogliamento dei bulbetti avviene con temperature minime di 5 °C. La pianta resiste nelle prime fasi di sviluppo anche a temperature di -10, -15 °C (Tesi, 1994). E' una specie che trova buone condizioni climatiche negli ambienti a clima temperato, dove il fabbisogno in freddo viene facilmente soddisfatto sia in magazzino che in campo, in quanto sistematicamente si verificano per almeno due mesi l'anno temperature sotto i 10 °C. Nei climi tropicali o subtropicali, l'aglio ha difficoltà a formare il bulbo a causa delle temperature costantemente superiori ai 15 °C. La pianta vegeta con fotoperiodo corto e temperature basse. La formazione del bulbo avviene invece in condizioni di fotoperiodo lungo e temperature prossime ai 10-15 °C (ossia in primavera) e cessa appena si raggiungono valori termici di 25 °C. Per la maturazione finale del bulbo sono necessarie temperature di almeno 15 °C, anche se a 20 °C il processo è molto accelerato. Per quanto concerne il terreno, l'aglio non è troppo esigente. Predilige comunque suoli ben drenati, permeabili, non asfittici, con pH neutro (6-7), buon contenuto in sostanza organica e bassa salinità (Tesi, 1994). La coltura è infatti mediamente sensibile alla salinità. Quando la conducibilità elettrica dell'estratto saturo del terreno raggiunge valori pari a 1,7 dS m⁻¹ si assiste ad un decremento di produzione del 2% per ogni unità di incremento della salinità. A conducibilità elettrica pari a 8 dS m⁻¹, le rese risultano decurtate del 50% (Tesi, 1994). Preferisce terreni di medio impasto o tendenzialmente sabbiosi; nel caso di terreni argillosi, questi non devono presentare ristagni idrici.

L'aglio è una pianta che non necessita di una elevata disponibilità idrica. Solo nei mesi di aprile, maggio e giugno, in concomitanza dell'ingrossamento del bulbo, deve poter contare su

una sufficiente riserva idrica del terreno per avere elevate rese. In questo periodo, in particolare nei mesi di maggio e giugno, l'acqua persa per evapotraspirazione può raggiungere valori di 4 mm d⁻¹ e quindi, per soddisfare le esigenze idriche della coltura, servono circa 1500 m³ ha⁻¹ di riserva idrica nel suolo.

Per quanto concerne le esigenze nutrizionali, in bibliografia sono riportati molti lavori sulle asportazioni dei nutrienti della coltura; ma purtroppo, i dati risultano alquanto discordanti. Secondo quanto riportato da Bianco (1990), un ettaro di aglio asporta 160 kg di N, 35 kg di P, 135 kg di K, 55 kg di S, 25 kg di Ca, 6 kg di Mg. Secondo Calzecchi Onesti (1986) per produrre 10 t di prodotto edule, la coltura asporta 50 kg di N, 15 kg di P₂O₅, 30 kg di K₂O e 10 kg di CaO. Da prove effettuate da Tesi (1994) risulta che, per una produzione di 12,5 t ha⁻¹, vengono asportati dalla coltura 95 kg ha⁻¹ di N, 35 kg ha⁻¹ di P₂O₅ e 155 kg ha⁻¹ di K₂O. Secondo alcuni studiosi francesi, per rese pari a 10 t ha⁻¹ corrispondono asportazioni di N, P₂O₅, K₂O, CaO e SO₃ rispettivamente di 111, 43, 80, 66 e 15 kg ha⁻¹ (Gorini, 2004). Si evince da tutto ciò la difficoltà nel definire un corretto piano di fertilizzazione dell'aglio.

1.1.7 TECNICA COLTURALE

1.1.7.1 AVVICENDAMENTO

L'aglio è considerata una coltura da rinnovo e viene spesso posta in successione al frumento. Non deve seguire se stesso o la cipolla, soprattutto quando si sono verificati problemi di malattie o di nematodi. Nei terreni con problemi di nematodi è bene non coltivare aglio se non a distanza di 8–10 anni. In consociazione, viene di solito abbinato in settembre-ottobre alla lattuga, ai cavoli primaticci, alle fave, ai piselli, agli spinaci e, in febbraio-marzo, ai lattughini e ai ravanelli. Si deve sempre tener conto di consociare specie dalle esigenze idriche e culturali (soprattutto in materia di lavorazioni meccaniche) compatibili con la coltura (Tesi, 1994).

1.1.7.2 PREPARAZIONE DEL TERRENO

Avendo un apparato radicale molto superficiale, l'aglio non richiede lavorazioni principali molto profonde, ma piuttosto lavorazioni complementari molto accurate per la preparazione del “letto di semina”. Infatti queste ultime devono consentire la facile deposizione dei bulbetti nei solchetti durante l'impianto.

1.1.7.3 FERTILIZZAZIONE

In materia di fertilizzazione, i pareri dei diversi Autori sono piuttosto discordanti. Nella pratica agricola, usualmente vengono somministrati circa 150 kg di N, frazionato in un paio di interventi, 100 kg di P_2O_5 e laddove necessario 150-200 kg circa di K_2O ottenendo buoni risultati produttivi. Rispondendo molto bene allo zolfo, importante per l'aroma e il sapore, è consigliato l'impiego di concimi semplici contenenti tale elemento, quali solfato ammonico e solfato potassico. Solitamente l'apporto di ammendanti organici non viene effettuato direttamente alla coltura, ma a quella che la precede, per evitare l'insorgenza di marciumi radicali. Alcuni Autori non sono del tutto concordi sulla efficacia della concimazione fosfatica e consigliano di utilizzare dosi ridotte a 60 kg ha^{-1} di P_2O_5 .

Altre prove, condotte in Bangladesh, riportano dosi di concimazione pari a 98-100-125 kg ha^{-1} rispettivamente di N- P_2O_5 e K_2O (Islam *et al.*, 2007). Le diverse indicazioni in materia di concimazione e asportazioni riscontrate in bibliografia, potrebbero derivare dalle differenti condizioni pedoclimatiche delle zone oggetto delle prove.

Per quanto riguarda le epoche di somministrazione, si usa distribuire il concime azotato, parte prima dell'impianto, al momento della preparazione del terreno, e parte alla ripresa vegetativa primaverile, interrando il fertilizzante con una sarchiatura. La distribuzione del fosforo e del potassio viene effettuata al momento della preparazione del letto di semina. Per il potassio, dai dati riportati in bibliografia sulle asportazioni, si evince la possibilità di dilazionare l'apporto del concime potassico, parte prima dell'impianto e parte alla ripresa vegetativa primaverile, in concomitanza con la forte richiesta dell'elemento da parte della coltura.

L'aglio sembra essere sensibile alla carenza di micronutrienti. In particolare, carenze di zinco, porterebbero ad uno squilibrio nell'accrescimento della pianta, ritardando l'epoca di maturazione; boro e molibdeno sembrano essere importanti in primavera, per prevenire alterazioni al bulbo e aumentarne la serbevolezza dello stesso (Bianco, 2001).

1.1.7.4 IMPIANTO

L'impianto viene effettuato nel nostro Paese in linea di massima ad ottobre-novembre al Sud, a novembre-dicembre al Centro e a gennaio-marzo al Nord. I bulbetti vengono "seminati", manualmente o meccanicamente, con piantatrici agevolatrici o pneumatiche, in solchetti profondi 5-10 cm e ricoperti con 2-4 cm di terra, in modo uniforme per non avere problemi di disomogeneità di germogliamento.

Nel caso in cui l'operazione di impianto dei bulbetti venga svolta a mano, è utile deporli con

l'apice rivolto verso l'alto per favorire lo sviluppo della nuova plantula. Si adottano densità colturali di 20-30 piante m^{-2} disponendo i bulbetti alla distanza di 10-15 cm sulla fila e interfila di 35-45 cm (figura 1.1.7.4.1). Pertanto, considerando che il peso medio di un bulbetto è di 2-3 grammi e che un bulbo è formato mediamente da 16 bulbetti, per impiantare un ettaro serviranno circa 0,8-1,2 t di bulbi.

E' stato rilevato che a densità colturali maggiori corrispondono rese complessive maggiori ma il peso medio dei singoli bulbi risulta essere inferiore.

Quindi, nella scelta della distanza di impianto, si deve valutare *in primis* la destinazione commerciale del prodotto finale. Se il prodotto è destinato al consumo fresco, al mercato ortofrutticolo o come materiale di propagazione, allora i bulbi di grande dimensione sono più apprezzati e maggiormente pagati. Se il prodotto è destinato all'industria di trasformazione, per cui la pezzatura e l'aspetto hanno minore importanza, si possono adoperare densità maggiori per puntare a maggiori rese. Per assicurare una buona produzione, è fondamentale impiantare materiale di propagazione sano, uniforme e di grande pezzatura.

Prima del piantamento i bulbetti devono essere separati dal girello. Tale operazione, detta anche sgranatura o spicchiatura, viene effettuata manualmente, con costi molto elevati per la manodopera, o meccanicamente con sgranatrici a doppio nastro portanti crivelli oscillanti, cilindri rotanti e sistemi di pulizia e vagliamento che permettono di avere bulbetti separati per calibro e puliti.

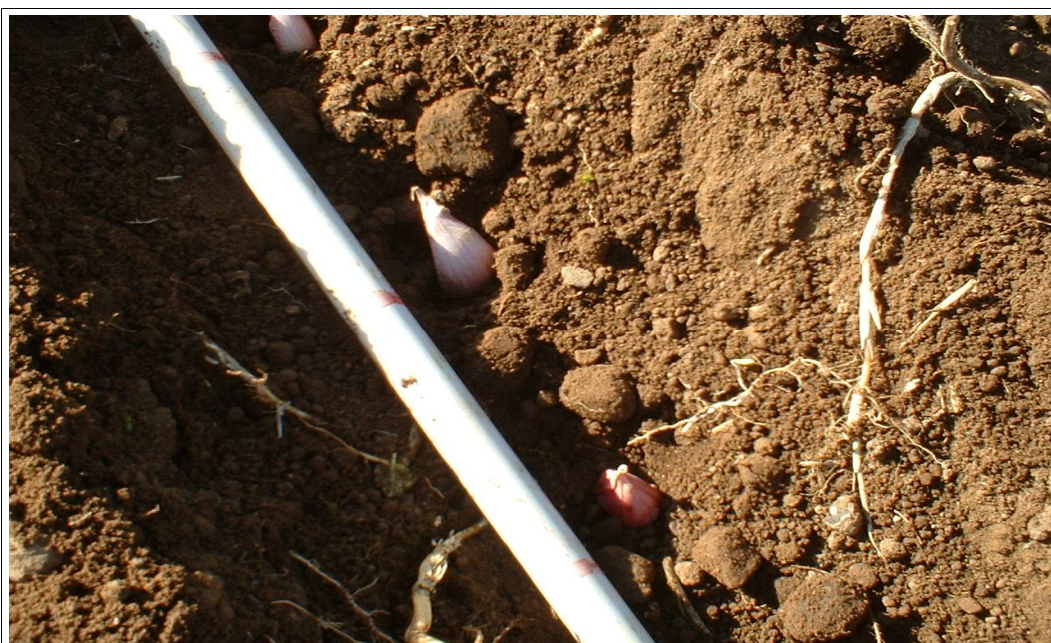


Figura. 1.1.7.4.1 - Bulbetti di aglio nel solco al momento dell'impianto.

A volte, per evitare o comunque ridurre attacchi fungini, è utile trattare direttamente i bulbetti o il terreno con idonee sostanze antiparassitarie prima dell'interramento.

Il germogliamento avviene a spese delle sostanze di riserva del bulbetto, quindi la precocità di questa fase è positivamente correlata con la dimensione e peso del bulbetto.

Temperature di 15-20 °C sembrano essere ottimali per il germogliamento; infatti, a tali livelli termici vengono subito emesse le radici le quali si allungano rapidamente andando quindi a sostenere le esigenze idriche e nutritive della piantina in crescita.

L'emissione delle radici può essere stimolata con il trattamento degli spicchi con prodotti auxinici di sintesi prima della messa a dimora.

Il germogliamento per le semine autunnali avviene dopo 40-60 giorni mentre per le semine primaverili solo dopo pochi giorni. I bulbetti piantati in autunno terminano le loro riserve a inizio primavera (marzo), in concomitanza con la formazione della 6° foglia. L'ingrossamento del nuovo bulbo avviene in coincidenza del completamento di sviluppo dell'apparato fogliare (10-12 foglie, fino a 20) e con fotoperiodo compreso fra 11 e 18 ore di luce e temperature di 10-15 °C. Per la bulbificazione fondamentale, come già ricordato in precedenza, è l'esposizione dei bulbetti a basse temperature (0-10 °C per 30-60 giorni); infatti, in zone calde o tropicali o in semine troppo ritardate in primavera l'aglio non bulbifica e forma un solo bulbillo di grosse dimensioni.

1.1.7.5 CONTROLLO DELLE INFESTANTI

L'aglio si caratterizza per il lungo ciclo colturale (negli impianti autunnali la coltura rimane in campo per ben 8 mesi) in cui il controllo delle infestanti rappresenta una problematica di primaria importanza. L'azione antagonistica della pianta nei confronti delle erbe infestanti, dato il portamento e la forma dell'apparato fogliare, risulta essere modestissima; il che determina, in annate di gravi infestazioni, ingenti danni economici. Durante il ciclo colturale, inizialmente si assiste alla nascita di graminacee annuali quali *Avena*, *Lolium*, *Phalaris*. Spesso, in concomitanza dell'emergenza della coltura o prima, compaiono *Lamium*, *Stellaria*, *Papaver*, *Veronica*, composite e altre specie a ciclo autunno-vernino o autunno-primaverile. A fine inverno-inizio primavera si sviluppano, oltre alle specie già citate, anche polygonacee e chenopodiacee. In primavera inoltrata compaiono specie dei generi *Amaranthus*, *Solanum*, *Euphorbia*, *Mercurialis*, altre dicotiledoni e graminacee (*Lolium*, *Setaria*, *Echinochloa* e *Digitaria*) (Rapparini *et al.*, 2004). Quindi, già prima dell'impianto e durante tutto il ciclo colturale, è fondamentale il controllo delle infestanti che può essere svolto manualmente

(scerbatura), meccanicamente (sarchiatura) o chimicamente attraverso l'impiego di diversi erbicidi di sintesi.

Il controllo manuale delle infestanti è ormai stato abbandonato e viene effettuato solo nelle piccole realtà di produzione quali orti familiari; la sarchiatura può essere applicata con soddisfacente successo laddove la distanza tra le file sia almeno di 45 cm, ponendo sempre molta attenzione nell'operazione per non arrecare danno all'apparato radicale della coltura che risulta essere molto superficiale.

Il controllo chimico delle infestanti è il metodo più adottato soprattutto nelle coltivazioni specializzate e su grandi superfici. In commercio si trovano molti erbicidi selettivi per la coltura.

Spesso, a causa di nascite tardive e scalari delle malerbe, si rende necessario far seguire al trattamento erbicida, effettuato in pre-emergenza, un secondo intervento in post-emergenza.

I primi erbicidi impiegati nel diserbo dell'aglio appartenevano alla famiglia dei nitrofenoli (dinoseb e dinoterb), il cui impiego è stato vietato in Italia per l'alta tossicità e pericolosità nei confronti dell'ambiente e dell'uomo.

Negli anni '50 venne testata l'efficacia erbicida, sia nei confronti delle graminacee che delle dicotiledoni, di clorprofam usato in miscela con cloridazon. Negli anni '60 vennero messi in commercio il clortal-dimetile e trifluralin, ancora oggi impiegati con successo in pre-emergenza. Successivamente, con l'introduzione dei derivati ureici a elevata selettività e a largo spettro d'azione, si è di molto semplificato il controllo delle infestanti nella coltura. Tra i derivati ureici annoveriamo linuron, diuron e altri principi, ora non più in commercio, come nitrofen e metabenzthiazuron.

Tra le anilidi, ancora usate sia in pre che in post-emergenza, ricordiamo il propaclar e il più recente metazoclor.

Nella lotta alle graminacee, dagli anni '80 sono stati introdotti principi attivi come quizalofopetile, propaquizafop e setosidim.

Le politiche comunitarie, finalizzate a ridurre l'impatto ambientale dell'attività agricola, hanno portato, anche nella coltura dell'aglio, ad adottare disciplinari regionali che limitano l'impiego di prodotti chimici. In molti disciplinari di produzione dell'aglio delle diverse regioni italiane, viene sempre più ricercata una produzione "ecologica" a basso impatto ambientale, che garantisca una elevata qualità delle produzioni con l'impiego di mezzi di lotta integrata, sia per le infestanti che per altri agenti biotici di malattia.

Alcune ricerche mostrano come un buon controllo delle infestanti può essere garantito con un

trattamento in pre-emergenza con pendimetalin e con due trattamenti in post-emergenza, uno alla ripresa vegetativa e un altro dopo 30-40 giorni con una miscela di pendimetalin e ioxinil o ioxinil e oxifluorfen (Rapparini *et al.*, 2004).

1.1.7.6 IRRIGAZIONE

Nei climi temperati, considerando il ciclo autunno-estivo della coltura, le precipitazioni sono generalmente sufficienti a soddisfarne le esigenze idriche e ad ottenere buone produzioni. In tali ambienti è quindi raro il ricorso all'irrigazione; però, in annate molto siccitose e soprattutto al Sud, si possono effettuare alcuni interventi irrigui di soccorso per sostenere l'ingrossamento del bulbo. In questo caso, 2-3 interventi irrigui per un volume totale di 1.200-1.500 m³ ha⁻¹ sono sufficienti per raggiungere buone rese produttive. Tenendo conto delle precipitazioni, dell'acqua persa per evapotraspirazione e di altre perdite, è facile stimare la quantità di acqua da apportare. Si deve avere sempre l'accortezza di sospendere ogni tipo di intervento almeno 20 giorni prima della raccolta, per facilitare la conservabilità del prodotto ed evitare lo sviluppo di marciumi che ne comprometterebbero fortemente la qualità. Importante, ai fini della produttività della coltura, è l'impiego di acque di irrigazione con una bassa concentrazione salina. Si è osservato come rese, altezza della pianta, peso e diametro dei bulbi, siano inversamente proporzionali alla percentuale di sodio scambiabile (ESP) presente nel suolo (Bianco, 1990).

1.1.7.7 ELIMINAZIONE DELLO SCAPO FIOREALE

Nelle cultivar che emettono lo scapo fiorale è conveniente asportarlo appena questo ha raggiunto una lunghezza di circa 30 cm. Tale operazione, detta “starlatura”, viene svolta manualmente ed è necessaria per garantire il completo ingrossamento del bulbo in quanto, con l'inizio dell'attività riproduttiva (emissione dei fiori), cessa ogni attività vegetativa (Gorini *et al.*, 1977; Dalla Costa e Miceli, 2004).

Gli scapi o “tarli” così asportati possono essere destinati al consumo fresco e impiegati per la produzione di piatti tipici o conservati sott'olio.

1.1.7.8 AVVERSITÀ E DIFESA

Classifichiamo le avversità dell'aglio in base all'eziologia in: malattie causate da agenti biotici (funghi, batteri, virus, nematodi, insetti) e fisiopatie causate da agenti abiotici (temperatura, umidità, salinità).

Malattie fungine

Tra le malattie crittogamiche che colpiscono l'aglio ricordiamo: la peronospora (*Peronospora schleideni* Ung.), le ruggini (*Puccinia porri* Sow. Wint. e *Puccinia allii* D.C. Rudolphi), il carbone delle foglie (*Urocystis cepulae* Frost), l'alternariosi (*Alternaria porri* Ell. Neerg.), fusariosi (*Fusarium oxysporum*), verticilliosi (*Verticillium alboatrum*), elmintosporiosi (*Helminthosporium alii* Camp.), sclerotinia (*Sclerotium cepivorum* Berkeley), *Penicilium* spp., *Aspergillus niger* Tiegh., *Aspergillus alliaceus* Tom. e Churde, la muffa grigia (*Botrytis alii* Munn.) (Bianco, 1990). I danni più ingenti sono causati dalla ruggine, che compare a fine ciclo, circa un mese prima della raccolta a maggio-giugno, e dal marciume bianco (*S. cepivorum*) che può determinare anche la morte di piante sia giovani che adulte.

La ruggine, causata da *P. alii* o da *P. porri*, determina la comparsa di pustole allungate (fino a 4-5 mm lunghe) nel senso delle nervature, circondate da un alone decolorato che si fessurano lasciando fuoriuscire una polvere rugginosa costituita da una miriade di spore. Le foglie manifestano i sintomi a fine ciclo colturale ed in annate molto umide, con gravi attacchi: possono ingiallire e disseccare. Le due ruggini si differenziano per la lunghezza delle teleutospore di 39 μ per *P. porrii* e di 50 μ per *P. allii*. Per contenere le infezioni si può intervenire preventivamente effettuando 1 o 2 trattamenti in annate particolarmente piovose con composti ftalimidici (figura 1.1.7.8.1).



Figura. 1.1.7.8.1 - Foglie attaccate dalla ruggine (*Puccinia alli* D.C. Rudoiphi).

La muffa bianca (*S. cepivorum*) attacca le piante in pieno sviluppo causandone avvizzimenti e anche la morte. I bulbi vengono ricoperti da un micelio cotonoso con sclerozi neri. Le infezioni sono favorite da bassa umidità del terreno e temperature di circa 20 °C. Per ridurre i danni sono efficaci gli avvicendamenti colturali e trattamenti ai bulbetti prima dell'impianto con Dicloran, Procymidone e Vinclozolin.

Alcune crittogame possono attaccare l'aglio durante il periodo di conservazione, provocando marciumi sui bulbi ad esempio: *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. in qualsiasi condizione di temperatura, ma anche *Penicillium* sp., *Botrytis* sp. ed *H. allii* in condizioni di alte temperature.

A. alliaceus forma sui bulbi delle muffe giallastre, *A. niger* muffe nere; *P. corymbiferum* provoca delle muffe azzurrine e la marcescenza dei bulbetti, *F. oxysporum* forma muffe biancastre con macchie marroni, *H. allii* determina l'annerimento delle tuniche esterne e delle depressioni sulla parte convessa dei bulbetti. Il controllo di questi marciumi si effettua utilizzando per la semina bulbetti sani o concitati con composti benzimidazolici e conservando i bulbi in post-raccolta in luoghi ventilati ed asciutti.

Malattie batteriche

Tra i batteri, quello che si ritrova maggiormente è *Pseudomonas fluorescens*. Questo provoca inizialmente delle lesioni marcescenti ovali sulla parte epigea della pianta; in presenza di alta umidità le infezioni si estendono alle guaine sottostanti e al bulbo causandone la marcescenza. La difesa è puramente preventiva e consiste nell'attuare ampie rotazioni, nell'eliminare i residui infetti e nell'usare materiale di propagazione sano.

Virus

Tra i virus, quello che desta più preoccupazione è il mosaico giallo nano (OYDV). In annate di forte attacco tale virus, provocando delle striature clorotiche sulle foglie, riduce la produzione anche del 50%. L'unico mezzo di lotta contro i virus è la prevenzione; quindi è bene impiegare del materiale di propagazione che ne sia esente e controllare i possibili vettori (es. afidi e tripidi). Esistono in commercio delle cultivar virus esenti come “Cristop” e “Serena”.

Parassiti animali

Tra i parassiti animali dannosi per la coltura ricordiamo i nematodi (*Tylenchus devastatrix* e *Ditylenchus dipsaci*) che attaccano la base dello stelo e i bulbi “svuotandoli”. Le piante infestate si mostrano sofferenti e stentate. In particolare il nematode *D. dipsaci* risulta essere molto dannoso. Si trova con maggiore frequenza nei terreni argillosi che, essendo più umidi di quelli leggeri, ne favoriscono il movimento. Nei terreni sabbiosi e siccitosi ed in presenza di basse temperature può sopravvivere per molti anni sia allo stadio di larva che di uova. Per la lotta puramente preventiva si deve impiegare materiale sano e rotazioni almeno quinquennali.

Altri parassiti sono:

- il cosside dell'aglio (*Dyspessa ulula*): il lepidottero allo stadio adulto vola dal mese di giugno a luglio, si accoppia e depone le uova alla base della pianta. Allo schiudersi delle uova le larve penetrano nel bulbo erodendolo;
- la mosca della cipolla (*Delia antiqua*): gli adulti compiono quattro generazioni all'anno e compaiono a inizio primavera, dopo aver passato l'inverno con pupari in diapausa. Le femmine vivono fino a 50 giorni e depongono fino a 500 uova, ad intervalli di quindici giorni, all'ascella delle foglie o alla base della pianta. Le larve, che nascono dopo circa una settimana, erodono i tessuti che le hanno ospitate e i bulbi. La lotta può essere fatta contro la prima generazione con deltametrina;

- la tignola del porro (*Acrolepiopsis assectella*): gli adulti volano a inizio primavera dopo aver svernato in diapausa. Le femmine depongono le uova sulle foglie. Le larve che nascono, dapprima minano le foglie, poi si trasferiscono sul caule erodendolo. Può compiere fino a 5 generazioni l'anno. La lotta viene effettuata contro gli adulti con deltametrina.

Durante la conservazione dell'aglio, sono stati constatati dal 2002 delle infestazioni di *Nemapogon granellus* L. (*Tinea granella* L.) nota come la tignola del grano (Espinosa e Sannino, 2004). La femmina adulta del lepidottero depone le uova nei bulbi in conservazione da aprile a settembre; in tale periodo si susseguono tre generazioni, mentre una quarta sverna come larva e dà adulti nella primavera successiva. I danni causati da tale lepidottero, rinvenuto dal 2002 nel napoletano, sono ingenti e si manifestano con erosioni alle tuniche e con il disfacimento dei bulbetti. Per difendere il prodotto da tali attacchi, è necessaria un'accurata pulizia dei locali, impiego di trappole a feromoni per monitorarne la presenza e l'impiego di piretroidi per disinfestare gli ambienti di conservazione (Espinosa e Sannino, 2004).

Fisiopatie

Tra le principali fisiopatie annoveriamo “la rugosità dei bulbi” provocata da alte temperature in prossimità della raccolta, più frequentemente nelle colture troppo lussureggianti per eccesso di concimazione azotata o per bassa densità d'impianto (Jones e Mann, 1963). Basse e prolungate temperature determinano invece la presenza di bulbi multipli, ambrati e untuosi al tatto.

1.1.7.9 RACCOLTA E PRODUZIONE

La raccolta per il consumo fresco inizia ad aprile-maggio, mentre per il prodotto da conservare inizia a giugno nell'Italia meridionale e prosegue fino ad inizio agosto in quella settentrionale. La maturazione fisiologica della coltura viene raggiunta quando le foglie ingialliscono e disseccano.

La raccolta viene effettuata a mano o con macchine. Nella raccolta manuale, le piante di aglio vengono estirpate e lasciate ad asciugare in campo o in luoghi riparati per circa una settimana, se i bulbi sono destinati al consumo fresco, o per 2-3 settimane, se destinati al consumo secco. L'asciugatura in luogo protetto è preferibile per evitare lesioni e scottature dei bulbi esposti alle radiazioni. In alcuni casi si ricorre all'asciugatura forzata in magazzino, con flussi di aria calda. Nella raccolta meccanizzata, troviamo sia macchine semplici che combinate. Le

macchine semplici sono costituite da erpici rotativi, che scavano i bulbi lasciando il prodotto in campo, dove viene lasciato ad asciugare come suddetto, e successivamente radunato a mazzi manualmente. Tra le macchine combinate, abbiamo delle scava-raccogliatrici-legatrici monofila che estirpano, puliscono e confezionano direttamente il prodotto destinato al consumo fresco in un unico passaggio (circa 10 mazzi al minuto ciascuno costituito da 30-40 piante).

Per il prodotto da destinare all'industria, ci sono macchine che tagliano le radici e la parte aerea della pianta. I residui vegetali vengono lasciati per circa una settimana sul terreno. Per proteggere i bulbi sottostanti dalla radiazione cocente del sole il prodotto viene scavato, prelevato meccanicamente e trasportato in magazzino dove viene pulito e confezionato (Bianco, 1990).

Prima della commercializzazione, ogni singolo bulbo viene sottoposto a “tolettatura” (eliminazione delle tuniche esterne spesso danneggiate e deteriorate) e confezionato in mazzi, in trecce, in retine o venduto sfuso.

La resa media in bulbi secchi è di 9 t ha^{-1} con valori massimi di 20 t ha^{-1} . L'eliminazione di girello, tuniche esterne e radici comporta uno scarto del 20%.

Sul costo di produzione la manodopera incide per il 40%, l'acquisto del materiale di propagazione per il 20% e l'acquisto dei mezzi tecnici per il 30% (Bianco, 1990).

1.1.7.10 CONSERVAZIONE DEI BULBI IN POST-RACCOLTA E UTILIZZO

Per la conservazione dell'aglio è necessario far asciugare bene i bulbi in post-raccolta, portando l'umidità di questi a valori al di sotto del 65%, in modo da prevenire fenomeni di germogliazione e sviluppo di marciumi. Il germogliamento è favorito da temperature di 15-18 °C, mentre l'umidità relativa elevata causa lo sviluppo di marciumi e l'emissione di radici. Alcune ricerche hanno evidenziato che, non solo temperature intorno ai 0 °C, ma anche prossime ai 30 °C prevengono il germogliamento che, come suddetto, è favorito da temperature di circa 15 °C.

Un metodo tradizionale di conservazione dell'aglio secco è di porlo in ambienti freschi, asciutti e ventilati. Con tale metodo si registra però a fine inverno un forte calo di peso (anche del 30%) e non sempre viene garantita la dormienza dei bulbi e l'assenza di muffe. I bulbi possono essere conservati anche in frigo per 6-7 mesi a 0 °C e 70% di umidità relativa con un calo di peso molto ridotto, mantenendo sostanzialmente inalterate le caratteristiche

organolettiche.

Un metodo di conservazione più recente ed efficace è quello effettuato in celle frigorifere ad atmosfera controllata in cui si mantengono valori di temperatura al di sotto dei 3 °C, CO₂ al 5-6% e O₂ al 3-4%.

In alcuni Paesi viene impiegata l'idrazide maleica (uso non consentito in Italia) 15-25 giorni prima della raccolta che sembra ridurre lo sviluppo di marciumi in magazzino e il germogliamento durante la conservazione.

Sempre a tale scopo vengono effettuati dei trattamenti con raggi gamma sui bulbi nei primi 15-45 giorni dalla raccolta. L'impiego delle radiazioni riduce il calo peso a cui sono solitamente soggetti i bulbi in conservazione, riduce significativamente l'accrescimento delle radici e contiene lo sviluppo di marciumi.

Si è osservato però che dosi eccessive di radiazioni (> 75 Gy) provocano la necrotizzazione dei tessuti nella zona di accrescimento dell'apice, compromettendo la germinabilità del bulbo, ed inoltre comportano una riduzione del contenuto di bisolfuro di allile che è uno dei maggiori componenti responsabili del sapore dell'aglio. L'aglio irradiato può essere commercializzato in Paesi quali: Italia, Francia, Belgio, Cina, Taiwan, Israele, Filippine, Argentina e Sud-Africa. I patogeni responsabili delle alterazioni dei bulbi durante la conservazione appartengono principalmente ai generi *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

1.1.7.11 CENNI DI MIGLIORAMENTO GENETICO

L'aglio, considerato sterile, è stato sempre propagato per via vegetativa e quindi è stato poco soggetto a programmi di miglioramento genetico. E' stata sempre considerata una specie apomittica obbligatoria, ma sono stati selezionati ad oggi molti cloni con polline e semi vitali. A causa della diffusa sterilità di molte varietà di aglio, il miglioramento genetico negli anni passati ha operato con programmi di selezione volti a valutare insorgenze di mutazioni naturali. Con la messa a punto di tecniche, come fusione di protoplasti e coltura in *vitro*, si potrebbe operare per ottenere degli ibridi ampliando così la variabilità della specie. Gli obiettivi del miglioramento genetico sono: aumento della produttività, della pezzatura, dell'uniformità, della conservabilità, buon contenuto in composti solforati (principali responsabili dell'aroma) e maggiore resistenza alle diverse malattie.

1.2 QUALITÀ DELLE PRODUZIONI

1.2.1 VALORIZZAZIONE DELLA TIPICITÀ DEL PRODOTTO

ITALIANO

In Italia, negli ultimi anni, si è assistito ad un crescente interesse per il rilancio della coltura dell'aglio, dovuto allo stato fortemente passivo della bilancia commerciale con l'estero, che ci vede importatori di quasi la metà del prodotto edule. Tale situazione spinge le aree di tradizionale coltivazione dell'aglio a ottenere e commercializzare un prodotto di qualità altamente superiore a quello importato in modo da proteggerlo dalla concorrenza straniera.

Il prodotto di importazione punta infatti alla convenienza del prezzo e all'estetica. L'aglio italiano invece racchiude le potenzialità per puntare alla valorizzazione del prodotto tipico e delle caratteristiche qualitative (Pacifico *et al.*, 2005). Per quanto riguarda la valorizzazione del prodotto tipico, sempre più assistiamo alla richiesta di marchi di protezione europea secondo il Reg. Cee 2081/92 (IGP e DOP), che possano valorizzare e proteggere le produzioni nostrane. Inoltre alcuni ecotipi di aglio, interessanti dal punto di vista biologico e agronomico, sono stati iscritti al Registro Nazionale delle varietà di specie ortive, istituito con Decreto ministeriale del 21 aprile 1981. L'istituzione di un registro nazionale varietale, comportante la certificazione degli ecotipi, nasce dall'esigenza di proteggere questi sui mercati nazionali ed esteri. Ai fini dell'iscrizione nel Registro, i caratteri della pianta che devono essere valutati sono: foglia, bulbo, scapo, bulbetti, precocità, conservabilità, resistenza o tolleranza ad alcune malattie, ecc. La certificazione varietale, oltre a garantire la provenienza e la qualità del prodotto, consente di reperire del materiale di propagazione controllato anche da un punto di vista fitosanitario (Benini, 2004).

1.2.2 PANORAMA VARIETALE ITALIANO

L'aglio viene propagato per via vegetativa in quanto non differenzia, se non in rari casi, organi di riproduzione funzionali. Questo comporta un limite nella diversificazione della specie (Branca *et al.*, 2003).

Ciò nonostante il panorama varietale risulta essere vario negli areali là dove la coltivazione è ormai diffusa da secoli. In Italia esistono diverse popolazioni locali (biotipi e ecotipi) che differiscono tra loro per :

- caratteristiche morfologiche del bulbo: dimensione, peso, compattezza, forma,

pigmentazione delle tuniche esterne e di quelle interne aderenti al bulbetto, disposizione dei bulbetti;

- caratteristiche fisiologiche: precocità di bulbificazione, presenza più o meno costante dello scapo florale, periodo di vernalizzazione;
- caratteristiche merceologiche: calibro, rese, conservabilità;
- caratteristiche organolettiche: aroma e sapore.

La variabilità riscontrabile tra i diversi ecotipi italiani deriva essenzialmente dalla selezione effettuata dagli agricoltori negli anni nelle diverse regioni e dalla introduzione più o meno remota di materiale di propagazione di origine estera.

Storicamente, il parametro di classificazione maggiormente utilizzato in Italia per distinguere gli agli è quello della colorazione delle tuniche. Tale parametro è sicuramente poco preciso e discriminante, ma viene accettato soprattutto a livello commerciale.

Gli ecotipi così valutati vengono divisi in due gruppi: agli bianchi e agli pigmentati.

Gli agli bianchi italiani sono caratterizzati da tuniche esterne di colore bianco argenteo, non screziate, bulbi grossi, compatti, aventi 14–18 bulbetti regolari. Solitamente hanno una buona produttività, rusticità e serbevolezza. Sono generalmente più tardivi degli agli pigmentati e sono adatti a semine autunnali al Centro-Sud e primaverili o autunnali al Nord.

Annoveriamo in questo gruppo i seguenti genotipi con denominazioni locali a cui non corrispondono spesso differenze sostanziali:

- Bianco piacentino: varietà iscritta al Registro Nazionale delle cultivar di aglio (D.M. G.U. N.147/81). E' stata selezionata dalle popolazioni di aglio bianco coltivate nella Provincia di Piacenza.

Questa varietà, a maturazione medio tardiva, presenta bulbi con pezzatura medio-grande, regolari, buona produttività e conservabilità in frigorifero. Ha sapore marcato, aroma piuttosto piccante e acre. Viene seminato di solito in ottobre. E' iscritto come prodotto agroalimentare tradizionale della Regione Emilia Romagna (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99);

- Serena: cultivar iscritta al Registro Nazionale. E' una selezione virus-esente di Bianco piacentino ottenuta mediante coltura *in vitro* di apici meristematici.

E' un aglio a maturazione medio tardiva molto produttivo, con bulbi di pezzatura maggiore rispetto al Bianco piacentino. I bulbi sono regolari, facilmente conservabili e con sapore e aroma marcati. E' adatto a semine autunnali;

- Grosso piemontese o Bianco piemontese: ascrivibile al Bianco piacentino, è un aglio di buona pezzatura e produttività;

- Bianco polesano: è caratterizzato da bulbi di colore bianco uniforme, di forma regolare e tondeggiante. I bulbetti sono fortemente appressati gli uni agli altri ed hanno tuniche rosate nella parte convessa. Il ciclo è autunno-estivo (viene piantato al massimo a inizio inverno e raccolto entro la prima decade di luglio). E' iscritto come prodotto agroalimentare tradizionale della Regione Veneto (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99);
- Aglio di Voghera: proviene dalla selezione delle popolazioni di aglio bianco coltivato nella provincia di Ferrara. Ha una buona pezzatura e produttività. Si semina in autunno e viene raccolto tra l'ultima decade di giugno e la seconda di luglio. E' iscritto come prodotto tradizionale agroalimentare della Regione Emilia Romagna;
- Bianco di Vessalico: viene coltivato con metodi sostanzialmente biologici su piccole superfici terrazzate nella Valle Arroscia in Provincia di Imperia. Ha aroma e sapore molto intensi. E' iscritto come prodotto agroalimentare tradizionale della Regione Liguria (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99);
- Bianco napoletano: ascrivibile al Bianco piacentino, è diffuso in Campania;
- Aglio dell'Ufita: è un aglio bianco medio precoce (si raccoglie a giugno), con tuniche esterne screziate lievemente di rosa, è composto da diversi ecotipi locali coltivati in alcuni Comuni della Provincia di Avellino. E' iscritto come prodotto agroalimentare delle Regione Campania (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99);
- Massese: aglio con bulbi arrotondati, di colore bianco sporco, sapore e aroma più dolci e morbidi degli altri ecotipi bianchi. E' iscritto come prodotto agroalimentare delle Regione Toscana (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99).

Oltre a queste cultivar di maggiore diffusione, ve ne sono molte altre che arricchiscono il panorama varietale italiano degli agli bianchi. Ne citiamo di seguito alcuni: Bianco veneto, Bianco di Pescia, Bianco del Fucino, Bianco calabrese, Bianco siciliano, ecc.

Nel gruppo degli agli pigmentati distinguiamo due sottogruppi: agli rosa e agli rossi.

I rosa italiani sono contraddistinti da tuniche esterne bianche più o meno intensamente screziate di rosa.

I bulbi sono grandi, poiché generalmente composti da un numero maggiore di bulbetti, meno regolari e meno appressati di quelli bianchi. Sono solitamente meno serbevoli e quindi vengono preferiti per il consumo fresco. Generalmente sono più precoci, alla raccolta, dei bianchi (circa 1 mese di anticipo) e per questo molto diffusi al Sud in semina autunnale. A tale sottogruppo appartengono biotipi di limitata diffusione. Tra i più rappresentativi citiamo: il Rosa napoletano e il Rosa di Agrigento.

I rossi italiani sono caratterizzati da tuniche esterne bianche o leggermente screziate e bulbetti con tunica rosso vinosa. Hanno caratteristiche intermedie rispetto alle tipologie suddette. Hanno un più alto contenuto in sostanze aromatiche e sapore molto piccante, buona produttività e conservabilità. La maturazione è di solito medio-precocce (fine giugno - inizio luglio) quindi anticipata rispetto al bianco. La semina è autunnale. In questo insieme distinguiamo alcuni ecotipi che emettono costantemente lo scapo fiorale. Tale attitudine viene considerata un difetto, poiché l'infiorescenza deve essere eliminata manualmente, altrimenti ridurrebbe la produttività della coltura penalizzando in particolare l'ingrossamento del bulbo. Tale operazione, detta "starlatura", comporta un grande dispendio di tempo e manodopera, con un conseguente aumento dei costi per la produzione.

Lo scapo comunque, raccolto al raggiungimento di 30 cm di lunghezza, viene destinato alla produzione di piatti tipici locali.

Tra gli ecotipi di aglio rosso citiamo:

- Rosso di Sulmona: varietà iscritta al Registro Nazionale, ha bulbetti con tunica di color rosso vinoso screziato. E' caratterizzata dalla costante presenza dello scapo fiorale, da una maturazione medio-precocce (terza decade di giugno), buona produttività, pezzatura dei bulbi medio-grande e regolare. E' una varietà dalla spiccata aromaticità e da un gusto decisamente piccante. Viene seminata in novembre-dicembre. E' iscritta come prodotto agroalimentare tradizionale della Regione Abruzzo (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99);
- Rosso di Proceno: aglio con bulbetti aventi tuniche di color rosso rame, caratterizzato dalla presenza più o meno costante dello scapo fiorale, che viene eliminato quando emesso a maggio. La coltivazione di tale ecotipo è limitata al Comune di Proceno e alle zone limitrofe. E' raccolto nel mese di luglio. E' iscritto come prodotto agroalimentare tradizionale della Regione Lazio (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99);
- Rosso di Castelliri: la coltivazione di questo ecotipo è circoscritta alle zone del Comune di Castelliri (FR) e il mercato di riferimento è essenzialmente locale. Il bulbo, di forma ovale, ha tuniche esterne bianche. I bulbetti hanno tunica rossa omogenea. Il sapore è acre e piccante. La semina avviene da fine novembre fino inizio gennaio. La raccolta viene effettuata nei primi quindici giorni di giugno. Ancora oggi le metodiche di coltivazione, lavorazione e conservazione del prodotto rispettano i tempi e i modi della tradizione storica locale;
- Rosso di Paceco = Rosso di Trapani: caratterizzato da tuniche dei bulbetti rosso vinoso o rosa intenso, maturazione precoce, bulbi di pezzatura media, discreta produttività, aroma e

sapore molto piccanti per l'alto contenuto in allicina e presenza costante dello scapo fiorale. E' anche denominato Rosso di Nubia;

- Rosso maremmano: ha tuniche esterne bianche-rosate e tuniche dei bulbetti rosso intenso. Presenta bulbi di piccola pezzatura, presenza costante dello scapo fiorale e maturazione abbastanza precoce (fine giugno). E' un'accessione a rischio di erosione genetica ed è iscritto come prodotto agroalimentare tradizionale della Regione Toscana (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99);

- Aglio di Resia: ha tuniche esterne rossastre, bulbo di piccole dimensioni, bulbetti di colore bianco disposti radialmente intorno all'asse del vero fusto sotterraneo. Non presenta bulbetti centrali quindi il numero di questi in un bulbo è basso (8-10). Viene seminato in autunno e raccolto tra fine luglio-inizio agosto. E' iscritto come prodotto agroalimentare tradizionale della Regione Friuli-Venezia Giulia (Dlgs 173/98 e D.M. 350/99) (Giannini, 2004).

Oltre a questi ecotipi descritti ve ne sono molti altri che ampliano l'offerta varietale italiana di aglio.

1.2.3 CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE E NUTRIZIONALI

Tra gli aspetti importanti della qualità che possano far distinguere il prodotto nazionale da quello importato, oltre alla valorizzazione della tipicità, sono le caratteristiche organolettiche-nutrizionali. Tra queste, l'aroma è di sicuro uno dei parametri che caratterizzano un aglio d'eccellenza. Alcuni recenti studi sono volti proprio alla caratterizzazione del profilo aromatico di alcuni biotipi italiani, attraverso un'analisi delle componenti volatili con gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (Rapparini *et al.*, 2005).

Dal punto di vista chimico, l'aglio è costituito per il 65% da acqua; la maggioranza dei composti presenti nella sostanza secca è idrosolubile (97%) e una piccola quantità liposolubile (tabella 1.2.3.1).

La sostanza secca è costituita principalmente da carboidrati (in particolare fruttosio), composti solforati, proteine, fibra e amminoacidi liberi.

Inoltre contiene composti fenolici, saponine, fosforo, potassio, zinco, selenio, vitamine A e C e bassi livelli di calcio, magnesio, sodio, ferro, manganese e vitamine del gruppo B (Paoletti, 2004).

