



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E
AMBIENTALI**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

**VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI SOSTANZE DI
ORIGINE NATURALE E A BASSO IMPATTO
AMBIENTALE NELLA PROTEZIONE DEL CAVOLO
CAPPuccio E DELLA CIPOLLA DA SEME DA
MALATTIE FUNGINE**

***EFFECTIVENESS OF NATURAL COMPOUNDS AND LOW RISK
ACTIVE INGREDIENTS IN THE CONTROL OF FUNGAL DISEASES OF
SEEDBEARING CABBAGE AND ONION***

Studente:
BINNI TANIA

Relatore:
PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

Correlatore:
DOTT.SSA MARWA MOUMNI

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE	7
1.1. PRODUZIONE DELLE SEMENTI NELL'ORTICOLTURA ITALIANA.....	8
2. CAVOLO CAPUCCIO DA SEME.....	11
2.1. LE PRINCIPALI MALATTIE CRITTOGAMICHE DEL CAVOLO CAPPUCCIO ...	12
2.1.1. Alternariosi delle <i>Brassicaceae</i>.....	12
2.1.1.1. <i>Alternaria alternata</i>	14
2.1.1.2. <i>Alternaria brassicicola</i>.....	15
2.1.1.3. <i>Cancro del fusto</i>.....	17
2.1.1.4. <i>Fusariosi</i>	19
2.1.1.5. <i>Fitoplasm</i>	20
3. CIPOLLA DA SEME	21
3.1. LE PRINCIPALI MALATTIE CRITTOGAMICHE DELLA CIPOLLA	22
3.1.1. Infezioni di <i>Botrytis</i> spp. su cipolla	22
3.1.2. <i>Peronospora</i> della cipolla.....	24
3.1.3. Disseccamento fogliare.....	26
4. AGRICOLTURA SOSTENIBILE	27
4.1. PROTEZIONE DELLE COLTURE IN AGRICOLTURA INTEGRATA	28
4.2. PROTEZIONE DELLE COLTURE IN AGRICOLTURA BIOLOGICA.....	29
5. MEZZI DI PROTEZIONE CHIMICI.....	30
5.1. RIDUZIONE DEI MEZZI TECNICI NELL'ERA DEL GREEN DEAL: LA SITUAZIONE DEL RAME	33
6. SOSTANZE ATTIVE ALTERNATIVE AI FUNGICIDI TRADIZIONALI	34
6.1. LE SOSTANZE DI BASE	34
6.1.1. Il chitosano.....	35
6.2. SOSTANZE ATTIVE A BASSO RISCHIO.....	37
6.2.1. Chito-oligosaccaridi ed oligo-galatturonidi (COS-OGA).....	38
6.3. AGENTI DI LOTTA BIOLOGICA	39
6.3.1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	41
6.4. ESTRATTI VEGETALI.....	41
6.4.1. Terpeni	42
6.5. SOSTANZE AD AZIONE DISINFETTANTE	43
6.5.1. Acido peracetico	43

7. OBIETTIVI DELLA RICERCA	44
8. MATERIALI E METODI.....	45
8.1. DESCRIZIONE DEGLI APPEZZAMENTI PER CAVOLO CAPPUCCIO DA SEME	45
8.1.1. Disegno sperimentale e strategie saggiate per cavolo cappuccio da seme	47
8.2. DESCRIZIONE DELL'APPEZZAMENTO SPERIMENTALE PER CIPOLLA DA SEME.....	50
8.2.1. Disegno sperimentale e strategie saggiate per cipolla da seme	51
8.3. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI IN CAMPO.....	53
8.4. PROVE DI LABORATORIO: ANALISI MORFOLOGICA E MOLECOLARE DELLE PRINCIPALI MALATTIE RICONTRATE NEI CAMPI DI CAVOLI E CIPOLLE	59
8.4.1. Isolamento e identificazione dei principali funghi	59
8.4.2. Analisi molecolari per piante affetta da fitoplasmi	60
9. RISULTATI	62
9.1. ANDAMENTO METEOROLOGICO.....	62
9.2. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI IN CAMPO CAVOLO CAPPUCCIO DA SEME	64
9.2.1. Monterado, Trecastelli (AN): produzione di semente standard ...	64
9.2.1.1. Primo rilievo - 10 giugno 2021	64
9.2.1.2. Secondo rilievo - 21 giugno 2021	72
9.2.2. Montefiore dell'Aso (AP): produzione di semente ibrido	79
9.2.2.1. Primo rilievo - 17 giugno 2021	79
9.2.2.2. Secondo rilievo - 1 luglio 2021	87
9.3. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI IN CAMPO DI CIPOLLA DA SEME	94
9.3.1. Rilievo a San Lorenzo in Campo (PU)	94
9.4. PROVE DI LABORATORIO.....	95
9.4.1. Analisi morfologica di campioni sintomatici.....	95
9.4.2. Analisi molecolari su piante affette da fitoplasmosi.....	102
10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	104
11. BIBLIOGRAFIA.....	111
11. RINGRAZIAMENTI.....	120

“In agricoltura si dovrebbe fare un uso assai più limitato di prodotti chimici
ed entrare quanto più possibile in armonia con i processi naturali.
Nell’immediato forse questo farebbe calare i profitti,
ma nel lungo periodo sarebbe benefico”
(Dalai Lama)