Tabella. 1.2.3.1 - Composizione chimica dell'aglio (Paoletti, 2004)	
Componente	%
Acqua	62-68
Carboidrati (principalmente fruttani)	26-30
Proteine	1,5-2,1
Lipidi	0,1-0,2
Fibra	1,5
Composti solforati totali	1,1-3,5
Minerali	0,7
Vitamine	0,015
Saponine	0,04-0,11
Composti liposolubili totali	0,15
Composti idrosolubili totali	97

L'aroma ed il sapore caratteristico dell'aglio è dato dai composti solforati in esso presenti e in particolare dall'allicina. Tale composto solforato (disolfuro di allile) si forma quando l'aglio viene tagliato o schiacciato, dall'amminoacido alliina per mezzo dell'enzima alliinasi.

L'allicina è estremamente instabile. La sua azione antimicrobica è stata dimostrata *in vitro*, ma in vivo gli effetti di tale composto sono dubbi per la scarsa biodisponibilità. L'alliina (S-alchil-L-cisteina solfosside), invece, ha proprietà battericide ed antimicrobiche già note fin dall'antichità. I bulbi di aglio contengono anche una piccola quantità di SAC (S-allil-cisteina), composto organosolforato solubile in acqua con proprietà antiossidanti, immunostimolanti, chemioprotettive, antitumorali e epatoprotettive. Molti studi evidenziano come l'assunzione di aglio riduca il rischio di malattie cardiovascolari. Il consumo giornaliero di uno spicchio di aglio sembra ridurre il livello di colesterolo del 10%. Tuttavia si riscontra un'ampia variabilità in base alla durata dei trattamenti, alla modalità di preparazione e alla quantità totale consumata (Paoletti, 2004).

Altri studi svolti su colture cellulari mostrano come l'aglio sia un inibitore della genesi dei tumori. In particolare i composti organosolforati liposolubili sembrerebbero sortire tale effetto. La sperimentazione, volta a chiarire e documentare l'efficacia dei prodotti a base di aglio da impiegare a scopo salutistico, è ancora in esecuzione ed è una tematica estremamente

attuale.

Sta di fatto che nell'ultimo decennio sono sempre più diffusi integratori a base di aglio.

1.2.4 CARATTERISTICHE COMMERCIALI

L'aglio può essere commercializzato fresco, semisecco o secco. Si intende:

- per aglio fresco o verde, il prodotto che presenta lo stelo e la tunica esterna del bulbo ancora allo stato fresco;
- per aglio semisecco, il prodotto con stelo e tunica esterna non completamente secchi;
- per aglio secco, il prodotto con stelo, tuniche esterne e tuniche avvolgenti ciascun bulbetto secchi (Giannini, 2004).

In Italia la raccolta dell'aglio è concentrata nei mesi di maggio, giugno e luglio. La disponibilità del prodotto sul mercato è garantita, comunque, per tutto l'anno sia per la possibilità di conservare i bulbi con opportune tecniche anche fino alla successiva produzione, sia per la globalizzazione dei mercati e quindi l'importazione da Paesi esteri.

I bulbi vengono classificati, per la commercializzazione, in tre categorie (extra, I , II).

Le caratteristiche minime di qualità richieste a livello mondiale per le tre categorie sono:

- sanità dei bulbi, assenza di alterazioni o attacchi parassitari;
- consistenza dei bulbi, i bulbetti della testa devono essere pieni e di forma regolare;
- pulizia, i bulbi devono essere privi di terra e altre sostanze estranee;
- assenza di danni provocati dal freddo (già a temperature di -1 °C) o dal sole;
- assenza di germogli visibili esternamente;
- assenza di odore e sapore estranei.

Per la categoria “extra” i bulbi devono essere di forma regolare, interi, con bulbetti ben appressati, radici tagliate rasente il bulbo, senza germogli evidenti e con un calibro minimo di 45 mm. I bulbi in questa classe devono essere di qualità superiore e non devono presentare difetti. Per gli agli presentati sciolti o a mazzi è ammesso il 5% in peso di bulbi non rispondenti alle caratteristiche della categoria ma conformi a quella della “I”.

Per la I e la II categoria il calibro minimo deve essere di 30 mm. Il calibro è determinato dal diametro massimo della sezione equatoriale. Il prodotto di calibro inferiore ai 30 mm è principalmente destinato all'uso farmaceutico o alla trasformazione (Benini, 2004).

Per la I categoria, i bulbi devono essere di buona qualità. Sono ammesse piccole lacerazioni della tunica esterna e leggere irregolarità nella forma dei bulbi. E' ammesso negli imballaggi o nei mazzi il 10% in peso di bulbi non rispondenti alle caratteristiche della categoria, ma

conformi a quelle della II.

Per la II categoria sono ammesse lacerazioni della tunica esterna, danni meccanici cicatrizzati, ammaccature superficiali che non interessino più di due bulbetti per bulbo, forma irregolare e mancanza al massimo di tre spicchi per bulbo (Fonte: FAO 2007).

Un difetto merceologico del prodotto nostrano è quello di avere un numero alto di bulbetti di piccole dimensioni, i quali allungano i tempi di mondatura in cucina.

Negli ultimi anni esistono in commercio valide alternative al prodotto fresco: aglio in polvere, in pasta, liofilizzato, macerato oleoso, estratto e olio essenziale (Borghi e Paoletti, 2004). Il prodotto essiccato in polvere (resa del 25% circa) è usato anche in miscela con sale e amido (agente antiaggregante). L'olio estratto dall'aglio è di colore giallo-bruno e presenta un aroma forte e pungente. Per un litro di olio servono da 0,4 a 1 t di bulbi (la resa in olio varia in base all'ecotipo, alla zona di produzione, etc.) (Bianco, 1990).

CAPITOLO 2

**Studio della biologia riproduttiva di cultivar di aglio
(*Allium sativum* L.).**

2.1 INTRODUZIONE

L'aglio (*Allium sativum* L.) è una monocotiledone appartenente alla famiglia delle *Alliaceae*, ampiamente distribuita nelle regioni temperate e tropicali, frequentemente in ambienti semiaridi, con corredo cromosomico $2n = 2x = 16$ (specie diploide); ad oggi non si conoscono poliploidi (Tesi, 1994). Al genere "*Allium*" fanno parte altre piante coltivate quali: il porro e l'Elephant garlic, di solito tetraploidi e esaploidi rispettivamente (Simon and Jenderek, 2003). Si pensa che il progenitore selvatico dell'*A. sativum* sia l' *A. longicuspis* Rgl., per la sua somiglianza con l'aglio coltivato. L'*A. longicuspis* Rgl., è una specie endemica dell'Asia Centrale, e si suppone che questa regione sia anche il centro d'origine di *A. sativum* (Vvedensky, 1935; Jones and Mann, 1963; Tesi, 1994).

In Italia sono riportate ben 67 specie spontanee di aglio, tra entità endemiche e esotiche naturalizzate, appartenenti al genere "*Allium*": di queste, solo 28 sono presenti nel Lazio, tra cui una sola specie endemica, quale "*Allium anzaloni*". Le specie endemiche rappresentano la componente floristica di maggior pregio di ciascuna regione. Recenti studi hanno dimostrato come ancora oggi lo standard delle conoscenze floristiche vari da regione a regione. Le regioni che mostrano la maggiore ricchezza floristica sono anche quelle con una maggiore complessità ambientale, per quanto riguarda orografia, morfologia, litologia e bioclimate; tra queste ricordiamo Piemonte (3510 entità), Toscana (3435), Friuli-Venezia Giulia (3335), Veneto (3295), Abruzzo (3232), Lazio (3228) e Lombardia (3220) (Conti *et al.*, 2005).

L'aglio coltivato, essendo completamente sterile, si moltiplica esclusivamente per via vegetativa attraverso bulbetti o "spicchi"; anche se in alcune varietà si ha la formazione di uno scapo fiorale, con fiori misti a bulbilli, che in genere abortiscono. I semi che raramente si sviluppano sono scarsamente vitali. Questo fenomeno è dovuto a irregolarità durante e dopo la meiosi. Etho (1985), ha raccolto alcune piante fertili in Asia Centrale, e afferma che potrebbe trattarsi di specie selvatiche imparentate con *A. longicuspis* (Takagi, 1990). Essendo una specie che si propaga per via vegetativa, questo comporta da un lato il problema della trasmissione di virosi (principale causa della diminuzione di qualità e resa), dall'altro la scarsa possibilità di migliorarlo geneticamente con metodi convenzionali (Bima, 1997).

L'aglio è una pianta erbacea, bulbosa, con radici fascicolate, cordiformi, e foglie basali amplessicauli, distiche, semplici, guainanti alla base e con stipole assenti. Queste foglie

contribuiscono a formare una struttura abbastanza consistente tanto da essere considerata un falso stelo cilindrico. Il bulbo maturo, detto volgarmente “capo” o “testa”, è la struttura adatta alla riproduzione agamica; è rivestito da un numero variabile di foglie trasformate, dette tuniche, da cui si formano solo dalle tuniche “fertili” più interne i bulbetti o “spicchi”, i quali sono inseriti sul fusto detto “girello” (Bianco, 1990), come ampiamente descritto nel paragrafo: 1.1.4.

Lo scapo florale quando si forma è cilindrico, pieno, con altezza variabile (40-80 cm), avvolto da guaine fogliari fino alla metà; alla sommità porta una infiorescenza subsferica, quasi completamente sterile e bulbillifera, costituita da una o più cime contratte, elicoidali, apparentemente ad ombrella, avvolte da alcune brattee membranacee spatiformi, univalve, lungamente rostrate che si fendono ad un lato, rimanendo attaccate permanentemente allo scapo. I fiori sono ermafroditi, attinomorfi o zigomorfi, spesso vistosi e privi di brattee, variabili in numero. Sono portati da un esile pedicello, e possono essere bianchi, rosei, porporini, frequentemente frammisti a bulbilli (viviparia), derivati dalla trasformazione di gemme fiorali, i quali possono essere impiegati per la propagazione dell’aglio. Spesso i fiori non si aprono, avvizziscono e abortiscono quando sono ancora nello stadio di bocciolo florale. Il fiore è formato da 6 tepali liberi o connati, lanceolato-acuminati, persistenti nel frutto, perianzio campanulato o tubuloso, embriciati, petaloidi, non maculati, con occasionale presenza di una corona (formata da un rilievo del perianzio), da 6 stami (3); filamenti liberi o connati, a volte adnati ai tepali, a volte con appendici, e granuli pollinici monocolpati, e da 3 carpelli connati. L’ovario supero, con placentazione assile, triloculare, con stilo diritto e filiforme e stigma unico, intero, capitato oppure trilobato che difficilmente produce seme, presenta 2 ovuli per loculo, anatropi o campilotropi, con nettari nei setti dell’ovario. Il frutto è una capsula loculicida. I semi sono globosi o angolosi, con tegumento provvisto di fitomelano e con strati interni compressi o collassati, con embrione più o meno ricurvo (Agardh, 2007). I semi difficilmente si formano, e quei pochi che si generano sono scarsamente germinabili, perciò bisogna ricorrere a speciali trattamenti ormonali, stratificazioni, scarificazioni e trattamenti con freddo umido per stimolare la germinazione (Etoh, 1938b; Etoh *et al.*, 1988; Inaba *et al.*, 1995).

Formula florale delle *Alliacee*: * o X , ~~(6)~~, (6), (3); capsula

- Dove:
- (*) simmetria raggiata;
 - (X) simmetria bilaterale;
 - (-6-) numero di tepali, con calice e corolla riuniti insieme;
 - (6) numero di stami;
 - ((3)) numero di carpelli, con saldatura di tipo connato, ovario supero;
 - (Capsula) tipo di frutto;
 - le linee tratteggiate indicano all'interno di un taxon variazione nella saldatura di tipo connato o in quella di tipo adnato.

Il numero di fiori in una infiorescenza varia da meno di 10 ad oltre 300, ma di solito oscilla da 150 a 200 (Etoh, 1985; Pooler and Simon, 1994; Jenderek, 1998). I fiori di aglio sono proterandri per un tempo che va da 2 a 4 giorni, dalla deiscenza del polline alla recettività dello stigma, lo stigma rimane recettivo per uno due giorni, e gli stili sono di solito più lunghi dei tepali, con una antesi che in tutto dura da 5 a 20 giorni. I tepali di fiori maturi di aglio formano un angolo di circa 45°, sebbene molti semi derivino da fiori con tepali quasi chiusi. Diversi studi hanno evidenziato come trattamenti a basse temperature (< 5 °C) inducono la fioritura; ma è solo la predisposizione genetica che dà un forte contributo alla fioritura in aglio, come dimostrato da alcuni cloni che quasi mai fioriscono se sottoposti a trattamenti di vernalizzazione, mentre altri fioriscono facilmente (Takagi, 1990; Pooler and Simon, 1993b). Trattamenti con basse, e specialmente, con alte temperature, possono far risultare incompleto lo sviluppo dell'infiorescenza e l'allungamento dello scapo (Takagi, 1990). Durante lo sviluppo dello scapo florale, la regione meristemica inizia a differenziarsi dalla punta, differenziando fiori frammisti a bulbilli (Kothari and Shah, 1974a,b; Etoh and Ogura, 1977; Etoh, 1985; Qu-Ying *et al.*, 1994; Kamenetsky and Rabinowitch, 2001, 2002). Durante lo sviluppo dell'infiorescenza dell'aglio, c'è un equilibrio o competizione tra bulbo, bulbilli e fiori, in termini di sviluppo e risorse allocate (Pooler, 1991; Pooler and Simon, 1993b, 1994). Prove per determinare l'ipotesi di questa competizione furono fatte da Katarzhin and

Katarzhin (1982) and Etoh (1983b, 1997), i quali produssero seme di aglio senza eliminare i bulbilli, mentre Konvicka (1984), Pooler and Simon (1994) and Jenderek (1998), rimossero i bulbilli durante lo sviluppo dell'infiorescenza, per migliorare lo sviluppo dei fiori e dei semi, osservando così che lo sviluppo dei fiori è in parte influenzato dalla competizione con i bulbilli per i fotosintetati. Questa competizione porta ad un aborto dei fiori. In natura non esiste una infiorescenza di aglio coltivato senza fiori frammisti a bulbilli, eccetto in rari casi di coltura *in vitro*, capace di azzerare la competizione tra fiori e bulbilli dentro l'infiorescenza. Senza uno sviluppo completo dei fiori, non è possibile la produzione di gameti e semi vitali. La fertilità dell'aglio è principalmente determinata dal background genetico: infatti cloni fertili di solito presentano una infiorescenza con numerosi fiori vitali e piccoli bulbilli, mentre i cloni non fertili hanno pochi fiori e grandi bulbilli. La presenza nell'infiorescenza di grandi bulbilli, di solito, è indice di una scarsa attitudine nella produzione di semi. In molti cloni, i fiori durante il loro sviluppo vanno incontro ad una prematura senescenza in fase di bocciolo fiorale, non permettendo al fiore di andare in meiosi, e quindi di svilupparsi regolarmente (Weber, 1929; Gvaladze, 1965; Etoh, 1985; Pooler and Simon, 1994). Questa prematura senescenza può assumere parecchie forme: in alcuni cloni la differenziazione dei tessuti permette l'entrata in meiosi, mentre in altri la microsporogenesi può completarsi; ma poi le microspore degenerano e non vanno al di là dello stadio di tetradi. E' difficile determinare con precisione le cause che portano agli aborti fiorali e alla sterilità. Aberrazioni cromosomiche, competizione durante lo sviluppo della pianta tra bulbo, bulbilli e fiori, danno un forte contributo al fallimento dello sviluppo dei fiori (Etoh, 1985). In alcuni cloni con completa sinapsi e normale microsporogenesi, comunque maschio-sterili, la presenza di tepali ipertrofici e altri disturbi inibiscono fortemente lo sviluppo delle microspore (Novak, 1972; Etoh, 1982). Tuttavia, diversi studi hanno rivelato analoghi risultati con trattamenti antibiotici (Novak and Havranek, 1975; Pooler, 1991), mentre è stata osservata fitotossicità e arresto dello sviluppo del polline mediante questi trattamenti antibiotici (Etoh, 1980). Esaminando lo sviluppo dei fiori durante l'allungamento dello scapo fiorale, molti studi hanno evidenziato la presenza di numerosi fiori abortiti anche in cloni fertili (Qu-Ying *et al.*, 1994). Molti fattori influenzano la morfologia e lo sviluppo dell'aglio, come evidenziato in molti studi (Mann, 1952; Mann and Minges, 1958; Takagi, 1990). Tra i principali troviamo: la temperatura dell'ambiente di conservazione e il tempo di stoccaggio, la temperatura di crescita della coltura, il momento migliore di impianto, il fotoperiodo, la temperatura dell'aria e del terreno e l'intensità di luce durante il ciclo produttivo. Tutte queste variabili influenzano la

dimensione e il numero di bulbetti per bulbo, la dimensione e il numero delle foglie, la dormienza e la fioritura, come evidenziato in altre *Alliaceae* (Takagi, 1990; Pooler and Simon, 1993b). Ulteriori ricerche hanno evidenziato come prolungate temperature basse negli ambienti di stoccaggio del materiale di semina, incrementino l'incidenza della fioritura delle piante in alcuni cloni, come l'ombreggiamento rallenti la maturazione e riduca la produzione, e come condizioni di "giorno corto" determinino un bulbo di piccole dimensioni e spesso indiviso.

I primi risultati riguardanti la produzione di seme provengono da ricerche fatte in Russia, usando germoplasma proveniente dall'Asia Centrale e da regioni vicine (Kononkov, 1953; Gvaladze, 1961; Katarzhin and Katarzhin, 1978, 1982). L'Asia Centrale, essendo il centro della diversità del germoplasma dell'aglio, è l'unica area dove ancora si trova l'aglio selvatico (*Allium longicuspis*). La riproduzione sessuale presente in questa specie rende l'Asia Centrale un bacino di ricombinazione genetica, capace di generare molti nuovi genotipi. Tuttavia possiamo ipotizzare che il lungo periodo di coltivazione e la costante selezione, hanno consentito lo sviluppo di genotipi modificati, capaci di limitare la capacità dell'aglio a fiorire a produrre semi. Dunque, il lungo periodo di propagazione asessuale ha consentito l'accumulo di aberrazioni cromosomiche (Sharma, 1956), che favoriscono probabilmente il meccanismo della maschio sterilità (Simon and Jenderek, 2003).

Nell'aglio i fiori si sviluppano in primavera e maturano in estate: questo permette di mettere in atto una procedura per stimolare la formazione del seme, tramite l'eliminazione dei bulbilli e l'impollinazione dei fiori sullo scapo florale, direttamente in laboratorio o in ambiente controllato (serra). Questo processo richiede molto lavoro, e di conseguenza non permette la produzione di seme per una commercializzazione su larga scala, ma fornisce seme solo per piccoli programmi di riproduzione (Simon and Jenderek, 2003). I fiori maschio-fertili, capaci di produrre semi, di solito presentano antere con una leggera pigmentazione purpurea o rossa (Etoh, 1983a; Konvicka, 1984; Etoh *et al.*, 1988; Pooler and Simon, 1994; Hong and Etoh, 1996). Altri studi evidenziarono come alcune piante maschio-fertili con antere gialle siano state in grado di produrre ugualmente seme (Pooler and Simon, 1994; Jenderek, 1998). Inoltre, piante maschio-sterili possono ancora essere femmina-fertili e produrre seme; questo consente la produzione di seme da ibridi F1 (Simon and Jenderek, 2003). Per assicurare la produzione di seme di aglio, parecchi autori hanno ripetuto per diversi giorni l'impollinazione su alcuni fiori ottenendo ottimi risultati (Etoh, 1983b; Pooler and Simon 1994; Etoh, 1997). A limitare molto la produzione di seme, sono le alte temperature (> 30 °C), che, se persistono

per diversi giorni durante l'antesi, diminuiscono rapidamente la vitalità del polline, costringendo il fiore ad una rapida senescenza. Questa sensibilità al caldo varia molto da clone a clone (Simon and Jenderek, 2003).

Diversi studi hanno evidenziato come il materiale clonato possa produrre circa 50 semi per ombrella (Etoh *et al.* 1998; Jenderek and Hannan, 2002), mentre piante derivanti da vero seme, producono in media 656 semi per ombrella (Etoh, *et al.*, 1998; Jenderek, 1998). Diversi sono i trattamenti usati per stimolare la germinazione, quali trattamenti ormonali, stratificazioni, scarificazione e trattamenti con freddo umido (Etoh, 1938b; Etoh *et al.*, 1988; Inaba *et al.*, 1995).

Una variabile che ha un significativo effetto negativo sull'intera performance dell'aglio in termini produttivi e riproduttivi e sulla valutazione del germoplasma, è l'infezione da virus, in particolare Potyvirus: *onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *leek yellow stripe virus* (LYSV). Le virosi in aglio sono molto comuni e, nonostante le numerose ricerche fatte per produrre aglio virus esente, ad oggi non sono state identificate resistenze (van Dijk, 1994; Verbeek *et al.*, 1995; Salomon, 2002).

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Analisi morfologica di scapi fiorali, fiori e bulbilli

Dalle prove agronomiche realizzate nel 2007 presso l'azienda didattico-sperimentale "Nello Lupori" dell'Università degli Studi della Tuscia, sono stati fatti 4 prelievi a giorni alterni per una durata complessiva di 7 giorni, su 100 piante di aglio della cultivar Rosso di Sulmona, replicate quattro volte, per determinare l'epoca di comparsa e di eliminazione degli scapi fiorali. Il test si è ritenuto concluso quando non è stata rilevata la presenza di nuovi scapi, una volta avviato il processo di comparsa. L'eliminazione è stata fatta quando gli scapi presentavano una lunghezza non inferiore a 15 cm, per non andare incontro a problemi di rottura. Al momento dell'eliminazione, di questi scapi fiorali sono stati presi 15 scapi per la cv R. di Sulmona e 10 scapi per la cultivar Bianco piacentino, sui quali sono state fatte osservazioni sulla morfologia fiorale usando lo stereomicroscopio. Per queste osservazioni, i 25 scapi di entrambe le cultivar sono stati sezionati mediante bisturi, disposti su vetrino, osservati allo stereomicroscopio ed infine fotografati mediante macchina digitale Canon.

Mediante queste prove agronomiche, sono stati presi, durante tutto il ciclo colturale, dati sul diametro dell'infiorescenza e dell'asse fiorale, e sulla lunghezza dello scapo fiorale dal momento dell'emissione, fino alla completa maturazione dello stesso, che coincide con la raccolta in campo della coltura. I rilievi sono stati fatti con intervalli settimanali, su 80 scapi fiorali della cv R. di Sulmona e 20 scapi fiorali della cv B. piacentino, con quattro repliche per ogni cultivar, allo scopo di determinare l'evoluzione in lunghezza dello scapo e del diametro dell'infiorescenza e dell'asse fiorale durante lo sviluppo.

Al momento della raccolta in campo della coltura, sono stati prelevati tutti i 100 scapi fiorali delle due cultivar, sui quali si è determinato il diametro equatoriale dell'infiorescenza alla completa maturazione, e per ciascuna infiorescenza sono stati contati il numero di fiori e il numero di bulbilli. Solo per i bulbilli, è stato determinato anche il peso medio.

In una serra fredda, è stata effettuata anche una prova di germinazione dei bulbilli in tre repliche, sia della cv R. di Sulmona che B. piacentino, con "semina" avvenuta il 10 gennaio 2007. Il test si è ritenuto concluso quando per tre volte consecutive non sono stati rilevati nuovi bulbilli germinati, una volta avviato il processo di germinazione. I bulbilli sono stati posti in contenitori alveolati di polistirolo da 160 fori, su un substrato di coltivazione costituito da torba neutra di sfagno, con un titolo in percentuale di peso sulla sostanza secca di

carbonio organico di origine biologica (C) 35%, azoto organico (N) 0,8%, sostanza organica 85%, con pH (CaCl₂): 5,0-6,0. Al substrato di coltivazione non è stato aggiunto nessun elemento fertilizzante; durante l'intero periodo di permanenza in serra pertanto le piantine hanno beneficiato dei soli elementi minerali presenti naturalmente nel substrato. I controlli sono stati effettuati 2 volte alla settimana, per una durata complessiva di 8 settimane, la germinabilità è stata desunta dal rapporto tra numero di bulbilli, che hanno prodotto radichetta, e foglioline sul numero totale di bulbilli testati.

2.2.2 Analisi al microscopio ottico, fissazione ed inclusione del materiale in paraffina

Durante il II° anno di attività, in collaborazione con il Prof. Andrea Mazzucato del Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica sezione di genetica, sono stati recuperati in campo, da una serie di prove agronomiche, realizzate usando come materiale propagativo, aglio 'R. di Sulmona', 'B. piacentino' e aglio spontaneo (*Allium ampeloprasum* L.); 50 scapi fiorali, dai quali sono stati presi 145 fiori, raccolti ad intervalli settimanali, dalla loro formazione fino alla fioritura, per essere sottoposti ad uno studio sulla morfologia fiorale, al fine di valutarne la biologia riproduttiva di cultivar di aglio (*Allium sativum* L.). Tutti i 145 fiori impiegati negli studi sulla morfologia fiorale, prima di essere fissati e inclusi in paraffina, sono stati divisi in classi sulla base dei loro diametri polari ed equatoriali, al fine di definire gli stadi fenologici (sporogenesi maschile) sulla base delle dimensioni dei fiori.

Tutto il materiale raccolto è stato fissato in FAA (50% etanolo al 100%, 5% acido acetico, 10% formaldeide al 37% e 35% di H₂O), e tenuto a 4 °C per 2 giorni. Il materiale così ottenuto è stato sottoposto per un tempo di 15' in condizioni di sotto vuoto mediante una campana del vuoto, permettendo al fissativo di penetrare meglio nei tessuti dei fiori, al termine del quale il fissativo è stato cambiato con etanolo al 70%. Questo trattamento permette di conservare a lungo il materiale in frigorifero a 4 °C fino al momento del suo utilizzo.

Per l'inclusione, il materiale è stato rimosso dal fissativo e deidratato mediante tre lavaggi con etanolo a diversa concentrazione, operando a temperatura ambiente e sotto cappa, 30' in etanolo al 70%, 30' in etanolo al 96% ed infine 30' in etanolo al 100%. Alla fine di questi lavaggi, i campioni sono stati incubati per 30' a temperatura ambiente, in una miscela

composta da tre parti di etanolo al 100% e una parte di xilene (Etanolo/Xilene rapporto 3:1), poi in una miscela composta da una parte di etanolo al 100% e una parte di xilene (Etanolo/Xilene rapporto 1:1), e per ultimo in una miscela composta da una parte di etanolo al 100% e tre parti di xilene (Etanolo/Xilene rapporto 1:3), fino ad una completa incubazione in solo xilene, mediante tre passaggi nello stesso per un tempo ciascuno di 15'. Al termine di questa fase, i campioni sono stati disposti in una soluzione costituita da una parte di xilene e da una parte di paraffina (*Paraplast*, SIGMA), e lasciati in stufa a 42 °C O.N., per favorire lo scioglimento della paraffina mediante xilene e la sua penetrazione nei tessuti vegetali.

La soluzione xilene/paraffina in seguito è stata rimossa, ed ai campioni è stata aggiunta paraffina liquida; così sono stati lasciati ad incubare per 6 h a 60 °C, con sostituzione ed aggiunta, circa ogni ora, di nuova paraffina liquida sempre alla temperatura di 60 °C. Durante questi passaggi, le provette contenenti i campioni sono state lasciate aperte, per consentire allo xilene di evaporare, lasciando penetrare la paraffina nei tessuti vegetali.

Dopo questa fase in cui i campioni si trovano inclusi in paraffina liquida, sono stati disposti in stampini pre-riscaldati a 60 °C, che una volta raffreddati a temperatura ambiente sono stati conservati a 4 °C fino al sezionamento.

2.2.3 Sezionamento e colorazione dei tessuti

I campioni di fiori inclusi in paraffina sono stati tagliati in sezioni di 8/10 µm mediante microtomo rotativo, ottenendo strisce di tessuto, le quali sono state disposte in piastre Petri sterili, per essere poi conservate a 4 °C e utilizzate per le osservazioni.

Il materiale sezionato è stato controllato per poter scegliere le sezioni migliori mediante stereo microscopio, ed una volta scelta la sezione migliore, quest'ultima è stata adagiata sopra una goccia d'acqua sterile, sulla superficie di vetrini poli-lisinati. Quando la sezione del materiale si è ben distesa sul vetrino, questo è stato disposto in stufa a 37 °C O.N (over night). per facilitare la completa distensione del materiale sul vetrino. Per la colorazione, i vetrini con le sezioni sono stati sottoposti a deparaffinizzazione in una soluzione di xilene al 100% per 10-15'. Questo permette la completa eliminazione della paraffina, rendendo i vetrini pronti per essere idratati nuovamente con tre lavaggi in etanolo a diverse concentrazioni, rispettivamente: 1-2' in etanolo al 100%, 1-2' in etanolo al 96% e per 1-2' in etanolo 70%, ed infine sono stati disposti in acqua sterile per la completa idratazione. Questo ultimo passaggio permette all'acqua di sostituirsi totalmente all'etanolo nei campioni. In seguito una parte dei

campioni sono stati colorati con blu di toluidina, disponendoli per 1,5- 2' in una soluzione allo 0,1% di blu di toluidina in una soluzione tampone al 2,5% di NaCO_3 a pH 11. I vetrini sono stati sciacquati per tre volte in acqua sterile per 1' rispettivamente, e sottoposti ad una nuova disidratazione mediante tre lavaggi di pochi secondi in etanolo al 70%, al 96% e al 100%. Infine sono stati fatti asciugare per 5' e chiusi con una goccia di balsamo (Eukit) capace di garantirgli una lunga conservazione. I campioni così ottenuti sono stati osservati con un microscopio ottico Zeiss Axioskop 2 in campo chiaro e fotografati mediante macchina fotografica digitale Canon. Il resto dei campioni, invece è stato colorato con una goccia di blu di anilina [0,1% di blu di anilina in idrogeno fosfato di potassio (K_2HPO_4) 0,5M]: questa colorazione è servita per evidenziare il deposito di callosio tipico delle divisioni meiotiche maschili e femminili. I campioni così colorati sono stati osservati nuovamente al microscopio ottico Zeiss Axioskop 2 in luce a fluorescenza (lampada HBO50/AC), e fotografati mediante macchina digitale Canon.

Per ogni variabile rilevata, è stata calcolata sia la media delle osservazioni che il rispettivo errore standard (ES) della media, e come tali sono state riposti nei grafici.

2.3 RISULTATI

2.3.1 Osservazione morfologica in scapi fiorali, fiori e bulbilli

Dalle osservazioni fatte allo stereomicroscopio sugli scapi fiorali delle due cv R. di Sulmona e B. piacentino al momento dell'eliminazione degli stessi sulla coltura, sono state osservate già a questi primi stadi di sviluppo delle sostanziali differenze a livello della spata univalve o "guaina" che avvolge l'infiorescenza, sul numero e dimensione dei fiori e bulbilli e sulla pigmentazione sia degli scapi fiorali che dei bulbilli.

Per quanto riguarda la spata che avvolge l'infiorescenza, si nota una sostanziale differenza a livello della saldatura della stessa sull'asse florale nelle due cultivar e una differente pigmentazione sia dell'asse florale che della spata, osservando una pigmentazione più marcata in 'B. piacentino' (Fig. 1a), rispetto alla cv R. di Sulmona (Fig. 1b).

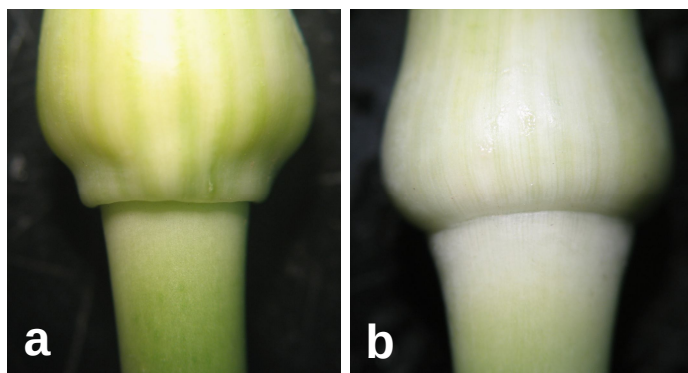


Fig. 1 – Asse florale e spata avvolgente l'infiorescenza in aglio Bianco piacentino e Rosso di Sulmona. a) spata in Bianco piacentino con pigmentazione verde accentuata, b) spata in Rosso di Sulmona con pigmentazione molto tenue.

Dalle osservazioni morfologiche allo stereomicroscopio, emerge anche una sostanziale differenza sul numero dei fiori portati dall'infiorescenza delle due cultivar. L'infiorescenza della cv B. piacentino presenta pochi fiori frammisti a bulbilli di grandi dimensioni (Fig. 2a), contrariamente all'infiorescenza del 'R. di Sulmona' che si presenta con numerosi fiori che avvolgono interamente tutti i bulbilli di dimensioni minori (Fig. 2b).

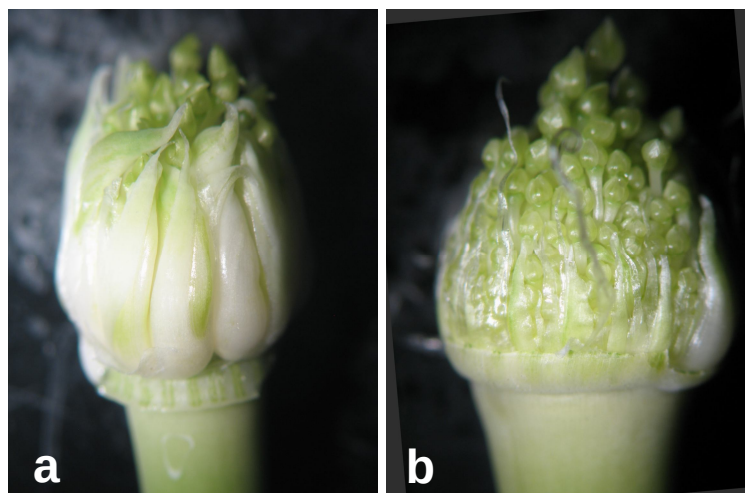


Fig. 2 – Infiorescenze prive della spata in aglio Bianco piacentino e Rosso di Sulmona. a) infiorescenza in Bianco piacentino con pochi fiori frammisti a bulbilli, b) infiorescenza in Rosso di Sulmona con moltissimi fiori che avvolgono interamente i bulbilli.

Sezionando questi scapi fiorali emerge anche la differenza sul numero dei bulbilli portati da questi scapi. La cv B. piacentino oltre a portare pochi fiori, porta anche pochi bulbilli ma di grandi dimensioni (Fig. 3a), rispetto all'infiorescenza del 'R di Sulmona' la quale presenta molti bulbilli di piccole dimensioni (Fig. 3b).

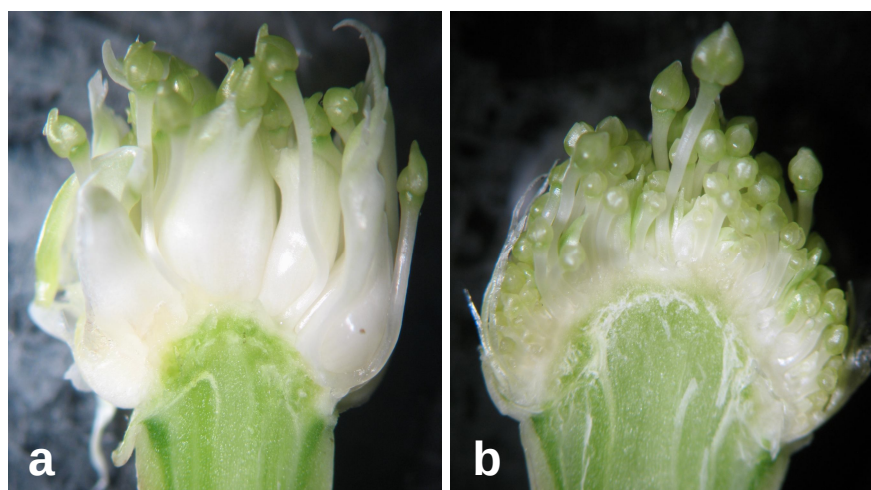


Fig. 3 – Sezioni longitudinali di scapi fiorali in aglio Bianco piacentino e Rosso di Sulmona. a) fiori e bulbilli in infiorescenza di aglio Bianco piacentino, b) fiori e bulbilli in infiorescenza di aglio Rosso di Sulmona.

I bulbilli delle due cultivar oltre a presentare differenze nel numero e dimensioni, presentano anche differenze sulla pigmentazione della tunica esterna. La cv B. piacentino presenta bulbilli con una tipica pigmentazione rossa, localizzata all'apice della tunica esterna che avvolge gli stessi (Fig. 4 a,b), mentre i bulbilli della cv 'R. di Sulmona' si presentano bianchi con una leggera pigmentazione di colore verde all'apice della tunica esterna (Fig. 5 a,b).

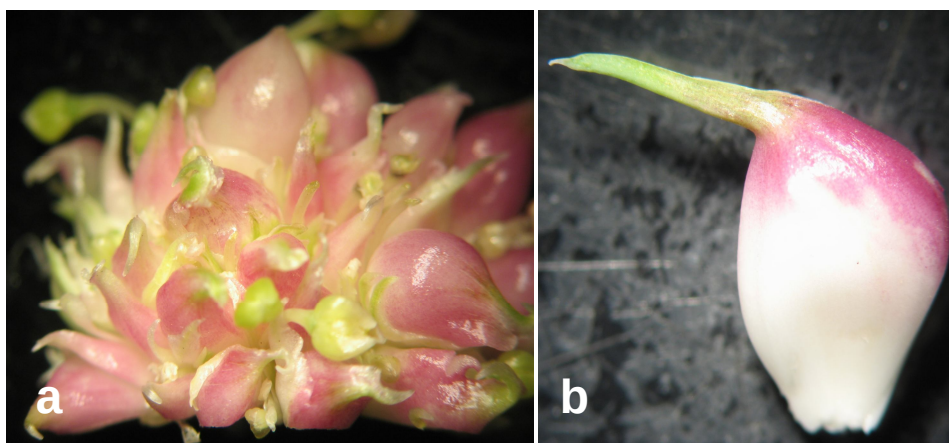


Fig. 4 – Fiori e bulbilli portati dall'infiorescenza in aglio Bianco piacentino. a) bulbilli con tipica pigmentazione rossa all'apice della tunica esterna che avvolge i bulbilli, b) particolare di un bulbillo.

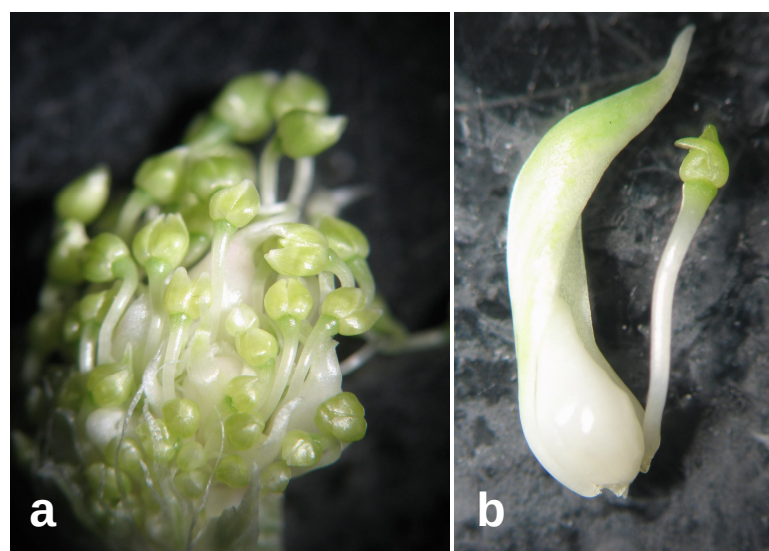


Fig. 5 – Fiori e bulbilli portati dall'infiorescenza in aglio Rosso di Sulmona. a,) bulbilli con tipica pigmentazione verde all'apice della tunica esterna che avvolge i bulbilli, b) particolare di un bulbillo.

Dai rilievi effettuati sulle prove agronomiche realizzate presso l'azienda didattica-sperimentale "Nello Lupori" dell'Università degli Studi della Toscana, per il parametro "epoca di eliminazione degli scapi fiorali", emerge che il 100% degli scapi fiorali presenti nella cv R. di Sulmona sono stati eliminati dalla coltura nell'arco della settimana dal 16 al 22 maggio. Per l'eliminazione di tutti gli scapi fiorali sono stati necessari quattro passaggi, e ad ogni passaggio sono stati tolti manualmente tutti gli scapi presenti sulla coltura, la cui % maggiore è stata eliminata nei primi due passaggi (Fig. 6). Sulla cv B. piacentino non è stato possibile rilevare la presenza degli scapi fiorali, perché, come tutte le cultivar appartenenti alla "tipologia aglio bianco" lo scapo non viene prodotto se non solo da sporadiche piante presenti in coltura. (Tesi, 1994).

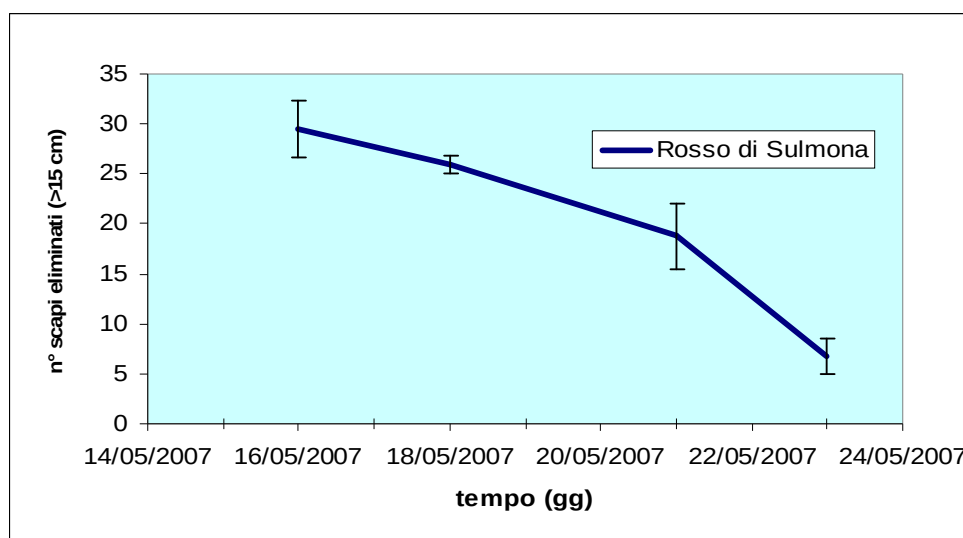


Fig. 6 - Numero e epoca di eliminazione degli scapi fiorali in Aglio (Rosso di Sulmona)

I risultati ottenuti dalla elaborazione dei dati sullo sviluppo dello scapo fiorale, evidenziano come la lunghezza finale dello scapo in 'R. di Sulmona' arrivi a 64,25 cm, rispetto ai 37,48 cm della cv B. piacentino. Dei 64,25 cm di lunghezza dello scapo fiorale in 'R. di Sulmona', 52,76 cm sono interessati dall'asse fiorale e i rimanenti 11,49 cm rappresentano la lunghezza dell'infiorescenza: mentre per il 'B. piacentino' dei 37,48 cm, 27,32 rappresentano la lunghezza dell'asse fiorale e i rimanenti 10,16 cm sono imputabili alla lunghezza dell'infiorescenza vera e propria (Fig. 7).