RIASSUNTO

Le ortive da seme rappresentano un comparto di notevole importanza economica e strategica per la regione Marche. La recrudescenza di determinate malattie e la necessità di ottenere sementi di qualità hanno promosso la ricerca di soluzioni alternative per la protezione delle colture ortive dalle malattie trasmissibili via seme. Questo lavoro, realizzato nell'ambito del progetto PSR Marche "CleanSeed", ha come obiettivo quello di valutare, a livello aziendale, l'efficacia di diverse strategie innovative a basso rischio su cavolo cappuccio (sia ibrido che non) e cipolla da seme. Su cavolo sono state saggiate quattro diverse strategie di protezione, basate su chitosano, chito-oligosaccaridi e oligo-galatturonidi (COS-OGA), miscela di terpeni e *Bacillus amyloliquefaciens*. I composti sono stati valutati sia da soli, che in aggiunta ai convenzionali trattamenti aziendali. Per ogni appezzamento di cavolo sono stati effettuati due rilievi riguardanti malattie di tipo necrotico su foglie, steli e silique. Su cipolla sono stati saggiati chitosano, COS-OGA, miscela di terpeni, *Bacillus* spp. e un disinfettante, ed è stato condotto un rilievo sulle infezioni di scapo fiorale e steli. I risultati ottenuti mostrano, nei due appezzamenti di cavolo cappuccio, che le strategie hanno mostrato livelli di efficacia variabili in funzione dell'organo valutato e del tipo d'impiego dei composti. Sulle foglie, nella porzione di campo dove i prodotti innovativi sono stati applicati da soli, la miscela di terpeni e il chitosano hanno assicurato dei livelli di efficacia più elevati di protezione, da necrosi fogliari dovute a infezioni fungine. COS-OGA ha fornito livelli più significativi quando abbinato ai trattamenti aziendali. Per quanto riguarda steli e silique, invece, le strategie basate sull'impiego di *B. amyloliquefaciens* e miscela di terpeni hanno mostrato risultati più promettenti rispetto a quelle basate su altri composti innovativi. Su cipolla, la strategia basata sull'impiego di chitosano ha mostrato i risultati migliori nei confronti delle infezioni dello scapo fiorale e steli.

In base alle indagini di laboratorio sui sintomi osservati nei campi sperimentali, è stato possibile stimare la presenza di uno o più patogeni nelle varie sintomatologie osservate. Su campioni di cavolo sono stati identificati: *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Stemphylium* spp. *Cladosporium* spp. e *Phoma lingam*. Nell'appezzamento della cipolla, sono state identificate soltanto colonie di *Botrytis* spp. I dati ottenuti aprono la strada a nuove strategie di protezione basate sull'impiego di sostanze naturali nella gestione delle avversità fungine che colpiscono il cavolo cappuccio e la cipolla per la produzione di seme.

ABSTRACT

Seed-bearing crops represent a sector with considerable economic and strategic importance for the Marche region. The recrudescence of some fungal diseases and the requirement to obtain seeds with high quality, have promoted the search for alternative solutions to protect seed-bearing vegetable crops from diseases that can be transmitted through seeds. This work, developed within the *PSR Marche* project “CleanSeed”, aimed to evaluate, under farming conditions, the effectiveness of several innovative protection strategies with low-risk active substances on cabbage (both hybrid and standard) and onion. Four different protection strategies were tested on cabbage, based on chitosan, chito-oligosaccharides and oligo-galacturonides (COS-OGA), mixture of terpenes and *Bacillus amyloliquefaciens*. These compounds were evaluated both alone and added to conventional company treatments. For each cabbage field, two assessments were carried out regarding necrotic diseases on leaves, stems and siliques. On onion were tested chitosan, COS-OGA, a mixture of terpenes, *Bacillus* spp. and a disinfectant, and one assessment was carried out on the infections of the floral scape and stems. The results showed that in the two cabbage fields, all the innovative strategies tested demonstrated variable levels of protection according to plant portions. On the leaves, in the part of the field where the innovative products were applied alone, the mixture of terpenes and chitosan generally showed higher levels of protection against leaf necrosis due to fungal infections. COS-OGA was more effective when applied together with standard treatments. For stems and siliques, the strategies with *B. amyloliquefaciens* and the mixture of terpenes showed most promising results. On onion, the chitosan strategy showed good effectiveness toward diseases of the flowers and stems.

According to the laboratory investigations on different symptoms observed in the experimental field, it was estimated the presence of one or more pathogens in the observed symptoms. On cabbage, the main fungi detected were: *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Stemphylium* spp., *Cladosporium* spp. and *Phoma lingam*. On onion, the only fungus detected was *Botrytis* spp. The results obtained from this study open the way for new protection strategies based on the use of natural substances in the management of fungal diseases of seed-bearing vegetables.

1. INTRODUZIONE

La propagazione per seme è particolarmente importante per le colture annuali, le quali vengono seminate ogni anno e viene adotta per la maggior parte delle specie ortive. Le piante propagate per seme presentano diversi vantaggi: facile meccanizzazione delle operazioni di semina, sia queste avvengano in pieno campo con semina diretta o in vivaio con il successivo trapianto in campo; permettono di conservare per lungo tempo il materiale genetico; la possibilità di decidere quale pianta coltivare in base a delle caratteristiche come la dimensione del frutto, il periodo di fioritura, adattamento all'ambiente circostante e la resistenza ai patogeni. Dal momento in cui si verifica la meiosi con il rimescolamento dei genotipi ricombinati, la progenie differisce sempre dai genitori, per questo l'agricoltore ha maggiore scelta di piante con caratteristiche specifiche della specie desiderata. Le piante riprodotte per seme presentano una vigoria e un ritmo di crescita superiore rispetto alle piante propagate per via vegetativa. Infatti, una pianta ottenuta da seme riesce a sviluppare un apparato radicale più profondo e più stabile, in grado di esplorare al meglio il suolo e raggiungere più facilmente le sostanze nutritive garantendo resilienza e longevità alla pianta.