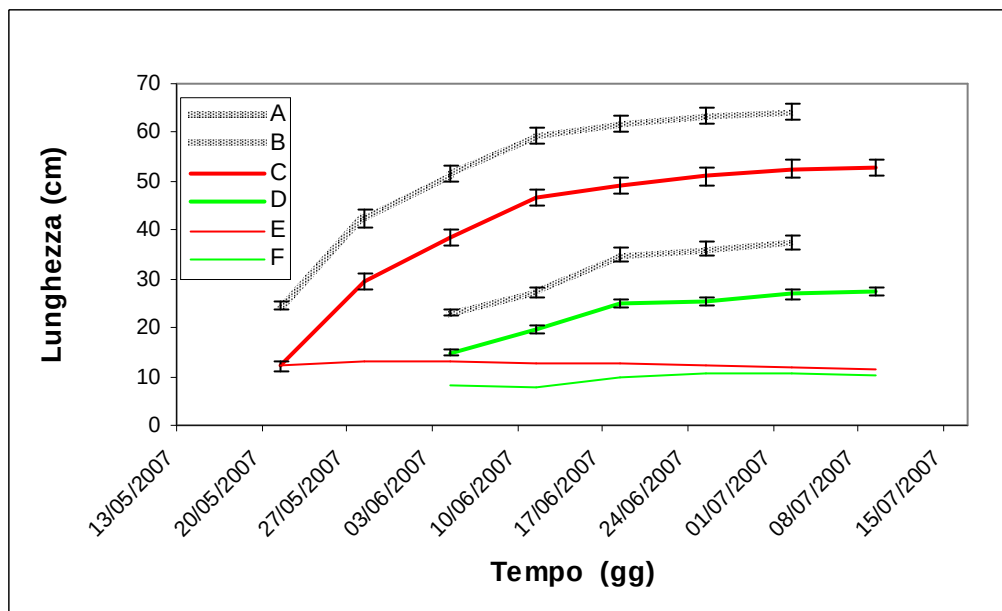


Fig. 7 - Sviluppo scapi fiorali. A) Lunghezza scapo fiorale in R.S. dall'ultima foglia all'apice, B) Lunghezza scapo fiorale in B.p. dall'ultima foglia all'apice, C) Lunghezza asse fiorale in R.S. dall'ultima foglia alla base dell'infiorescenza, D) Lunghezza dell'asse fiorale in B.p. dall'ultima foglia alla base dell'infiorescenza, E) Lunghezza dell'infiorescenza in R.S, F) Lunghezza infiorescenza in B.p.

Dai risultati provenienti dall'analisi dei diametri dell'asse fiorale e dell'infiorescenza, emerge che il diametro medio dell'asse fiorale alla completa maturazione in 'R. di Sulmona' è di 5,33 mm, nettamente superiore al diametro riscontrato nel 'B. piacentino' quale 3,07 mm. Il diametro equatoriale medio dell'infiorescenza in 'B. piacentino' a maturazione ultimata è di 22,18 mm; in 'R. di Sulmona' risulta essere di 21,63 mm (Fig. 8).

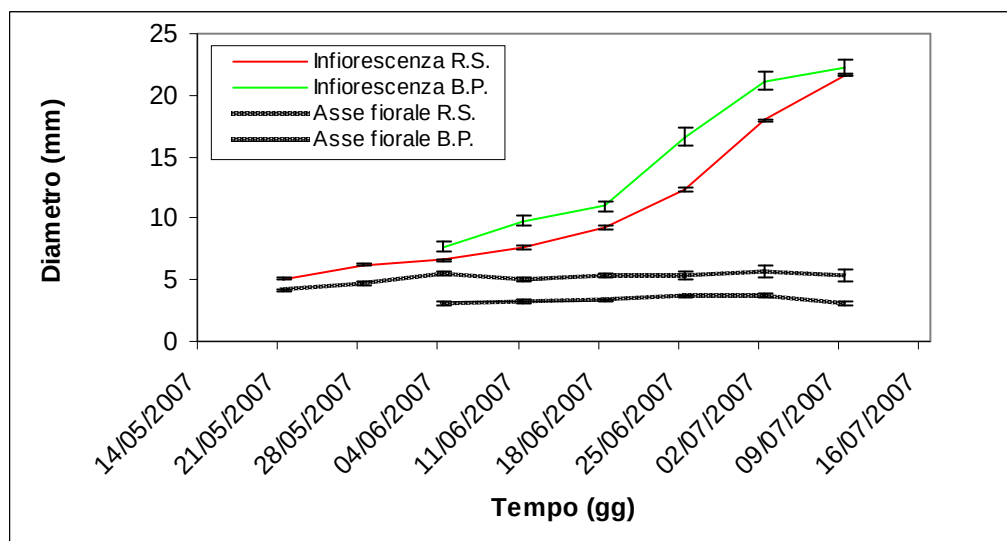


Fig. 8 - Diametro dell'infiorescenza e dell'asse fiorale in aglio.

Dall'analisi dei dati sull'infiorescenza, risulta che se il diametro dell'infiorescenza in aglio 'R. di Sulmona' è simile rispetto al diametro della stessa in 'B. piacentino', il numero di fiori e di bulbilli portati dall'infiorescenza nella cv R. di Sulmona risultano essere nettamente maggiori rispetto a quelli portati dall'infiorescenza del 'B. piacentino'. Infatti la cv Rosso di Sulmona per ogni infiorescenza risulta avere in media 158,8 fiori e 224,1 bulbilli, mentre la cv Bianco piacentino ha presentato solo 25 fiori e 20 bulbilli. Dall'analisi delle medie del peso dei singoli bulbilli, emerge che il 'B. piacentino' presenta bulbilli di 139,2 mg, nettamente più grandi di quelli portati dall'infiorescenza dell'aglio 'R. di Sulmona' con peso di 13,7 mg ciascuno (Fig. 9).

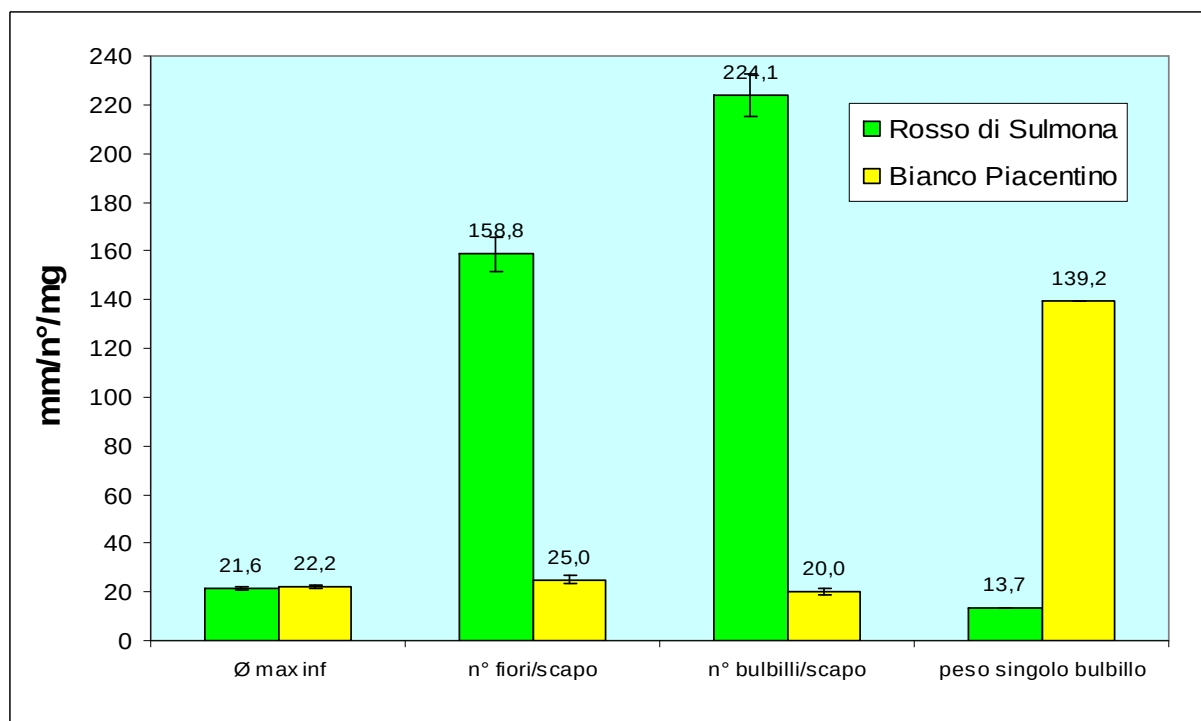


Fig. 9 - Diametro massimo dell'infiorescenza alla completa maturazione, numero di fiori e bulbilli per scapo, peso del singolo bulbillo, in Rosso di Sulmona e Bianco piacentino.

I risultati ottenuti dalla prova di germinazione dei bulbilli, mostrano come i bulbilli appartenenti alla cv B. piacentino abbiano avuto una germinazione pari all'88%, significativamente superiore alla germinazione riscontrata sui bulbilli della cv R. di Sulmona pari al 74%, evidenziando però una certa scalarità nella germinazione e nell'emergenza delle giovani piantine (Fig. 10).

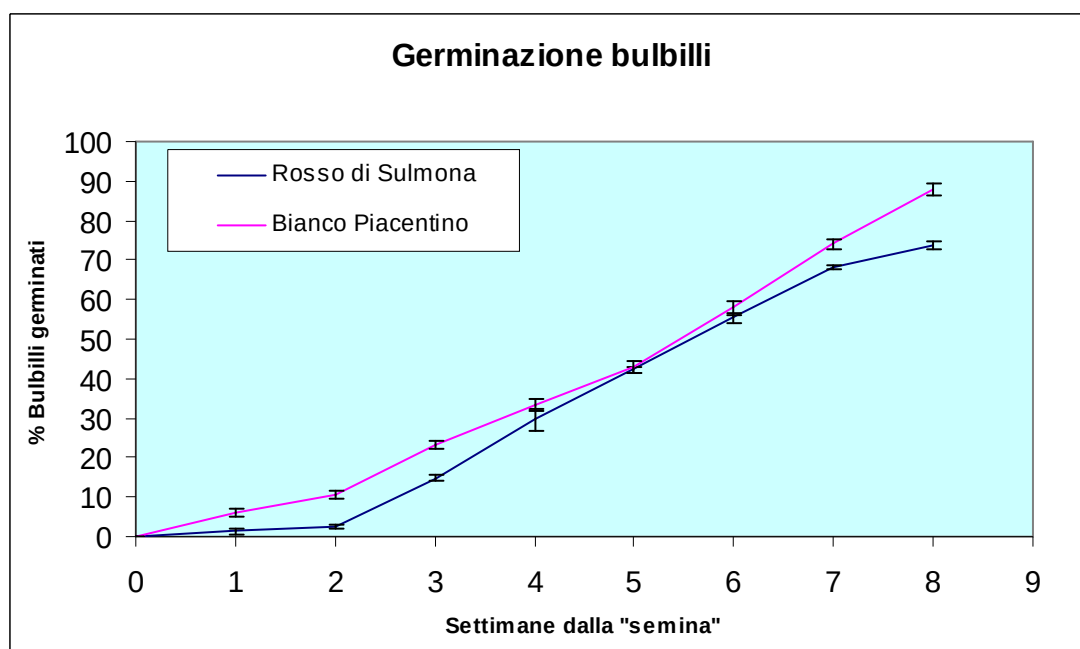


Fig. 10 - % di germinazione in bulbilli in Rosso di Sulmona e Bianco piacentino.

2.3.2 Caratterizzazione dello sviluppo maschile in fiori di aglio mediante preparati istantanei

Tutti i fiori impiegati negli studi relativi alla morfologia fiorale derivano dalle due cultivar di aglio nazionale: ‘R. di Sulmona’ e ‘B. piacentino’, e sono stati confrontati con fiori provenienti da aglio spontaneo (*Allium ampeloprasum* L.). Dai 50 scapi fiorali, prelevati ad intervalli settimanali dalle 2 cultivar sopra citate e dall’aglio spontaneo fissati e conservati in etanolo, sono stati studiati 145 fiori, i quali sono stati calibrati sulla base del diametro polare ed equatoriale. Per ogni fiore è stato fatto uno studio sullo stadio del polline in relazione alla sporogenesi maschile. I fiori sono stati aperti, le antere sono state prelevate, schiacciate, e tutto il materiale fuoriuscito è stato disposto su vetrino, colorato con una goccia di blu di anilina, ed osservato al microscopio ottico in luce fluorescente, per determinare il deposito di callosio caratteristico del polline in meiosi (Fig. 11).

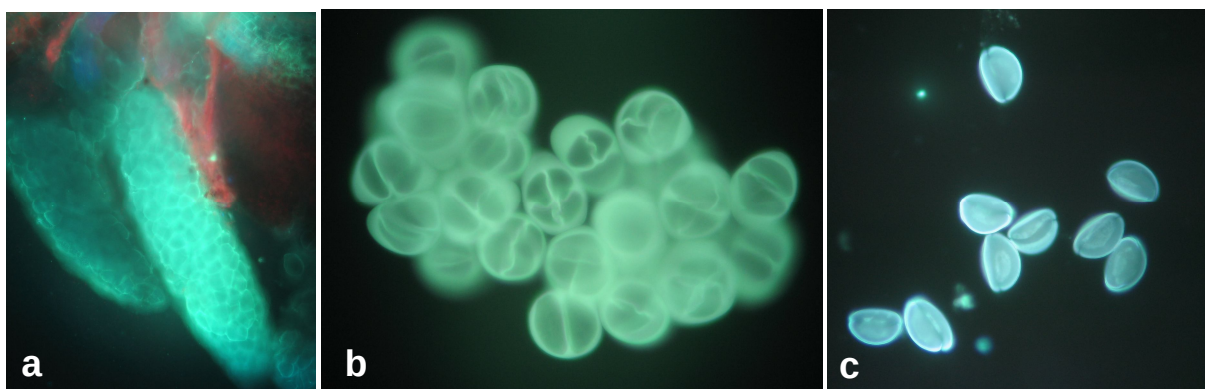


Fig. 11 - Stadi di sviluppo maschile (microsporogenesi e micro gametogenesi) in fiori di aglio, mediante colorazione con blu di anilina. a) stadio di pre-meiosi con cellule madri del polline (PMC) caratterizzate da deposito di callosio, b) cellule madri del polline (PMP) in divisione con deposito di callosio a livello dei setti di divisione, con formazione di diadi e tetradi, c) stadio di post-meiosi con granuli pollinici maturi privi di fluorescenza.

Quando le cellule madri del polline (*pollen mother cells*, PMC) presentavano un aspetto ammassato e un elevato deposito di callosio, i fiori sono stati classificati nello stadio di pre-meiosi (Fig. 11a). Quando invece le PMC hanno iniziato a dividersi e il callosio si è depositato a livello dei setti di divisione cellulare (formazione di diadi e tetradi), i fiori sono stati classificati in divisione meiotica (Fig. 11b). Infine quando sono state osservate microspore isolate e prive di callosio, i fiori sono stati classificati nello stadio di post-meiosi (Fig. 11c); in questo stadio il polline ha assunto una forma di tipo lentiforme.

Questo studio sullo sviluppo del polline ha permesso di determinare una stadizzazione, relativa alla microsporogenesi e microgametogenesi in fiori di aglio ‘R. di Sulmona’, ‘B. piacentino’ e di aglio spontaneo. Ciò ha messo in evidenza una correlazione tra lo stadio di sviluppo del polline e il diametro polare dei fiori, mentre non c’è alcuna correlazione tra gli stadi di sviluppo e il diametro equatoriale degli stessi. Le antere dei 145 fiori collezionati sono state osservate al microscopio a fluorescenza per le osservazioni sul polline, per classificare a seconda del deposito di callosio, il fiore in uno dei tre stadi di sviluppo del polline (Fig. 12). Da tali osservazioni emerge che, per entrambe le cultivar di aglio e per l’aglio spontaneo si è avuto un andamento di accrescimento differente; infatti l’aglio spontaneo in tutti e tre gli stadi (pre-meiosi, divisione e post-meiosi), risultava avere fiori con un diametro medio polare maggiore rispetto all’accrescimento delle altre due cultivar studiate. Dal confronto di questi diametri medi si può determinare che la divisione meiotica nella cv R. di Sulmona è presente

in fiori con un diametro medio di 2,09 mm; nella cv B. piacentino è presente in fiori con diametro di 3,12 mm, mentre nell'aglio spontaneo in fiori con diametro di 4,07 mm. I fiori di 'B. piacentino' in post-meiosi hanno mostrato una diminuzione nelle dimensioni a differenza delle altre due accessioni (Fig. 12).

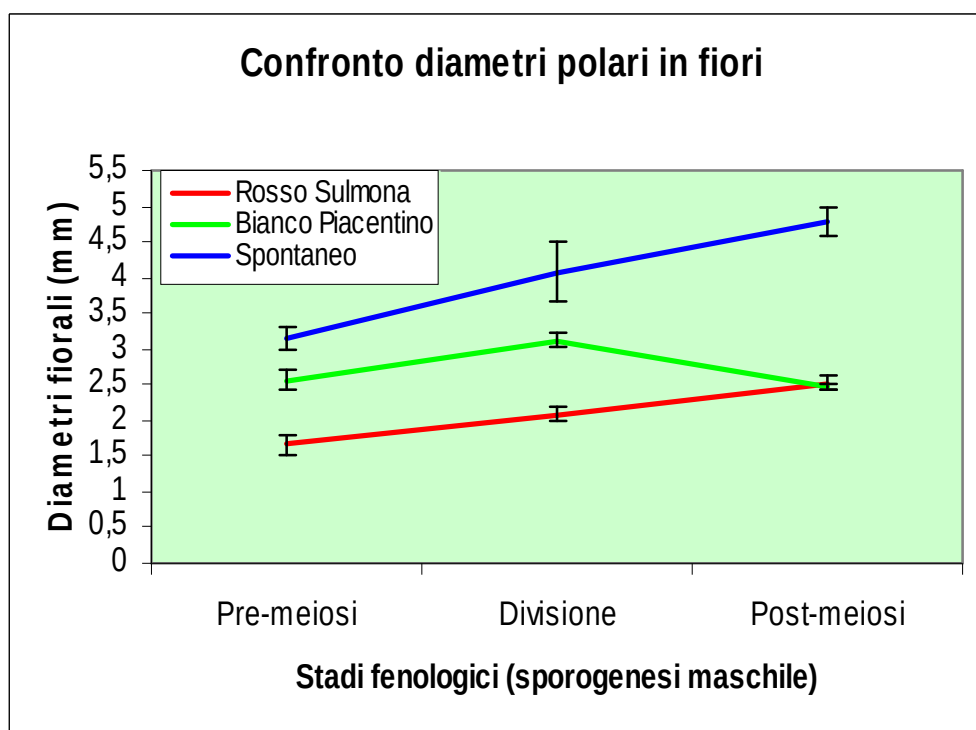


Fig. 12 - Diametri dei fiori inclusi in paraffina.

Durante le osservazioni della divisione, sono state riscontrate frequentemente alterazioni del processo meiotico come asincronia nelle divisioni (es. presenza contemporanea di tetradi e diadi, (Fig.13a) triadi (Fig. 13b), tetradi con i setti più o meno degenerati (Fig. 13c) ed altri prodotti meiotici di chiara natura aberrante (Fig. 13d).

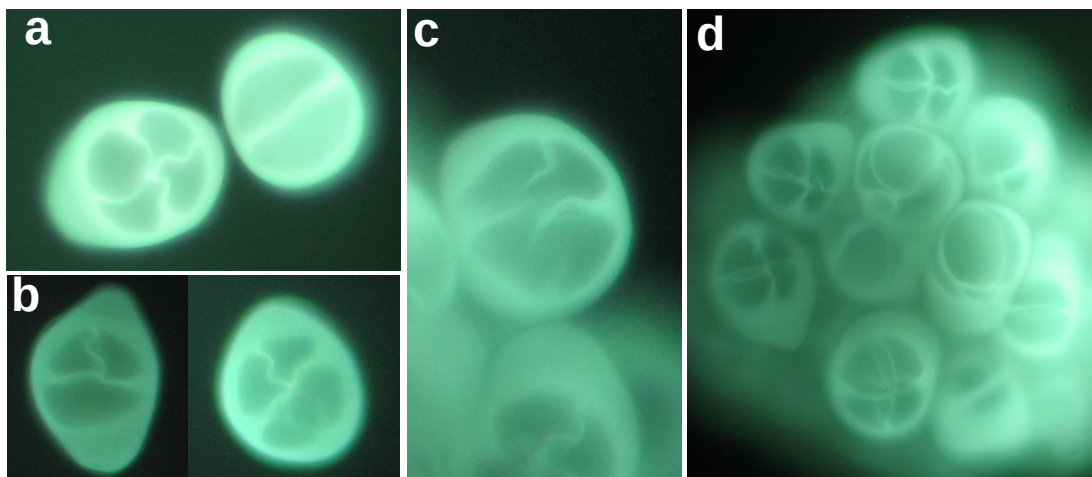


Fig. 13 – Anomalie meiotiche riscontrate in aglio della cultivar Rosso di Sulmona. a) tetrade morfologicamente normale (sinistra) e diade; b) triadi; c) tetrade con setti degenerati; d) tetradi apparentemente normali mescolate a prodotti meiotici visibilmente aberranti.

Dalle osservazioni effettuate al microscopio, è stato osservato che nelle due cv R. di Sulmona e B. piacentino, i granuli pollinici, nello stadio di post-meiosi, presentavano in tutti i casi delle anomalie. Infatti, i granuli pollinici hanno sempre presentato un aspetto lentiforme con fluorescenza prevalentemente assente o comunque debole, distribuita in modo più o meno uniforme su tutta la superficie del granulo. In entrambe le cultivar, il granulo pollinico non ha mai presentato deposito di callosio a livello dei pori germinativi (Fig. 14a). I Granuli pollinici in aglio spontaneo (*Allium ampeloprasum* L.) specie sessualmente fertile (Pignatti, 1982) hanno invece presentato un aspetto turgido e tondeggiante, con deposito di callosio e quindi fluorescenza soltanto a livello dei pori (Fig. 14b).

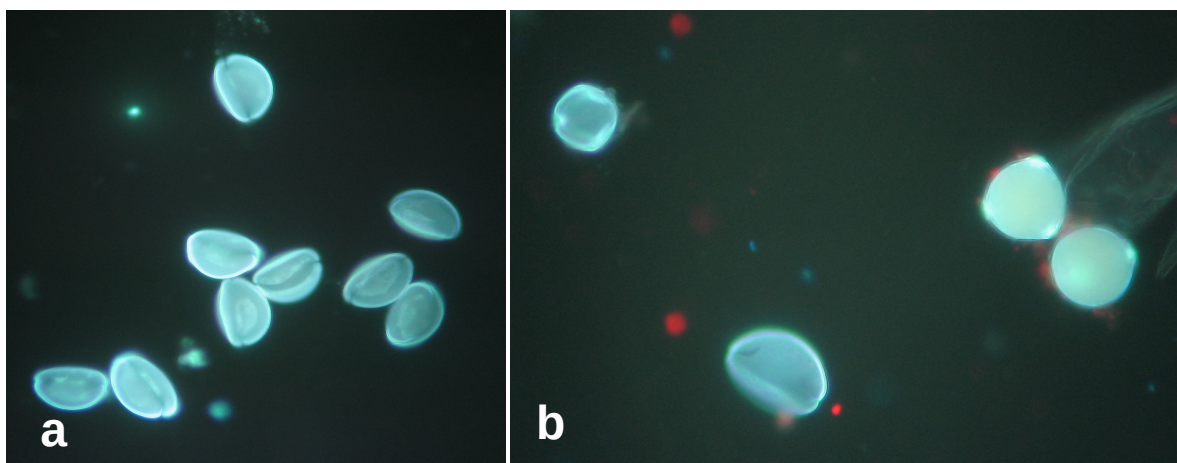


Fig. 14 - Polline allo stadio di post-meiosi in fiori di aglio, osservati mediante colorazione con blu di anilina. a) polline in post-meiosi in fiori di aglio della cultivar Rosso di Sulmona, b) polline in post-meiosi in aglio spontaneo (*Allium amperoprasum* L.), in cui si nota fluorescenza a livello dei pori germinativi.

Da queste osservazioni è emerso che probabilmente soltanto il granulo pollinico di aglio selvatico è vitale e, quindi, in grado di fecondare, rispetto ai granuli pollinici delle altre due cultivar: ciò potrebbe contribuire a spiegare la sterilità della cv R. di Sulmona e B. piacentino.

2.3.3 Caratterizzazione dello sviluppo riproduttivo in aglio mediante sezioni istologiche

Per approfondire lo studio delle cause della sterilità dell'aglio coltivato, è stata fatta una osservazione sulla morfologia dei tessuti, relativi agli organi fiorali responsabili della sporogenesi e gametogenesi maschile e femminile. Per questo sono stati inclusi in paraffina fiori con diametro polare tra 1,8-2,5 mm, per osservare gli stadi di sviluppo precedenti allo stadio di maturazione del polline. I fiori utilizzati per questa osservazione provengono dalla sola cv R. di Sulmona, che presenta, come riportato in (Fig. 12), lo stadio di divisione e post-meiosi in fiori con diametri polari compresi nell'intervallo studiato. I fiori una volta inclusi in paraffina sono stati sezionati al microtomo, e le sezioni depositate su vetrini polilisinati, disidratate e colorate una parte con blu di toluidina e la rimanente parte con blu di anilina, per osservare rispettivamente i tessuti relativi alle antere e agli ovari, e la fluorescenza tipica del

deposito di callosio durante la sporogenesi.

Per quanto riguarda la morfologia fiorale generale (Fig. 15), si è notata una perdita della funzionalità tipica del fiore, con forme più o meno marcate di degenerazione a livello degli ovuli, delle antere e del polline.

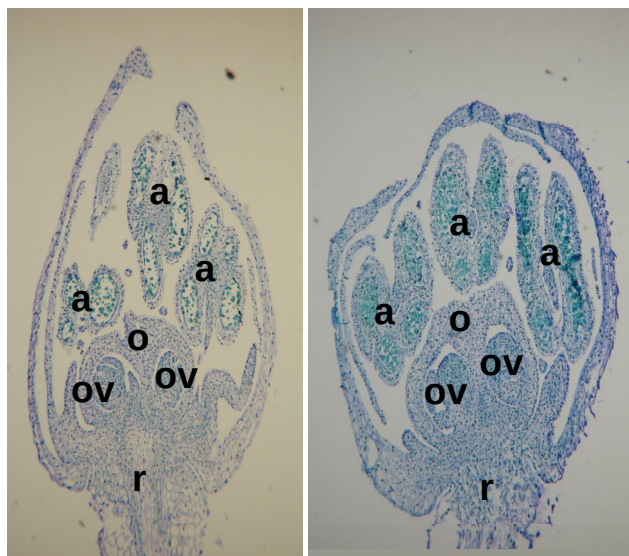


Fig. 15 – Sezioni longitudinali di fiori di aglio Rosso di Sulmona, colorate con blu di toluidina. r, ricettacolo; o, ovario; ov, ovuli; a, antere.

Il polline all'interno delle sacche polliniche si presenta degenerato (non vitale) (Fig. 16a); si osservano anomalie a livello dei granuli pollinici (Fig. 16b), una marcata degenerazione anche a livello delle cellule del tappeto (Fig. 16c). Tali alterazioni, hanno confermato le osservazioni riportate in precedenza tramite colorazione con blu di anilina. La fluorescenza da callosio rilevata in corrispondenza dei vasi sulle sezioni, ha confermato uno stato degenerativo globale dell'antera (Fig. 17 a,b,c).

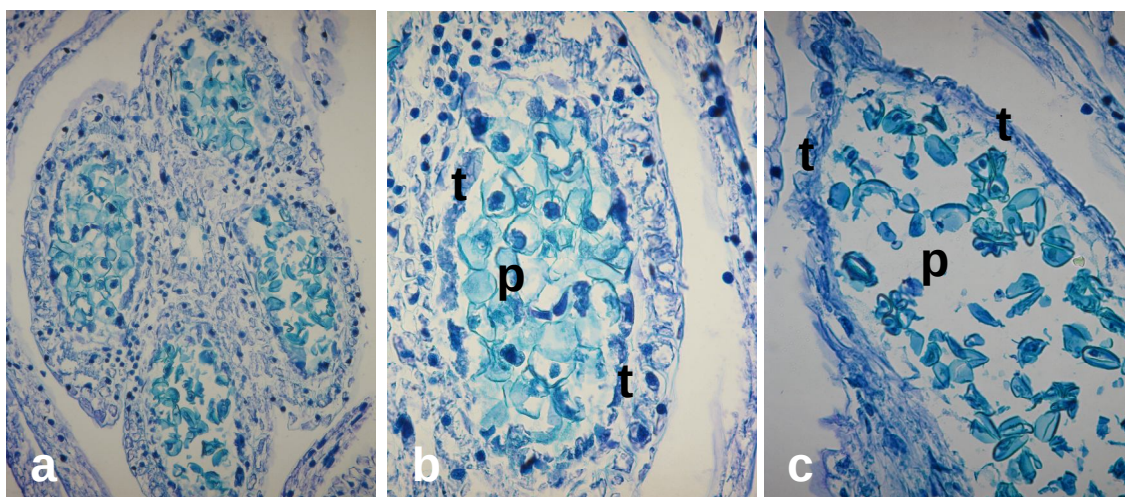


Fig. 16 – Sezioni di antere con sacche polliniche in fiori di aglio colorati con blu di anilina. a) sacche polliniche contenenti polline (p) non vitale, b) granuli pollinici (p) totalmente degenerati, c) marcata degenerazione a livello delle cellule del tappeto (t).

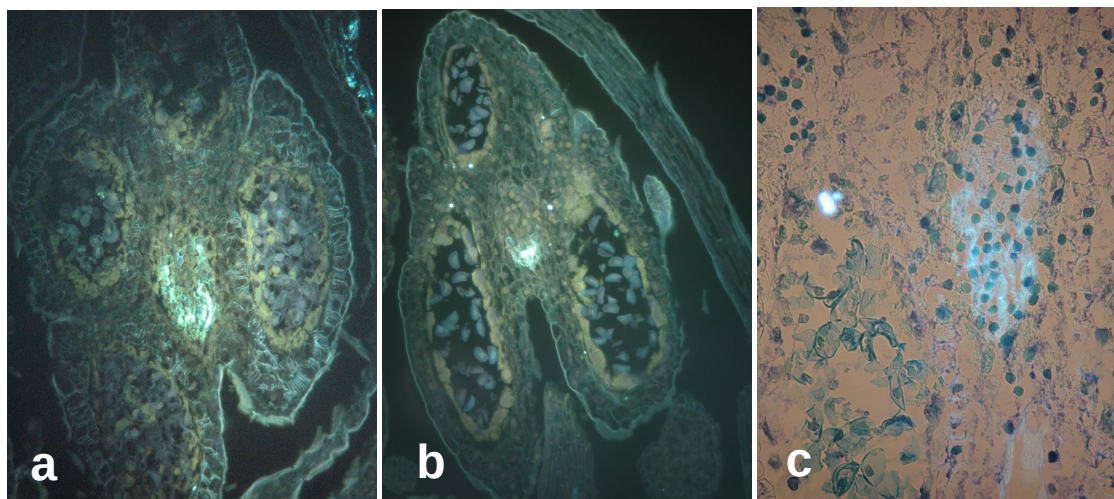


Fig. 17 – Sezione di antere con sacche polliniche colorate con blu di anilina. a,b,) polline e cellule del tappeto altamente degenerate, c) particolare della fluorescenza a livello del tessuto vascolare dovuta al deposito di callosio.

Per quanto riguarda il deposito di callosio trovato a livello delle cellule del tappeto, questo risulta essere ancora più anomalo, evidenziando una sorta di ipertrofia (Fig. 18).

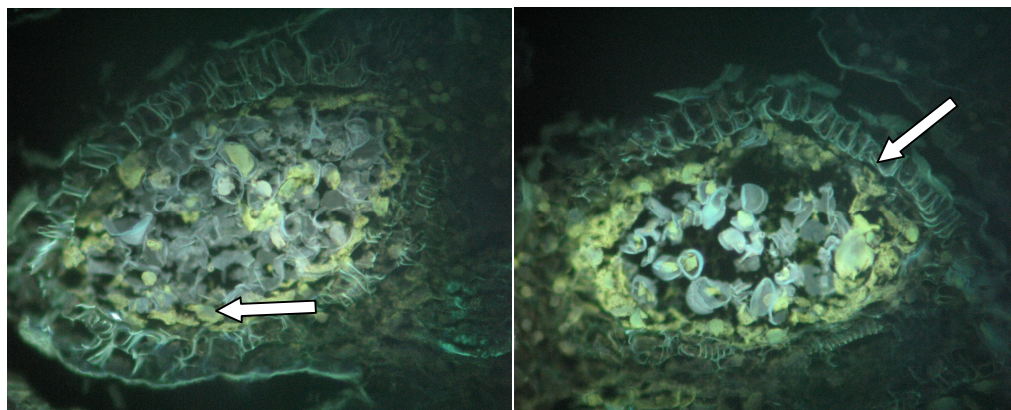


Fig. 18 – Sezione di antere con sacche polliniche colorate con blu di anilina. Deposito di callosio a livello delle cellule del tappeto (freccia) e polline maturo degenerato, trasparente e non turgido.

Prendendo in esame la parte riproduttiva femminile degli organi fiorali, l'ovario presenta ovuli apparentemente regolari, (Fig. 19 a,c), e cellule madri delle megaspore differenziate normalmente (Fig. 19 b,d).

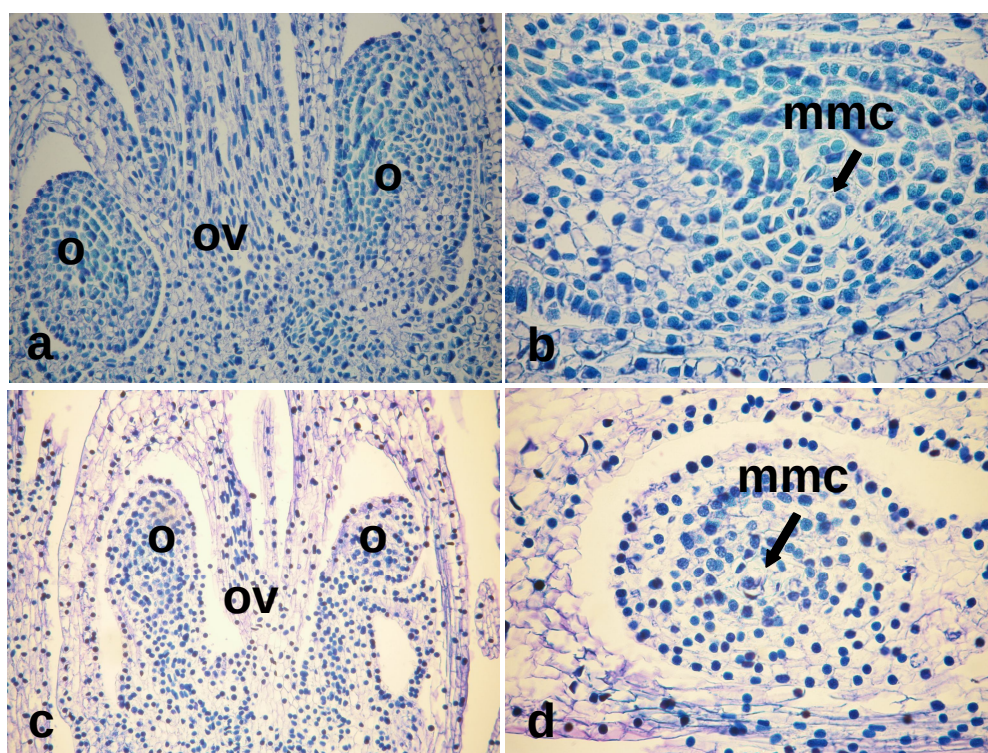


Fig. 19 – Sezioni di ovario in fiori di aglio colorati con blu di toluidina. a,c) ovario (ov) con ovuli (o) apparentemente regolari, b,d) ovuli (ov) con cellule madri delle megaspore (mmc) sviluppate normalmente.

Da queste osservazioni a livello degli ovuli, emerge anche un deposito di callosio distribuito in modo irregolare e puntiforme segno apparente di degenerazione, mentre invece in alcuni casi lo stesso è presente intorno alle cellule madri delle megaspore, facendo pensare a una meiosi regolare (Fig. 20 a,b).

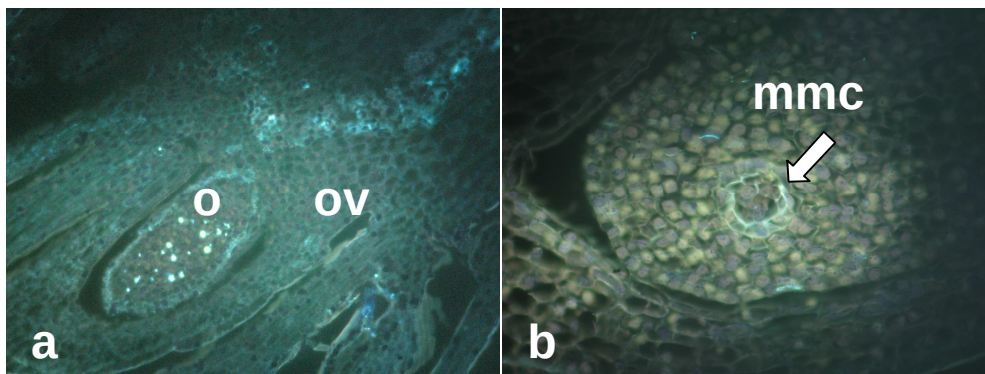


Fig. 20 – Sezioni di ovario (ov) con ovuli colorati con blu di anilina. a) deposito puntiforme di callosio all'interno dell'ovulo (o), b) particolare di ovulo (o) con deposito di callosio intorno alle cellule madri delle megaspore (mmc).

Le osservazioni istologiche del fiore hanno inoltre messo in evidenza la presenza di un anomalo deposito di callosio anche a livello del ricettacolo, che fa pensare ad una possibile degenerazione della struttura fiorale (Fig. 21).

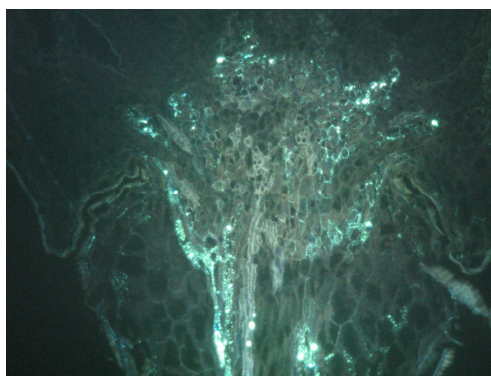


Fig. 21 – Sezione di fiori di aglio colorata con blu di anilina. Anomalo deposito puntiforme di callosio a livello del ricettacolo.

Osservando le sezioni del ricettacolo, emergono anche a livello di questo tessuto anomale strutture vegetative, che fanno pensare ad eventi di gemmazione avventizia (Fig. 22 a,b).

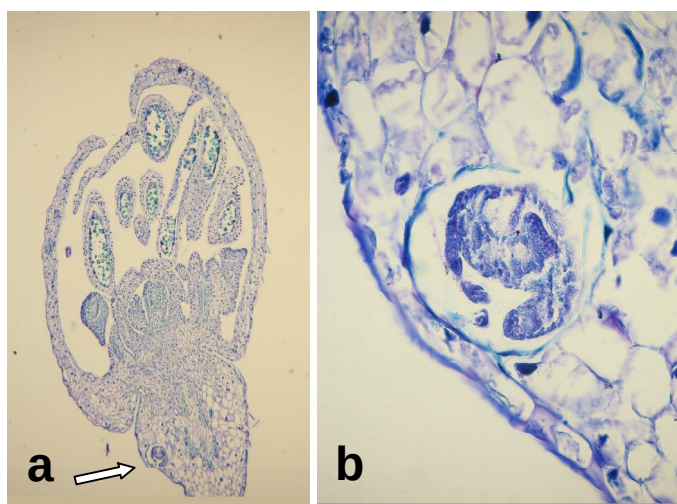


Fig. 22 – Sezioni di fiore di aglio colorati con blu di anilina. a) struttura vegetativa anomala a livello del ricettacolo (vedi freccia), b) particolare della struttura vegetativa.

2.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le osservazioni eseguite sulla biologia fiorale delle due cultivar di aglio studiate, Rosso di Sulmona e Bianco piacentino, hanno permesso di rilevare diverse differenze morfo-fisiologiche, di possibile interesse per la caratterizzazione varietale, ed alcune informazioni di interesse scientifico al fine di comprendere la presenza della sterilità nelle forme coltivate di questa specie.

Morfologicamente, l'apparato riproduttivo si differenzia tra le due cultivar per le modalità di inserzione della spata sullo stelo, per la diversa lunghezza dello stelo (ma non dell'infiorescenza propriamente) e per il diametro dello scapo fiorale.

Le due cultivar hanno anche differenze sulla risposta ai fattori che stimolano la fioritura, in quanto lo scapo fiorale è emesso raramente e solo da alcune cultivar. Le cultivar che hanno la tendenza a produrre lo scapo fiorale sono quelle appartenenti alla tipologia "aglio rosso", mentre la tendenza a produrre lo scapo è pressoché assente nella tipologia "aglio bianco" (Tesi, 1994). Tutto questo è stato confermato anche da questa sperimentazione, in quanto lo scapo fiorale è stato prodotto dal 100% delle piante appartenenti alla cv R. di Sulmona, mentre solo alcuni sporadici scapi fiorali sono stati prodotti dalle piante di aglio appartenenti alla cv B. piacentino. Questa sporadica presenza di scapi fiorali sulla cv B. piacentino, potrebbe essere dovuta al particolare andamento termo-pluviometrico riscontrato nell'anno 2007.

Differenze macroscopiche sono anche state riscontrate sul numero di fiori e di bulbilli portati da una singola infiorescenza, il numero di fiori e di bulbilli è stato inversamente proporzionale alle dimensioni del bulbillo, verosimilmente in relazione al fatto che le due tipologie di pianta hanno la stessa sorgente, che si può riversare in un'infiorescenza composta da molti elementi ma piccoli, oppure, da pochi ma grandi (fiori o bulbilli).

Le analisi effettuate sui fiori hanno messo in evidenza che lo sviluppo fiorale iniziale in aglio è normale e che si differenziano normalmente gli organi maschili e femminili. I primi segni di sviluppo anomalo comunque sono presenti sin dallo svolgimento della microsporogenesi, in quanto in un gran numero di tetradi si notano i segni di anomalie meiotiche, come asincronia e formazione di triadi o tetradi irregolari. Le irregolarità meiotiche, unite ad una degenerazione generale della struttura dell'antera che avviene durante la gametogenesi, comportano

l'assenza di polline vitale in fiori che comunque appaiono avere uno sviluppo interrotto prima della maturità.

Le analisi eseguite non consentono di dire se le anomalie della meiosi avvengono e con uguale frequenza nella parte femminile del fiore; tuttavia il ritrovamento di callosio a livello ovulare e ovarico, nonché nel ricettacolo, indica che tutti i tessuti del fiore e non solo le antere, vanno incontro ad una degenerazione post-meiotica che determina la completa sterilità della pianta.

In virtù dell'interesse di recuperare un benché minimo livello di capacità sessuale in aglio, è necessario studiare meglio come gli stimoli ambientali e/o ormonali e/o agronomici siano in grado di modificare questo scenario nelle due cultivar di aglio studiate. Molti di questi stimoli influenzano la morfologia e lo sviluppo dell'aglio, come la dimensione e il numero di bulbetti per bulbo, la dimensione e il numero delle foglie, la dormienza e la fioritura (Takagi, 1990; Pooler and Simon, 1993b).

Il ritrovamento a livello del ricettacolo di strutture di tipo meristematico incapsulate in una specie di alveolo e il fatto che il ricettacolo acquisisca una conformazione simile a un bulbillo, fa ipotizzare che l'ontogenesi del bulbillo sia dovuta proprio alla differenziazione di queste strutture. Una differenziazione precoce potrebbe determinare l'incanalamento del programma di sviluppo verso la formazione del bulbillo, mentre una differenziazione tardiva consentirebbe lo sviluppo di un fiore che comunque non ha la possibilità di conseguire la maturità. Se questa ipotesi trovasse conferma, l'aglio acquisirebbe un forte interesse come sistema sperimentale per studiare i meccanismi che regolano la persistenza del processo sessuale di riproduzione o l'accensione di percorsi alternativi correlati alla propagazione vegetativa.

CAPITOLO 3

**Aspetti agronomici, morfologici e caratterizzazione
molecolare di cultivar ed ecotipi di aglio.**

3.1 PREMESSA ED OBIETTIVI DEL LAVORO

Nell'era della globalizzazione anche in agricoltura si assiste ad una omologazione delle produzioni e ad una costante perdita della biodiversità.

Il nostro Paese, come altri, per rispondere alla concorrenza estera, cerca di puntare all'eccellenza fornendo dei prodotti di alta qualità e valorizzando la tipicità di questi. Proteggere le varietà locali è fondamentale non solo per la tutela della biodiversità vegetale ma anche per la valenza storico-culturale di queste, per questi ed altri motivi e per il rilancio della coltivazione dell'aglio in Italia, constatata la carenza di informazioni bibliografiche di recente pubblicazione sono state avviate delle prove agronomiche volte a definire un itinerario tecnico adeguato ai mezzi tecnici oggi a disposizione dagli agricoltori.