Le colture ortive da seme sono considerate colture ad alto reddito e quindi rappresentano una valida alternativa alle sementi classici per le aziende con superfici degli appezzamenti poco estese, anche se servono più competenze tecniche rispetto ad altre colture come i frumenti. L'acquisto delle sementi costituisce una voce molto importante fra i costi di produzione, arrivando anche al 20-25% del totale dei costi. In Italia, uno dei principali requisiti richiesti per la compravendita delle sementi è la certificazione sanitaria, sancita dalla Legge n. 195 del 1976, perché molte malattie possono essere causate e diffuse da patogeni che infettano o contaminano i semi. Il seme, infatti, rappresenta un efficiente vettore di disseminazione di patogeni a breve e lunga distanza. Circa il 90% delle colture alimentari del mondo sono riprodotte per seme, pertanto, l'uso di sementi certificate il cui stato sanitario è stato valutato, è raccomandato per evitare importanti perdite economiche e l'introduzione di organismi nocivi in nuove aree. La coltivazione di semi infetti o infestati è attualmente considerata, fra i principali fattori di perdita sia economica, in quanto, c'è un aumento dei costi di gestione (o addirittura la perdita della coltivazione), ma soprattutto ambientale, poiché con l'introduzione involontaria di organismi patogeni, si vanno a diffondere delle malattie in aree dove non erano presenti. I diversi organismi patogeni sono in

grado di insediarsi nel nuovo territorio grazie alla capacità di adattamento all'ambiente e alla loro diffusione attraverso un gran numero di piante ospiti, senza indurre manifestazioni patologiche in grado di creare delle epidemie. Per questa ragione è importante eseguire dei controlli fitosanitari sulle sementi oggetto di scambio tra paesi. L'agente patogeno può essere trasmesso dalla pianta ai semi che genera e quindi la malattia continua a diffondersi. Per garantire l'elevata qualità sanitaria dei semi, sulle colture destinate alla produzione di semente per la propagazione, vengono generalmente effettuati un elevato numero di trattamenti fitosanitari durante la stagione. Le colture da seme necessitano generalmente di un numero più elevato di trattamenti fitosanitari con prodotti chimici rispetto alle colture destinate al consumo umano, poiché esse restano in campo per periodi generalmente più lunghi, risultando quindi più esposte alle avversità. Inoltre, non essendo direttamente destinate all'alimentazione umana, viene meno considerato il problema dei residui di agrofarmaci. Questo si può tradurre in un elevato impatto ambientale nei siti di produzione, dovuto all'utilizzo di molecole nocive per l'ambiente, per l'uomo e per gli animali come gli insetti pronubi, fondamentali per il risultato produttivo. Tuttavia, è in corso un processo di riduzione dell'uso di agrofarmaci ed è quindi importante sviluppare nuove strategie di protezione a basso impatto ambientale, che consentano di salvaguardare la qualità delle produzioni, l'ambiente e il reddito degli agricoltori. D'altro canto, il problema della resistenza dei patogeni ai prodotti chimici, il cambiamento climatico e la recrudescenza di alcune patologie, stanno minacciando la redditività di queste colture. Per questo sono necessarie nuove strategie di protezione sostenibili dal punto di vista ambientale, sociale ed economico per la produzione di sementi di alta qualità. Tuttavia, queste nuove strategie necessitano di una validazione d'efficacia nei contesti operativi aziendali.

1.1. PRODUZIONE DELLE SEMENTI NELL'ORTICOLTURA ITALIANA

La produzione delle sementi riveste un ruolo fondamentale nell'agricoltura italiana, in particolare, per la produzione di sementi orticole. Il valore del mercato delle sementi stimato al livello globale è di circa 25 miliardi di euro. In modo particolare la coltura che fa da padrone è il mais, con il 40% del mercato, seguito dalle orticole con un 13-14%. Il mercato italiano di sementi vale circa un miliardo di euro con un 30% dedicato alla moltiplicazione di seme delle orticole. Il

territorio della dorsale adriatica, quasi interamente composto da aree collinare e pianeggianti, è compreso tra il mare Adriatico e l'Appennino. Questa tipologia di territorio è idonea per la coltivazione delle sementi poiché ha un buon isolamento geografico, valli ventilate, un clima mite con piogge autunnali e primaverili. Alcuni agricoltori locali hanno approfittato delle ottime caratteristiche del territorio per la produzione di piante da seme, ampliando le conoscenze tecniche e tecnologiche per la lavorazione. Le pratiche colturali impiegate in aree geografiche particolarmente idonee rappresentano la combinazione ottimale per produrre semi di elevata qualità. Nel 2020 dalle Marche sono stati esportati circa 4979,85 dt semi di orticole, di cui 565,43 dt semi appartenenti alle *Liliaceae* e 926,27 dt appartenenti alle specie *Brassica* spp. Secondo l'Associazione Italiana Sementi (AIS), nel 2021 sono stati oltre 36.000 gli ettari destinati alla produzione delle sementi di ortive e aromatiche in Italia, facendo registrare nel complesso una crescita del 10% rispetto all'anno precedente e del 28% considerando le sementi prettamente ortive. A livello di distribuzione territoriale, la regione leader resta l'Emilia-Romagna con 12.264 ettari, seguita da Puglia con 9.650 ettari e dalle Marche con 6.639 ettari; anche il Molise si conferma un'importante regione sementiera con 4.376 ettari (dati AIS, 2021) (Tabella 1). La produzione di seme biologico è concentrata in tre regioni: Emilia-Romagna, Puglia e Marche (Figura 1).

Tabella 1 - Ripartizione regionale delle superfici destinate alla coltivazione di piante ortive da seme in Italia (in ettari) dal 2018 al 2021 (AIS, 2021).