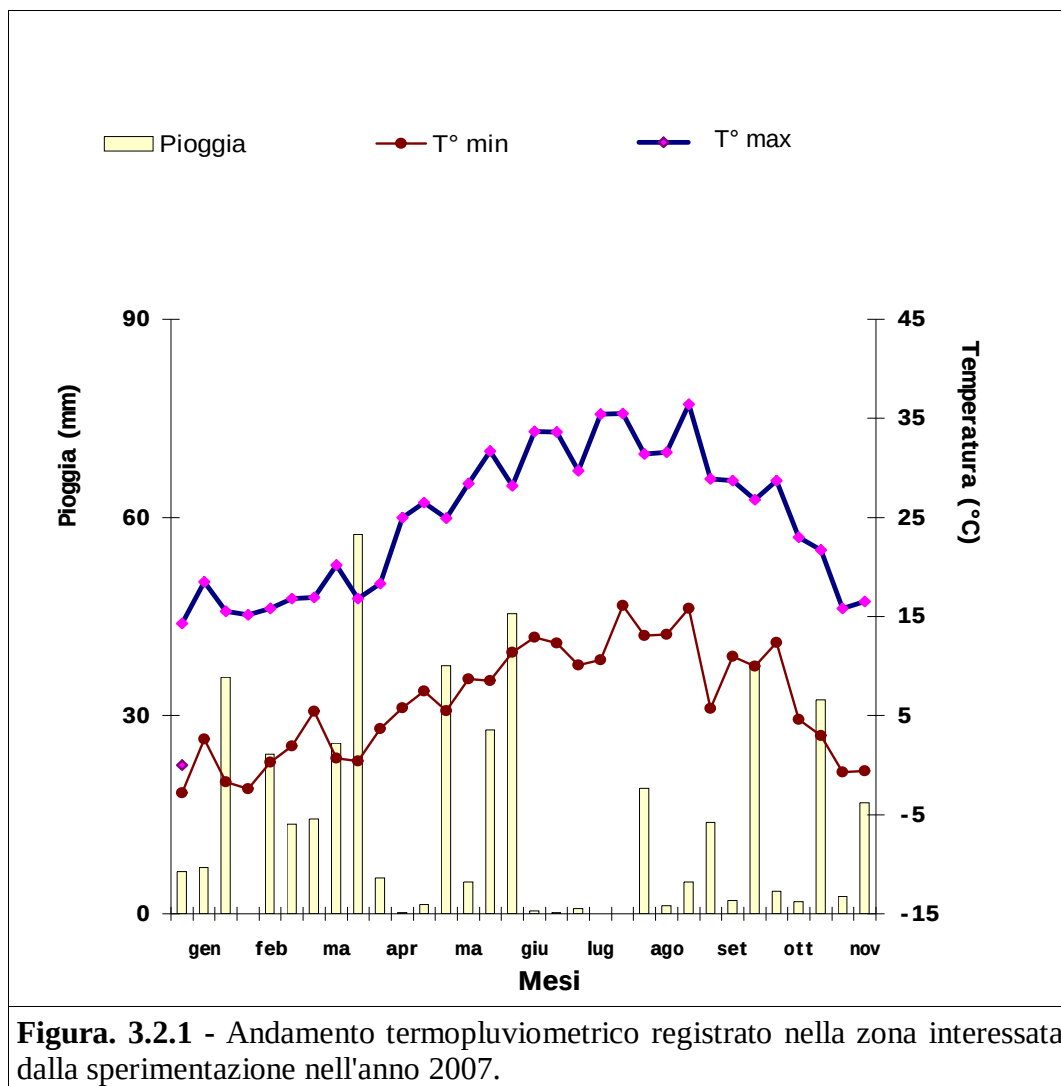
Sulla base delle considerazioni sopra esposte nel triennio 2006-2008, sono state condotte quattro sperimentazioni i cui obiettivi sono stati rispettivamente quelli di:

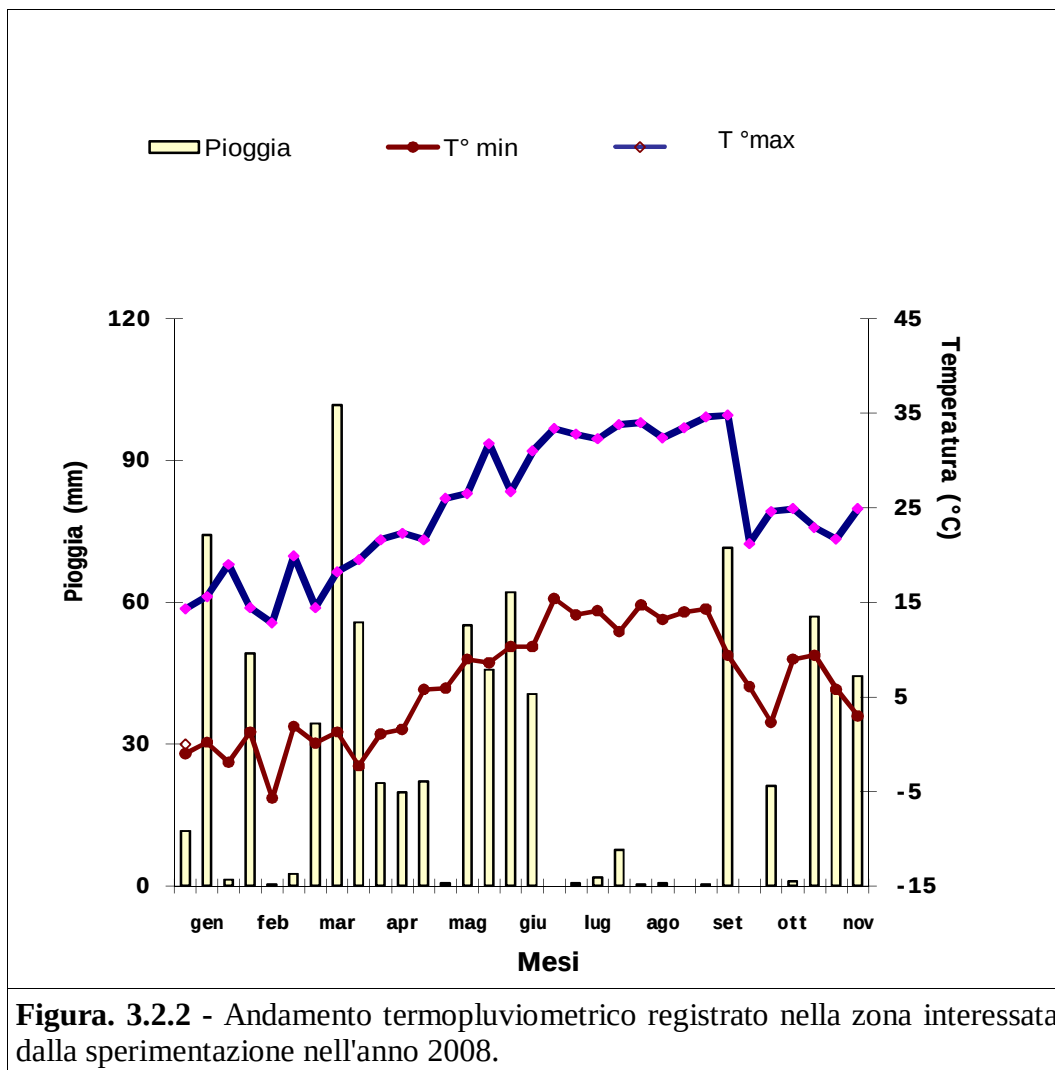
- caratterizzare sotto il profilo agronomico, morfologico, merceologico e molecolare quattro cultivar di aglio, di cui due di rilevanza nazionale (Bianco piacentino e Rosso di Sulmona) e due di importanza locale (Rosso di Castelliri e Rosso di Proceno):
- determinare le asportazioni totali dei nutrienti e i relativi ritmi di assorbimento durante l'intero ciclo colturale di due cultivar di aglio 'B. Piacentino' e 'R. di Sulmona' al fine di definire un adeguato piano di concimazione:
- individuare la migliore epoca di impianto della coltura, studiando il comportamento vegeto-produttivo di due cultivar di aglio nazionali 'B. Piacentino' e 'R. di Sulmona' seminate in differenti epoche;
- studiare l'effetto della densità colturale sulla qualità del prodotto edule e la performance produttiva in aglio 'B. Piacentino' e 'R. di Sulmona'.

3.2 MATERIALI E METODI

Le prove sono state condotte nelle annate agrarie 2006/2007 e 2007/2008 presso l'azienda didattico-sperimentale “Nello Lupori” dell'Università degli Studi della Tuscia.

L'andamento termopluviometrico verificatosi nel corso delle prove è riportato nelle figure 3.2.1 e 3.2.2 utilizzando i dati registrati da una capannina meteorologica posta all'interno della stessa azienda.





Dall'analisi dell'andamento delle temperature e delle precipitazioni, si osserva che il decorso stagionale differisce notevolmente tra le due annate; infatti, l'anno 2007 rispetto al successivo è caratterizzato da una minore piovosità e da più alti picchi delle temperature massime. Il terreno che ha ospitato le prove è classificato, secondo il “Triangolo della tessitura” (ISS), in sabbioso-limoso (tabella. 3.2.1).

Tabella. 3.2.1 – Caratteristiche fisico-chimiche del terreno che ha ospitato la prova.		
Parametro	Unità di misura	Valore
Sabbia	% del p.s. del terreno	65
Limo	% del p.s. del terreno	23
Argilla	% del p.s. del terreno	12
pH	1:2,5 in acqua	6,6
N totale	% del p.s. del terreno	0,09
P scambiabile	ppm, metodo Olsen	33
K scambiabile	ppm, metodo Intern	421
CaCO ₃	% del p.s. del terreno	5,1

Fonte: Paolini et al., 2004.

Itinerario tecnico

La preparazione del letto di semina nei due anni di sperimentazione è iniziata, per tutte le prove agronomiche, con un'aratura del terreno profonda circa 30 cm, seguita da un passaggio con erpice a dischi. La realizzazione dei solchi per l'impianto è stata svolta manualmente con l'aiuto di zappe e la profondità del solco è stata di circa 10 cm.

Il materiale di propagazione, impiegato per le prove, è stato reperito presso da alcune cooperative agricole locali.

Al momento dell'impianto è stata effettuata in entrambi gli anni di sperimentazione una concimazione di base che ha previsto la distribuzione di 0,6 t ha⁻¹ di un fertilizzante minerale (titolo 11:22:16), per un apporto complessivo di 66 kg ha⁻¹ di N, 132 kg ha⁻¹ di P₂O₅ e 96 kg ha⁻¹ di K₂O. Le esigenze idriche della coltura sono state soddisfatte dalle sole precipitazioni atmosferiche.

Nel 2006/2007 il contenimento delle infestanti è avvenuto durante l'intero ciclo colturale mediante scerbatura manuale. Nell'annata agraria 2007/2008 invece, è stato effettuato chimicamente, subito dopo l'impianto della coltura, un trattamento erbicida distribuendo un antigerminello (p.a. Pendimetalin); successivamente è stato necessario intervenire con scerbatura manuale.

L'emissione dello scapo florale è avvenuta soltanto nelle cultivar di "aglio rosso" 'R. di Sulmona', 'R. di Castelliri' e 'R. di Proceno' l'eliminazione dello scapo florale, operazione necessaria per favorire l'accrescimento del bulbo, è avvenuta manualmente a partire dal 16 maggio nel 2007 e dal 28 maggio nel 2008. Tale operazione, definita "starlatura" o "scapatura", è stata eseguita scalarmente ed è durata in entrambi gli anni circa 7 giorni.

La raccolta è stata effettuata estirpando manualmente le piante, ed è avvenuta il 5 luglio nel 2007 e il 12 luglio nel 2008.

Le piante estirpate, riunite in mazzi di circa 50 piante sono state lasciate in entrambi gli anni in campo ad asciugare per circa 5 giorni. Trascorso tale periodo sono stati raccolti in sacchi e trasportati in magazzino, dove sono stati conservati per essere poi utilizzati per il rilievo dei dati previsti dalla sperimentazione.

Anno 2007

La sperimentazione ha previsto tre prove:

- *caratterizzare quattro cultivar di aglio sotto il profilo agronomico e morfologico*, di cui uno appartenente alla tipologia "aglio bianco" 'B. piacentino' e tre appartenenti alla tipologia "aglio rosso" 'R. di Sulmona', 'R. di Castelliri' e 'R. di Proceno';
- *valutare delle asportazioni totali dei nutrienti e relativo ritmo di assorbimento*;
- *definire l'epoca ottimale di impianto*.

Prova confronto varietale

L'impianto è stato eseguito manualmente il 6 dicembre (2006); l'emergenza è iniziata il 7 gennaio; l'emissione dello scapo florale, per le tipologie con tale attitudine, è iniziata il 16 maggio e la raccolta è stata eseguita il 5 luglio 2007.

Il campo sperimentale era composto da 16 parcelle elementari delle dimensioni di 5,40 m² (2,70 m x 2,00 m) ottenute disponendo le quattro cv B. piacentino, R. di Sulmona, R. di Proceno e R. di Castelliri, secondo lo schema sperimentale a blocco randomizzato con quattro repliche (figura. 3.2.3). L'area di saggio, su cui sono stati prelevati i campioni da analizzare ed effettuati i rilievi di campo, presentava una superficie di 1,35 m². È stata adottata una densità colturale di 22,22 piante m⁻², ottenuta disponendo i bulbi all'impianto alla distanza di 10 cm lungo la fila e 45 cm tra le file.

Per caratterizzare morfologicamente le cultivar, nel periodo di massimo sviluppo vegetativo della coltura (16 giugno) sono stati effettuati dei rilievi riguardanti: il numero di foglie per

pianta, la lunghezza dello “stelo” e il diametro al colletto. Tali parametri sono stati misurati direttamente in campo su un campione di 10 piante per ciascuna parcella elementare, per un totale di 40 piante per cultivar.

Alla raccolta sono stati rilevati, sulle piante prelevate dall'area di saggio (30 piante a parcella, per un totale di 120 piante valutate per cultivar), i seguenti dati: peso fresco e secco della parte aerea, peso fresco del bulbo “tolettato”, diametro equatoriale e polare dei bulbi, peso fresco e secco delle tuniche esterne del bulbo e del girello, numero dei bulbetti a bulbo, peso fresco e secco delle tuniche dei bulbetti e della “polpa” degli stessi. L’essiccamento dei campioni è avvenuto in stufa a ventilazione forzata (figura. 3.2.4), mantenendo la temperatura a 70 °C (± 1 °C), sino al raggiungimento del peso costante (mediamente 72 ore).



Fig. 3.2.4 - Essiccamento dei campioni in stufa.

Successivamente i dati rilevati sono stati sottoposti all’analisi della varianza, impiegando il programma di statistica SPSS, per i seguenti caratteri: caratteristiche morfologiche dei bulbi, produttività delle cultivar e percentuale di sostanza fresca e secca del prodotto commerciabile.



Fig. 3.2.3 - Prova confronto varietale. Panoramica del campo sperimentale.

Prova asportazioni

La prova di asportazioni prevedeva due tesi principali rappresentate dalle cv B. piacentino e R. di Sulmona e 11 tesi secondarie relative ad altrettante date di rilevamento (6/12, 28/12, 18/01, 8/02, 1/03, 22/03, 12/04, 3/05, 24/05, 14/06 e 5/07). Tale prova è stata articolata in 88 parcelle elementari dalle dimensioni di $2,7 \text{ m}^2$ ($2,70 \text{ m} \times 1,00 \text{ m}$), disposte secondo lo schema sperimentale a “split-plot” con quattro repliche (figura. 3.2.5). E’ stata adottata, una densità colturale di $22,22 \text{ piante al m}^{-2}$, ottenuta disponendo i bulbi all'impianto alla distanza di 10 cm lungo la fila e 45 cm tra le file. Durante il ciclo colturale, a partire dall'impianto (6 dicembre) con cadenza di 21 giorni fino alla raccolta, sono stati effettuati 11 prelievi, ognuno dei quali prevedeva il campionamento di 12 piante per ripetizione.



Figura. 3.2.5 - Prova asportazioni. Parcelle sperimentali.

Ad ogni campionamento i parametri presi in esame sono variati in funzione della fase fenologica delle piante, e nel complesso hanno riguardato: peso fresco e secco delle tuniche esterne e della “polpa” dei bulbeti, peso fresco e secco dello “stelo”, delle radici, dello scapo fiorale, del girello e della parte basale dello scapo (figura. 3.2.6). Le suddette componenti sono state essiccate in una stufa a ventilazione forzata, mantenendo la temperatura a 70 °C (± 1 °C) sino al raggiungimento del peso costante (mediamente 72 ore). La sostanza secca è stata finemente macinata e quindi impiegata nelle analisi chimiche, svolte presso il Dipartimento di Biologia Vegetale delle Piante Agrarie della Facoltà di Agraria dell'Università di Pisa. Il contenuto in azoto dei campioni analizzati è stato determinato mediante metodo Kjeldhal, il contenuto in fosforo mediante metodo colorimetrico Morgan, il potassio mediante lettura fotometrica a fiamma, il calcio e il magnesio mediante titolazione con EDTA (acido etilendiamminicotretacetico).

I dati raccolti sono stati analizzati per determinare:

- l'evoluzione della sostanza fresca e secca della pianta intera durante il ciclo colturale;
- la quantità di nutrienti asportati complessivamente dalla coltura (N, P, K, Ca e Mg) e il ritmo di assorbimento degli stessi durante il ciclo colturale;

- la ripartizione percentuale della sostanza secca e degli elementi nelle componenti della pianta intera a fine ciclo colturale.



Figura. 3.2.6 - Campioni vegetali in fase di preparazione per le analisi chimiche.

Prova epoca di impianto

L'impianto è avvenuto manualmente in tre epoche, rispettivamente il 20 novembre (2006), il 20 dicembre (2006), e il 20 gennaio (2007). L'emergenza delle piante è iniziata 40 giorni dopo l'impianto per la prima epoca, per la seconda dopo 30 giorni e per la terza 15 giorni dopo l'impianto. L'emissione dello scapo florale per le tipologie con tale attitudine è avvenuta intorno al 16 maggio. La raccolta è stata effettuata manualmente ed è avvenuta il 5 luglio 2007 per tutte le tre epoche.

La sperimentazione è stata impostata secondo lo schema sperimentale a parcelle suddivise (split-plot) con quattro ripetizioni, dove le parcelle principali erano rappresentate da tre epoche di impianto e quelle secondarie da due cv 'B. piacentino' e 'R. di Sulmona'. Complessivamente la prova ha interessato 24 parcelle elementari. Le dimensioni delle singole parcelle elementari era di 5,40 m² (2,70 m x 2,00 m), e quella dell'area di saggio di 1,35 m². Per la prova è stata adottata una densità colturale di 22,22 piante m⁻², ottenuta disponendo i bulbi all'impianto alla distanza di 10 cm lungo la fila e 45 cm tra le file.

Per caratterizzare morfologicamente le cultivar, nel periodo di massimo sviluppo vegetativo della coltura (16 giugno) sono stati effettuati dei rilievi riguardanti il numero di foglie per pianta, la lunghezza del "stelo" e il diametro al colletto. Tali parametri sono stati misurati direttamente in campo su un campione di 10 piante per ciascuna parcella elementare, per un totale di 40 piante per cultivar.

Alla raccolta sono stati rilevati, sulle piante prelevate dall'area di saggio (30 piante a parcella, per un totale di 120 piante per cultivar) i seguenti parametri: peso fresco e secco della parte aerea, peso fresco del bulbo "tolettato", diametro equatoriale e polare dei bulbi, peso fresco e secco delle tuniche esterne del bulbo e del girello, numero dei bulbetti per ogni bulbo. Inoltre, sono stati anche rilevati: peso fresco e secco delle tuniche dei bulbetti e della "polpa" degli stessi. L'essiccamento dei campioni è avvenuta in stufa a ventilazione forzata mantenendo la temperatura a 70 °C (± 1 °C), sino al raggiungimento del peso costante (mediamente 72 ore). Successivamente tutti i dati rilevati sono stati sottoposti all'analisi della varianza, impiegando il programma di statistica SPSS, per i seguenti caratteri: produzione commerciabile delle cultivar e percentuale di sostanza fresca e secca del prodotto commerciabile.

Anno 2008

La sperimentazione ha previsto la ripetizione di due delle tre prove condotte nel 2007 e di una ulteriore prova agronomica per:

- *caratterizzare quattro cultivar di aglio sotto il profilo agronomico e morfologico;*
- *definire l'epoca ottimale di impianto;*
- *individuare la migliore densità colturale.*

Prova confronto varietale

La sperimentazione prevedeva il confronto dei quattro genotipi analizzati l'anno precedente ed inoltre l'analisi molecolare per stabilire la stabilità genetica e la vicinanza genetica dei suddetti genotipi.

Pertanto la sperimentazione è avvenuta sia in pieno campo (prova agronomica) che in laboratorio (analisi molecolare).

a) prova agronomica

L'impianto è stato effettuato il 20 dicembre 2007, l'emergenza delle piante è iniziata il 20 gennaio 2008, l'emissione dello scapo florale è iniziata il 26 maggio e la raccolta è stata effettuata il 12 luglio.

Il disegno sperimentale e la conduzione agronomica della prova è avvenuta con le stesse modalità di quelle dell'anno 2007.

Per valutare le caratteristiche morfologiche della parte aerea della pianta di ciascun ecotipo, nel periodo di massimo sviluppo vegetativo della coltura (22 giugno 2008) sono stati effettuati dei rilievi riguardanti: il numero di foglie verdi e secche per pianta, la lunghezza dello "stelo", il diametro al colletto, la lunghezza e larghezza delle singole foglie. Tali parametri sono stati misurati direttamente in campo su 10 piante di ogni parcella sperimentale per un totale di 40 piante per cultivar.

Alla raccolta sulle piante provenienti dall'area di saggio di ogni parcella (30 piante per un totale di 120 piante per cultivar) sono stati rilevati i seguenti dati: peso fresco e secco della parte aerea, peso fresco del bulbo tolettato, diametro equatoriale e polare dei bulbi, peso fresco e secco delle tuniche esterne del bulbo e del girello, numero dei bulbetti per bulbo, peso fresco e secco delle tuniche dei bulbetti e della "polpa" degli stessi.

Successivamente i dati rilevati sono stati sottoposti ad analisi statistica, per valutare le caratteristiche morfologiche dei bulbi, la produttività degli ecotipi e la percentuale di sostanza

fresca e secca del prodotto commerciabile.

b) analisi molecolare

Al momento della raccolta della prova confronto varietale, sono stati prelevati alcuni bulbi maturi e utilizzati in una prova di caratterizzazione molecolare: i bulbi scelti appartenevano ad una cultivar della tipologia “aglio bianco” ‘B. Piacentino’, e a tre cultivar appartenenti alla tipologia “aglio rosso” ‘R. di Sulmona’, ‘R. di Castelliri’ e ‘R. di Proceno’. Per questa prova sono stati impiegati 15 bulbi di aglio per ciascuna delle quattro cultivar testate, per un totale di 60 bulbi. Prima della “semina”, avvenuta il 15 ottobre 2008, i 60 bulbi in fase di dormienza sono stati conservati a 4 °C per 10 giorni, dopodichè da ciascuno bulbo è stato preso un bulbetto o “spicchio”, e “seminato” singolarmente in vasetti di plastica 11 x 11 x 12 cm, contenenti un substrato commerciale di coltivazione costituito da torba neutra di sfagno come ammendante organico naturale, caratterizzato da: 35 % carbonio organico di origine biologica (C) sulla sostanza secca, 0,8 % azoto organico (N), 85 % di sostanza organica e pH compreso tra 5,0 e 6,0. Terminata l’operazione di semina, i 60 vasetti sono stati collocati su bancale in una serra fredda. Per l’intero periodo di permanenza in serra, al substrato di coltivazione non è stato aggiunto alcun elemento fertilizzante, pertanto le piantine hanno beneficiato dei soli elementi minerali presenti naturalmente nel substrato. Il fabbisogno irriguo è stato soddisfatto mediante irrigazione manuale, eseguita in media una volta alla settimana. In queste condizioni, l’emergenza delle singole piantine è avvenuta con una certa regolarità dopo 15 giorni dalla semina; il campionamento è stato eseguito 45 giorni dalla semina, quando la coltura era allo stadio della terza foglia vera. Il campionamento ha interessato l’intera terza foglia vera, sia delle 15 piantine della sola cultivar della tipologia “aglio bianco, sia delle 45 piantine delle tre cultivar della tipologia “aglio rosso”.

Per l’estrazione del DNA genomico sono stati impiegati 300 mg di materiale fogliare, utilizzando il kit di estrazione GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx). Il DNA ottenuto è stato conseguentemente quantificato mediante lettura spettrofotometrica ed impiegato in reazioni di PCR (Polymerase Chain Reaction). Per l’analisi molecolare sono stati utilizzati primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (British Columbia University, Canada) con 2 nucleotidi degenerati ancorati in 3’ e marcati per il sequenziamento con fluorofori FAM o HEX.

Le reazioni di PCR sono state condotte in un volume totale di reazione di 10 µl contenenti 10 ng di DNA genomico, 0,6 µM di primer, 100 µM di ciascun deossinucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 0,5 unità di *Taq* DNA polimerasi. Le reazioni di amplificazione sono state

condotte in termociclatori Eppendorf secondo il seguente profilo termico: 2 minuti a 95 °C (fase di denaturazione iniziale); 1 minuto a 94 °C, 2 minuti alla temperatura di *annealing* specifica per ogni primers (tabella. 3.2.2) (fase di *annealing*), 2 minuti a 72 °C (fase di *extension*) per 40 cicli e una extension finale di 10 minuti a 72 °C. La visualizzazione degli amplificati marcati FAM o HEX, è stata effettuata mediante l'impiego di un sequenziatore Applied BioSystem 3730.

Tab. 3.2.2 – Primers ISSR e loro temperatura (T_m) di annealing. Y = Pirimidine		
Primer	Sequenze 3' → 5'	T _m (°C)
810	(GA) ₈ T	43
834	(GA) ₈ YT	45
841	(GA) ₈ YC	45

Per il sequenziamento è stata utilizzata un'aliquota di 2 µl della miscela di reazione di PCR, denaturata in presenza di formammide denaturante e di un marker di peso molecolare noto GeneScan 500 LIZ Size Standard. I frammenti sequenziati sono stati letti mediante il software GeneMapper ver. 3.7 (Applied BioSystem). L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata svolta mediante l'impiego del software GDA (Lewis and Zaikin, 2001).

Prova epoca di impianto

Nel 2008 è stata ripetuta anche la prova epoca di impianto, prevedendo ugualmente tre epoche di “semina” distanziate tra loro di circa un mese e mantenendo costante per ciascuna epoca la densità di investimento. L'impianto delle prime due epoche è avvenuto negli stessi giorni dell'anno precedente rispettivamente il 20 novembre e il 20 dicembre 2007, mentre la terza epoca di impianto è stata posticipata (causa pioggia) di 5 giorni ed è quindi stata effettuata il 25 gennaio 2008. L'emergenza delle piante è iniziata 40 giorni dopo l'impianto nella prima epoca, 30 giorni dopo l'impianto nella seconda, mentre, per la terza epoca l'emergenza è iniziata a distanza di 15 giorni dall'impianto. L'emissione dello scapo fiorale nelle cultivar di aglio rosso è iniziata il 26 maggio 2008; la raccolta dei bulbi è stata effettuata il 12 luglio.

La prova epoca di impianto è stata impostata secondo lo stesso schema sperimentale a parcelle suddivise (split-plot) con quattro ripetizioni, dove le parcelle principali erano rappresentate dalle epoche di impianto e quelle secondarie dalle due cv B. piacentino e R. di Sulmona.

Alla raccolta, sulle piante provenienti dall'area di saggio di ogni singola parcella elementare

(30 piante per ripetizione), sono stati rilevati i seguenti dati: peso fresco e secco della parte aerea, peso fresco del bulbo tolettato, diametro equatoriale e polare dei bulbi, numero dei bulbetti per bulbo.

Per valutare le caratteristiche morfologiche della parte aerea della pianta di ciascun ecotipo nel periodo di massimo sviluppo vegetativo della coltura (22 giugno 2008) sono stati effettuati dei rilievi riguardanti: il numero di foglie verdi e secche per pianta, la lunghezza del “stelo”, il diametro al colletto, la lunghezza e larghezza delle singole foglie. Tali parametri sono stati misurati direttamente in campo su 10 piante di ogni parcella sperimentale per un totale di 40 piante per cultivar.

Alla raccolta sono stati eseguiti gli stessi rilievi produttivi effettuati nel 2007.

Tutti i dati rilevati sono stati analizzati, con le stesse modalità del 2007, per valutare le caratteristiche morfologiche dei bulbi, la produttività degli ecotipi e la percentuale di sostanza fresca e secca del prodotto commerciabile.

Prova densità colturale

La prova prevedeva il confronto di due cultivar coltivate a sei diverse densità colturali (13,33 - 15,38 - 18,18 - 22,22 - 28,57 - 40 piante m⁻²), ottenute facendo variare la distanza tra le file (25, 35, 45, 55, 65, 75 cm) e mantenendo costante la distanza lungo la fila di 10 cm. Pertanto la sperimentazione ha previsto sei tesi principali rappresentate dalle sei distanze di impianto e due tesi secondarie rappresentate dalle due cultivar nazionali ‘B. piacentino’ e ‘R. di Sulmona’.

L’impianto è avvenuto il 20 dicembre 2008 e l’emergenza delle piante è iniziata a distanza di 30 giorni. L’emissione dello scapo florale è avvenuta tra il 26 maggio e il 3 giugno, mentre la raccolta della prova è stata fatta manualmente il 12 luglio.

La prova è stata impostata secondo lo schema sperimentale a parcelle suddivise con quattro ripetizioni, ottenendo complessivamente 48 parcelle elementari, 8 per ogni distanza di impianto scelta. Ogni parcella elementare era interessata da sei file, con lunghezza di 2 m e larghezza variabile da 1,5 a 4,5 m in funzione della distanza tra le file adottata, pertanto la superficie delle singole parcelle elementari variava da 3,00 - 9,00 m². L’area di saggio su cui sono stati prelevati i campioni da analizzare e su cui sono stati effettuati i rilievi di campo, presentava una superficie per ogni distanza adottata di rispettivamente 0,75 - 1,05 - 1,35 - 1,65 - 1,95 - 2,25 m². Alla raccolta sono stati rilevati, sulle piante prelevate dall’area di saggio (30 piante a parcella, per un totale di 120 piante per cultivar), i seguenti parametri: peso fresco

e secco della parte aerea, peso fresco del bulbo “tolettato”, diametro equatoriale e polare dei bulbi, numero dei bulbetti per ogni bulbo.

Per valutare le caratteristiche morfologiche della parte aerea della pianta di ciascun ecotipo nel periodo di massimo sviluppo vegetativo della coltura (22 giugno 2008) sono stati effettuati dei rilievi riguardanti: il numero di foglie verdi e secche per pianta, la lunghezza del “stelo”, il diametro al colletto, la lunghezza e larghezza delle singole foglie. Tali parametri sono stati misurati direttamente in campo su 10 piante di ogni parcella sperimentale per un totale di 40 piante per cultivar.

Le componenti suddette sono state essiccate in una stufa a ventilazione forzata mantenendo la temperatura a 70 °C (± 1 °C), sino al raggiungimento del peso costante (mediamente 72 ore).

Successivamente tutti i dati rilevati sono stati sottoposti all’analisi della varianza, impiegando il programma di statistica SPSS, per valutare le caratteristiche morfologiche dei bulbi, la produttività degli ecotipi e la percentuale di sostanza fresca e secca del prodotto commerciabile.

3.3 RISULTATI

Prove di confronto varietale (2006/2007)

Parametri biometrici

In tabella 3.3.1, dove sono riportati i dati medi delle caratteristiche morfologiche dei bulbi delle cultivar analizzate, è possibile osservare che la cv R. di Sulmona ha presentato un valore del peso medio del bulbo alla raccolta pari a 33,11 g. Tale dato risulta significativamente maggiore rispetto ai valori registrati per le altre cultivar.

Tabella. 3.3.1 – Caratteristiche biometriche dei bulbi delle cultivar in prova (anno 2007)				
Cultivar	Bulbo			
	Peso medio g	Ø equatoriale mm	Ø polare mm	bulbetti n
B. piacentino	25,44 b	40,53 b	30,83 b	8,9 b
R. di Sulmona	33,11 a	44,52 a	33,77 a	10,52 a
R. di Castelliri	25,88 b	40,78 b	31,16 b	10,6 a
R. di Proceno	14,17 c	33,58 c	27,71 c	8,17 b
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)				

Dalla valutazione degli altri parametri biometrici considerati (diametro equatoriale, diametro polare e numero dei bulbetti per bulbo), sembra che il maggior peso del bulbo sia positivamente correlato al diametro equatoriale e polare dello stesso; infatti, la cv R. di Sulmona caratterizzata dal maggior peso medio del bulbo, è risultata anche quella con il maggior diametro equatoriale (44,52 mm) e diametro polare (33,77 mm). La cv R. di Castelliri, si è attestata insieme al 'B. piacentino', al secondo posto della scala di merito per i caratteri peso, diametro equatoriale e polare del bulbo. Il numero dei bulbetti è però risultato significativamente maggiore nel 'R. di Castelliri' (10,6 per bulbo), eguagliato solo dal 'R. di Sulmona'. Il 'R. di Proceno', invece, ha registrato valori inferiori alle altre cultivar per i parametri peso medio, diametro polare ed equatoriale. Tale risposta è probabilmente da associare ad una minore resistenza allo stress idrico verificatosi in primavera a causa delle

scarse precipitazioni atmosferiche.

Dall'analisi dei dati riportati in tabella 3.3.2, relativi alle caratteristiche morfologiche della parte aerea della pianta delle cultivar oggetto di prova, è possibile osservare l'ampia variabilità (riscontrata) nelle diverse varietà di aglio circa i caratteri esaminati (figura. 3.3.1). In particolare, si osserva una maggior numero di foglie per pianta nella cv B. piacentino (12,27), seguita dal 'R di Sulmona' (9,80), dal 'R. di Castelliri' (8,56) e dal 'R. di Proceno' (7,87).

Tab. 3.3.2 – Caratteristiche biometriche della parte epigea delle cultivar in prova (anno 2007)			
Cultivar	Parte epigea		
	Foglie per pianta n	Ø “stelo” mm	Altezza “stelo” cm
B. piacentino	12,27 a	10,33 a	27,64 a
R. di Sulmona	9,80 b	10,17 a	26,11 b
R. di Castelliri	8,56 c	9,21 ab	23,04 c
R. di Proceno	7,87 d	8,23 b	21,48 d
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)			

L'altezza dello “stelo” è risultata maggiore nelle cultivar più fogliose e oscilla da valori di 27,64 cm nel 'B. piacentino' a valori di 21,48 cm nel 'R. di Proceno'.

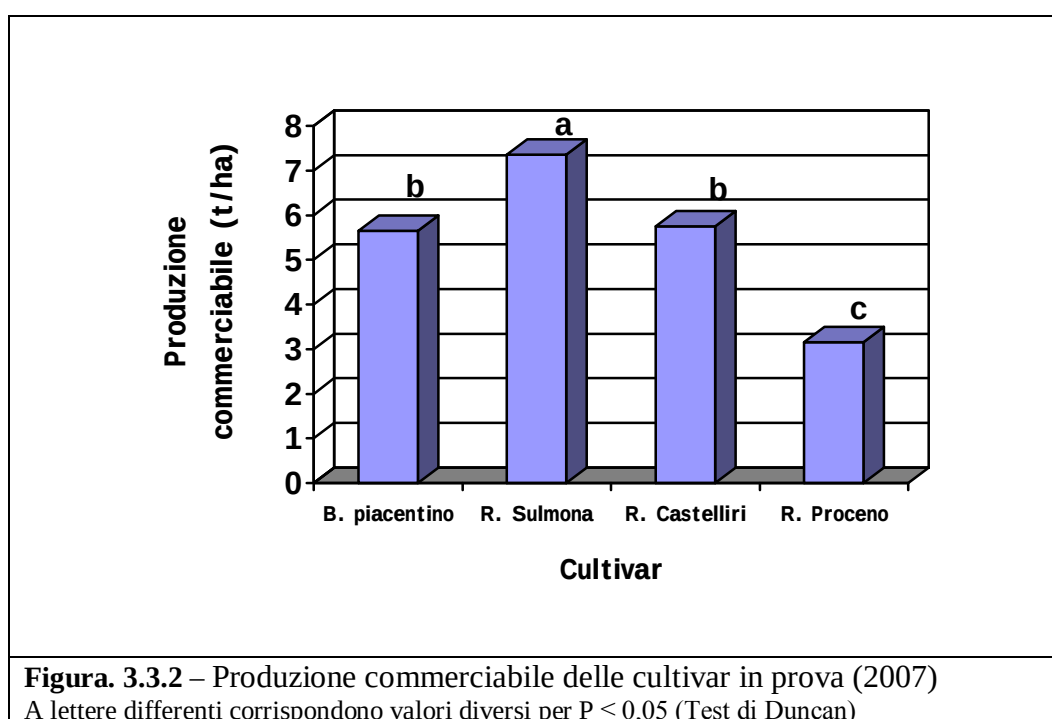
Il diametro dello “stelo” è stato maggiore nel 'B. piacentino' (10,33), a pari merito con il 'R. di Sulmona' (10,17) e con il 'R. di Castelliri' (9,21).

	
A) Bianco piacentino	B) Rosso di Castelliri
	
C) Rosso di Proceno	D) Rosso di Sulmona
Figura. 3.3.1 – Piante di aglio delle cultivar presenti nella prova confronto varietale.	

Parametri produttivi

La produzione commerciabile rilevata alla raccolta, espressa in $t\ ha^{-1}$, è riportata in figura 3.3.2.

Tra gli ecotipi in prova, il ‘R. di Sulmona’, con una resa di $7,35\ t\ ha^{-1}$, è risultato essere il più produttivo. Rese significativamente inferiori sono state osservate nelle restanti cultivar; infatti, la produzione è risultata pari a $5,75\ t\ ha^{-1}$ per la cv R. di Castelliri, di $5,65\ t\ ha^{-1}$ nel ‘B. piacentino’ e di $3,15\ t\ ha^{-1}$ nel ‘R. di Proceno’.



Le rese ottenute, nettamente al di sotto della media nazionale (di $9\ t\ ha^{-1}$), sono da attribuire all'andamento termopluviometrico dell'anno 2007 poco favorevole alla coltura. Infatti, le scarse precipitazioni verificatesi nel periodo d'ingrossamento del bulbo ne hanno penalizzato fortemente l'accrescimento.

Dall'analisi della figura 3.3.3, dove è riportata la ripartizione percentuale della sostanza fresca dei bulbi commerciabili, si nota come le cv R. di Castelliri e R. di Sulmona presentino dei valori percentuali della componente “polpa” (rispettivamente 94,2% e 93,3%) riferita al bulbo intero, significativamente maggiore rispetto alle altre due cultivar. Questo si traduce in una maggiore resa alla lavorazione e al consumo molto importante ai fini commerciali.

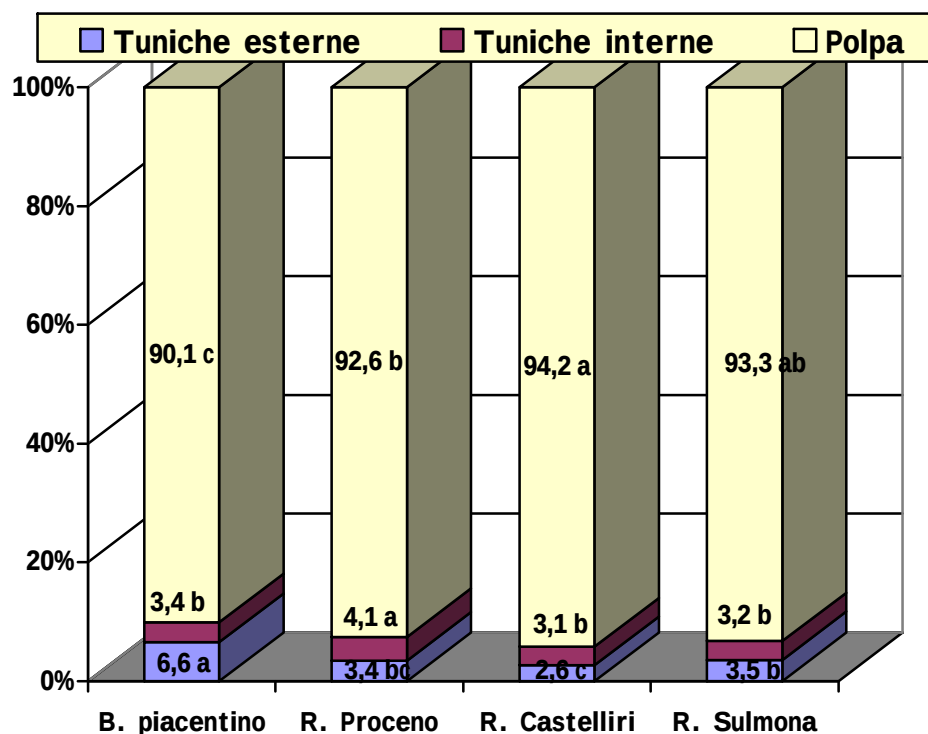


Figura. 3.3.3 – Ripartizione percentuale della sostanza fresca dei bulbi commerciabili (anno 2007)
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)

Nella stessa figura si osserva una maggiore quantità percentuale di tuniche esterne nel ‘B. piacentino’ (6,6%) rispetto alle altre cultivar. Relativamente al parametro “tuniche interne” la cv ‘R. di Proceno’ è risulta quella con la maggior percentuale (4,1%).

Prova confronto varietale (2007/2008)

Parametri biometrici

Dall’analisi della tabella 3.3.3, dove sono riportati i dati medi delle caratteristiche morfologiche dei bulbi delle cultivar oggetto di prova, è possibile osservare che, anche in questo secondo anno, la cv R. di Sulmona è risultata quella con il maggior peso medio del bulbo, (50,19 g). Per questo parametro non sono emerse differenze significative tra le altre cultivar. Il ‘B. piacentino’ si è distinto per il minor diametro equatoriale (43,53 mm). Il ‘R. di Sulmona’ ed il ‘R. di Castelliri’ si sono distinti per il maggior numero di bulbetti per bulbo

(rispettivamente di 13,53 n e di 12,64 n). Nella tabella 3.3.4 sono riportati i valori medi delle caratteristiche morfologiche della parte aerea della pianta degli ecotipi rilevate il 22 giugno 2008 direttamente nell'area di saggio

Tabella. 3.3.3 – Caratteristiche biometriche dei bulbi delle cultivar in prova (anno 2008)

Cultivar	Bulbo			
	Peso medio g	Ø equatoriale mm	Ø polare mm (n.s.)	bulbetti n
B. piacentino	36,34 b	43,53 b	38,39	12,10 b
R. di Sulmona	50,19 a	51,09 a	40,56	13,53 a
R. di Castelliri	39,57 b	47,82 a	38,73	12,64 ab
R. di Proceno	40,08 b	48,37 a	38,23	10,80 c
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan) (n.s.) Interazione non significativa				

Tabella. 3.3.4 – Caratteristiche biometriche della parte epigea delle cultivar in prova (anno 2008)

Cultivar	Parte epigea					
	Foglie n (n.s.)	Ø “stelo” mm	Altezza “stelo” cm (n.s.)	foglie secche %	Lungh. media foglia cm (n.s.)	Largh. media foglia cm
B. piacentino	8,77	17,02 b	22,26	22,54 c	49,21	2,54 b
R. di Sulmona	9,25	18,97 a	24,62	45,07 b	51,21	2,76 a
R. di Castelliri	8,40	17,30 b	22,62	55,24 a	49,69	2,33 c
R. di Proceno	7,92	16,56 b	22,98	44,45 b	53,24	2,49 b
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan) (n.s.) Interazione non significativa						

L'altezza dello “stelo” e la lunghezza delle foglie non sono risultate statisticamente differenti per i quattro ecotipi valutati, che sono state mediamente pari a 23,12 cm e 50,83 cm.

Differenze statisticamente significative sono state invece osservate per i parametri: diametro dello “stelo”, numero e larghezza delle foglie. In particolare, si è osservato che la cv R. di Sulmona, caratterizzata dal maggior peso medio del bulbo, ha presentato anche il maggior diametro dello stelo.