REGIONI	2018	2019	2020	2021
Emilia-Romagna	9.855	9.704	10.705	12.264
Puglia	3.596	6.065	8.653	9.650
Marche	3.996	3.498	5.467	6.639
Molise	408	1.847	4.981	4.376
Umbria	399	460	468	829
Piemonte	577	726	932	793
Abruzzo	82	148	611	737
Lazio	90	292	832	510
Toscana	280	47	246	321
Basilicata	80	4	84	270
Campania	72	29	334	209
Veneto	20	26	36	100
Lombardia	0	12	30	60
Calabria	0	12	13	4
TOTALE	19.452	22.870	33.391	36.752

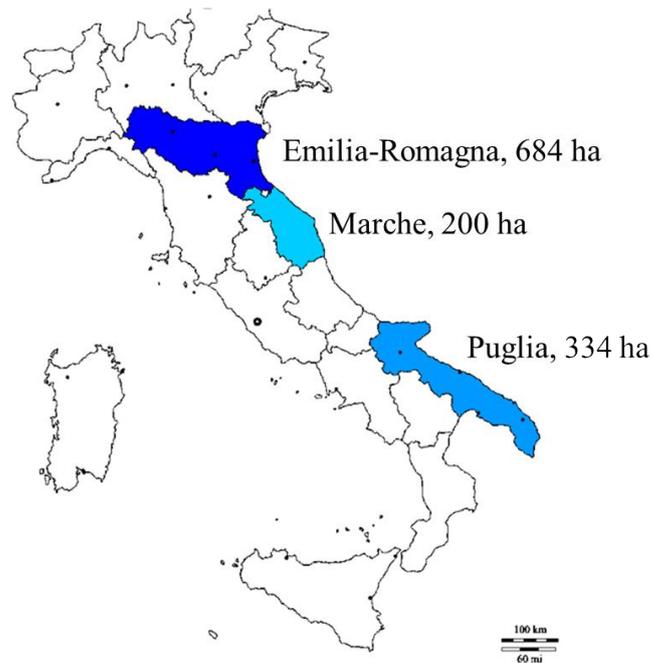


Figura 1 - Mappa degli areali di produzione biologica delle colture orticole da seme - distribuzione geografica in ettari (Assosementi, 2020).

2. CAVOLO CAPUCCIO DA SEME

Il nome scientifico del cavolo cappuccio è *Brassica oleracea* var. *capitata*. Questa brassicacea presenta un ciclo biennale e si può coltivare per quasi tutto l'anno secondo il ciclo stagionale perché esistono molte varietà adatte alle diverse stagioni. Ha uno o più steli eretti di 40-50 cm, con foglie larghe, lisce ed embricate, avvolte le une sulle altre a formare una testa compatta la quale racchiude il germoglio centrale. È di colore verde nella maggior parte delle varietà mentre il cuore è di colore biancastro. La fioritura avviene al secondo anno dopo aver superato l'inverno, le ramificazioni del corimbo si allungano e terminano con l'infiorescenza a racemo di colore giallo. Per favorire lo stelo florale è utile eseguire in primavera un'incisione profonda a forma di croce sulla testa del cavolo per tutta la sua lunghezza (Figura 2). La fioritura inizia verso maggio, lo stigma è ricettivo prima dell'apertura delle antere, per favorire l'impollinazione incrociata. L'impollinazione è prevalentemente entomofila ad opera di insetti pronubi e rappresenta una fase cruciale del ciclo colturale se l'obiettivo è quello di ottenere semi. I frutti si chiamano silique e contengono dei piccoli e tondeggianti semi col peso di mille semi di 2-4 g. La durata germinativa è di 3-4 anni con una germinabilità di commercializzazione minima del 70%. In Italia, la produzione di cavolo cappuccio è concentrata soprattutto nelle zone centro-meridionali con una superficie di 3896 ha con una produzione di circa 1035371 t. Nelle Marche si

coltiva su una superficie di 66 ha con produzione totale 22310 t (Istat, 2019). La superficie totale italiana per la produzione delle sementi per il cavolo è stata di 871 ha nel 2020 mentre nel 2021 è stata di 959 ha (ASI, 2021).



Figura 2 - Incisione della testa del cavolo cappuccio per favorire la crescita degli steli per la produzione del seme.

2.1. LE PRINCIPALI MALATTIE CRITTOGAMICHE DEL CAVOLO CAPPuccio

2.1.1. Alternariosi delle *Brassicaceae*

I funghi appartenenti al genere *Alternaria* spp. sono diffusi in tutto il mondo, e colpiscono la maggior parte delle colture crucifere, inclusi broccoli e cavolfiore (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.), cavolo cinese o sedano (*B. pekinensis*), cavolo (*B. oleracea* var. *capitata*) (Mamgain, 2013). Le specie appartenenti al genere *Alternaria* sono un gruppo di funghi ascomicete e sono noti come patogeni o saprofiti delle piante. Alcuni di loro vivono su parti di piante: foglie, semi e frutti e possono causare dei marciumi.

Durante il periodo vegetativo il micelio produce ife e conidiofori che producono spore libere dette conidi. I singoli conidi germinando danno origine a un nuovo micelio. Questo tipo di riproduzione si verifica quando le condizioni ambientali sono favorevoli (Forgiarini *et al.*, 2012) (Figura 3). La temperatura ottimale per la germinazione dei conidi è compresa tra i 12-25°C, umidità relativa > 70% e la dispersione avviene tramite vento o acqua, andando a colpire la pianta.

In condizioni avverse si verifica la produzione sessuale, con la formazione delle ascospore che vengono liberate per rottura dell'asco; con la loro germinazione daranno di nuovo inizio al ciclo (Forgiarini *et al.*, 2012; Pratibha *et al.*, 2021).