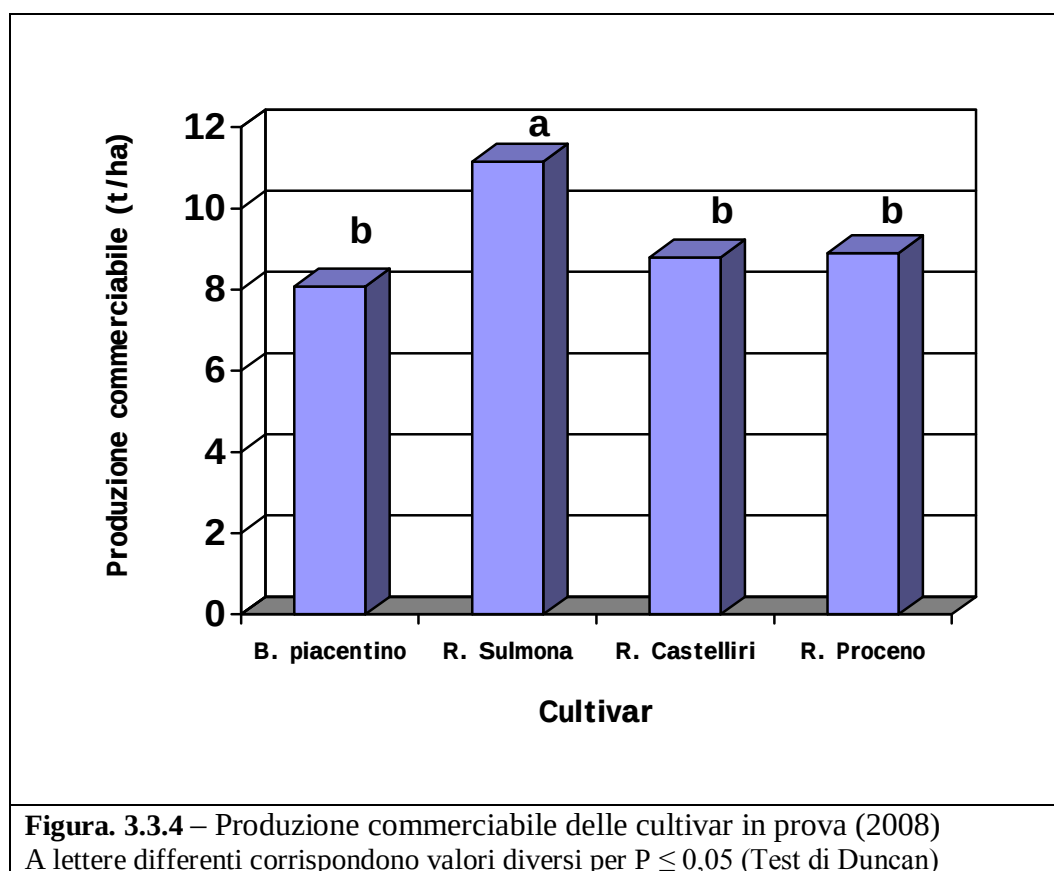
Dalla stessa tabella si osserva che le cultivar appartenenti alla tipologia “aglio rosso” presentavano al momento del rilievo (circa 20 giorni prima della raccolta), un numero medio di foglie secche (45,27%) nettamente superiore rispetto alla cv B. Piacentino (22,54 %).

Tale comportamento è probabilmente da imputare ad un ciclo vegetativo della pianta inferiore nella tipologia “Rosso” rispetto al “Bianco”.

Parametri produttivi

La produzione commerciabile rilevata alla raccolta, espressa in $t\ ha^{-1}$, è riportata in figura 3.3.4. Tra le quattro cultivar, il ‘R. di Sulmona’, è risultata essere quella più produttiva raggiungendo rese di $11,15\ t\ ha^{-1}$. I dati medi registrati per le cv R. di Proceno, R. di Castelliri e B. piacentino sono risultati essere rispettivamente pari a 8,90, 8,79 e $8,07\ t\ ha^{-1}$.

Le rese ottenute sono state nettamente superiori rispetto all’anno precedente; ciò è probabilmente da attribuire all’andamento termopluviometrico dell’anno 2008 decisamente più favorevole alla coltura. Infatti, le copiose precipitazioni verificatesi nei mesi di aprile e maggio, hanno favorito un’equilibrata crescita della pianta e quindi anche l’ingrossamento dei bulbi.



Dalla figura 3.3.5, dove è riportata la ripartizione percentuale della sostanza fresca dei bulbi delle quattro cultivar, si osserva che le cv R. di Castelliri, R. di Proceno e R. di Sulmona presentano valori percentuali della componente “polpa” (rispettivamente di 93,5%, 93% e 92,3%) riferita al bulbo intero, significativamente maggiore rispetto all'ecotipo B. piacentino (86,3%). Questo si traduce in una maggiore resa alla lavorazione e al consumo delle cultivar della tipologia “aglio rosso” molto importante ai fini commerciali.

La cv B. piacentino invece, anche in questo secondo anno di prova, si è distinta per la maggior percentuale di tuniche esterne (8,3%).

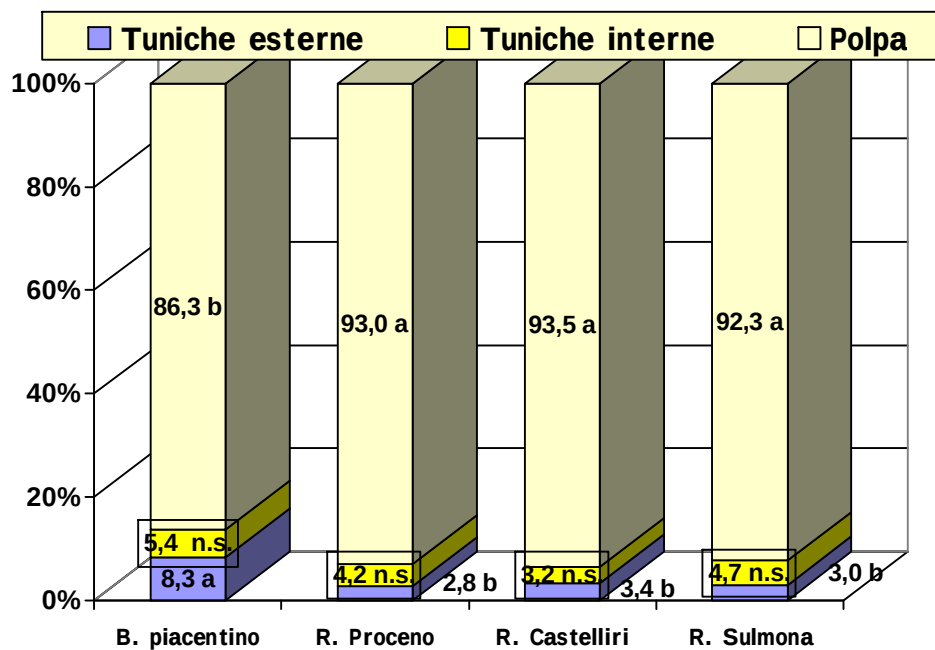


Figura. 3.3.5 – Ripartizione percentuale della sostanza fresca dei bulbi commerciabili (2008)
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)

Analisi molecolare

Per le analisi molecolari sono stati impiegati tre marcatori ISSR individuati in letteratura (paragrafo 3.2). L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di rilevare un elevato livello di polimorfismo compreso tra 0,67 e 0,73 (tabella 3.3.5).

Tabella. 3.3.5 – Valori ottenuti dall'analisi statistica dei dati sulle quattro cultivar.

Popolazione	n	P	A	Ap	He
B. piacentino	15,00	0,72	1,72	2,00	0,19
R. di Castelliri	15,00	0,68	1,68	2,00	0,19
R. di Proceno	15,00	0,67	1,67	2,00	0,19
R. di Sulmona	15,00	0,73	1,73	2,00	0,20
Media	15,00	0,70	1,70	2,00	0,19

n = numero campioni P = polimorfismi, A = numero di alleli, Ap = numero di alleli polimorfici, He = eterozigotà attesa

Le quattro linee analizzate hanno mostrato un livello di variabilità genetica entro popolazione molto simile e sorprendentemente la variabilità genetica rilevata è risultata essere di gran lunga superiore entro popolazione (94%) piuttosto che fra popolazioni (6%). Dall'analisi delle

distanze genetiche di Nei (1972) ottenute, le quattro cultivar impiegate sono risultate essere poco distanti tra loro presentando valori di distanza genetica pressoché identici (tabella 3.3.6) come si può osservare anche nel dendrogramma ottenuto (figura 3.3.6).

Tabella. 3.3.6 – Distanze genetiche di Nei (1972).				
Distance matrix	B. piacentino	R. di Castelliri	R. di Proceno	R. di Sulmona
B. piacentino	-	-	-	-
R. di Castelliri	0,02	-	-	-
R. di Proceno	0,02	0,02	-	-
R. di Sulmona	0,02	0,02	0,02	-

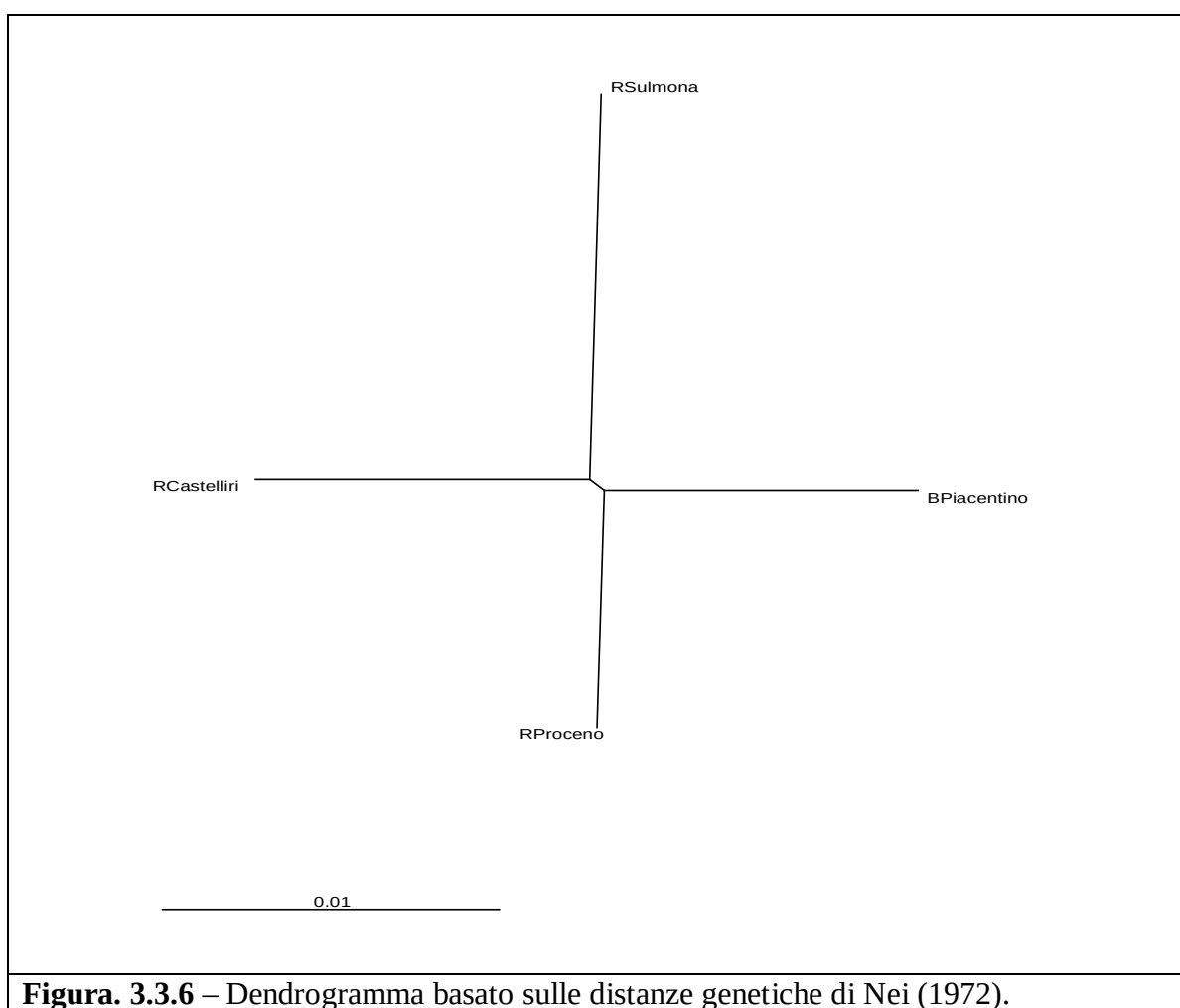


Figura. 3.3.6 – Dendrogramma basato sulle distanze genetiche di Nei (1972).

Prova epoca di impianto (2006/2007)

Parametri biometrici

Dall'analisi statistica dei dati non sono emerse interazioni significative cultivar x epoca per tutti i parametri considerati. In tabella 3.3.7 sono riportati i valori medi delle due cultivar, riferiti ai parametri biometrici dei bulbi: peso medio, diametro equatoriale e polare, e numero dei bulbetti. I valori dei parametri peso medio, diametro equatoriale e polare del bulbo sono risultati massimi in corrispondenza della prima epoca di semina (rispettivamente 30,60 g, 42,58 mm e 36,42 mm), per gli stessi parametri non sono state riscontrate differenze significative tra la seconda e la terza epoca di impianto.

Tabella. 3.3.7 - Caratteristiche biometriche dei bulbi in prova nelle tre epoche di impianto (anno 2007)				
Epoca di impianto	Bulbo			
	Peso medio g	Ø equatoriale mm	Ø polare mm	Bulbetti n (n.s.)
20 - novembre	30,60 a	42,58 a	36,42 a	9,11
20 - dicembre	22,10 b	37,48 b	31,58 b	8,59
20 - gennaio	23,89 b	38,47 b	33,12 b	8,87
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan) (n.s.) Differenze non significativa				

L'epoca di "semina" non ha influenzato il numero di bulbetti per bulbo, parametro che invece è risultato dipendere dal genotipo; infatti, il 'R. di Sulmona' ha mostrato un numero di bulbetti per bulbo (9,74) significativamente maggiore rispetto al 'B. Piacentino' (7,99).

Per quanto riguarda il numero di bulbetti per bulbo dall'analisi statistica non sono state evidenziate dei dati differenze significative tra le tre epoche che hanno raggiunto un valore medio in numero di 8,86.

In tabella 3.3.8, dove sono riportati i dati relativi al numero di foglie, diametro e altezza dello "stelo", si nota che l'interazione cultivar x epoche è risultata positiva soltanto per il parametro numero foglie per pianta. Per tale parametro si osserva infatti una diversa risposta delle due cultivar ai trattamenti; in particolare mentre per il 'B. piacentino' il numero di foglie per pianta diminuisce passando dalla prima epoca a quelle successive, per il 'R. di Sulmona' i valori non discostano in maniera significativa nelle tre epoche.

I valori relativi ai parametri diametro e altezza dello "stelo" sono risultati maggiori nella

prima epoca di impianto. Differenze significative per tali parametri non sono state riscontrate per le altre epoche.

Tabella. 3.3.8 – Caratteristiche biometriche della parte epigea delle cultivar in prova nelle tre epoche di impianto (anno 2007)

Cultivar	Epoca di impianto	Parte epigea		
		Foglie per pianta n	Ø “stelo” mm (n.s.)	Altezza “stelo” cm (n.s.)
B. piacentino	20-novembre	12,20 a	10,29	27,50
	20-dicembre	10,12 b	8,13	22,32
	20-gennaio	8,57 c	7,56	20,01
R. di Sulmona	20-novembre	9,92 b	9,48	24,87
	20-dicembre	9,10 bc	8,40	20,97
	20-gennaio	8,87 bc	8,38	22,17
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan) (n.s.) Interazione non significativa				

Parametri produttivi

Dall’analisi statistica non è emersa significativa l’interazione cultivar x epoca tra i trattamenti per la produzione commerciabile; per lo stesso parametro sono state invece riscontrate differenze significative tra le epoche di “semina”. Infatti, la produzione commerciabile è risultata massima nella prima epoca di impianto rispetto, alle altre due epoche che si sono eguagliate attestandosi al secondo posto nella classe di merito (figura 3.3.7).

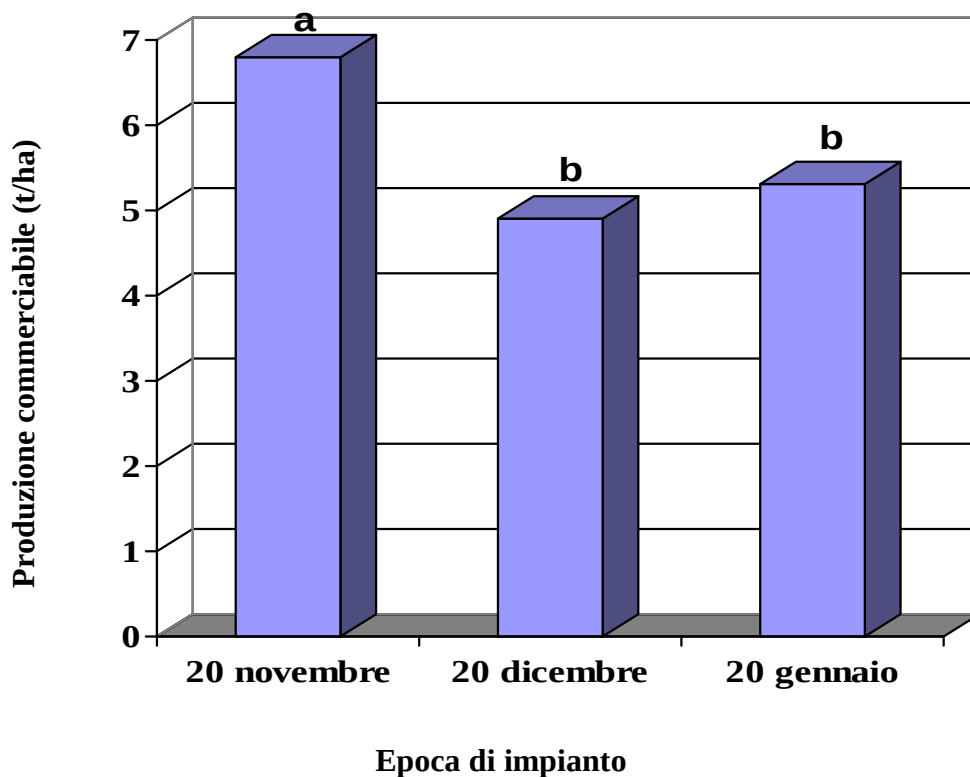


Figura. 3.3.7 – Produzione commerciabile delle cultivar in prova nelle tre epoche di impianto (2007)
 A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)

Dall'analisi dei dati sperimentali riportati in tabella 3.3.9 relativi alla ripartizione della sostanza fresca e secca dei bulbi commerciabili si nota che per tutti i parametri considerati è risultata significativa l'interazione cultivar x epoca, fatta eccezione per i parametri peso fresco e secco delle tuniche esterne del bulbo.

In particolare, relativamente al parametro peso fresco delle tuniche esterne del bulbo, si osserva che mentre per la cv Rosso di Sulmona i valori tra le diverse epoche non differiscono significativamente tra loro, per la cv B. piacentino il valore riferito alla prima epoca di impianto (1,86 g) è superiore sia alla seconda (0,85 g) che alla terza epoca (0,36 g).

La cv B. piacentino è risultata quella con i valore più alti sia per il parametro peso secco delle tuniche esterne (1,68 g) che per il parametro peso secco del bulbo (16,68 g) in corrispondenza della prima epoca di "semina".

Anche per questi due parametri per il ‘B. piacentino’ si nota una riduzione dei valori passando dalla prima epoca a quelle successive.

Per il parametro peso fresco del bulbo, la cv B. piacentino ha raggiunto i valori massimi nella prima epoca di “semina”, eguagliati da quelli della cv R. Sulmona in tutte e tre le epoche di “semina”. I bulbi di peso inferiore sono stati ottenuti dalla cv B. piacentino nella seconda e terza epoca di “semina”.

I parametri peso fresco e secco delle tuniche interne non sono stati influenzati dall’epoca d’impianto dei bulbi. Differenze significative sono state invece riscontrate per tali parametri tra le cultivar ‘R. di Sulmona’ e ‘B. piacentino’.

Tabella. 3.3.9 - Ripartizione della sostanza fresca e secca in bulbi di aglio.							
Cultivar	Epoca di impianto	Bulbo					
		Pes.fresco tuniche esterne g	Pes.secco tuniche esterne g	Peso fresco bulbo g	Peso secco bulbo g	Pes.fresco tuniche interne (n.s)	Pes.secco tuniche interne (n.s)
B. piacentino	20-novembre	1,86 a	1,68 a	23,86 a	16,68 a	0,93	0,55
	20-dicembre	0,85 b	0,72 c	11,30 b	4,18 c	0,72	0,35
	20-gennaio	0,36 c	0,22 d	11,64 b	5,38 c	0,64	0,29
R. di Sulmona	20-novembre	1,39 ab	1,16 b	24,52 a	10,95 b	1,19	0,83
	20-dicembre	1,08 ab	0,90 bc	21,68a	7,25 bc	1,13	0,74
	20-gennaio	1,37 ab	1,15 b	23,20 a	9,42 bc	1,11	0,74
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan) (n.s) Interazioni tra le epoche non significative							

In tabella 3.3.10, dove sono riportati i dati dei parametri sostanza fresca e sostanza secca della parte epigea, si nota una diversa risposta delle due cultivar all’epoca di impianto; in particolare, la cv B. piacentino fa registrare, in assoluto, i valori più elevati in corrispondenza della prima epoca di semina e quelli inferiori nella seconda e terza epoca. Per la cv R. di Sulmona non sono emerse differenze significative tra le epoche.

Tabella. 3.3.10 - Ripartizione della sostanza fresca e secca della parte epigea delle piante di aglio

Cultivar	Epoca di impianto	Parte epigea	
		Peso fresco "stelo" g	Peso secco "stelo" g
B. piacentino	20-novembre	6,43 a	5,84 a
	20-dicembre	1,75 c	1,51 c
	20-gennaio	1,04 c	0,80 c
R. di Sulmona	20-novembre	3,97 b	3,44 b
	20-dicembre	3,12 b	2,67 b
	20-gennaio	3,10 b	2,58 b
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)			

Prova epoca di impianto (2007/2008)

Parametri biometrici

Dall'analisi della tabella 3.3.11 dove sono riportati i dati medi dei parametri peso, diametro equatoriale e polare del bulbo e numero dei bulbetti per bulbo, risultata significativa l'interazione cultivar x densità per tutti i parametri considerati ad eccezione del parametro numero di bulbetti per bulbo.

Passando ad esaminare in dettaglio i singoli parametri, si osserva per tutte e tre le epoche un maggior peso medio dei bulbi del 'R. di Sulmona' nei confronti del 'B. piacentino'. Inoltre si nota che il peso medio dei bulbi non decresce tra la prima e la seconda epoca di semina come osservato nel primo anno di prova, ma soltanto tra la seconda e la terza epoca. Tale comportamento è probabilmente da associare all'andamento pluviometrico dell'anno 2008 caratterizzato da copiose precipitazioni vernino-primaverili che hanno favorito l'ingrossamento del bulbo anche nella seconda epoca di impianto.

I parametri diametro equatoriale e diametro polare del bulbo sono stati maggiori nella cv R. di Sulmona in tutte e tre le epoche di semina, eguagliati da quelli della cv B. piacentino soltanto nella prima e nella seconda epoca di semina.

Tabella. 3.3.11 - Caratteristiche biometriche dei bulbi delle cultivar in prova (anno 2008)					
Cultivar	Epoca di impianto	Bulbo			
		Peso medio g	Ø equatoriale mm	Ø polare mm	Bulbetti n (n.s.)
B. piacentino	20 novembre	39,31 b	50,42 a	39,61 a	9,88
	20 dicembre	37,59 b	48,68 a	39,00 a	9,58
	20 gennaio	20,47 c	37,41 b	34,79 b	8,43
R. di Sulmona	20 novembre	47,05 a	51,91 a	40,16 a	13,83
	20 dicembre	44,44 a	49,61 a	40,28 a	13,12
	20 gennaio	43,93 a	49,54 a	39,56 a	12,33
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan) (n.s.) Interazione non significativa					

Il numero di bulbetti per bulbo è risultato maggiore per entrambe le cultivar nella prima e seconda epoca di impianto rispetto alla terza epoca dove si è registrato un valore medio significativamente minore.

Dall'analisi statistica tabella 3.3.12 non è risultata significativa l'interazione cultivar x epoca per tutti i parametri considerati ad eccezione del parametro percentuale di foglie secche.

Tabella. 3.3.12 - Caratteristiche biometriche della parte epigea delle cultivar Bianco piacentino e Rosso di Sulmona nella prova epoca di semina (anno 2008)							
Cultivar	Epoca di impianto	Parte epigea					
		Altezza "stelo" cm (n.s.)	Ø "stelo" cm (n.s.)	Foglie n (n.s.)	Foglie secche %	Lungh. media foglia cm (n.s.)	Largh media foglia cm (n.s.)
B. piacentino	20 novembre	32,21	14,59	8,60	54,55 ab	50,56	2,16
	20 dicembre	25,00	14,87	7,96	50,13 b	51,01	2,44
	20 gennaio	25,89	14,67	6,64	39,64 c	48,72	2,48
R. di Sulmona	20 novembre	27,82	16,90	8,43	58,47 a	50,96	2,28
	20 dicembre	23,75	15,31	8,03	53,60 b	51,71	2,45
	20 gennaio	24,35	15,39	8,18	52,36 b	48,72	2,57
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan) (n.s.) Interazione non significativa							

L'altezza dello stelo e il numero delle foglie sono risultate significativamente maggiori nella prima epoca di "semina" (rispettivamente 30,01 cm e 8,51) rispetto alla altre due epoche che si sono invece attestate entrambe nella seconda classe di merito.

Differenze statisticamente significative non sono state notate tra le tre epoche per i parametri diametro dello stelo e lunghezza delle foglie che hanno raggiunto valori medi di 15,28 mm e 50,86 cm.

La percentuale di foglie secche è risultata massima in corrispondenza della prima epoca di semina sia per la cv R. di Sulmona (58,47 %) che per la cv B. piacentino (54,55 %). Nelle epoche successive si nota un diverso comportamento tra le due cultivar; infatti, mentre nel 'R. Sulmona' i valori di tale parametro decrescono e si attestano sugli stessi valori nelle due epoche più tardive, nel 'B. piacentino' la percentuale di foglie secche è risultata inferiore a tutti i trattamenti nella terza epoca (39,64 %). Tale risposta denota una maggiore lunghezza del ciclo culturale del 'B. piacentino' rispetto al 'R. di Sulmona'.

Parametri produttivi

L'analisi statistica ha evidenziato interazione tra i trattamenti per il parametro 'produzione commerciabile'. Dalla figura 3.3.8 si osserva che la cv R. di Sulmona in tutte e tre le epoche ha espresso una resa in bulbi significativamente maggiore rispetto al 'B. piacentino' raggiungendo valori medi di $10,03 \text{ t ha}^{-1}$. Inoltre, è possibile notare che per la cv B. piacentino la produzione commerciabile non decresce tra la prima e la seconda epoca di semina, dove si ottiene una resa media di $8,54 \text{ t ha}^{-1}$, ma soltanto tra la seconda e la terza epoca. Infatti, in quest'ultima si osserva una resa in bulbi di appena $4,55 \text{ t ha}^{-1}$. Tale comportamento è imputabile probabilmente alla minore precocità del 'B. piacentino', che ha quindi risentito maggiormente della carenza idrica e delle alte temperature caratteristiche dei mesi di giugno e luglio della zona sede della sperimentazione.

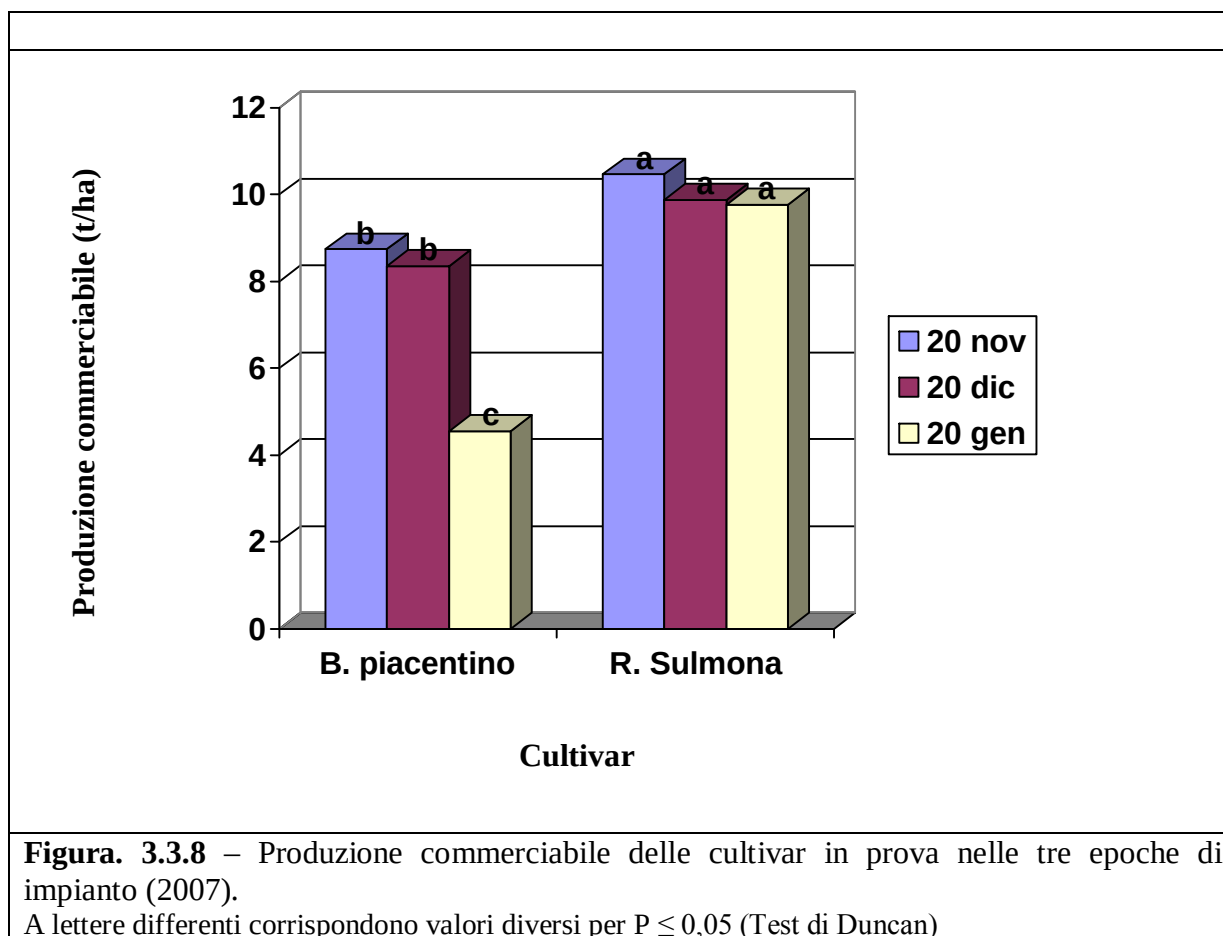


Figura. 3.3.8 – Produzione commerciabile delle cultivar in prova nelle tre epoche di impianto (2007).

A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)

Prova densità colturale (2007/2008)

Parametri biometrici

In tabella 3.3.13 sono riportati i valori dei parametri peso, diametro equatoriale e polare del bulbo e numero dei bulbetti per bulbo.

Relativamente al parametro peso medio del bulbo non è risultata significativa l'interazione cultivar x densità; infatti, per entrambe le cultivar, il peso medio dei bulbi ha raggiunto i valori massimi nelle tre densità colturali inferiori (18,18, 15,38 e 13,33 piante m⁻²) per poi decrescere a partire dalla densità 22,22 piante m⁻² e quindi raggiungere il valore minimo alla densità 40 piante m⁻².

Interazioni significative sono state invece osservate per il diametro equatoriale del bulbo che è risultato massimo in tutte le densità colturali, ad eccezione della densità 40 piante m⁻², per la cv R. di Sulmona, mentre per il 'B. piacentino' il valore maggiore, che ha eguagliato quello massimo raggiunto dal 'R. di Sulmona', è stato registrato soltanto nella densità colturale minore.

Tabella. 3.3.13 – Caratteristiche biometriche dei bulbi della cultivar Bianco piacentino nella prova densità di impianto (anno 2008)

Cultivar	Densità colturale piante m ⁻²	Bulbo		
		Peso medio g (n.s.)	Ø equatoriale mm	Bulbetti n (n.s.)
B. piacentino	40,00	30,56	44,86 bc	9,51
	28,57	34,36	47,83 bc	9,15
	22,22	29,40	43,61 c	9,85
	18,18	36,05	47,92 b	9,75
	15,38	34,94	46,76 bc	10,35
	13,33	37,52	48,82 ab	9,76
R. di Sulmona	40,00	39,93	48,64b	13,36
	28,57	42,70	49,99ab	12,50
	22,22	46,32	51,33ab	13,45
	18,18	47,87	52,66ab	14,10
	15,38	47,61	52,34ab	13,65
	13,33	49,44	52,95a	14,10

A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)
(n.s.) Interazione non significativa

Relativamente, al parametro numero bulbetti per bulbo differenze significative sono state osservate tra le due cultivar, indipendentemente dalla densità colturale adottata. In particolare la cv R. di Sulmona si è caratterizzata per un numero di bulbetti per bulbo nettamente

superiore (13,53) rispetto a ‘B. piacentino’ (9,73).

Interazione cultivar x densità colturale non è risultata significativa per tutti i parametri riportati in tabella 3.3.14.

Tabella. 3.3.14 - Caratteristiche biometriche della parte epigea delle cultivar Bianco piacentino e Rosso di Sulmona nella prova epoca di impianto (anno 2008)						
Densità colturale piante m²	Cultivar					
	Altezza “stelo” cm	Ø “stelo” cm	Foglie n	Foglie secche %	Lungh. media foglia cm	Largh media foglia cm
40,00	31,37 a	13,23 b	3,28 c	67,31 a	1,85 c	45,73 c
28,57	28,46 b	14,77 a	3,58 ab	61,70 b	2,27 ab	49,75 ab
22,22	26,53 b	15,66 a	3,68 ab	58,57 bc	2,19 b	48,99 ab
18,18	26,01 b	15,92 a	3,78 a	56,37 c	2,41 a	50,44 a
15,38	26,39 b	15,68 a	3,53 b	60,15 b	2,39 a	49,12 ab
13,33	26,76 b	15,69 a	3,71 ab	62,16 b	2,32 ab	48,19 b
A lettere differenti corrispondono valori diversi per $P \leq 0,05$ (Test di Duncan)						

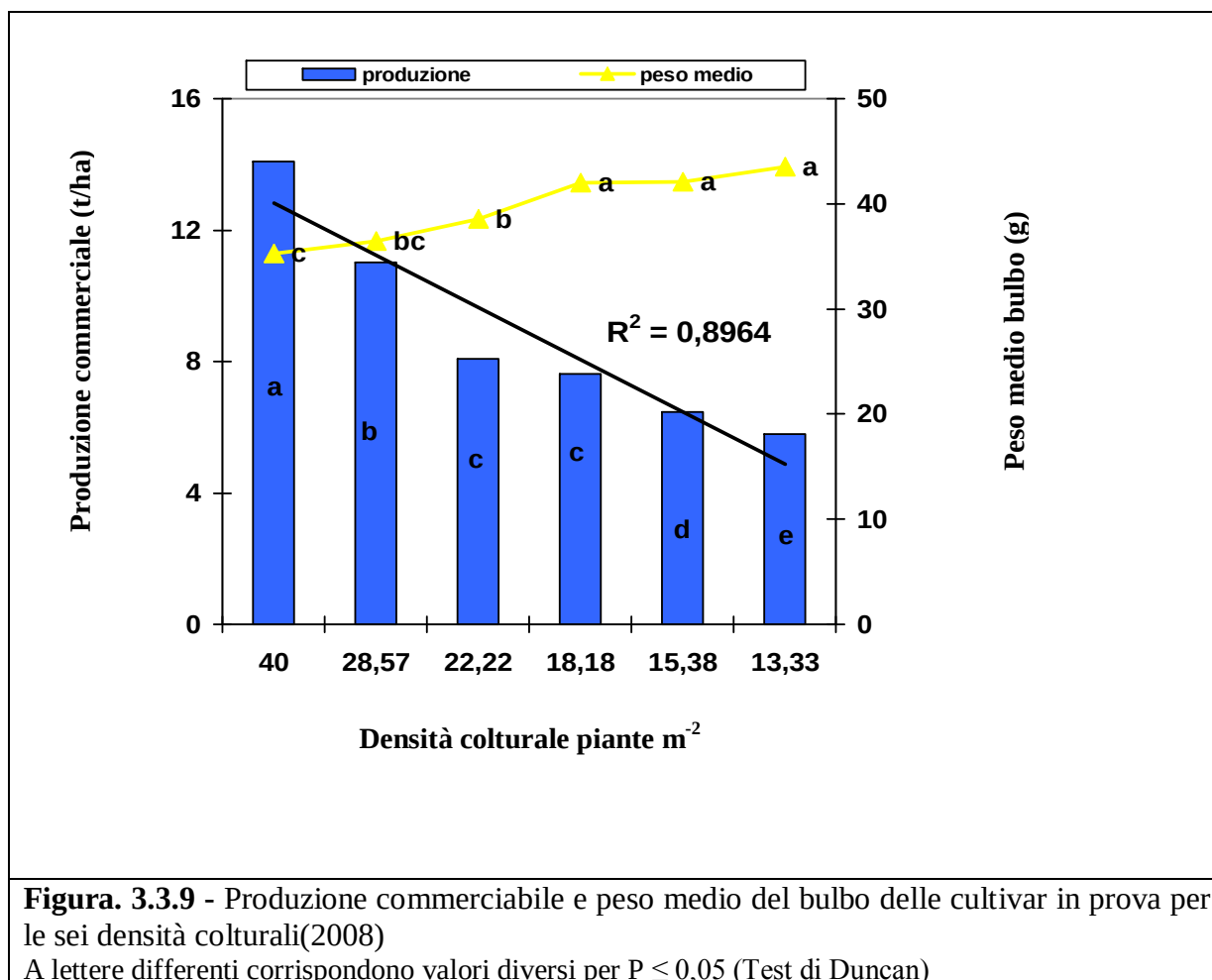
L'altezza dell “stelo” è risultata massima nella densità colturale maggiore rispetto a tutti gli altri trattamenti che si sono invece attestati nella seconda classe di merito. Al contrario, il parametro diametro dello “stelo” ha raggiunto un valore maggiore nelle densità colturali inferiori ed è risultato invece significativamente minore nella densità 40 piante m⁻².

Tale comportamento è imputabile alla forte competizione intraspecifica, derivante da densità colturali elevate, che spinge la pianta a “filare” per aumentare l'efficienza fotosintetica.

Andando ad analizzare i dati ottenuti per la percentuale di foglie secche è possibile notare che questa è stata massima in corrispondenza della densità 40 piante m⁻² (67,31%). Inoltre, è interessante osservare che i valori dei parametri numero, lunghezza e larghezza delle foglie si sono attestati all'ultimo posto nella classe di merito per la densità colturale maggiore. Le minori dimensioni delle foglie sono da attribuire probabilmente all'influenza esercitata dalla densità d'impianto.

Parametri produttivi

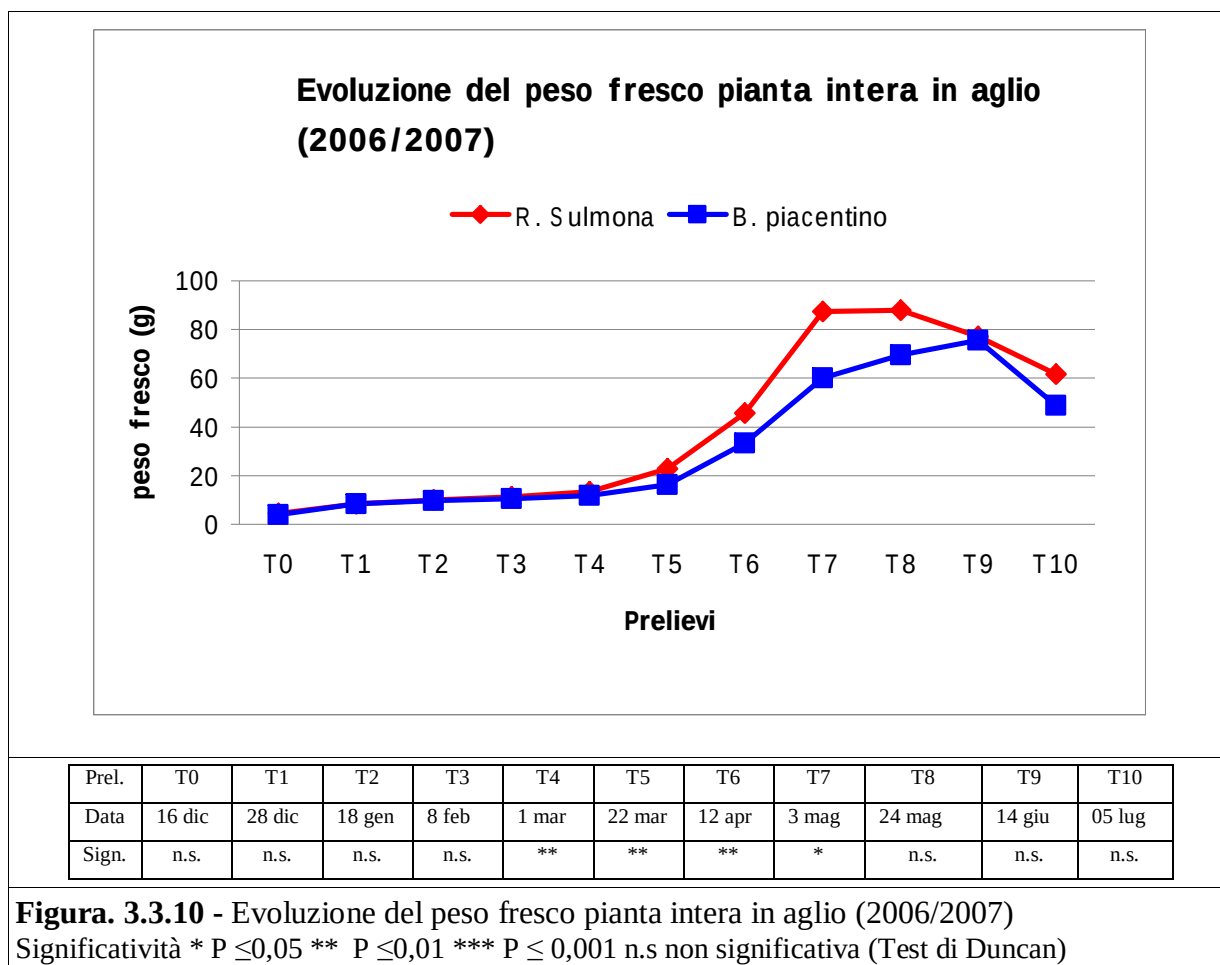
Dalla figura 3.3.9 è possibile osservare che, relativamente al parametro produzione commerciabile ($R^2 = 0,9$), non è risultata significativa l'interazione cultivar x densità; infatti, per entrambe le cultivar, tale parametro è risultato massimo nelle densità colturale maggiore per poi decrescere fino a raggiungere il valore minimo alla densità di 13,33 piante m^{-2} .



Nella stessa figura si osserva che la produzione commerciabile è positivamente correlata con la densità colturale, mentre il peso medio del bulbo tende a diminuire all'aumentare del numero di piante al metro quadro.

Prova asportazioni (Anno 2006/2007)

In figura 3.3.10 è riportata l'evoluzione del peso fresco (espresso in grammi) della pianta intera delle due cultivar di aglio impiegate nella prova (Bianco piacentino e Rosso di Sulmona) durante l'intero ciclo colturale.



Dall'analisi dell'andamento delle due curve, si nota che l'accrescimento della pianta delle due cultivar è simile nel periodo compreso tra il tempo T0 (emergenza) e il tempo T4 (emissione 6° foglia), mentre si differenzia significativamente nell'ultima parte di questo. In particolare, il “R. di Sulmona” raggiunge il massimo accrescimento tra il 22 marzo (T5) e il 24 maggio (T8). Successivamente (T9-T10), il peso medio della pianta diminuisce, denotando l'inizio della fase di senescenza. Il diverso comportamento nell'evoluzione del peso fresco è dovuto sostanzialmente alla diversa precocità delle due cultivar.