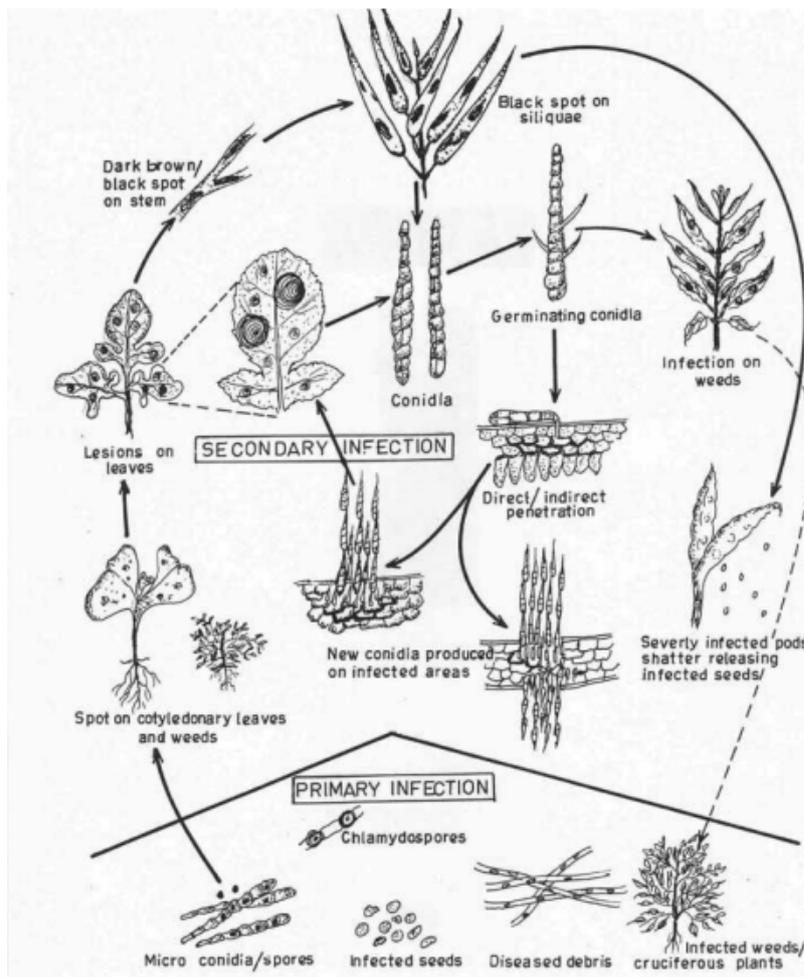


Figura 3 - Rappresentazione schematica del ciclo biologico di *Alternaria* spp., agente responsabile dell'alternariosi su *Brassicaceae* (Pratibha *et al.*, 2021).

I sintomi di questa malattia includono la presenza di macchie fogliari irregolari, spesso circolari di colore che vira da marrone a marrone scuro sulle foglie con linnee concentriche all'interno delle macchie (Figura 4). In diversi casi si formano anche piccole macchie di colore scuro sulle silique e sui teneri rametti (Valkonen *et al.*, 1990). A causa della loro vasta gamma di ospiti e della distribuzione mondiale, le specie di *Alternaria* spp. causano gravi problemi economici (Chung, 2012). *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola* e *Alternaria brassicae* sono i fitopatogeni più comuni e importanti che causano alternariosi su cavolo cappuccio e sono responsabili di perdite qualitative e quantitative importanti.



Figura 4 - Sintomi su foglia di cavolo cappuccio provocati da *Alternaria* spp.

2.1.1.1. *Alternaria alternata*

Alternaria alternata (Fr.) Keissl. (1912) è una delle specie fungine più cosmopolite (Thomma, 2003). *A. alternata* da sola può infettare più di 100 specie di piante (Chung, 2012). Tuttavia, *A. alternata* produce delle tossine specifiche nell'ospite causando malattie necrotiche in diverse piante (Thomma, 2003). L'infezione da *A. alternata* è diventata la più importante malattia postraccolta delle colture ortive. I sintomi della malattia compaiono inizialmente sulle foglie più vecchie come macchie circolari di colore da marrone a marrone scuro (Valkonen *et al.*, 1990). Attacca soprattutto le foglie (su cui provoca macchie e disseccamenti), ma anche altri organi delle piante. Questo patogeno produce conidi neri in catene; al microscopio questi conidi hanno una forma molto variabile, $5,0-17,0 \mu\text{m} \times 4,0-8,5 \mu\text{m}$, con setti trasversali e longitudinali. Anche i becchi dei conidi avevano una forma molto variabile, da $1,7 \mu\text{m}$ a $14,0 \mu\text{m}$ di lunghezza (Moumni *et al.*, 2020) (Figura 5). *A. alternata*, inoltre, presenta un elevato rischio di sviluppare resistenze ai fungicidi, come gli inibitori dell'ubichinolo, gli inibitori dell'enzima succinato deidrogenasi e gli inibitori della biosintesi degli steroli (Wang *et al.*, 2021). Un altro aspetto da tenere in considerazione è che *A. alternata* può essere facilmente trasmessa da una coltura

alla successiva tramite semi (Guillemette *et al.*, 2003) e per questo va gestita in maniera opportuna nelle coltivazioni destinate a produrre semi.

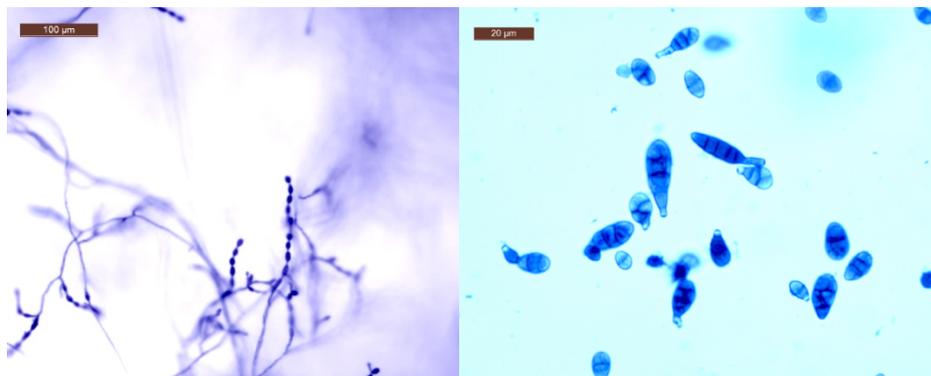


Figura 5 - Dettaglio al microscopio ottico dei conidi di *Alternaria alternata* in catene (a sinistra) e dettaglio sulla variabilità della loro forma (a destra) (Moumni *et al.*, 2020).

2.1.1.2. *Alternaria brassicicola*

Alternaria brassicicola (Schwein.) Wiltshire è responsabile di una delle malattie, che colpisce foglie e steli, più distruttive nelle brassicacee coltivate in tutto in mondo (Macioszek *et al.*, 2018). I sintomi di *A. brassicicola* su cavolo possono inizialmente svilupparsi su giovani piante in semenzaio (Gorny *et al.*, 2014). Il ciclo vitale di *A. brassicicola* è quello di un tipico patogeno necrotrofico e delle altre specie del genere *Alternaria*: può essere saprofita sui resti di piante morte o su tessuti necrotizzati di un ospite vivente (Macioszek *et al.*, 2018). Questo la rende un patogeno molto difficile da eradicare una volta insediato può essere facilmente trasmessa tramite semi, porzioni di suolo e dal vento (Macioszek *et al.*, 2018). I semi possono essere contaminati da spore superficiali o infettati internamente dal fungo. Le spore sulla superficie del seme possono rimanere vitali fino a due anni, mentre se la contaminazione è interna il micelio fungino può rimanere vitale per più di 12 anni. Il fungo può anche sopravvivere nei resti colturali nel terreno delle crucifere infettate o sulle infestanti delle crucifere (Gorny *et al.*, 2014). Il patogeno attacca tutte le crucifere coltivate, in modo particolare cavolo, cavolfiore e ravanella. Le condizioni climatiche favorevoli per l'insorgere dell'infezione sono condizioni di elevata umidità e temperature intorno ai 25-27°C. Il patogeno si conserva sul seme, solitamente sui tegumenti esterni e più raramente sull'embrione, e sui residui delle piante infette, dove vi può rimanere per periodi piuttosto lunghi sotto forma di micelio. La contaminazione del seme avviene soprattutto dopo lo sfalcio e durante la trebbiatura. Responsabili

dell'infezione sono i conidi prodotti in corrispondenza dei tessuti colpiti e dispersi principalmente dal vento e dalle piogge (Figura 6).

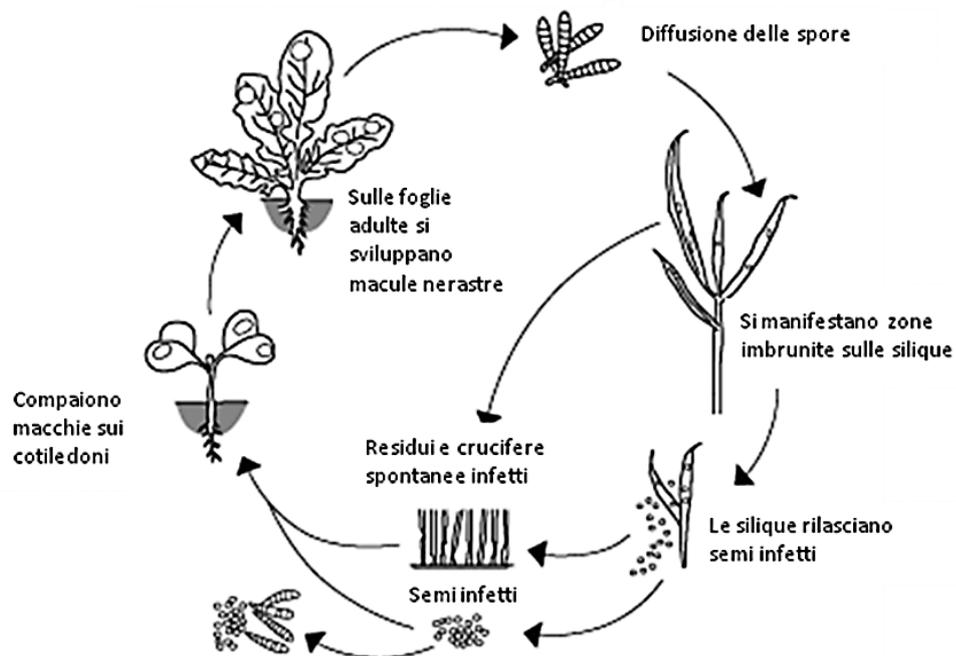


Figura 6 - Schematizzazione del ciclo vitale di *Alternaria brassicicola*, uno dei principali agenti causali dell'alternariosi su cavolo (Crescenzi *et al.*, 2015).

Questo patogeno ha conidi in catene 7-10 conidi, di forma da ovoidale a ellissoide, di colore da marrone a marrone scuro, la dimensione è $8-60 \mu\text{m} \times 6-16 \mu\text{m}$, con 0-8 setti trasversali e longitudinali ispessiti, generalmente lisci a volte ruvido (Nishikawa e Nakashima 2020) (Figura 7).