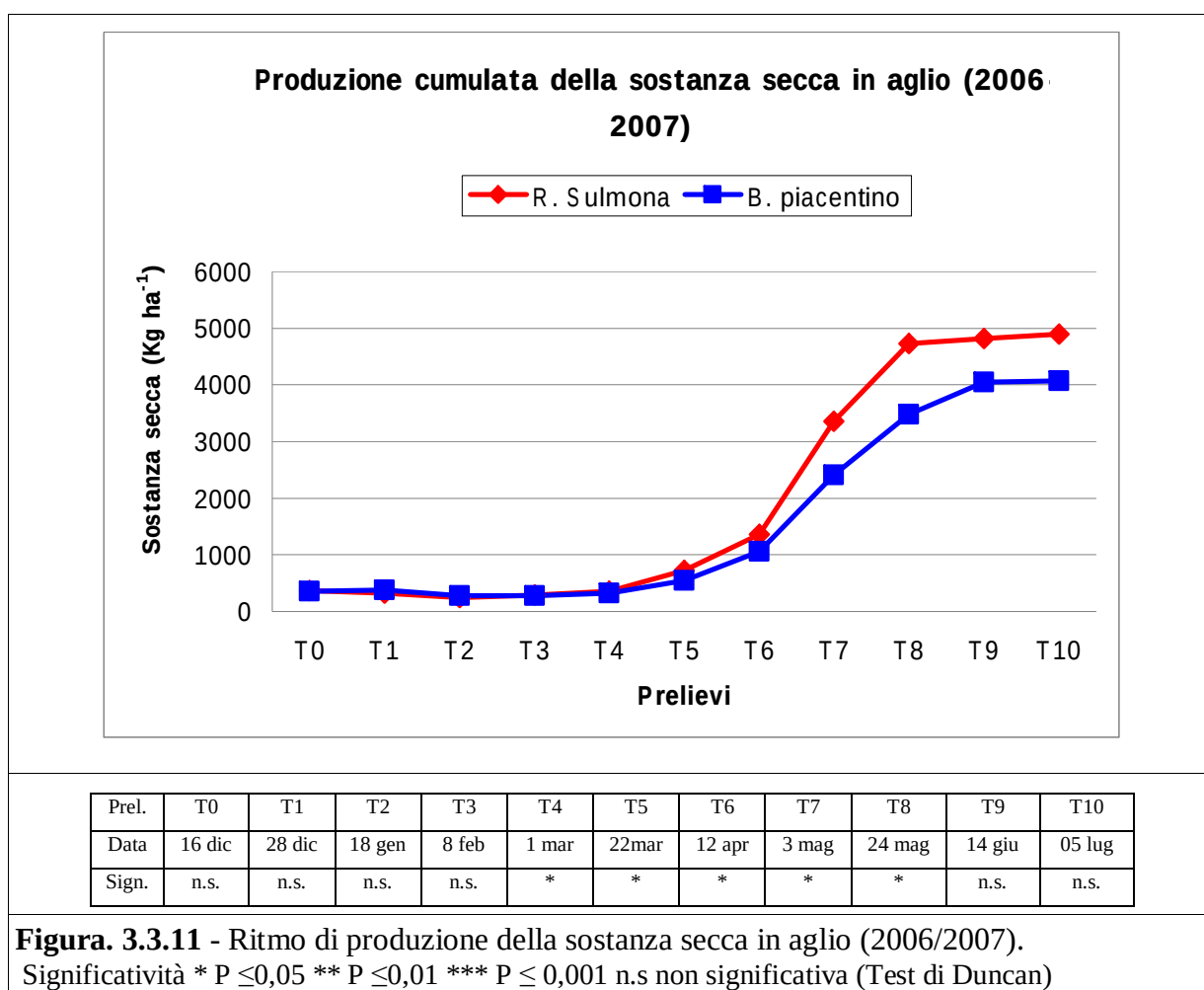
Infatti, il ‘B. piacentino’ presenta una pendenza della curva meno accentuata nel periodo di massimo accrescimento, rispetto a quella del ‘R. di Sulmona’, ma termina l'accrescimento

circa 20 giorni dopo.

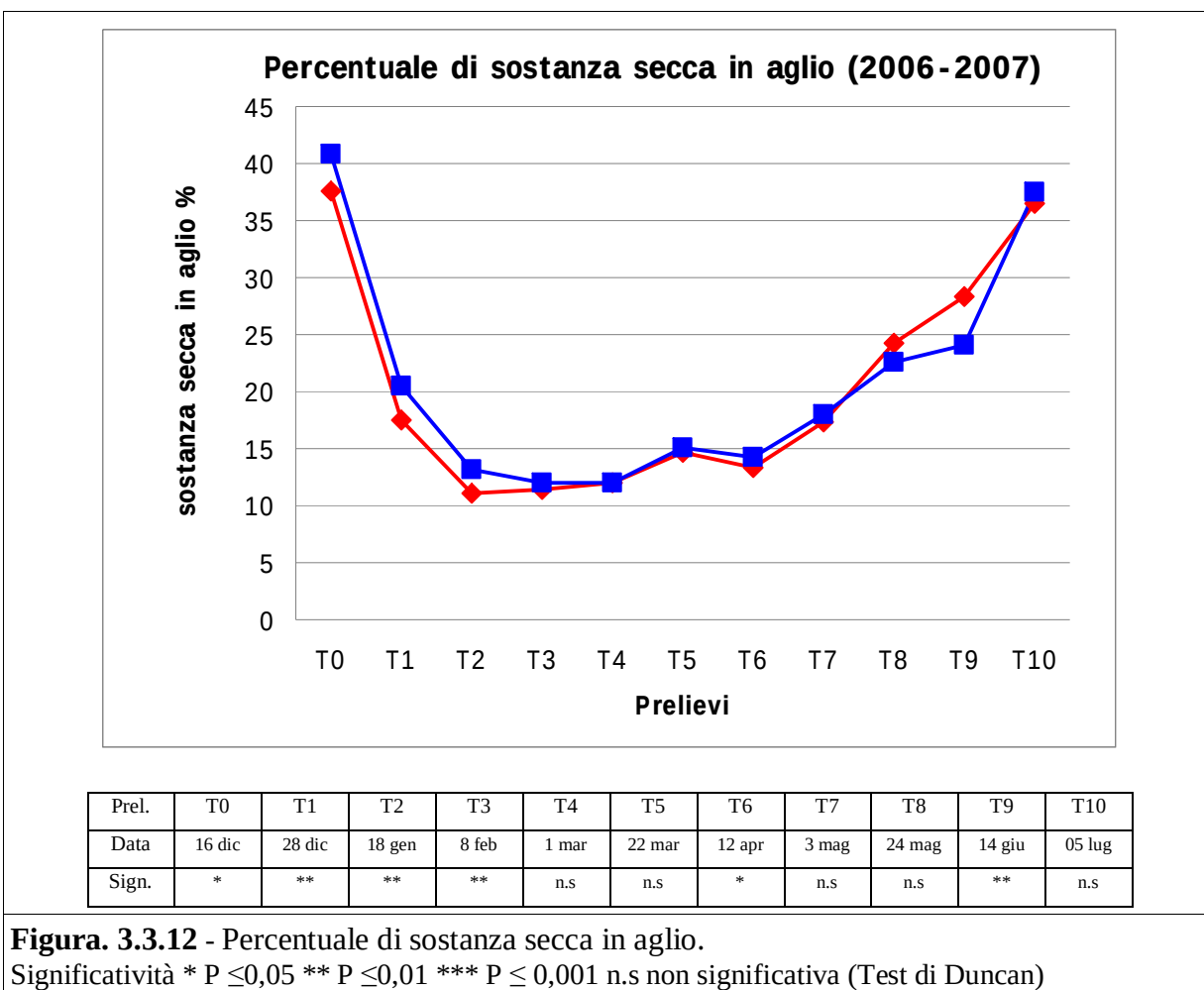
Sulla base dell'andamento della curva di crescita delle due cultivar, è possibile dedurre che il 'R. di Sulmona' va raccolto almeno 20 giorni prima del 'B. piacentino'.

Analizzando la figura 3.3.11, dove è riportata la produzione cumulata di sostanza secca delle due cultivar, si nota che il maggior accumulo in sostanza secca è stato ottenuto dalla cv R. di Sulmona (4,89 t ha⁻¹), rispetto al 'B. piacentino' (4,06 t ha⁻¹).

La produzione cumulata della sostanza secca durante il ciclo colturale, in base a quanto appare nella figura 3.3.11, può essere diviso in tre stadi: il primo è quello che va dal momento dell'impianto (T0) sino al 1 marzo (T4) nel 'R. di Sulmona' e fino al 21 marzo per il 'B. piacentino'; esso è contrassegnato da una crescita piuttosto lenta delle piante a causa delle basse temperature. Il secondo stadio dura circa 80 giorni e termina il 24 maggio (T8) per il "Rosso" e il 14 giugno (T9) per il "Bianco". In questo periodo si verifica la massima produzione di sostanza secca. Il terzo stadio termina per entrambe le cultivar il 5 luglio con la raccolta (T10) ed è caratterizzato dal disseccamento della parte aerea.



La percentuale di sostanza secca (figura. 3.3.12), calcolata considerando il peso fresco e il peso secco della pianta intera, evolve in modo simile nelle due varietà. Al momento dell'impianto, il bulbo della cv R. di Sulmona presentava valori percentuali di sostanza secca pari a 37,6% mentre quello del 'B. piacentino' valori percentuali di 40,87%.



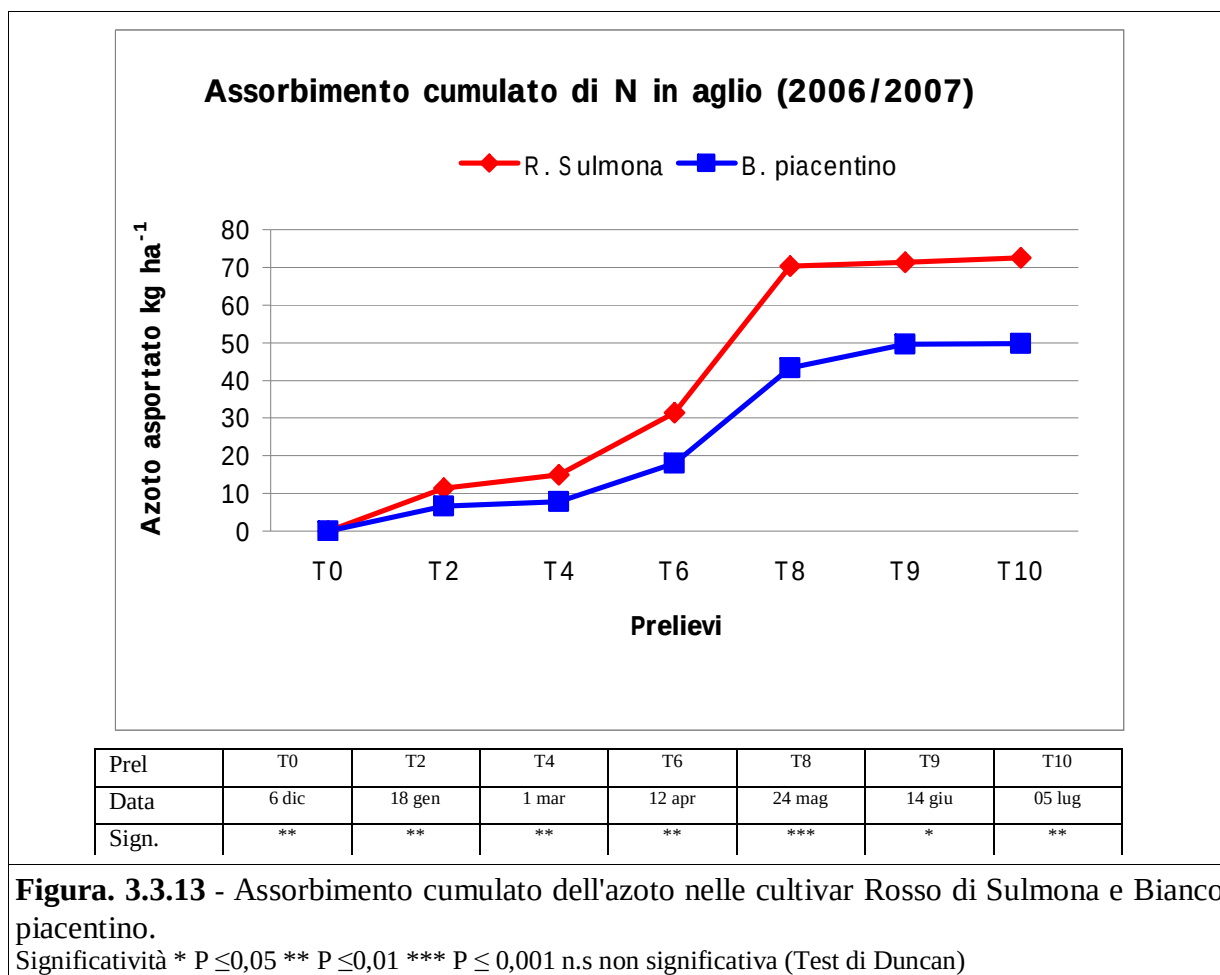
Nelle prime fasi del ciclo colturale, la percentuale di sostanza secca della pianta intera, in entrambe le cultivar, ha subito una flessione fino ad arrivare a valori di circa il 12% attorno a marzo, per poi aumentare raggiungendo i valori di partenza a fine ciclo.

In figura 3.3.13 è rappresentato l'assorbimento cumulato dell'azoto durante il ciclo colturale delle due varietà oggetto di prova.

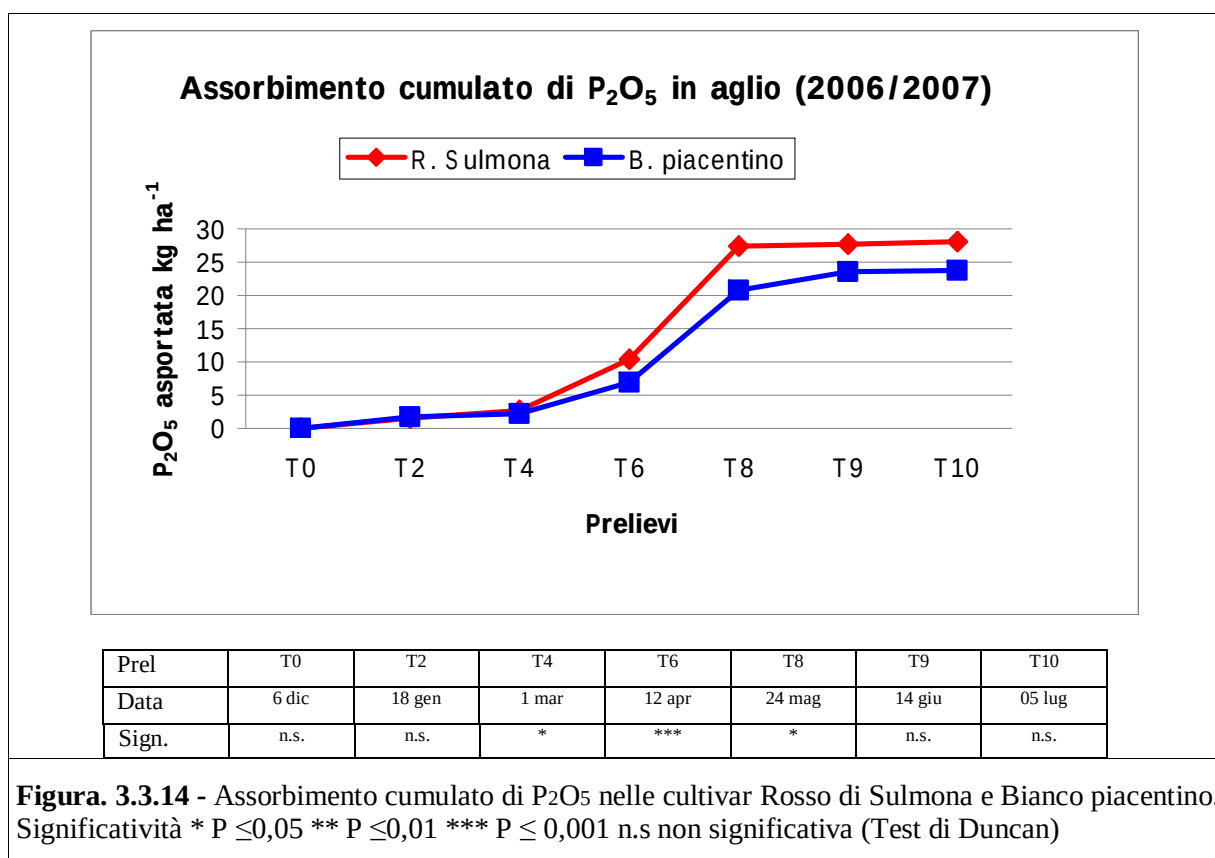
Dal momento dell'impianto fino al quarto prelievo, effettuato in data 1 marzo, la quantità d'azoto asportata, espressa in kg ha^{-1} , si è mantenuta costante intorno a valori di $12,55 \text{ kg ha}^{-1}$, per la cv R. di Sulmona, e intorno a valori di $7,01 \text{ kg ha}^{-1}$ per la cv B. piacentino.

Il massimo ritmo di assorbimento dell'azoto avviene in concomitanza del periodo di maggiore sviluppo della coltura. Le asportazioni più significative per la cv R. di Sulmona avvengono tra

il prelievo T4 (1 marzo) e il prelievo T8 (24 maggio); per il 'B. piacentino' più tardivo, tra il prelievo T4 e T9 (14 giugno). Infatti, nei periodi suddetti, si passa da valori d'azoto asportato di 14,94 kg ha⁻¹ a ben 70 kg ha⁻¹ per il 'R. di Sulmona' e da valori di 7,83 kg ha⁻¹ a 49,58 kg ha⁻¹ per la cv B. piacentino. Nella parte finale del ciclo colturale, in cui la pianta comincia a disseccare, le asportazioni totali di azoto si attestano, per il 'R. di Sulmona' a valori medi di 72,56 kg ha⁻¹ e per la cv B. piacentino a valori medi di 49,84 kg ha⁻¹.

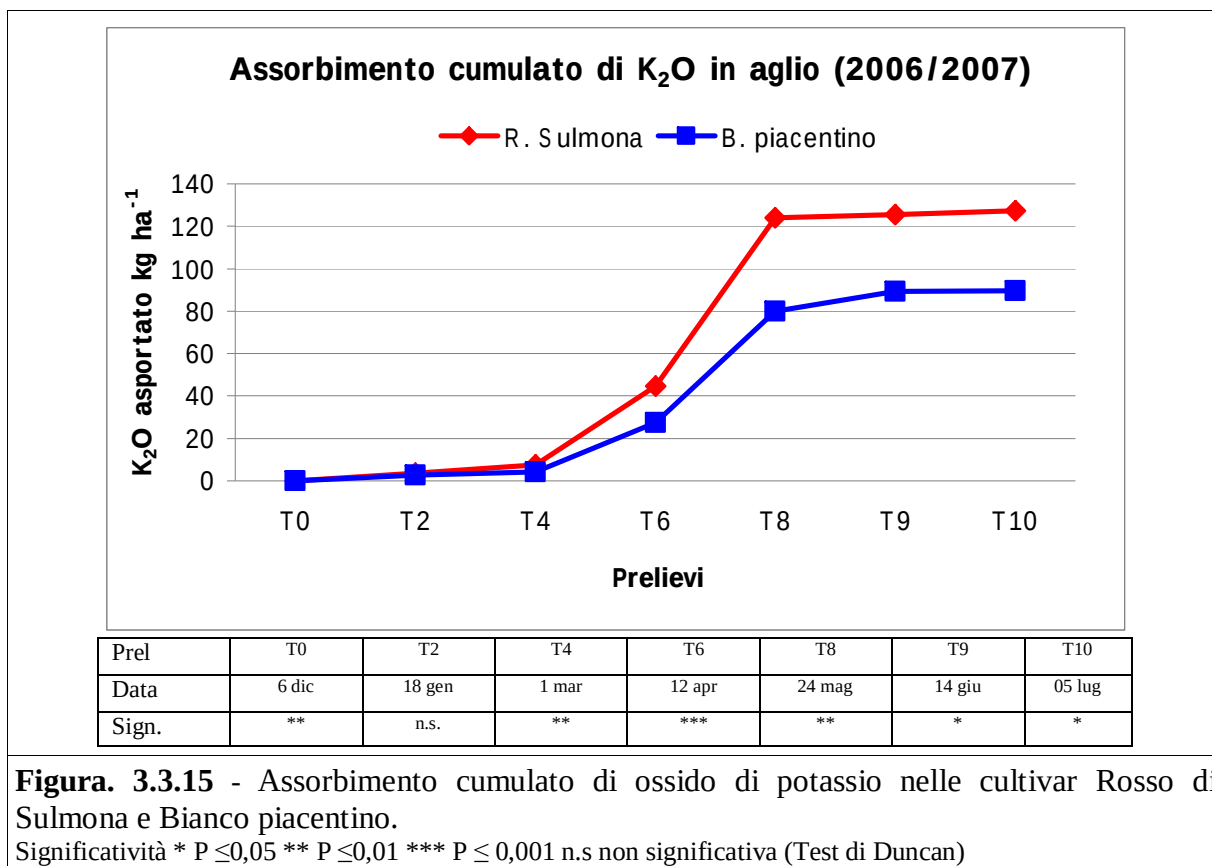


In figura 3.3.14 si riporta l'assorbimento cumulato dell'anidride fosforica durante il ciclo colturale delle cultivar di aglio 'R. di Sulmona' e 'B. piacentino'.



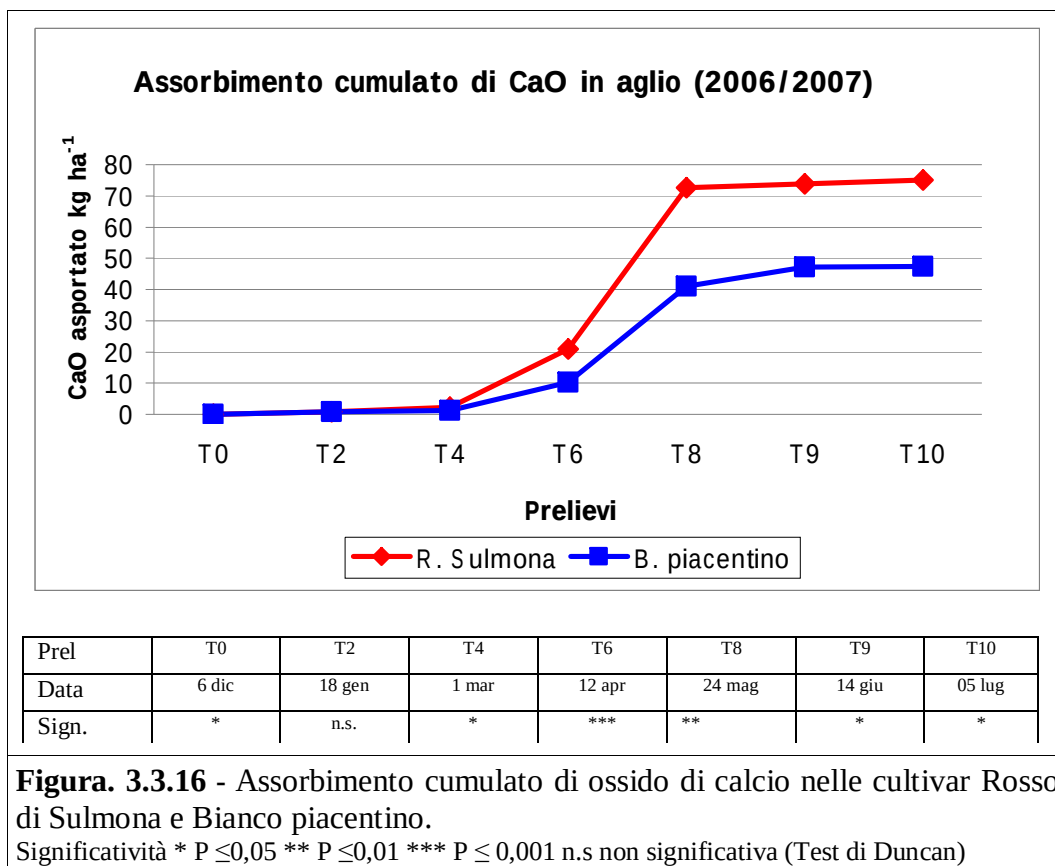
L'andamento delle asportazioni di anidride fosforica ricalca molto da vicino quello osservato per l'azoto. Dall'impianto fino al prelievo T4 (marzo), la quantità di P_2O_5 asportata risulta essere di $2,67 \text{ kg ha}^{-1}$ per la cv R. di Sulmona e di $2,18 \text{ kg ha}^{-1}$ per il 'B. piacentino'. Da marzo fino a fine maggio, la cv R. di Sulmona ha il massimo assorbimento giungendo a valori di $27,38 \text{ kg ha}^{-1}$ di anidride fosforica asportata; nell'ultima parte del ciclo colturale, quando la pianta comincia a disseccare, le asportazioni totali si attestano a valori di $28,06 \text{ kg ha}^{-1}$. La cv B. piacentino, nel periodo che va da inizio marzo fino alla metà di giugno, giunge a valori di asportazioni totali di anidride fosforica di $23,6 \text{ kg ha}^{-1}$, non subendo in pratica ulteriori variazioni sino alla fine del ciclo colturale.

L'assorbimento cumulato di K_2O delle varietà di aglio esaminate, si mantiene costante nella prima parte del ciclo colturale (a valori complessivi di $6,02 \text{ kg ha}^{-1}$) per il 'R. di Sulmona' e (a valori complessivi di $3,85 \text{ kg ha}^{-1}$) nella cv B. piacentino (figura. 3.3.15).



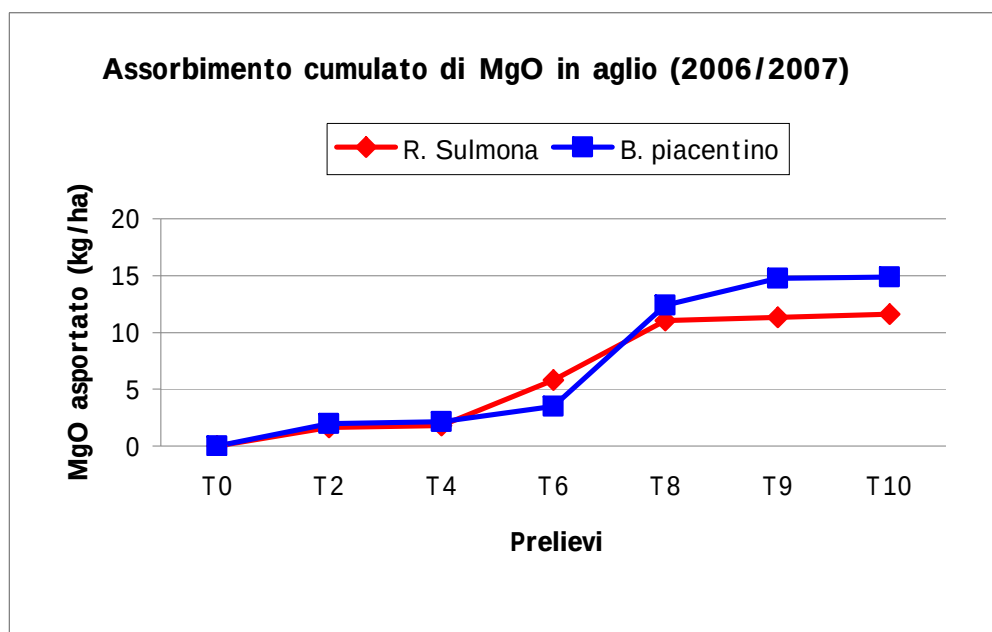
Da marzo a fine maggio la cv R. di Sulmona arriva ad asportare fino a 123,95 kg ha⁻¹ di ossido di potassio, mentre la cv B. piacentino nello stesso periodo ne asporta solo 79,9 kg ha⁻¹. Da inizio giugno fino a fine ciclo colturale, le asportazioni totali si attestano a 127,22 kg ha⁻¹ nel 'R. di Sulmona' e 89,73 kg ha⁻¹ nel 'B. piacentino'.

Le asportazioni di ossido di calcio sono riportate in figura 3.3.16.



Le asportazioni iniziali di CaO risultano essere di circa 2 kg ha^{-1} per entrambe le cultivar. Il massimo assorbimento avviene nel periodo marzo-maggio in concomitanza del completamento dello sviluppo vegetativo e dell'ingrossamento del bulbo. I valori totali delle asportazioni a fine ciclo colturale risultano essere per la cv R. di Sulmona $75,09 \text{ kg ha}^{-1}$ mentre per il 'B. piacentino' $47,35 \text{ kg ha}^{-1}$.

Le asportazioni di MgO risultano essere nel 'R. di Sulmona' di $1,66 \text{ kg ha}^{-1}$ ad inizio ciclo e di $11,6 \text{ kg ha}^{-1}$ a fine ciclo colturale, con un ritmo di assorbimento massimo tra marzo e maggio. Nella cv B. piacentino le asportazioni di MgO passano da valori di circa 2 kg ha^{-1} ad inizio ciclo colturale a valori di $14,86 \text{ kg ha}^{-1}$ a fine ciclo, con un ritmo di assorbimento massimo tra aprile e maggio (figura. 3.3.17).



Prel	T0	T2	T4	T6	T8	T9	T10
Data	6 dic	18 gen	1 mar	12 apr	24 mag	14 giu	05 lug
Sign.	*	n.s.	*	***	**	*	*

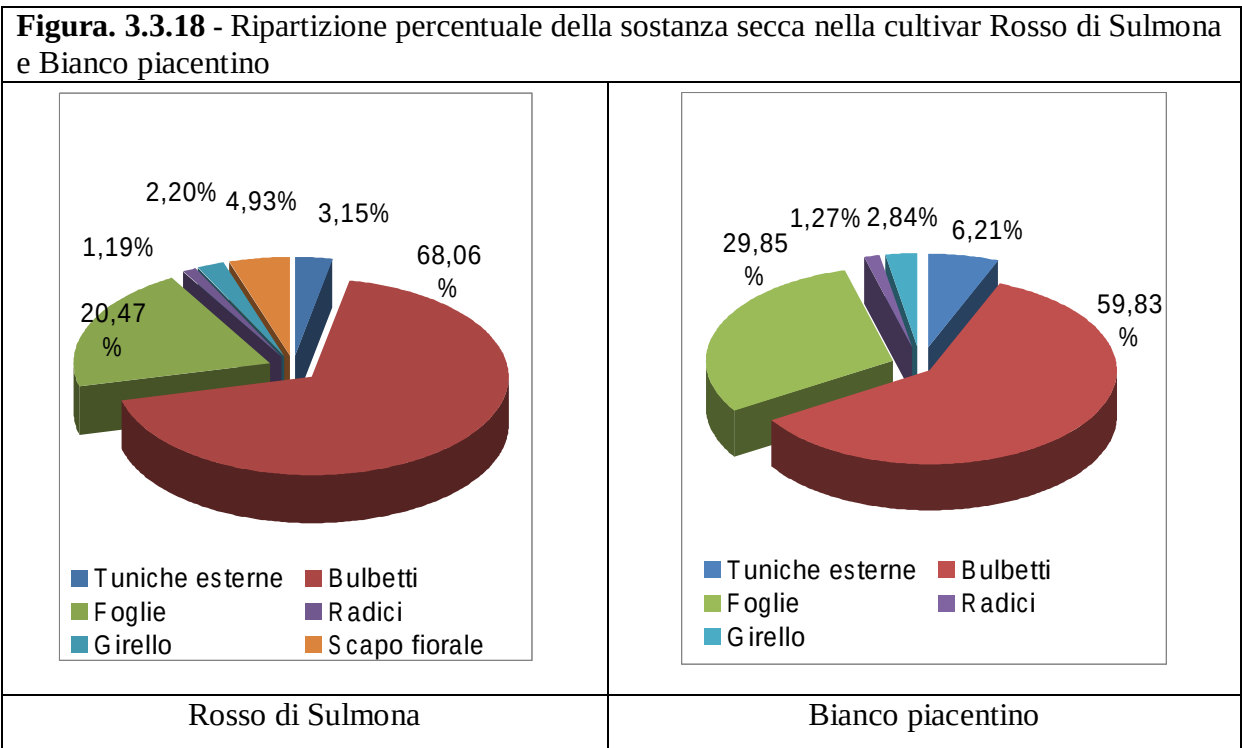
Figura. 3.3.17 - Assorbimento cumulato di MgO nelle cultivar Rosso di Sulmona e Bianco piacentino.

Significatività * $P \leq 0,05$ ** $P \leq 0,01$ *** $P \leq 0,001$ n.s non significativa (Test di Duncan)

In figura 3.3.18 è possibile notare la ripartizione percentuale della sostanza secca nelle diverse componenti della pianta delle due cultivar esaminate a fine ciclo colturale.

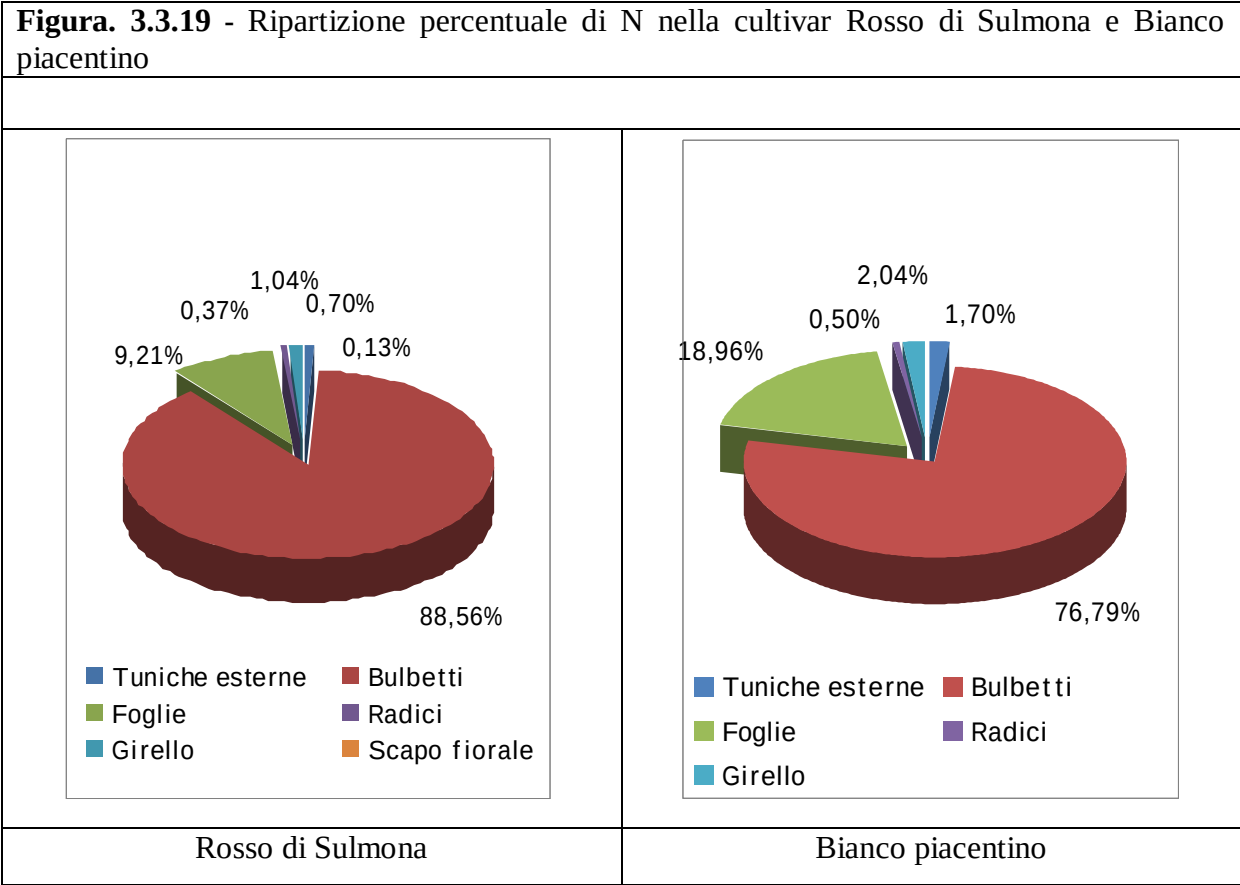
Nella cv R. di Sulmona la sostanza secca è allocata per il 68,06% nei bulbetti, per il 20,47% nelle foglie, per il 4,93% nello scapo florale, per il 3,15% tuniche esterne, per il 2,20% nel girello e per l'1,19% nelle radici.

Nella cv B. piacentino la sostanza secca al momento della raccolta è ripartita per il 59,83% nei bulbetti, per il 29,85% nelle foglie, per il 6,21% nelle tuniche esterne, per il 2,84% nel girello e per il 1,27% nelle radici.



Confrontando i dati relativi alle due cultivar, si osserva un maggiore accumulo di sostanza secca nei bulbetti nella cv R. di Sulmona, mentre nella cv B. piacentino si hanno valori maggiori nelle foglie e nelle tuniche esterne del bulbo.

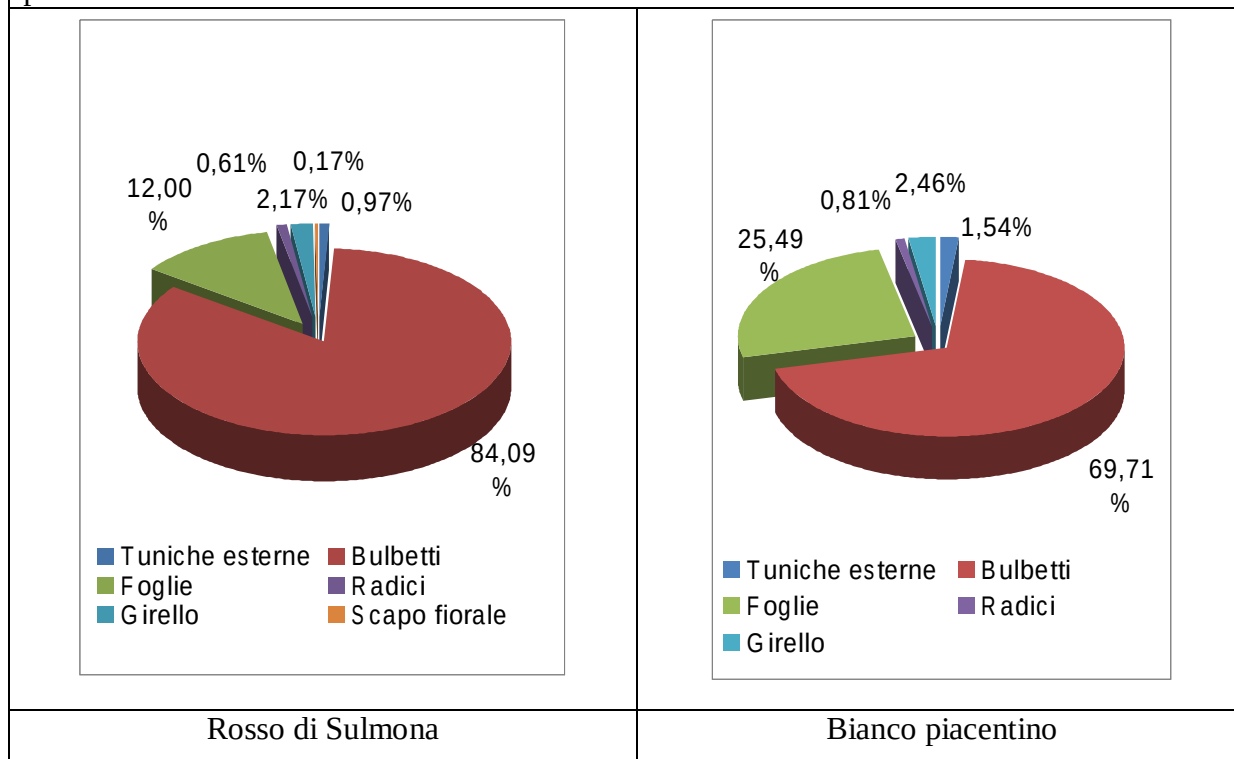
In figura 3.3.19 viene rappresentata la ripartizione percentuale dell’azoto assorbito nelle diverse componenti della pianta di aglio delle due cultivar. In entrambe le cultivar la maggior percentuale di azoto si ritrova nei bulbetti; per l’88,56% nella cv R. di Sulmona e per il 76,79% nel ‘B. piacentino’. Il resto dell’azoto è distribuito in ordine decrescente nelle foglie, nel girello, nelle tuniche esterne e nelle radici.



Il fosforo accumulato durante il ciclo colturale viene ripartito nella cv R. di Sulmona per l’84,09% nei bulbetti, per il 12% nelle foglie, per 2,17% nel girello e in misura minore nelle tuniche esterne, nelle radici e nello scapo fiorale.

Nelle piante della cv B. piacentino, il fosforo asportato si trova allocato per il 69,71% nei bulbetti, per il 25,49% nelle foglie e per il resto nelle tuniche esterne, nelle radici e nel girello. Confrontando i dati, si nota come la cultivar di aglio rosso alloca più fosforo nei bulbetti rispetto al bianco, mentre questo presenta valori maggiori di accumulo nelle foglie (figura. 3.3.20).

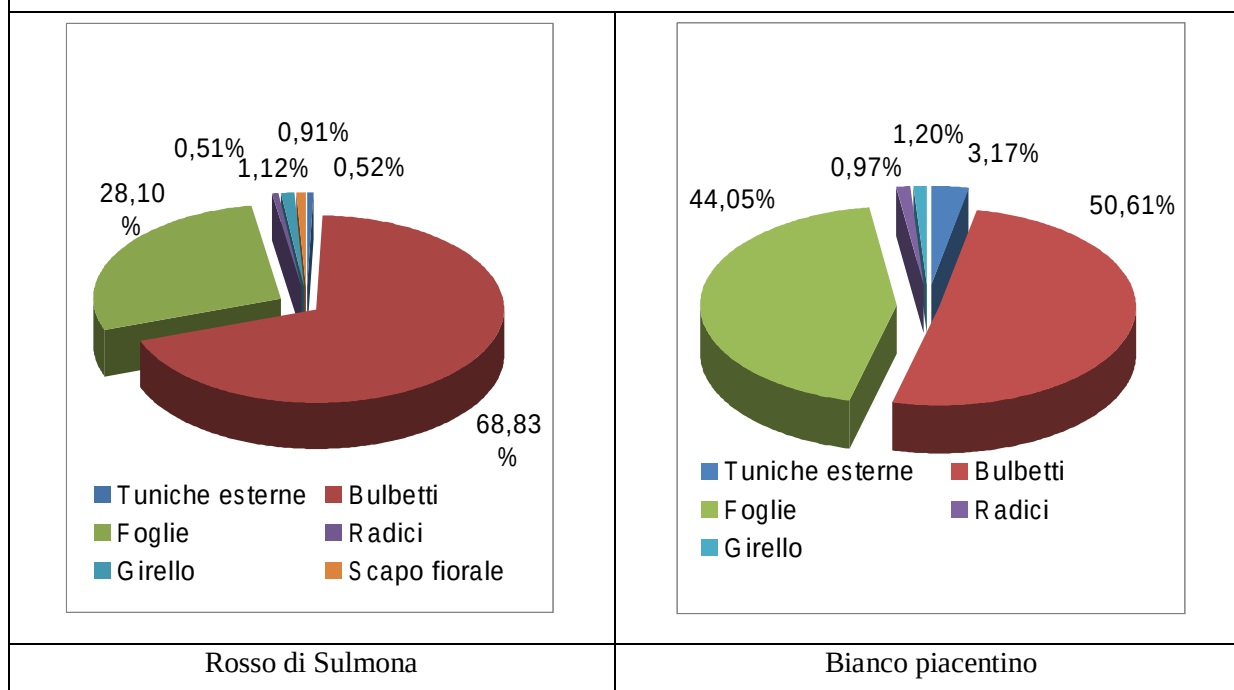
Figura. 3.3.20 - Ripartizione percentuale di P nella cultivar Rosso di Sulmona e Bianco piacentino



A fine ciclo colturale, il potassio si trova accumulato principalmente nei bulbetti e nelle foglie delle piante di entrambe le cultivar.