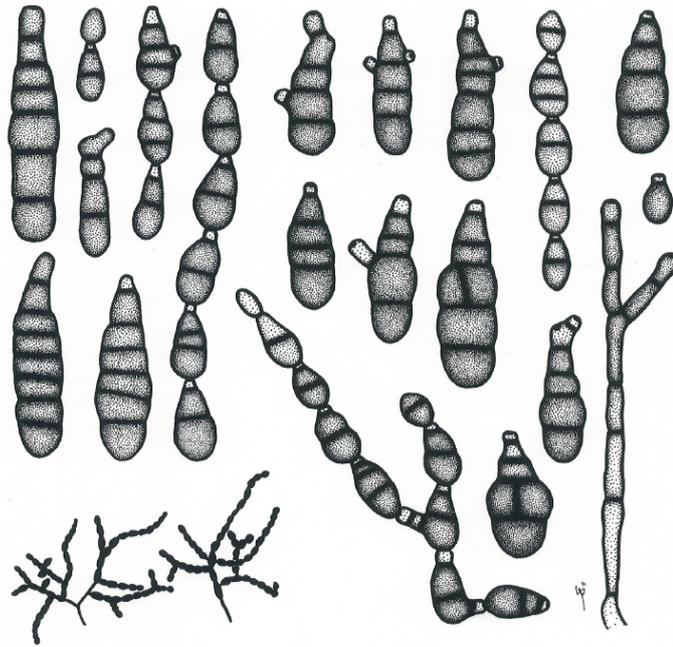


Figura 7 - Illustrazioni morfologiche dei conidi di *Alternaria brassicicola*. Barra della scala = 25 µm (Nishikawa e Nakashima 2020).

2.1.1.3. Cancro del fusto

Il cancro del fusto delle *Brassicacee* è una malattia di importanza mondiale causata dal fungo ascomicete *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm., la cui forma perfetta è *Leptosphaeria maculans*. Il cancro del fusto, noto anche come marciume secco del fusto, è una grave malattia delle crucifere diffusa in tutto il mondo. I primi sintomi compaiono in semenzaio e sono osservabili anche sul seme sotto forma di macule decolorate di varie forme e dimensioni, dal seme il patogeno passa sui cotiledoni dove compaiono delle zone cancerose e si differenziano le prime fruttificazioni picnidi che, responsabili della diffusione della malattia sugli altri organi della pianta (Fitt *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2019). Le infezioni secondarie si sviluppano su tutte le parti della pianta adulta: foglie, piccioli, fusti, radici. Sulle foglie si evidenziano lesioni di colore bianco-grigio, che col tempo imbruniscono, necrotizzano e si lacerano; sui piccioli e sui fusti, invece, si manifestano macchie longitudinali, prima sparse poi confluenti, caratterizzate da un alone brunastro alla periferia, che dopo 6-7 giorni si presentano come veri e propri cancri secchi (Figura 8). Sull'apparato radicale si formano zone cancerose molto simili. Su tutti i tessuti colpiti, al centro delle lesioni, è facile individuare i picnidi caratteristici del patogeno.

Il cancro del fusto ha rilevanza agronomica perché può causare l'allettamento della pianta prima della raccolta (Dilmaghani *et al.*, 2013). Questa malattia

interessa molte crucifere di tipo ortivo, è diffusa in particolar modo su cavolo, cavolfiore, cavolo di Bruxelles e ravanello. Un clima umido con frequenti piogge e temperature intorno ai 20°C favoriscono l'attacco da parte del patogeno, che si trasmette principalmente tramite semi infetti e si conserva a lungo sui residui delle piante attaccate. Sui resti vegetali il fungo può produrre periteci neri, immersi nel tessuto fogliare o erompenti, ostiolati e globosi (ciclo sessuale) o picnidi brunonerastri e globosi, di dimensioni variabili (ciclo asessuale) (Figura 8). Durante i periodi piovosi, nel primo caso i periteci rilasciano le ascospore, che vengono disperse dal vento; nel secondo caso, i picnidi rilasciano i conidi, che si diffondono grazie all'azione della pioggia (Rouxel *et al.*, 2005). Ascospore o conidi si depositano sulle giovani piante o sui cotiledoni, penetrano nei tessuti ospiti attraverso gli stomi o le ferite e causano l'infezione primaria. Dall'inizio del processo infettivo, trascorrono 7-8 giorni prima che i sintomi caratteristici compaiano sulle parti aeree della pianta. Successivamente, in corrispondenza dei tessuti colpiti dal patogeno, si formano nuovamente i picnidi, al cui interno si differenziano i conidi che, una volta rilasciati sempre tramite le piogge, raggiungono altre foglie e piante vicini causando le infezioni secondarie (Travadon *et al.*, 2007).

Phoma lingam si trasmette principalmente tramite semi infetti e si conserva a lungo sui residui delle piante attaccate (Crescenzi *et al.*, 2015). Le principali strategie preventive per la difesa da questa avversità prevedono: uso di semi non infetti; disinfezione dei semi e del terreno dei semenzai; appropriate rotazioni colturali ed eliminazione dei residui colturali (Crescenzi *et al.*, 2015).