Infatti, la ripartizione percentuale di tale elemento risulta essere nel ‘R. di Sulmona’ del 68,83% nei bulbetti, del 28,10 % nelle foglie e della restante parte nelle altre componenti sopra elencate. Nel ‘B. piacentino’ il potassio è ripartito per la quasi totalità tra bulbetti e foglie (rispettivamente per il 50,61% e per il 44,05%)(figura. 3.3.21).

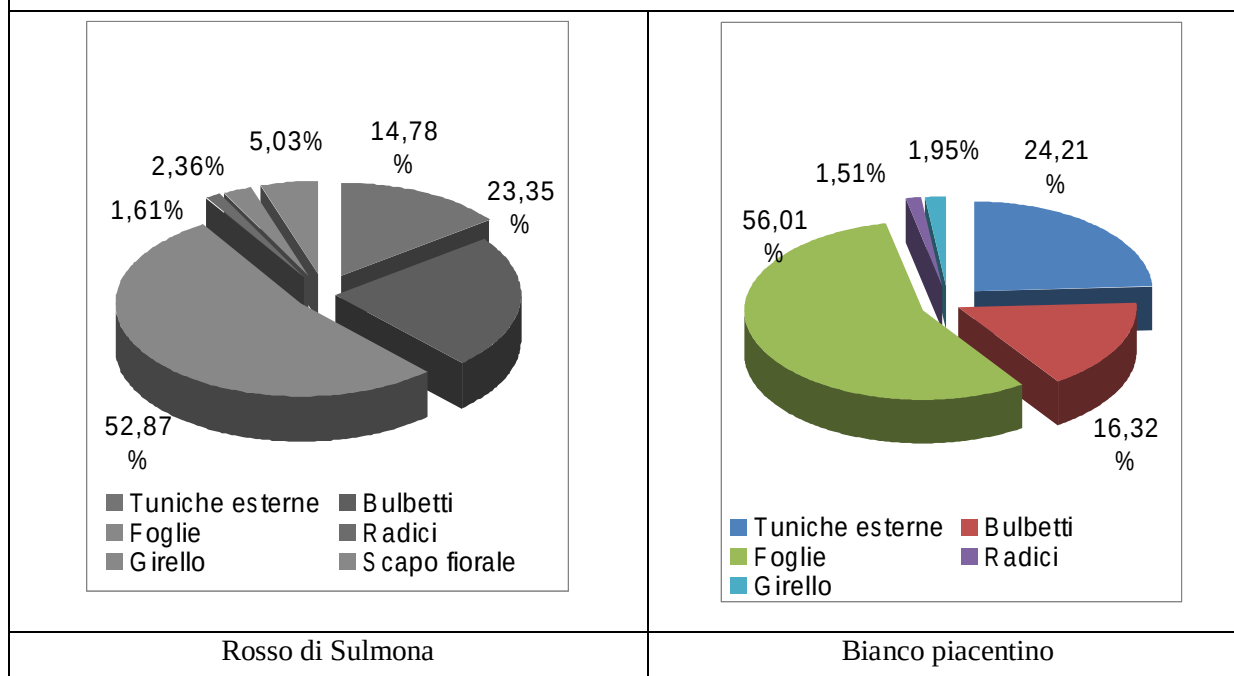
Figura. 3.3.21 - Ripartizione percentuale di K nella cultivar Rosso di Sulmona e Bianco piacentino



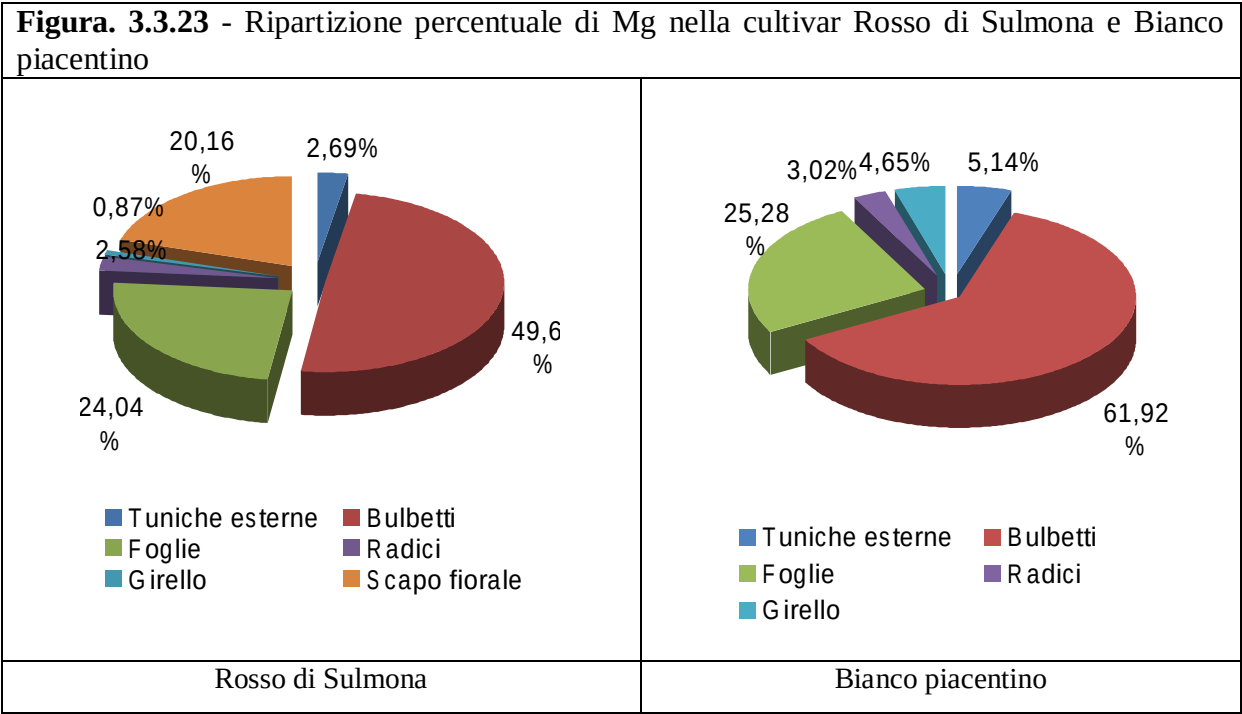
Il calcio viene accumulato per più del 50% in entrambe le varietà nelle foglie. Nel ‘R. di Sulmona’ si ritrova per il 23,35% nei bulbetti e per il 14,78% nelle tuniche esterne, per il 5,03% nello scapo fiorale e in modo minore nelle altre componenti.

Nel ‘B. piacentino’, oltre che nelle foglie, il calcio è accumulato per circa il 20% nelle tuniche esterne e per il 16% nei bulbetti (figura. 3.3.22).

Figura. 3.3.22 - Ripartizione percentuale di Ca nella cultivar Rosso di Sulmona e Bianco piacentino



Nella cv R. di Sulmona il magnesio asportato viene ripartito principalmente nei bulbetti (49,6%), nelle foglie (24%) e nello scapo florale (20%). Nella cv B. piacentino il (magnesio) è allocato per il 62% nei bulbetti, per il 25% nelle foglie e per il resto nelle altre componenti (figura. 3.3.23).



3.4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dalle prove agronomiche oggetto della sperimentazione, limitatamente alle condizioni pedoclimatiche in cui si sono svolte, è stato possibile trarre le seguenti conclusioni:

- tra le cultivar saggiate la varietà R. di Sulmona è risultata particolarmente interessante per l'elevata produttività;
- le cultivar in prova appartenenti alla tipologia “aglio rosso” si sono distinte per la maggior percentuale di “polpa” (parte edule), riferita al bulbo intero, rispetto alla cv B. Piacentino, tipologia “aglio bianco”, ciò comporta una maggiore resa al consumo e alla trasformazione;
- la cv B. piacentino ha presentato valori percentuali di tuniche esterne nel bulbo maggiori rispetto agli altri ecotipi in prova;
- l'andamento termopluviometrico ha fortemente influenzato le rese produttive. Infatti, nel 2008 la produzione media di bulbi delle cultivar in prova è stata superiore rispetto a quella registrata nell'anno precedente. Tale risposta è da attribuire alle copiose precipitazioni atmosferiche verificatesi nella primavera del 2008, che hanno accompagnato la coltura durante la fase di ingrossamento del bulbo. Quindi in annate particolarmente siccitose è consigliabile effettuare interventi irrigui di soccorso nel periodo aprile-maggio, in concomitanza del massimo accumulo della sostanza secca della coltura;
- la cv R. di Sulmona si è distinta dalla cv B. piacentino per il maggior accumulo di sostanza secca e il ciclo vegetativo inferiore.
- l'analisi molecolare realizzata presso il Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica dell'Università degli Studi della Tuscia, Facoltà di Agraria, Viterbo, ha evidenziato per le quattro cultivar in prova R. di Sulmona, R. di Castelliri, R. di Proceno e B. piacentino), una variabilità entro popolazione del 94% e fra popolazione del 6%, presentando anche tra loro una distanza genetica pressoché identica, relativamente ai primers utilizzati. Questi risultati, se pur preliminari, lasciano ampio spazio a programmi futuri di selezione.
- la cv R. di Sulmona, in funzione della maggior produzione di sostanza secca, ha asportato una quantità di elementi minerali superiore rispetto alla cv B. piacentino,

ad eccezione del magnesio che invece è stato assorbito maggiormente da quest'ultima cultivar;

- l'assorbimento degli elementi minerali è avvenuta nel periodo di fine inverno-inizio primavera ed è risultata chiaramente massima in concomitanza con la maggior quantità di sostanza secca accumulata. Pertanto, sulla base dei risultati sopra riportati, si ritiene che la distribuzione dei fertilizzanti nella coltura potrebbe essere convenientemente effettuata al momento dell'impianto per gli elementi poco mobili come il fosforo, potassio, calcio e magnesio. Per quanto riguarda l'azoto, in considerazione sia dell'elevata mobilità che caratterizza questo elemento nel terreno sia dell'esigua quantità assorbita nei primi tre mesi del ciclo colturale, considerato che la coltura ha una taglia ridotta ed è coltivata a file e non ostacola quindi il passaggio delle macchine operatrici, sarebbe opportuno distribuire il fertilizzante azotato in due o più interventi di copertura. Per esempio, nelle aree con inverni più caldi e meno piovosi (fascia costiera), dove il rischio di lisciviazione è ridotto e la coltura presenta un ritmo di accrescimento più precoce, si potrebbe intervenire distribuendo il fertilizzante azotato per 1/3 all'impianto, per 1/3 nella terza decade di febbraio e per 1/3 nella seconda decade di aprile. Nelle aree più interne, dove sono maggiori le precipitazioni invernali, si potrebbe intervenire apportando il concime azotato per una minima parte all'impianto e la restante dilazionarlo in due interventi primaverili.
- nella prova densità colturale le rese ottenute risultano positivamente correlate con le densità d'impianto adottate, mentre il peso medio del bulbo è inversamente correlato con le stesse. Pertanto, sulla base dei risultati registrati e limitatamente alle condizioni pedoclimatiche in cui si è svolta la prova, si ritiene che la distanza interfila di 55 cm, corrispondente ad una densità colturale di 18,18 piante/m², rappresenti un giusto compromesso tra una soddisfacente resa produttiva (7,63 t ha⁻¹) e un buon peso medio del bulbo di 41,57 g. Inoltre, in riferimento al diametro equatoriale del bulbo, si è osservato che in tutte le densità colturali adottate tale parametro ha raggiunto valori superiori ai 45 mm, rientrando così nella categoria commerciale extra (Reg CEE n° 2288/97);
- le rese produttive sono state influenzate dall'epoca d'impianto nell'anno 2007. Infatti, entrambe le cultivar in prova hanno raggiunto livelli produttivi massimi nella prima

epoca di impianto (20 novembre).

Nel secondo anno di prova si è riscontrato un diverso comportamento delle cultivar rispetto ai trattamenti; infatti, mentre il 'R. Sulmona' ha espresso la massima potenzialità produttiva in tutte e tre le epoche, il 'B. piacentino' ha fornito rese significativamente inferiori rispetto al R. di Sulmona in tutte le epoche di semina, ed in particolare nella terza epoca.

Tale comportamento è imputabile alla minore precocità della cv B. piacentino che ha quindi risentito maggiormente della carenza idrica e delle alte temperature caratteristiche dei mesi di giugno e luglio della zona sede della sperimentazione. Pertanto, nel biennio oggetto di studio, sulla base dei dati ottenuti, si ritiene che nelle nostre zone l'impianto per la cv B. piacentino debba essere convenientemente effettuato tra la fine di novembre e inizio dicembre mentre per la cv R. Sulmona questo può anche essere procrastinato a fine dicembre senza problemi. Si sconsigliano invece impianti tardivi (ad esempio a gennaio) in quanto, in annate caratterizzate da scarse precipitazioni e alte temperature primaverili-estive, le rese produttive subiscono forti decurtazioni in regime non irriguo.

CAPITOLO 4

Diagnosi e caratterizzazione del complesso virale in piante di aglio (*Allium sativum* L.), derivanti da bulbilli italiani e da bulbi in commercio disponibili sul mercato californiano.

4.1 INTRODUZIONE

I virus delle piante ortive sono fra i patogeni che più stanno causando gravi danni economici alle coltivazioni. I virus sono definiti semplicemente “entità infettive”, in quanto non possono essere definiti “organismi viventi” non essendo formati da cellule, ma semplicemente da una molecola di acido nucleico, costituito da DNA oppure RNA, inclusa in un involucro generalmente di natura proteica (capside). Esistono infine delle entità infettive “nude”, costituite dal solo frammento di acido nucleico, definite viroidi. I virus che infettano le piante, hanno per la maggior parte come acido nucleico l’RNA. I virus non sono capaci di riprodursi autonomamente, infatti per la loro moltiplicazione necessitano di una cellula vivente; non sono dotati di un proprio metabolismo e non sono in grado di rispondere a sollecitazioni ambientali.

I virus hanno dimensioni piccolissime da circa 0,03 a 0,30 micrometri, queste dimensioni gli permettono di non essere trattenuti da filtri batterici, pertanto sono visibili solo al microscopio elettronico. Le malattie delle piante provocate da virus chiamate in generale virosi, in grado di generare numerosi danni, sia qualitativi che quantitativi, sia nel settore agrario che in quello relativo alla produzione di piante da fiore ed ornamentali.

I virus, non essendo considerati dei veri e propri organismi e non potendo essere quindi inseriti in nessuno dei regni che raggruppano i viventi, non seguono i parametri generali di classificazione e di nomenclatura che regolano la sistematica dei viventi. Attualmente la nomenclatura più usata è quella che mette in relazione il sintomo con l’ospite (Koike, 2007).

La classificazione dei virus si basa su diversi parametri: il tipo di acido nucleico (RNA o DNA), la sua presenza in forma di singola o doppia elica, la forma e dimensione delle particelle virali, la presenza o meno dell’involucro lipoproteico, la struttura del capsido e da tante altre caratteristiche. I virus possono anche essere identificati in base alle loro modalità di replicazione.

Il decorso delle malattie virali comprende una prima fase di inoculazione, una seconda fase di moltiplicazione, per finire con la loro diffusione all’interno della pianta infetta, quest’ultima fase può avvenire con differenti modalità, dando origine ad infezioni localizzate oppure a infezioni sistemiche. La trasmissione dei virus da una pianta infetta ad una sana, può avvenire principalmente in due maniere, tramite trasmissione diretta indiretta. La trasmissione diretta si verifica prevalentemente in seguito alla propagazione vegetativa di piante infette

(talee, innesto), oppure tramite contatto diretto di organi vegetativi, attraverso seme infetto e più raramente attraverso il polline, mentre la trasmissione indiretta si verifica per mezzo di un vettore che può essere animale (insetti, acari, nematodi, molluschi ecc.) oppure vegetale, e in particolare attraverso piante parassite come la Cuscuta e certi funghi presenti nel terreno. Gli insetti costituiscono una delle più comuni vie di trasmissione dei virus, e gli insetti più importanti a riguardo sono quelli ad apparato boccale pungente-succhiante, come i Rincoti (afidi, cicaline e psille), i Tisanotteri, i Coleotteri e gli Ortotteri. Questa trasmissione dovuta agli insetti può avvenire attraverso due modalità: persistente e non persistente, trasmissioni che dipendono più dal tipo di virus che dall'insetto (Fonte: CRSA, 2008).

Le infezioni causate da virus determinano molte anomalie nel metabolismo dei vegetali, le più importanti sono: alterazione del processo fotosintetico, deviazione del metabolismo dei carboidrati con accumulo di zuccheri a cui seguono fenomeni di accartocciamento fogliare, e diminuzione delle sostanze di crescita (auxine) per la sintesi di sostanze inibenti. Le modificazioni fisiologiche indotte dall'infezione virale, si manifestano con vari sintomi, che interessano tutta la pianta (nanismo o gigantismo) oppure localizzati sui vari organi: foglie (arricciamento, accartocciamento, bollosità, polifilia, mosaicature, giallume, bronzatura, rotture di colore, necrosi ecc.), fiori (variegature, screziature, inverdimento dei petali, deformazioni ecc.), frutti (litiasi, gibbosità, bronzatura, necrosi ecc.).

Negli ultimi anni le malattie virali si sono sempre più diffuse, sia per gli scambi commerciali sia per l'importazione di materiale di moltiplicazione molte volte infetto, nonché per l'introduzione di nuovi vettori naturali. La terapia delle malattie virali praticamente non esiste, in quanto attualmente non ci sono dei fitofarmaci antivirali, pertanto le principali modalità di prevenzione si basano su diverse strategie, come: distruzione dei vegetali infetti che rappresentano fonti di inoculo, scelta di varietà resistenti o tolleranti, lotta ai vettori animali, eliminazione di piante infestanti o spontanee possibili ospiti secondari di alcuni virus, impiego di seme o di materiale di propagazione vegetativa sicuramente sano, disinfezione delle mani ed attrezzi mediante lavaggi con una soluzione al 10% di fosfato sodico, distruzione di tutti i residui della coltura precedente e sterilizzazione del terreno. Attualmente è possibile, mediante opportune tecniche ottenere materiale sano partendo da materiale infetto, queste tecniche sono la termoterapia e la coltura dei meristemi (Fonte: INEA, 2008).

La diagnosi delle virosi non può basarsi solo sulla sintomatologia che molto spesso è aspecifica e poco individuabile, ma occorre generalmente effettuare indagini di laboratorio, microscopiche e sierologiche. Tra le reazioni sierologiche che attualmente vengono impiegate

vi è il test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), ossia metodo di immuno-assorbimento e marcatura enzimatica, questo test essendo molto sensibile prevede l'impiego di materiale (antisiero e antigene) molto purificato (Fonte: Regflor, 2008). Per l'esatta diagnosi delle virosi sono necessari anche saggi biologici, basati sull'inoculazione di piante indicatrici erbacee. Per i controlli sanitari accanto alle due sopra citate, vengono sempre più spesso adottati controlli con microscopia a fluorescenza DAPI (4', 6 Diamidino-2-Phenylindole) e tecniche di biologia molecolare come la PCR (Polymerase Chain Reaction), permettono l'amplificazione di una specifica sequenza di DNA bersaglio (Ferrari *et al.*, 2001). Dal punto di vista della sanità del "seme", si ritiene che le coltivazioni dell'aglio siano tutte più o meno affette da virus. La moltiplicazione vegetativa attraverso i bulbetti, assicura la continuità delle infezioni e quindi della malattia, riducendo progressivamente la qualità e la resa delle coltivazioni. La coltivazione di meristemi preceduta da termoterapia, è finora l'unica via possibile per il risanamento, pur non rappresentando una soluzione definitiva, in quanto la coltura di meristemi non permette di eliminare i virus latenti. Molti studi hanno evidenziato che le piante provenienti da "seme" risanato, aumentano le rese dal 40 al 60% nelle varietà "R. Paraguay" e "Blanco", presentando differenze rilevanti per quanto riguarda la vigoria, il colore e l'aspetto generale della pianta (Conci, *et al.*, 1986; Sosa *et al.*, 1995). Un'alternativa per la generazione di nuova variabilità è costituita dall'utilizzo di tecniche di coltura in vitro. L'induzione di callo da meristemi, foglie, disco o bulbilli aerei e la successiva rigenerazione, da origine a variabilità somaclonale. In questo senso è interessante la produzione di poliploidi caratterizzati da bulbi più grandi e con minor numero di spicchi (Novak, 1990; Maggioni *et al.*, 1989).

Il primo passo da fare per la diagnosi dei virus responsabili delle più gravi virosi, è quello di fare una attenta analisi molecolare. Vista la mancanza di programmi di certificazione virale in aglio, si può affermare come il materiale propagativo sia generalmente affetto da *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Alexivirus*, includendo in questo ultimo gruppo *Garlic virus A-D*, *Shallot virus X* (ShVX) e *Garlic virus X* (GVX) (Chang *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1979; Marys *et al.*, 1994; Nogakubo *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1995; Sumi *et al.*, 1993; Tsuneyoshi and Sumi, 1996; van Dijk, 1993; Yamashita *et al.*, 1996; Helguera *et al.*, 1997; Shibboleth *et al.*, 2001; Song *et al.*, 1998). Al genere *Carlavirus* fanno parte: *Garlic common latent carlavirus* (GCLV), *Shallot latent carlavirus* (SLV) e *Garlic latent carlavirus* (GLV), tutti identificati in piante di aglio (Fajardo *et al.*, 2001). I *Carlavirus* non sono però considerati la causa di gravi sintomi se presenti in singole infezioni (van Dijk, 1993b). GCLV

è stato descritto in Brasile (Daniels, 1999) e in Italia (Dovas and Volvlas, 2003), mentre SLV è stato descritto in Grecia (Dovas *et al.*, 2001).

Al genere *Potyvirus* fanno parte: *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV), entrambi descritti in Grecia (Dovas *et al.*, 2001), Brasile (Daniels, 1999; Fajardo *et al.*, 2001), Giappone (Takaichi *et al.*, 1998, 2001), Italia (Dovas and Volvlas, 2003), e ulteriori studi su LYSV sono stati fatti in Argentina (Conci *et al.*, 2002). Gli *Alexivirus* sono stati descritti in Grecia (Dovas *et al.*, 2001), ed in Giappone (Takaichi *et al.*, 1998), i sintomi riportati da questi virus sono riconducibili a delle striature di un verde più o meno intenso, in grado di interessare tutta la lamina fogliare dell'aglio (Barg *et al.*, 1997; Takaichi *et al.*, 1998; Daniels, 1999).

Il GCLV si presenta sotto forma filamentosa, con una lunghezza di circa 650 nm, descritto a pieno solo nel 1981, singole infezioni di questo virus solitamente non causano problemi, mentre può causare serie perdite di produzione se in combinazione con altri virus. Questo virus è presente in molte coltivazioni di aglio in quasi tutti i paesi Europei, e diffuso in molte altre aree del mondo (Sud America, Centro America, India, Cina ecc.) (Barg, 1994).

La malattia si manifesta con sintomi molto leggeri o quasi assenti in singole infezioni su aglio e porro, mentre i sintomi causati da *Potyvirus* risultano aggravati e più evidenti in presenza di altri virus come GCLV (Graichen, 1991). In natura il GCLV ha molti ospiti appartenenti alla famiglia delle *Alliaceae*, e principalmente in aglio (van Dijk, 1993). Recenti studi hanno evidenziato la presenza di GCLV in più di 50 specie di aglio appartenenti ad una collezione di germoplasma (Graichen, 1991). Da prove sperimentali fatte, questo virus è stato trovato su diverse piante ospiti quali *Celosia argentea*, *Nicotiana occidentalis*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, su altre specie di *Chenopodium* e su molte altre *Alliaceae* (van Dijk, 1993).

Il GCLV ha una distribuzione cosmopolita. E' stato ben individuato in molti dei paesi che coltivano l'aglio, mentre non è stato individuato in Paesi come Giappone, Taiwan e in Thailandia, dove l'aglio non è una coltura tradizionale (Barg *et al.*, 1994). In questi Paesi il GCLV si può trovare su materiale importato, che verrà venduto direttamente ai consumatori, o impiegato nel processo di valutazione del germoplasma (Barg *et al.*, 1997). Questo virus è trasmesso con una certa difficoltà mediante l'inoculazione meccanica, anche se è sospetta una trasmissione da afidi (van Dijk, 1993; Barg *et al.*, 1994, 1997). Ad oggi non è stata ancora riscontrata una trasmissione da seme, mentre il principale modo di trasmissione di questo virus in aglio, è rappresentato dalla propagazione vegetativa (Bellardi *et al.*, 1995).

I metodi sierologici permettono di determinare con estrema facilità e rapidità la presenza di questo virus, rispetto alle indagini di microscopia. Diversi studi hanno confermato la presenza di uno stretto rapporto tra GCLV e CLV (*Carnation latent virus*) (Barg *et al.*, 1997).

Anche LYSV si presenta sotto forma filamentosa, con una lunghezza approssimativa di 820 nm. Nei Paesi dell'Ovest Europa, le produzioni di aglio sono severamente affette da questo virus, soprattutto nel periodo autunnale e invernale. Recentemente è stato dimostrato, che questo virus può causare una perdita della produzione del 15-50%, interessando direttamente i bulbi di aglio (Lot, *et al.*, 1994). La presenza di questo virus è stata riscontrata in molte *Alliaceae*, con sintomi più o meno simili. In aglio i sintomi si manifestano con irregolari e leggere striature grigio scure, colpendo principalmente le giovani foglie, virando poi ad un giallo a partire dalla base della foglia, fino ad arrivare nella parte distale della lamina. Il virus non determina una significativa riduzione dell'altezza della pianta, ma riduce fortemente il diametro dello "stelo" e dei bulbi. La coinfezione con OYDV accentua fortemente la manifestazione dei sintomi rendendoli indistinguibili (Boss *et al.*, 1978)

In natura l'infezione da LYSV è limitata al genere *Allium* (porro, aglio, cipolla ecc), e ad alcune specie ornamentali dello stesso genere (Bos, 1981). Studi sperimentali hanno dimostrato come piante di *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale* e *C. album*, hanno reagito ad inoculazioni manifestando locali lesioni (Noda *et al.*, 1989). L'infezione da LYSV su aglio è stata riportata per la prima volta da Walkey *et al.*, (1987), e in seguito identificato in quasi tutti i paesi dove l'aglio viene coltivato, manifestando così una diffusione su larga scala. Questo virus è trasmesso da afidi in maniera non persistente e tramite inoculazione meccanica, il ritmo di infezione di questo virus su bulbetti di aglio dipende dall'epoca di infezione, non è stata ancora scoperta una trasmissione da seme, quindi le piante sono l'unica sorgente di infezione (Bos *et al.*, 1978).

I test ISEM (Immunosorbent electron microscopy), sono particolarmente usati per determinare la presenza del virus LYSV, e la possibile presenza di più virus in piante coinfezzate da virus diversi. Il test ELISA, è il test correntemente usato per determinare la presenza di questo virus su foglie e bulbetti (Barg, 1995). Dal punto di vista sierologico, questo virus è lontanamente imparentato con l'OYDV (*Onion yellow dwarf virus*), mentre presenta una certa relazione con altri due *Potyvirus* che infettano il genere *Allium*: *Welsh onion yellow stripe virus* e *Shallot yellow stripe virus* (van Dijk, 1993; Barg, 1995).

Come gli altri virus OYDV si presenta sotto forma filamentosa, con una lunghezza approssimativamente di 775 nm. L'OYDV può essere molto nocivo, e le colture più

suscettibili ad attacchi sono la cipolla e scalogno, specialmente dove non vengono attuate le procedure sanitarie. Diversi studi hanno determinato l'incidenza di questo virus in molti paesi del mondo, dove sulla cipolla l'incidenza può salire fino ad un 50% (Melhus *et al.*, 1929).

La crescita stentata è il principale sintomo nella cipolla, le foglie si presentano inizialmente con irregolari striature gialle che con il passare del tempo interessano tutta la foglia, la quale perde turgore e si ricurva verso il basso, manifestando anche appiattimenti e contrazioni lungo l'intera lamina. Spesso i sintomi si manifestano anche su prodotti immagazzinati, promuovendo una precoce germogliazione dei bulbi. In aglio le irregolari striature gialle si possono essere più o meno tenui, fino ad arrivare ad un giallo molto vivace, questo dipende dalla presenza di un singolo virus o se c'è coinfezione con altri virus con un conseguente aggravamento dei sintomi. Oltre alle striature gialle sulle foglie, il virus promuove l'arresto della crescita della pianta con conseguente riduzione delle dimensioni del bulbo (Bos, 1976).

Questo virus in natura colpisce solo le specie appartenenti al genere *Allium*, tranne che il porro, il quale sembra apparentemente non essere affetto da questo virus. Da prove sperimentali sono emerse singole infezioni su piante di *Chenopodium mural* (Delecolle and Lot, 1981). La distribuzione di questo virus risulta essere cosmopolita, causando danni più o meno pesanti in base alle diverse aree geografiche mondiali (Marys *et al.*, 1994).

L'OYDV è trasmesso, in maniera non persistente da oltre 50 specie di afidi, e attraverso una inoculazione meccanica (Bos, 1976), mentre non è stata riportata alcuna trasmissione da seme (Louie and Lorbeer, 1966). Le principali vie di diffusione di questo virus sono dunque da imputare alla trasmissione dovuta a vettori e attraverso la propagazione vegetativa di ospiti infetti. L'ISEM test e l'ELISA test, sono i due più usati e accreditati test per una precisa e rapida identificazione di questo virus (van Dijk, 1993).

Molte delle piante di aglio coltivate in tutto il mondo, sono infette da vari tipi di virus, manifestando sintomi che vanno da leggere striature fino ad una vera e propria mosaicatura capace di interessare tutta la lamina fogliare, provocando una riduzione della dimensione del bulbo (Ahlawat, 1974). Recentemente sono stati fatti studi, basati sul sequenziamento nucleotidico di alcuni virus di aglio, determinando così le sequenze nucleotidiche di particolari cloni di cDNA di un *Potyvirus* e un *Carlavirus*, capaci di infettare le piante di aglio (Nagakubo *et al.*, 1994; Ryabov *et al.*, 1996; Sumi *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1996). Questi particolari cloni di cDNAs presentano strutture simili al virus X dello scalogno (ShVX) (Kanyuka *et al.*, 1992), ma sono stati raggruppati ad un nuovo gruppo di virus strettamente collegato ai *Potyvirus* e *Carlavirus* (Tsuneyoshi and Sumi, 1996). Questo nuovo

gruppo di virus determinato tramite il completo sequenziamento nucleotidico, va sotto il nome di virus X dell'aglio, ed è responsabile delle più importanti infezioni in aglio, causando pesanti striature e mosaicature sull'intera lamina fogliare, sia in tutta Europa che in Giappone. La completa sequenza nucleotidica del cDNA del virus X dell'aglio (GVX), ha evidenziato come questo virus sia caratterizzato da un singolo filamento di RNA virale, costituito da 8106 nucleotidi. In conclusione GVX non può essere classificato come *Potyvirus* e *Carlavirus* pur avendo proteine virali simili, ma viene considerato un membro separato di un nuovo gruppo di virus che includono l'ShVX e il GVX (Song *et al.*, 1998).

Le piante di aglio sono generalmente infette non da un singolo virus, ma da un mix di virus. La presenza di numerosi virus aggrava sempre più la sintomatologia, con una conseguente riduzione sia della qualità che della produttività (Davis, 1995; Walkey and Antill, 1989; Lot *et al.*, 1998). Considerando gli aspetti sopra descritti, l'obiettivo del seguente lavoro è stato quello di esaminare la presenza di quattro importanti virus quali LYSV, OYDV, GCLV, GVX, nel germoplasma di bulbilli di aglio in due importanti cultivar Italiane "Rosso di Sulmona" e "Bianco piacentino". I virus presenti sul materiale Italiano, sono stati comparati con i virus isolati da aglio in commercio proveniente dalla California, Cina e Argentina acquistato presso i supermercati della California. La diagnosi delle virosi e la loro attività biologica sono state effettuate usando differenti tecniche di laboratorio quali reazioni sierologiche (ELISA), tecniche di biologia molecolare (RT-PCR), e saggi biologici con piante ospiti indicatrici erbacee.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Sorgente e preparazione del materiale usato

Presso il Dipartimento di Patologia delle Piante, Università della California, Riverside (U.S.A.), con il Dr. Georgios Vidalakis, Direttore del “Citrus Clonal Protect”, sono stati testati per l’incidenza da virus, 200 infiorescenze (generanti bulbilli) di due cultivar di aglio Italiano, “Rosso di Sulmona” e “Bianco piacentino”, provenienti da una collezione di germoplasma, presente presso il Dipartimento di Produzione delle Piante, Università della Tuscia, Facoltà di Agraria, Viterbo, Italia (Fig. 1). Oltre a questo materiale Italiano, sono stati testati 25 bulbi di aglio Cinese, 20 bulbi di aglio Argentino, e bulbi di aglio provenienti della California (U.S.A.), 25 biologici (CA-organic), 15 non biologici (CA-Non-organic) e 10 bulbi di aglio gigante (Elephante garlic) (Fig. 2). Questi bulbi di aglio sono stati acquistati presso alcuni supermercati di Riverside (CA), mentre i bulbilli Italiani sono stati importati dall’Italia tramite un permesso United State Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection - Plant Protection and Quarantine (USDA-APHIS-PPQ).



Fig. 1 – Bulbilli di aglio (*Allium sativum* L.) prodotti dagli scapi fiorali delle due cultivar Italiane. a) bulbilli di aglio prodotti della cultivar Rosso di Sulmona, b) bulbilli di aglio prodotti dalla cultivar Bianco piacentino.

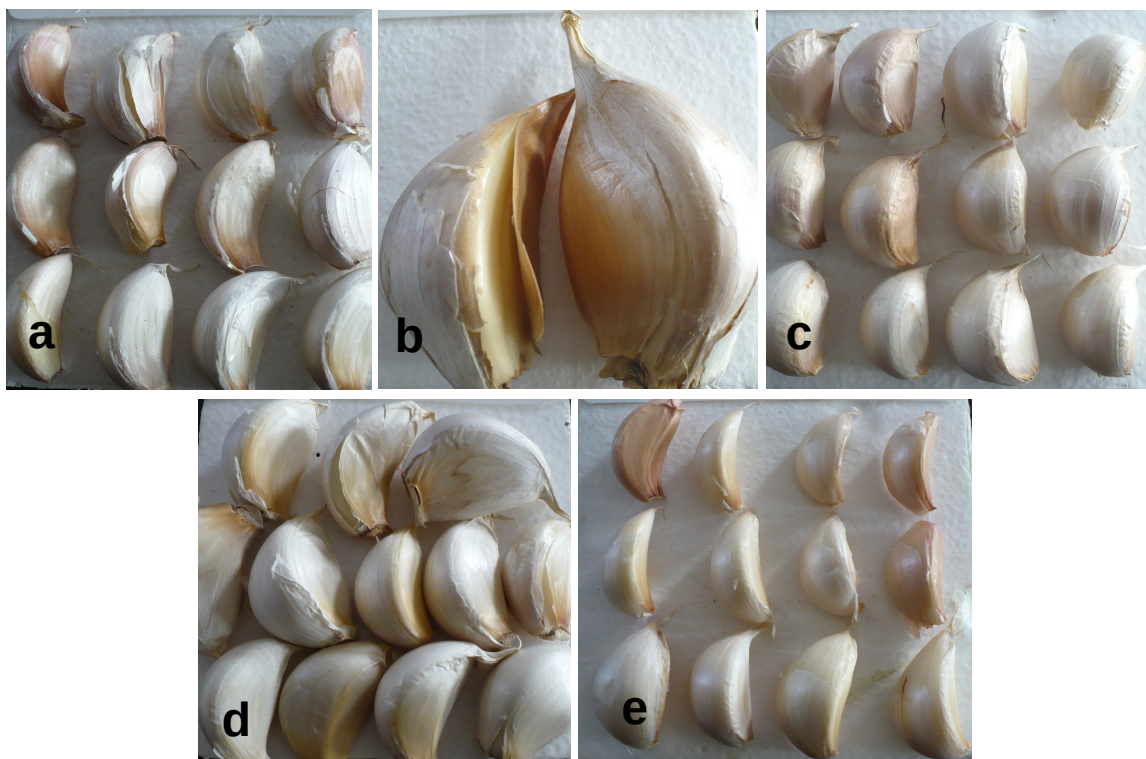


Fig. 2 - Bulbetti di aglio commerciale impiegati nella sperimentazione. a) bulbetti di aglio Cinese, b) bulbetti di “aglio gigante” (Elephant garlic), c) bulbetti di aglio Argentino, d) bulbetti di aglio Californiano prodotto in biologico, e) bulbetti di aglio Californiano prodotto in coltura tradizionale.

I bulbilli delle due cultivar Italiane, sono stati sterilizzati immergendoli in una soluzione di ipoclorito di sodio (10%, v/v) per 5 minuti, poi passati per qualche secondo in etanolo al 95%, infine accuratamente sciacquati in acqua sterile distillata. Successivamente i bulbilli sono stati fatti germinare *in vitro*, su un substrato agar acqua (10% agar DIFCO, Maryland U.S.A.), incubati in una camera di crescita a temperatura controllata di 25 °C, con un fotoperiodo di 16/8 ore (giorno/notte). Dopo 3-4 giorni tutti i bulbilli germinati sono stati trasferiti in vasetti di plastica 11 x 11 x 12 cm, contenenti un terriccio commerciale a base di torba (Supersoil, Rod McLellan Company, San Mateo, CA), miscelato con uno speciale mix di sabbia (sabbia, silice, muschio di torba, dolomite, ossido di potassio e fosfato), prodotto direttamente dall'Università della California, Riverside, e fatti crescere in laboratorio in condizioni di quarantena (Fig. 3).

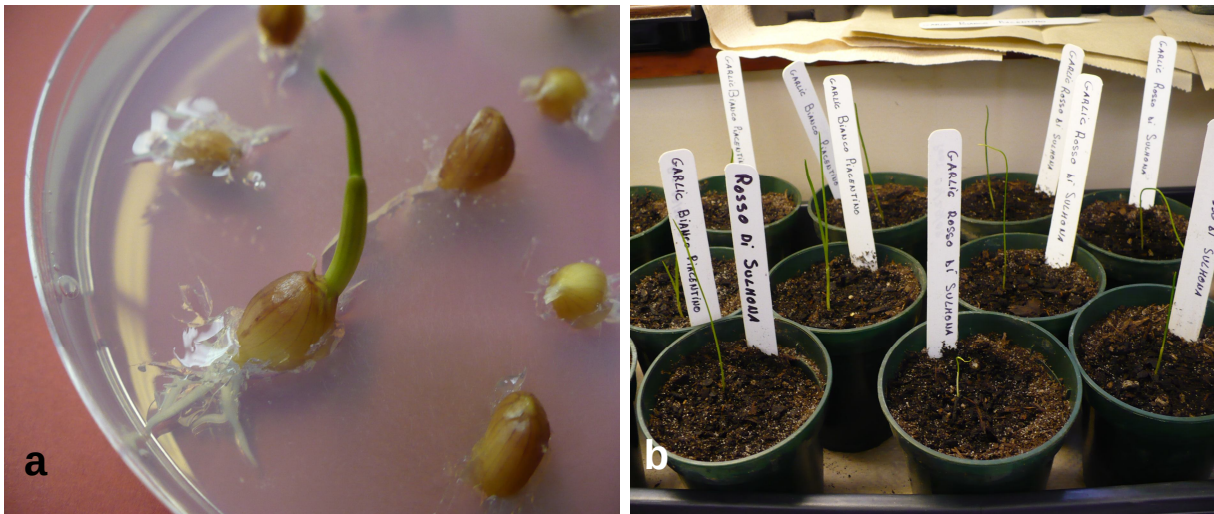


Fig. 3 – Germinazione e trapianto dei bulbilli della cultivar Bianco piacentino. a) germinazione dei bulbilli in vitro, su substrato agar acqua, b) trapianto dei bulbilli in vasetti di plastica su terriccio commerciale

I bulbetti di aglio commerciali, invece sono stati fatti crescere in vasi di plastica 16,5 x 16,5 x 17,5 cm, usando lo stesso mix di terreno descritto sopra, e allevati in una serra a temperatura controllata di 25-38 °C (Fig. 4). Tutte le piante sono state fertilizzate una volta a settimana, con una soluzione nutritiva (Peters Excel[®]), 21-5-20 di N-P-K solubile in acqua (Scotts-Sierra Horticultural Prod. Co Marysville OH). La concentrazione finale degli elementi nutritivi espressa in (µg/ml) nella soluzione nutritiva, risulta essere: N 222.7, P 62.1, K 241.5, Ca 235.1, Mg 48.8, S 64.5, B 0.44, Cu 0.05, C 10.85, Mn 0.62, Mo 0.06, Zn 0.09 e Fe 2.5 (Fig. 5).

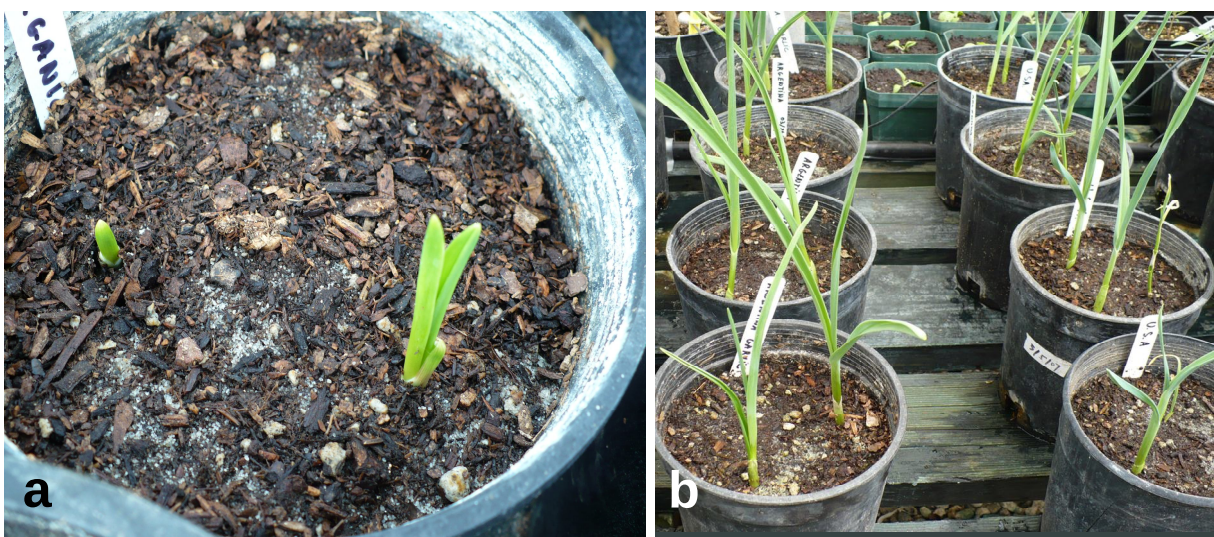


Fig. 4 – Emergenza e allevamento delle piante di aglio usate per la sperimentazione. a) emergenza dei bulbetti di aglio Californiano biologico, b) allevamento delle piante in vaso su bancali, in una serra a temperatura controllata di 25-35 °C.



Fig. 5 – Panoramica della prova sperimentale, aglio in vaso su banchale in una serra a temperatura controllata di 25-35 °C.

4.2.2 Indicatori biologici

L'attività biologica dei virus dell'aglio è stata valutata attraverso l'inoculazione meccanica di piante indicatrici, quali: tabacco (*Nicotiana tabacum* cv “Xanthi” e cv “Turkih”), pomodoro (*Lycopersicon esculentum*), cetriolo (*Cucumis sativum*), e chenopodio (*Chenopodium quinoa*). Queste piante indicatrici sono state fatte crescere in vasi di plastica 11 x 11 x 12 cm, usando lo stesso mix di terreno descritto sopra, e allevati in una serra a temperatura controllata (25-38 °C). Per l'inoculazione meccanica delle piante indicatrici, è stato preso 1g di tessuto fresco di aglio e omogeneizzato in un mortaio con 300 µl di soluzione tampone fosfato di sodio (0,1M) a pH 8.0 (Fig. 6). L'inoculazione è stata realizzata strofinando delicatamente con le mani provviste di guanti, le giovani foglie delle piante indicatrici, spruzzandoci alla fine del carborundum in polvere, come descritto da Hill, (1984). Le piante indicatrici sono state monitorate giornalmente per rilevare l'eventuale sviluppo di sintomi, per un periodo di 16 settimane (Fig. 7).



Fig. 6 – Inoculazione meccanica delle piante indicatrici, con tessuto fresco di aglio omogeneizzato in un mortaio con fosfato di sodio (0,1 M) a pH 8.0 e carborundum.



Fig. 7 – Panoramica delle piante indicatrici in vaso su bancali in serra a temperatura controllata, monitorate giornalmente per rilevare l'eventuale presenza di sintomi.

4.2.3 Estrazione dell'acido nucleico, RT-PCR e DAS-ELISA

I campioni fogliari sono stati presi da piante di aglio che hanno raggiunto un buon sviluppo vegetativo. Questi campioni di foglie sono stati usati nella RT-PCR, per le sole due cultivar Italiane sono state prese 40 piantine intere derivanti dalla germinazione dei bulbilli, mentre è stato preso un campione di circa 2 cm² su una sola foglia da 3-4 piante dal rimanente materiale non Italiano, e le estrazioni sono state ripetute due volte.

Altri campioni fogliari sono stati testati mediante test ELISA, e tutti i campioni sono stati presi seguendo la stessa modalità sopra descritta.

GCLV, OYDV, GVX e LYSV, sono stati individuati usando RT-PCR in campioni di foglie con leggere striature verdi. I primers usati per la PCR sono stati disegnati usando il Gene Runner program (V3.01, Hasting Software, Inc.) dal rivestimento proteico del virus (Tab. 1)

Tab. 1. Primers disegnati sulla base delle sequenze uniche del gene del rivestimento proteico di diversi virus dell'aglio usati nella RT-PCR.

Virus*	Primer	Orientamento**	Nucleotidi	GeneBank [#]	Sequenza (5' a 3')
OYDV	1-OYDV	F	1-22	NC005029	GCG GGG GAA GGA GAA GAT GCA G
	2-OYDV	R	730-710	NC005029	CCG CAG CTG TGT GTC TTT CCG
LYSV	1-LYSV	F	31-54	AFO71525	ACA AGT AAG AAA CAG AAG GAC AGC
	2-LYSV	R	440-417	AFO71525	GAG GTT CCA TTT TCA ATG CAC CAC
GCLV	1-GCLV	F	1-22	AF228416	CTA GTC TGC ATT GTT GGA TCC
	2-GCLV	R	960-940	AF228416	ATG TCA GTG AGT GAA ACA GAG G
GVX	1-GVX-FL	F	1-20	NC001800	ATG GGC GAT CGG AAC CAA GG
	2-GVX-FL	R	732-712	NC001800	TCA GAA TGT GAG CAT AAG GGG

* OYDV: *Onion yellow dwarf virus*, LYSV: *Leek yellow stripe virus*, GCLV: *Garlic common latent virus*, GVX: *Garlic virus X*

** F: Forward, R: Reverse

[#] numeri di accesso della sequenza

Le dimensioni reali di GCLV, OYDV, GVX e di LYSV, amplificate tramite PCR sono state di 960 bp, 730 bp, 732 bp e di 409 bp rispettivamente.

OYDV, GCLV e il gruppo dei *Potyvirus*, sono stati individuati tramite DAS-ELISA usando Kit diagnostici, prodotti dalla Bioreba AG (Reinach, Switzerland), seguendo le istruzioni presenti nelle confezioni. Per l'estrazione tramite RT-PCR, sono stati presi 500 mg di

campioni fogliari di aglio e omogeneizzati in presenza di 1 ml di Bufferd buffer in un mortaio con pestello, e poi centrifugati a 16.000 giri per 5 minuti. L'RNA totale è stato estratto usando la tradizionale estrazione fenolo: cloroformio. L'RNA così ottenuto, è stato fatto precipitare usando etanolo, e gli acidi nucleici così precipitati sono stati centrifugati a 16.000 giri per 15 minuti a temperatura costante di 4 °C, poi risospesi in DEPC. I virus così raccolti sono stati stimati tramite spettrofotometro (A260 nm). Per tutti i virus testati, la trascrizione inversa (RT) è stata condotta usando una reazione a volume di 20,3 µl, composta da 3 µl di RNA totale, 1 µl di 10 mM dMTP a pH neutro (invitrogen), 2 µl di primers oligo (dT) (5 nmole), 9 µl di DEPC dH₂O. Il tutto è stato denaturato tramite incubazione a 65 °C per 5 minuti, e passato immediatamente in ghiaccio freddo per meno di 1 minuto, e poi il contenuto è stato addizionato a 4 µl di First-Strand Buffer 5x (invitrogen), 0,1 µl di RNaseOUT (40 U/µL) Recombinant Ribonuclease Inhibitor (invitrogen), 1 µl (0,1 M) di DTT (invitrogen), 0,2 µl di SuperScript III RT (200 U/µL) (invitrogen), e il tutto è stato incubato a 45 °C per 90 minuti. Il cDNA ottenuto (2 µl), è stato amplificato tramite PCR, utilizzando i primers elencati in Tabella. 1, e usando una reazione a volume di 20 µl, contenente: 10 µl Go Taq Green Master Mix 2x (promega), 0,8 µl di ogni primers (5 nmole), e 6,4 µl di DEPC dH₂O, in un Termociclo (BIO-RAD).

Le fasi della PCR sono così di seguito riportati, pre-denaturazione a 95 °C per 1 minuto, seguita da 34 cicli di denaturazione a 95 °C per 10 secondi, annealing a 53 °C per GCLV, 58 °C per OYDV, 54 °C per GVX e 55 °C per LYSV per 10 secondi, allungamento a 72 °C per 1 minuto, e una estensione finale per 5 minuti a 72 °C. Il prodotto finale della PCR (6 µl), è stato analizzato in un gel di agarosio all'1,2% mediante elettroforesi e colorazione con etidio bromuro.

4.3 RISULTATI

4.3.1 Infezioni da virus in aglio italiano

Non tutti i virus testati in questa ricerca sono stati riscontrati sui due campioni di aglio Italiano (Tab. 2). Le infezioni da LYSV, GVX e OYDV sono state più rilevanti di quelle dovute a GCLV. Infatti, LYSV, OYDV e GVX sono stati riscontrati in entrambi i campioni di aglio Rosso di Sulmona e Bianco piacentino, mentre il GCLV è assente in entrambi i campioni, come risulta dalla RT-PCR.

Entrambe le cv B. piacentino e R. di Sulmona hanno lo stesso livello di infezione, presentando tre dei quattro virus testati (OYDV, LYSV e GVX). Questi risultati sono stati in parte confermati dal test ELISA, il quale mostra l'assenza del virus GCLV in entrambe le cultivar di aglio Italiane, e la presenza del virus OYDV non solo nella cv B. piacentino, ma anche nella cv R. di Sulmona, evidenziando inoltre l'assenza del Poty-group in entrambi i campioni.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti tramite RT-PCR sulle piante indicatrici inoculate con il succo cellulare delle due cultivar di aglio Italiano (Tab. 3), è emersa la presenza del solo virus GVX nel campione estratto dalle piante di *Cucumis sativus* inoculate con il campione di aglio B. piacentino. Mentre il test-ELISA eseguito sulle stesse piante indicatrici ha evidenziato la presenza del solo Poty-group in *C. sativus* inoculata con la cv B. piacentino e sul campione estratto dalle piante di *Chenopodium quinoa* inoculate con la cv R. di Sulmona.

4.3.2 Infezioni da virus in aglio commerciale

Testando tutti gli altri campioni di aglio tramite RT-PCR (Tab. 2), emerge che l'OYDV è stato determinato in quattro dei cinque campioni (Cina, Argentina e CA-biologici e CA-non-biologico), il LYSV è presente in quattro dei cinque campioni (CA-biologico, Argentina, Elephant e CA-non-biologico), il GVX è stato determinato solo in due campioni (CA-biologico e Elephant), mentre la presenza del GCLV è stata rilevata sul solo campione di aglio Cinese. Dall'analisi RT-PCR l'aglio CA-biologico risulta essere il più infetto, presentando tre dei quattro virus testati (OYDV, LYSV e GVX). Mentre le piante di aglio derivate da materiale propagativo Cina, CA-non-biologico, Argentina e Elephant sono state

trovate infette da solo due dei quattro virus testati, rispettivamente OYDV e GCLV, OYDV e LYSV, LYSV e OYDV, GVX e LYSV. Il test-ELISA ha invece determinato la presenza dell'OYDV in tutti i cinque campioni di aglio commerciale testato, a differenza del GCLV e Poty-group che sono stati rilevati nel solo campione aglio Cinese e Argentino rispettivamente. Testando tramite RT-PCR le piante indicatrici (Tab. 3), inoculate con il succo cellulare dei cinque campioni di aglio non Italiano, è emersa la presenza del LYSV nel campione estratto dalle piante di *Chenopodium quinoa* inoculate con l'aglio gigante (Elephant), mentre sui campioni estratti da *C. quinoa* inoculate con aglio Argentino è emersa la presenza del solo OYDV, mentre il campione estratto da *C. quinoa* inoculato con aglio Cinese, ha presentato ben due dei quattro virus testati tramite RT-PCR quali GCLV e GVX, risultando quindi il campione più infetto. Il test-ELISA, contrariamente alla RT-PCR ha evidenziato la presenza del Poty-group su tutte le piante di *C. quinoa* inoculate con le rispettive piante di aglio commerciale, mostrando anche la presenza del virus GCLV nelle piante di *C. quinoa* inoculate con aglio Cinese, e la presenza dell'OYDV in tutte le piante di *C. quinoa* inoculate con l'aglio Argentino. Le sole foglie di *C. quinoa* inoculate con aglio Cinese e Argentino hanno manifestato lesioni clorotiche puntiformi localizzate sulla lamina fogliare (Fig. 8).



Fig. 8 – Foglie di *Chenopodium quinoa* inoculate con tessuto fresco di aglio, con lesioni clorotiche puntiformi localizzate sulle foglie.

Tab. 2: Sintomi espressi e risultati dei test di laboratorio per virus su bulbilli italiani e bulbi di aglio commerciale.

Aglio	Sintomi		RT-PCR*				ELISA**		
	Tessuto	Descrizione	OYDV [#]	LYSV	GCLV	GVX	OYDV	GCLV	Poty-Group
<u>Bulbilli Italiani</u>									
Bianco piacentino	giovani foglie	striature gialle	+	+	-	+	+	-	-
Rosso di Sulmona	giovani foglie	striature gialle	+	+	-	+	+	-	-
<u>Bulbi Commerciali</u>									
Cina	porzioni di foglia	sriature clorotiche	+	-	+	-	+	+	-
Argentina	porzioni di foglia	sriature clorotiche	+	+	-	-	+	-	+
CA-biologico	porzioni di foglia	sriature gialle	+	+	-	+	+	-	-
CA-non-biologico	porzioni di foglia	sriature giallo chiaro	+	+	-	-	+	-	-
Elephant	porzioni di foglia	sriature giallo chiaro	-	+	-	+	+	-	-

* RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

** ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay

OYDV: *Onion yellow dwarf virus*, LYSV: *Leek yellow stripe virus*, GCLV: *Garlic common latent virus*, GVX: *Garlic virus X*, Poty-Group.

Tab. 3: Risultati ottenuti in laboratorio per i virus analizzati tramite test su piante indicatrici inoculate meccanicamente con bulbilli Italiani e bulbi di aglio commerciali e sintomi espressi.

Aglio	Indicatore	RT-PCR*				ELISA**		
		OYDV#	LYSV	GCLV	GVX	OYDV	GCLV	Poty-Group
<u>Bulbilli Italiani</u>								
Bianco piacentino	<i>N.tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cucumis sativus</i>	-	-	-	+	-	-	+
Rosso di Sulmona	<i>N.Tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cucumis sativus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<u>Bulbi Commerciali</u>								
CA-biologico	<i>N.Tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
CA-non- biologico	<i>N.Tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chenopodium quinoa</i>	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
Cina	<i>Chenopodium quinoa</i> ##	-	-	+	+	-	+	+
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chenopodium quinoa</i> ##	+	-	-	-	+	-	+
Argentina	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chenopodium quinoa</i> ##	+	-	-	-	+	-	+
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-
Elephant	<i>N.Tabacum</i> “Xanthi”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>N.Tabacum</i> “Turkish”	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chenopodium quinoa</i>	-	+	-	-	-	-	+
	<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	-	-	-	-	-	-

* RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

** ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay

OYDV: *Onion yellow dwarf virus*, LYSV: *Leek yellow stripe virus*, GCLV: *Garlic common latent virus*, GVX: *Garlic virus X*, Poty-Group.

Lesioni clorotiche puntiformi localizzate sulle foglie

4.3.3 Sintomatologia

Tutte le piante di aglio testate hanno presentato a livello delle foglie leggere striature verdi, più o meno evidenti, dovuti alla presenza di virus. Tuttavia singole infezioni di OYDV, in combinazione con altri virus causano sempre vivaci striature giallo-verdi sulle foglie di aglio. I virus LYSV e OYDV appartenenti al genere *Potyvirus* si manifestano inizialmente con striature gialle alla base delle giovani foglie, che poi si estenderanno andando ad interessare tutta la lamina fogliare manifestando un giallume generale che porta la foglia colpita a piegarsi verso il basso (Fig. 9).



Fig. 9 – Piante di aglio Argentino con striature gialle alla base delle giovani foglie.

Il virus GCLV appartenente al genere *Carlavirus* si manifesta con sintomi deboli o quasi assenti in singole infezioni. I sintomi causati da *Carlavirus* possono essere aggravati dalla presenza di *Potyvirus* (Fig. 10).

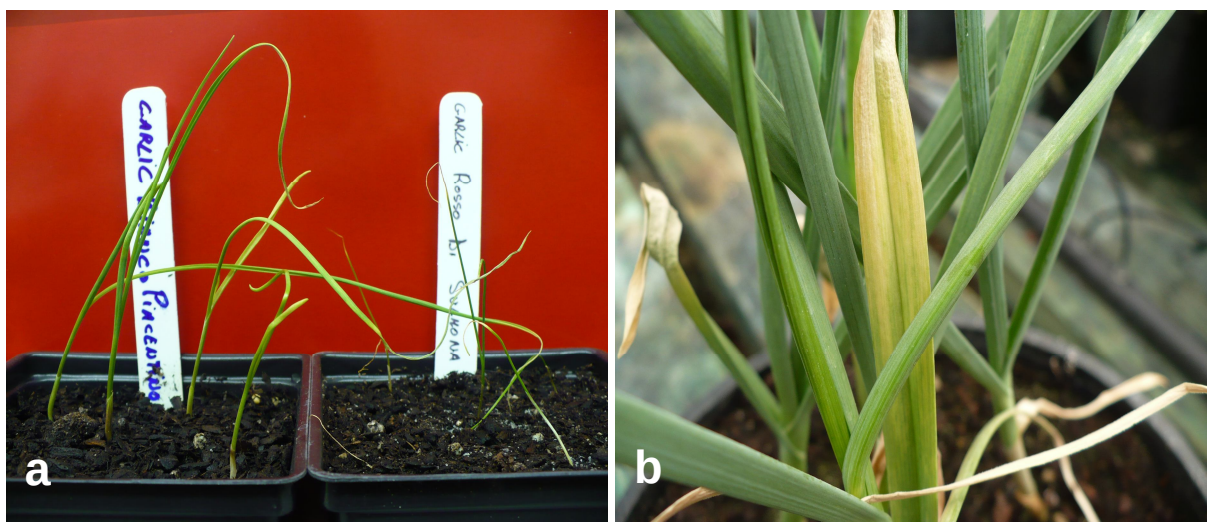


Fig. 10 – Sintomi da virosi. a) giovani piante di aglio provenienti dai bulbilli delle cultivar Rosso di Sulmona e Bianco piacentino con striature giallo-verdi sulle giovani foglie, b) piante di aglio Cinese con infezioni che interessano tutta la lamina fogliare.

Solo le piante indicatrici di *Chenopodium quinoa* utilizzate per la sperimentazione, dopo essere state inoculate meccanicamente con tessuto fresco proveniente da giovani piante di aglio Cinese e Argentino, monitorate giornalmente per un periodo di 16 settimane, hanno manifestato sintomi visibili da infezioni dovute a *Potyvirus* e *Carlavirus*. I sintomi si sono manifestati a partire dalla quarta settimana dal momento dell'inoculazione, con lesioni clorotiche puntiformi avvolte da aloni giallo-verdi inizialmente localizzati che poi vanno ad interessare l'intera lamina fogliare.

4.4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Essendo l'aglio una coltura tradizionale in Italia e nel resto del Mondo, la presenza di virus, determinata in questa ricerca, mette in evidenza come metodi sierologici e tecniche di biologia molecolari costituiscano un requisito essenziale per la produzione di aglio esente da virus. L'identificazione di virus è anche importante per studi epidemiologici e per creare programmi di miglioramento e di certificazione per la produzione di cultivar di aglio resistenti alle infezioni da virus. In generale i risultati mostrano come l'aglio sia pesantemente infettato da virus. Ci sono tuttavia differenze nel numero e nella frequenza delle virosi identificate nelle diverse cultivar, con i *Potyvirus* presenti in misura maggiore rispetto ai *Carlavirus*. Analogamente, van Dijk, (1993a) ha dimostrato che l'aglio infetto da *Potyvirus* è più frequente di quello infetto da *Carlavirus*, perché il *Potyvirus* è facilmente trasmesso da afidi. Recenti studi hanno dimostrato come i *Carlavirus* siano trasmessi tramite propagazione vegetativa (Dovas *et al.*, 2001), pur non essendo in grado in alcune circostanze di causare sintomi visibili sulle foglie. La presenza di numerosi virosi è stata dimostrata essere la causa di pesanti perdite di produzione in diversi Paesi (Davis, 1995; Walkey and Antill, 1989; Lot *et al.*, 1998), ma in Italia tale causa non è stata ancora dimostrata.

In questi studi sono stati trovati simultaneamente tre dei quattro virus testati (OYDV, LYSV e GVX), presenti in entrambe le cultivar Italiane e in CA-biologico, risultando le più infettate. I virus testati sembrano essere molto diffusi su aglio Italiano e in aglio di molti altri paesi al Mondo, causando significative degenerazioni sulla coltura, dopo uno o più cicli di moltiplicazione in campo (Fajardo *et al.*, 2000; Takaichi *et al.*, 2000).

I risultati ottenuti da RT-PCR e dal test ELISA (Tabella 2 e Tabella 3) mostrano che l'OYDV è il *Potyvirus* più comune. In particolare, con RT-PCR abbiamo trovato il 100% di infezioni da OYDV in sei delle sette cultivar testate ('B. piacentino', 'R di Sulmona', CA-biologico, Cina, Argentina e CA-non-biologico), fatta eccezione per l'Elephant garlic, mentre con il test ELISA la presenza di questo virus è stata confermata su tutte le cultivar testate. Simili risultati sono stati presentati da Kleikàckovà *et al.* (2007). In Europa, Dovas *et al.*, (2001) e Dovas and Vovlas, (2003), trovarono l'OYDV in quasi il 100% delle piante di aglio testate sia in Grecia che in Italia.

Con questi risultati abbiamo riscontrato il 100% di infezioni per un altro comune *Potyvirus*, LYSV in sei dei sette campioni testati ('B. piacentino', 'R. di Sulmona', CA-biologico, CA-

non-biologico, Argentina e in Elephant garlic).

Il GVX è stato determinato in quattro dei sette campioni testati ('B. piacentino', 'R. di Sulmona', CA-biologico e in Elephant garlic), mentre il *Carlavirus* GCLV è stato determinato soltanto sul campione di aglio Cinese. In altri studi è stato osservato che l'incidenza del GCLV in piante di aglio può variare dallo 0% al 98% in Grecia (Dovas *et al.*, 2001), e dal 23% al 98% in Italia (Dovas and Vovlas, 2003).

Ulteriori studi condotti da Daniels, (1999), affermano che il GCLV è stato determinato tra 0% e 4% su campioni di aglio della Cina e Brasile rispettivamente. Van Dijk, (1993), Diekmann, (1997) e Takaichi *et al.*, (1998), descrissero sintomi visibili su foglie di varie specie di *Allium* causate da *Potyvirus* e/o *Alexivirus*, e notarono che l'OYDV causa vivaci striature giallo-verdi e il LYSV causa leggeri e irregolari striature verde scuro sulle giovani foglie, questi sintomi sono aggravati dalla presenza di SLV (*Shallot latent carlavirus*) e GCLV (van Dijk, 1993b).

I nostri studi hanno confermato che c'è un'associazione tra *Potyvirus* e *Carlavirus*, e che la presenza del solo *Carlavirus* non consente la manifestazione di sintomi visibili nelle piante di aglio.

Dai risultati ottenuti attraverso RT-PCR e test ELISA sulle piante indicatrici inoculate con le due cultivar di aglio, abbiamo riscontrato che la cv B. piacentino è stata la più infetta, presentando sul campione estratto dalla pianta di *Cucumis sativus* due virus, GVX e Poty-group, come mostrato dalla RT-PCR e dal test ELISA rispettivamente, mentre la cv R. di Sulmona presenta solo il Poty-group come indicato dal test ELISA, riscontrando quindi un livello più basso di infezione tra le due cultivar Italiane. Testando tutte le piante indicatrici, inoculate con i rispettivi campioni di aglio non Italiano per mezzo della RT-PCR e il test ELISA, emerge che il 100% delle piante di *Chenopodium quinoa* inoculate con aglio Cinese hanno presentato il GCLV, GVX, e Poty-group. Questi risultati mostrano come l'aglio Cinese sia il più infetto, seguito dall'aglio Argentino e Elephant, infatti il 100% delle piante di *C. quinoa*, inoculate con aglio Argentino presentano i virus OYDV e Poty-group, mentre, il 100% delle piante di *C. quinoa*, inoculate con Elephant garlic presentano i virus LYSV e Poty-group.

Sulla base di quanto osservato, il risanamento da virus dell'aglio risulta un passaggio importante per il rilancio della coltivazione di questa Alliacea nel Lazio.

5. BIBLIOGRAFIA

- Agardh, J.G., 2007.** *Alliaceae*. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. Botanica sistematica un approccio filogenetico. Edizione Italiana (a cura di) Bigazzi, M., Bracco, F., Cornara, L., Macchia, F., Mariotti, M., Nepi, C., Papini, A., Raffaelli, A., Rizzotto, M., Selvi, F. ed. Padova, Piccin, pp. 223-224
- Ahlawat, Y.S., 1974.** A mosaic disease of garlic in Darjeeling hills. Science and Culture. 40, pp. 466-467
- Angelini, R., 2003.** Avversità animali e vegetali. Colture orticole e fragola. L'Informatore Agrario, pp. 243
- Barg, E., 1995.** Serologische und molekulargenetische Untersuchungen zur Variabilitae Allium-Arten infizierender, filamentöser Viren. Ph. D. Thesis, University of Göttingen, Germany.
- Barg, E., Lesemann, D.E., Vetten, H.J., Green, S.K., 1994.** Identification, partial characterization and distribution of viruses infecting *Allium* crops in South and South-east Asia countries. Acta Hort. 358: pp. 251-258
- Barg, E., Lesemann, D.E., Vetten, H.J., Green, S.K., 1997.** Viruses of alliums and their distribution in different *Allium* crops and geographical regions. Acta Hort. 433: pp. 607-616
- Bellardi, M.G., Marani, F., Betti, L., Rabiti, A.L., 1995.** Detection of garlic common latent virus (GCLV) in *Allium sativum* L. in Italy. Phytopath. Medit. 34: pp. 58-61
- Benini, A., 2004.** Voghiera triplica l'offerta. In Provincia di Ferrara si è passati da 360 a 1000 tonnellate, in quattro anni. Terra e Vita (Suppl. n 2, Speciale Aglio), pp. 20-22
- Bianco, V.V., 1990.** Aglio (*Allium sativum* L.). In: Bianco V.V., Pimpini F. (a cura di) Orticoltura. ed. Bologna, Patron, pp. 27-41
- Bianco, V.V., 2001.** Aglio (*Allium sativum* L.). In: Baldoni, R., e Giardini, L., (a cura di), Coltivazioni erbacee. Piante oleifere, da zucchero, da fibra, orticole e aromatiche. Patron Editore, pp. 285-290
- Bima, P., 1997.** Studio dei fattori che condizionano la micropropagazione in diverse cultivar di Aglio (*Allium sativum* L.), Tesi di Dottorato in Generica Agraria, Università degli Studi della Tuscia (Viterbo), facoltà di Agraria, a.a. 1996-1997
- Borghi, S., 2004.** In polvere, in pasta, liofilizzato. Esistono in commercio interessanti

- alternative al prodotto fresco. Terra e Vita (Suppl. n 2, Speciale Aglio), pp. 10-11
- Bos, L., 1976.** Onion yellow dwarf virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. 158
- Bos, L., 1981.** Leek yellow stripe virus. AAB Descriptions of Plant Viruses, 240. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK
- Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., Maat, D.Z., 1978.** Leek yellow stripe virus and its relationships to onion yellow dwarf virus: characterization, ecology and possible control. Neth. J. Plant Pathol. 84: pp. 185-204
- Branca, F., Marino, G.A., 2003.** Studio comparativo di provenienze siciliane di aglio (*Allium sativum* L.). Italus Hortus vol. 10, supplemento n. 4, luglio-agosto 2003, pp. 228-233
- Calzecchi Onesti, A., 1986.** La cipolla, l'aglio, il porro e le altre agliacee coltivate o infestanti. Reda, pp. 79-87
- Chang, M.U., Park, W.W., Chung, J.D., Lim, K.B., La, Y.J., 1998.** Distribution of garlic latent virus and garlic mosaic virus in infected garlic tissues. Journal of the Korean Society for Horticultural Science. 29: pp. 253-265
- Choi, J.N., Song, J.T., Song, S. I., Ahn, J.H., Choi, Y.D., Lee, J.S., 1995.** Immunological detection of garlic latent virus. Agricultural Chemistry and Biotechnology. 38: pp. 49-54
- Conci, V.C., Morriconi, D.N., Nome, S.F., 1986.** Cultivo de meristemas apicales en seis tipos clonales de ajo (*Allium sativum* L.). Phytot 46 (2): pp. 187-194
- Conci, V.C., Lunello, P., Buraschi, D., Italia, R.R., Nome, S.F., 2002.** Variations of Leek yellow stripe virus concentration in Garlic and its incidence in Argentina. Plant Dis. 86: pp. 1085-1088
- Conti, F., Abbate, G., Alessandrini, A., Blasi, C., 2005.** An Annotated Checklist of the Italian Vascular Floral. Rielaborata da Conti, F., Abbate, G., Alessandrini, A., Blasi, C. ed. Roma, Palombi
- Dalla Costa, L., Miceli, F., 2004.** Quello di Resia si vende 10 euro/kg. Non c'è un marchio di tutela. Il prezzo dipende da una domanda in crescita, Terra e Vita (Suppl. n 2, Speciale Aglio), pp. 24-25
- Daniels, J., 1999.** Occurrence of viruses in garlic in the state of Rio Grande de Sul, Brazil. Fitopatol. Brasil. 24: pp. 91
- Davis. R.M., 1995.** Diseases caused by viruses and mycoplasma-like organisms. In: Schwartz, H.F., Mohan, S.K. (Eds). Compendium of Onion and Garlic Diseases. St. Paul. APS

Press. pp. 54

- Delecolle, B., Lot, H., 1981.** Viroses de l'ail. Mise en évidence et essais de caractérisation par immunoelectromicroscopie d'un complexe de trois virus chez différentes populations d'ail atteintes de mosaïque. *Agronomie* 1: pp. 763-769
- Diekmann, M., 1997.** *Allium* spp. FAO/IPGRI, Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm No.18. FAO/IPGRI, Rome, Italy
- Dovas, C.I., Hatziloukas, E., Salomon, R., Barg, E., Shibolet, Y.M., Katis, N., 2001.** Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. *Eur. J. Plant Pathol.* 149: pp. 1-7
- Dovas, C.I., Vovlas, C., 2003.** Viruses infecting *Allium* spp. in Southern Italy. *J. Plant Pathol.* 85: pp. 135
- Espinosa, B., Sannino, L., 2004.** Insolita infestazione dell'aglio in magazzino. *L'informatore Agrario*, 16: pp. 73-74
- Etoh, T., 1980.** An attempt to obtain binucleate pollen of garlic, *Allium sativum* L. *Men. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 16: pp. 65-73
- Etoh, T., 1982.** Development and degeneration of the tapetum in garlic, *Allium sativum* L. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 18: pp. 75-84
- Etoh, T., 1983a.** Accomplishment of microsporogenesis in a garlic clone. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 19: pp. 55-63
- Etoh, T., 1983b.** Germination of seeds obtained from a clone of garlic, *Allium sativum* L. *Proc. Japan Acad., ser. B.* 59: pp. 83-87
- Etoh, T., 1985.** Studies on the sterility on garlic, *Allium sativum* L. *Men. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 21: pp. 77-132
- Etoh, T., 1986.** Fertility of the garlic clones collected in Soviet central Asia. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 55: pp. 312-319
- Etoh, T., Nova, Y., Nishitarumizu, Y., Wakamoto, T., 1988.** Seed productivity and germinability of various garlic clones collected in Soviet Central Asia. *Men. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 24: pp. 129-139
- Etoh, T., Ogura, H., 1977.** A morphological observation on the formation of abnormal flowers in garlic (*Allium sativum* L.). *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 13: pp. 77-88
- Etoh, T., 1997.** True seeds in garlic. *Acta Hort.* 433: pp. 247-255
- Fajardo, T.V.M., Nishijima, M., Buso, J.A., Torres, A.C., Avila, A.C., Resende, R.O.,**

- 2001.** Garlic viral complex: identification of Potyviruses and Carlaviruses in Central Brazil. *Fitopatol. Brasil.* 26: pp. 619-626
- Fajardo, T.V.M., Resende, R.O., Macielzambolim, E., 2000.** Doenças causadas por vírus em alho e cebala. In: Zambolim, L., Vale, F.X.R. & Costa, H. (Eds). *Controle de Doenças de Plantas Hortaliças*. Vol. 1. Viçosa. UFV. pp. 103-129.
- Ferrari, M., Menta, A., Marcon, E., Montermini, A., 2001.** Malattie e parassiti delle piante da fiore, ornamentali e forestali. Bologna. Edagricole, pp. 52-62
- Giannini, M., 2004.** Le caratteristiche merceologiche: le zone di produzione, il calendario dell'offerta, il futuro dell'aglio italiano, *Terra e Vita* (Suppl. n 2, Speciale Aglio), pp. 3-7
- Gorini, F., 1977.** La coltivazione dell'aglio. Universale Edagricole, Bologna
- Graichen, K., 1991.** Gelbstreifigkeit des Porrees verursacht erhebliche Pflanzenausfalle. *Gartenbau*, 38: pp. 17-19
- Gvaladza, G.E., 1961.** The embryology of the genus *Allium* L. (in Russian). *Bul. Acad. Sci. Georgian SSR.* 26: pp. 193-200
- Gvaladze, G.E. 1965.** Vivipary and the capability of generative reproduction in *Allium sativum* L. *Bul. Acad. Sci. Georgian SSR.* 40: pp.412-427
- Helguera, M., Bravo-Almonacid, F., Kobayashi, K., Rabinowicz, P.D., Conci, V.C., Mentaberry, A., 1997.** Immunological detection of GarV-type virus in Argentine garlic cultivars. *Plant Dis.* 81: pp. 1005-1010
- Hill, S.A., (1984).** Transmission Tests. In: Hill, S.A. (a cura di), *Methods in Plant Virology*, vol. 1 di *Methods in Plant Pathology*. Palo Alto (CA): pp. 25-32
- Hong, C-J., Etoh, T., 1996.** Fertile clones of garlic (*Allium sativum* L.) abundant around the Tien Shan mountains. *Breed. Sci.* 46: pp. 349-353
- Inaba, A., Ujiie, T., Etoh, T., 1995.** Seed productivity and germinabilità of garlic. *Breed. Sci.* 45 (Suppl.2): pp. 310
- Islam, M.J., Hossain, A.K.M.M., Khanam, F., Majumder, U.K., Rahman, M.M., Saifur Rahman, M., 2007.** Effect of mulching and fertilization on growth and yield of garlic at Dinajpur in Bangladesh. *Asian Journal of Plant Science*, n.6
- Jenderek, M.M., 1998.** Generative reproduction of garlic (*Allium sativum*) (in Polish).
- Jenderek, M.M., Hannan, R.M., 2002.** Fertility, reproductive characteristics and true seed production of the USDA garlic germplasm collection. *Hort Science* (in press)
- Jones, H.A., Mann, L.H., 1963.** Onions and their allies. Leonard Hill Books, London, UK.

- Jones, H.A., Mann, L.K., 1963.** Onion and their allies. Interscience Publisher, New York, pp. 268
- Judd, W.S., Campbell, C., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2007.** Botanica sistematica un approccio filogenetico. Rielaborata da Bigazzi, M., Bracco, F., Cornara, L., Macchia, F., Mariotti, M., Nepi, C., Papini, A., Raffaelli, M., Rizzotto Selvi, F. ed. Padova, PICCIN, pp. 218-220
- Kamenetsky, R., Rabinowitch, D.H., 2001.** Floral development in bolting garlic. Sexual Plant Reprod. 13: pp. 235-241
- Kamenetsky, R., Rabinowitch, D.H., 2002.** Florigenesis. In: Rabinowitch, H., Currah, L., (eds), Allium crop science: Recent advances. CABI Publ., New York. pp. 31-57
- Kanyuka, K.V., Vishnichenko, V.K., Levay, K.E., Kondrikov, D.Y., Ryabov, E.V., Zavriev, S. K., 1992.** Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. Journal of General Virology. 73: pp. 2553-2560
- Katarzhin, M.S., Katarzhin, I.M., 1978.** Experiments on the sexual reproduction of garlic (in Russian). Byulleten. Vsesoyuznogo Ordena Lenina I Ordena Druzhby Narodov Instituta Rastenievodstva Imeni N. I. Vavilova. 80: pp. 74-76
- Katarzhin, M.S., Katarzhin, I.M., 1982.** On generative reproduction of garlic (in Russian). Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike I Seleksii. 72: pp. 135-136
- Klukáčková, J., Navrátil, M., Duchoslav, M., 2007.** Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. Journal of Plant Diseases and Protection 114: pp. 97-100
- Kobayashi, K., Rabinowicz, P., Bravoalmonacid, F., Helguera, M., Conci, V., Lot, H. Mentaberry, A., 1996.** Coat protein gene sequences of garlic and onion isolates of the onion yellow dwarf potyvirus (OYDV). Archives of Virology. 141: pp. 2277-2287
- Koike, S.T., Gladders, P., Paulus, A.O., 2007.** Vegetable Disease. ed. San Diego, Academic Press
- Kononkov, P.F., 1953.** The question of obtaining garlic seed (in Russian). Sad I Ogorod. 8: pp. 38-40
- Konvicka, O., 1984.** Generative Reproduktion von Knoblauch (*Allium sativum*). Allium Newsl. 1: pp. 28-37
- Kothari, I.L., Shah, J.J., 1974a.** Histogenesis of seed stalk and inflorescence in garlic.

- Phytomorphology. 24: pp. 42-48
- Kothari, I.L., Shah, J.J., 1974a.** Structure and organization of shoot apex of *Allium sativum* L. Israel. J., Bot. 23: pp. 216-222
- Lee, Y.W., Yamazaki, S., Osaki, T., Inouye, T., 1979.** Two elongated viruses in garlic, garlic latent virus and garlic mosaic virus. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 45: pp. 727-734
- Lewis, P.O., Zaykin, D., 2001.** Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., Delecolle, B., 1998.** Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Dis. 82: pp. 1381-1385
- Lot, H., Delecolle, B., Boccardo, G., Marzachi, C., Milne, R.G., 1994.** Partial characterization of reovirus-like particles associated with garlic dwarf disease. Plant Pathol. 43: pp. 537-546
- Louie, R., Lorbeer, J.W., 1966.** Mechanical transmission of onion yellow dwarf virus. Phytopathology. 56: pp. 1020-1023
- Lunati, F., 2004.** Impariamo dai cugini d'oltralpe. La Francia sviluppa il binomio prodotto/territorio puntando sui marchi regionali. Terra e Vita (Suppl. n 2, Speciale Aglio), pp. 2
- Maggioni, L., Corti, C., Fogher, C., 1989.** Callus induction, ploidy level and plant regeneration *in vitro* Garlic (*Allium sativum* L.) cultures. Genet. & Breed. 43: pp. 251-254
- Mann, L.K., 1952.** Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. Hilgardia, 21: pp. 195-251
- Mann, L.K., Minges, P.A., 1958.** Growth and bulbing of garlic (*Allium sativum* L.) in response to storage temperature of planting stocks, day length, and planting date. Hilgardia, 27: pp. 385-419
- Marys, E., Carballo, O., Izaguirre-Mayoral, M.L., 1994.** Isolation and characterization of viruses present in four clones of garlic (*Allium sativum*) in Venezuela. Journal of Phytopathology. 142: pp. 227-234
- Melhus, I.E., Reddy, C.S., Henderson, W.J., Vestal, E., 1929.** A new virus disease epidemic on onions. Phytopathology 19: pp. 73-77

- Nagakubo, T., Kubo, M., Oeda, K., 1994.** Nucleotide sequence of the 3'-regions of two major viruses from-mosaic-diseased garlic: molecular evidence of mixed infection by a potyvirus and a carlavirus. *Phytopathology*. 84: pp. 640-645
- Nei, M., 1972.** Genetic distance between populations. *Am Nat*, n. 106, pp. 183-192
- Noda, C., Maea, T., Inouye, N., 1989.** Detection of leek yellow stripe virus by dot immunobinding assay. *Nogaku-Kenkyu*. 62: pp. 269-277
- Novak, F.J., 1972.** Tapetal development in the anthers of *Allium sativum* L. and *Allium longicuspis* Regel. *Experientia*. 28: pp. 363-364
- Novak, F.J., 1990.** Allium tissues culture. In: *Onions and Allied Crops*, vol. I, cap. 12. CRC Press, Inc. Boca Raton Florida, pp. 234-247
- Novak, F.J., Havranek, P., 1975.** Attempts to overcome the sterility of common garlic (*Allium sativum*). *Biol. Plant*. 17: pp. 376-379
- Pacifico, G., Santonicola, L., Freda, G., Silvestri, F., Romano, E., 2005.** Aglio dell'Ufita. Pergola Advpromedia, Avellino
- Paoletti, F., 2004.** Si all'uso no all'abuso. *Terra e Vita* (Suppl. n 2, Speciale Aglio), pp. 12-13
- Pollini, A., 1995.** La difesa delle piante da orto. *Edagricole*, pp. 2-19
- Pooler, M.R., Simon, P.W., 1993b.** Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. *Hort. Science*. 28: pp. 1085-1086
- Pooler, M.R., Simon, P.W., 1994.** True seed production in garlic. *Sexual Plant Reprod*. 7: pp. 282-286
- Pooler, M.R., 1991.** Sexual reproduction in garlic (*Allium sativum* L.). Ph.D. thesis. Univ. of Wisconsin-Madison
- Qu-Ying, H., Takagi, H., Ogasawara, N., Etho, T., 1994.** Development of types of inflorescences of garlic and some *Allium* species (in Japanese). *Japan. J., Soc. Hort. Sci.* 63: pp. 121-130
- Rapparini, F., Previati, A., Predieri, S., Da Re, F., 2005.** Aglio: la chiave è l'aroma. *L'informatore Agrario*, 36, pp. 45-48
- Rapparini, G., Bartolini, D., Paci, F., Vandini, G., Campagna, S., 2002.** Indicazioni pratiche sul diserbo dell'aglio. *L'informatore Agrario*, 40, pp. 83-87
- Ryabov, E., Generozov, E.V., Vetten, D.J., Zavriev, S.K., 1996.** Nucleotide sequence of 3'-terminal region of mite-borne filamentous virus indicates its relation to the shallot virus X group. *Molecular Biology*. 30: pp. 63-67
- Salomon, R., 2002.** Virus diseases in garlic and the propagation of virus-free plant. In:

- Rabinowitch, H., and Currah, L., (eds), *Allium crop science: Recent advances*. CABI Publ., New York, pp. 311-327
- Schwartz, H.F., Mohan, S.K., Havey, M.J., Crowe, F.J., 2008.** Compendium of Onion and Garlic Diseases and Pests. Second Edition. St. Paul. APS Press. pp. 1-7
- Sharma, A.K., 1956.** A new concept of a means of speciation in plants. *Caryologia*. 9: pp. 93-130
- Shiboleth, Y.M., Galon, A., Koch, M., Rabinowitch, H.D., Salomon, R., 2001.** Molecular characterization of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. *Ann. Appl. Biol.* 138 (2): pp. 187-195
- Simon, P.W., Jenderek, M.M., 2003.** Flowering, Seed Production, and the Genesis of Garlic Breeding, vol. 23 di *Plant Breeding Reviews*: pp. 211-244
- Song, J.T., Choi, J.N., Song, S.I., Lee, J.S., Choi, Y.D., 1995.** Identification of a potyvirus in Korean garlic plants. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 38: pp. 55-62
- Song, S.I., Song, J.T., Kim, C.O., Lee, J.S., Choi, Y.D., 1998.** Molecular characterization of the garlic virus X genome. *Journal of General Virology*. 79: pp. 155-159
- Sosa, M.C., Muñoz, J.N., Navelino, P.A., 1995.** Incremento de los rendimientos con el uso de ajo de alta calidad sanitaria. In: IV curso taller sobre producción, comercialización e industrialización de ajo. INTA. Mendoza
- Sumi, S., Tsuneyoshi, T., Furutani, H., 1993.** Novel rod-shaped viruses isolated from garlic, *Allium sativum*, possessing a unique genome organization. *Journal of General Virology*. 74: pp. 1879-1885
- Takagi, H., 1990.** Garlic *Allium sativum* L. In: Brewster, J.L., Rabinowitch, H.D., (eds), *Onions and allied crops*, vol. III. Biochemistry, food science, and minor crops. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 109-146
- Takaichi, M., Nagakubo, T., Oeda, K., 2001.** Mixed virus infections of garlic determined by a multivalent polyclonal antiserum and virus effects on disease symptoms. *Plant Disease*. 85: pp. 71-75
- Takaichi, M., Yamamoto, M., Nagakubo, T., Oeda, K., 1998.** Four garlic viruses identified by reverse transcription-polymerase chain reaction and their regional distribution in Northern Japan. *Plant Disease*. 82: pp. 694-698
- Tesi, R., 1994.** Aglio (*Allium sativum* L.). In: Tesi R. (a cura di), *Principi di orticoltura e ortaggi d'Italia*. ed. Bologna, Edagricole, pp. 212-217

- Tsuneyoshi, T., Sumi, S., 1996.** Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *Phytopathology*. 86: pp. 253-259
- Van Dijk, P., 1993.** Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Neth. J. Plant Pathol.* 99: pp. 233-257
- Van Dijk, P., 1993.** Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Neth. J. Plant Pathol.* 99 Suppl. 2: pp. 1-48
- Van Dijk, P., 1993.** Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 99: suppl.2, pp.1-48
- Van Dijk, P., 1993a.** Survey and characterisation of potyviruses and their strains of *Allium* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 99: pp. 1-48
- Van Dijk, P., 1993b.** Carlavirus isolated from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Plant Pathol.* 99: pp. 233-257
- Van Dijk, P., 1994.** Virus diseases of *Allium* species and prospects for their control. *Acta Hort.* 358: pp. 299-306
- Verbeek, M., van Dijk, P., van Well, P.M.A., 1995.** Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by meristem-tip culture. *Eur. J. Plant Path.* 101: pp. 231-239
- Vvedensky, A.I., 1935.** *Allium* L. In: Komarov, V.L. (ed), *Flora SSSR*, vol. 4. Translated into English by Airy-Shaw, H.K., as *The genus Allium in the USSR*. *Herbertia* 11: pp. 65-218
- Walkey, D.G.A., Antill, D.N., 1998.** Agronomic evaluation of virus free and virus infected garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Horticultural Science*. 64: pp. 53-60
- Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., Bolland, C.J., Miller, A., 1987.** Production of virus-free garlic (*Allium sativum*) and shallot (*A. ascalonicum*) by meristem tip-culture. *J. Hort. Sci.* 62: pp. 211-220
- Weber, E., 1929.** Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen über die Gattung *allium*. *Bot. Arch.* 25: pp. 1-44
- Yamashita, K., Sakai, J., Hanada, K., 1996.** Characterization of a new virus from garlic (*Allium sativum* L.), garlic mite borne mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 62: pp. 483-489

6. SITOGRAFIA

Crsa: www.crsa.it

Fao: www.fao.org

Inea: www.inea.it

Informatore agrario: www.informatoreagrario.it

Istat: www.istat.it

Regflor: www.regflor.it

Scopus: www.scopus.com

Wikipedia: www.wikipedia.it