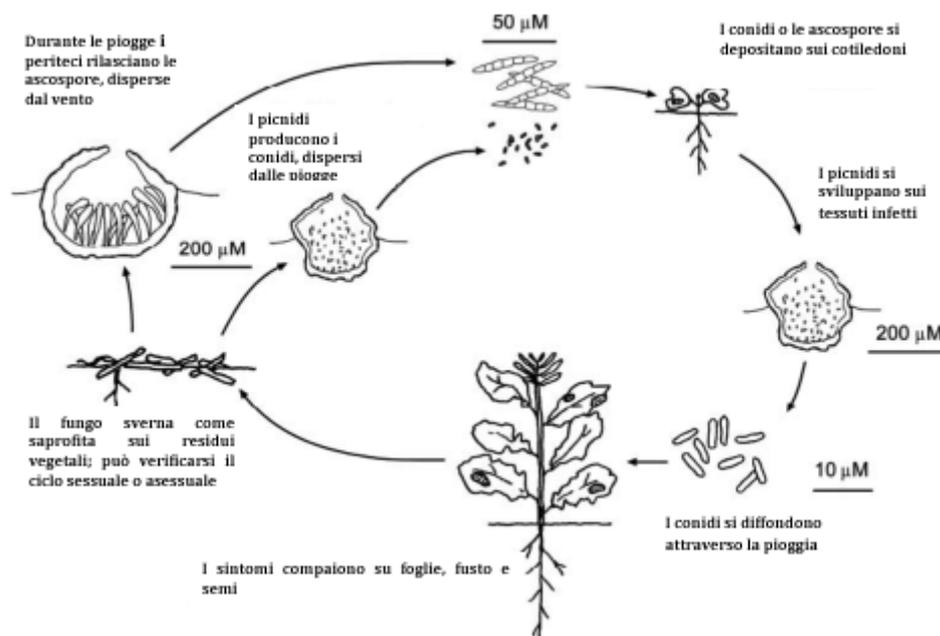


Figura 8 - Rappresentazione del ciclo vitale di *Phoma lingam*, agente responsabile del cancro del fusto delle crucifere (Howlett *et al.*, 2001).

2.1.1.4. Fusariosi

La fusariosi delle piante è una malattia causata dai funghi del genere *Fusarium*, comprendono danni distruttivi sulle colture cerealicole e l'avvizzimento e marciume radicale sulle colture orticole (Snyder *et al.*, 1940). *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* è l'agente causale dell'avvizzimento del cavolo, meglio conosciuto come *cabbage Fusarium wilt* (CFW), che rappresenta una grande minaccia per la produzione globale di cavolo (Yu *et al.*, 2021). Climi caldo-umidi e ristagni idrici rappresentano condizioni ideali per questo patogeno, le cui spore vivono nel terreno.

Le piante che ne sono colpite prima ingialliscono, cessano di crescere e le loro foglie inferiori mostrano tendenza a cadere appena toccate. Se le piante sono infette nei vivai prima del trapianto, non crescono più dopo questa operazione, ma diventano nere e muoiono. Le foglie si staccano tutte a poco a poco dal gambo e infine resta il gambo completamente nudo o con un piccolo ciuffo di foglie mal sviluppate all'apice (Bessey, 1911) (Figura 9).



Figura 9 - Sintomi su piante di cavolo provocati da *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans* (www.omafra.gov.on.ca/IPM/english/index.html).

2.1.1.5. Fitoplasm

I fitoplasm e le malattie delle piante associate rappresentano una seria minaccia per la produzione di diverse colture orticole, poiché portano a gravi perdite di resa in tutto il mondo. I fitoplasm infettano oltre 700 specie vegetali, comprese molte colture economicamente importanti come alberi da frutto e piante ornamentali (Bertaccini, 2007). I fitoplasm mancano di pareti cellulari rigide, sono circondati da una singola membrana e sono sferici o pleiomorfi con dimensioni simili a quelle dei micoplasm; pertanto, i fitoplasm sono stati chiamati organismi simili ai micoplasm alla loro scoperta nel 1967 (Doi *et al.*, 1967). Non sono coltivabili in vitro, sono biotrofi assoluti, sono sistemici e possono invadere tutti gli organi con floema attivo della pianta (radici, fusto, foglie, frutti).

In natura i fitoplasm sono trasmessi soprattutto da insetti vettori, in particolare omotteri (fra questi ricordiamo soprattutto cicadellidi e psillidi). L'insetto si nutre su una pianta infetta assorbendo il fitoplasma con la suzione di linfa elaborata e quando va a nutrirsi su di una nuova pianta ospite, i fitoplasm vengono introdotti nel tessuto floematico insieme ai fluidi salivari (Oshima *et al.*, 2013). La trasmissione dei fitoplasm può avvenire anche durante la propagazione vegetativa, come l'innesto e la talea, o tramite piante infestanti parassite come cuscuta o fanerogame.

Le piante infette mostrano una vasta gamma di sintomi, alcuni più comuni come arresto della crescita, ingiallimenti, scopazzi (proliferazione dei germogli), fillodia (formazione di tessuti simili a foglie anziché fiori), virescenza

(inverdimento degli organi floreali), proliferazione (proliferazione di organi, in genere di germogli), arrossamento di foglie e steli e necrosi del floema (Hogehout *et al.*, 2008), perdita della dominanza apicale, fioriture fuori stagione, frutti piccoli, stopposi, senza succo. L'infezione da fitoplasmi è spesso fatale e provoca danni devastanti alla produzione agricola in tutto il mondo. Nel 2001 un'epidemia fitoplasmatica nei meli ha causato in Italia una perdita di circa 100 milioni di euro (Oshima *et al.*, 2013). Inoltre, si prevede un aumento delle malattie associate ai fitoplasmi perché il riscaldamento globale risulta vantaggioso per i vettori sensibili al freddo (Hogehout *et al.*, 2008).

3. CIPOLLA DA SEME

Allium cepa L. è una pianta erbacea a ciclo biennale, che al primo anno forma il bulbo e le foglie e al secondo anno lo scapo fiorale. Lo scapo fiorale (quindi le infiorescenze) si origina in primavera dai germogli nati dopo un periodo di quiescenza. Gli scapi fiorali hanno un diametro compreso 2-4 mm e un'altezza tra 80-120 cm, in genere sono tubolari e portano all'estremità l'infiorescenza sferica protetta da una spata che si apre con 2-4 valve. I fiori sono bianchi ed ermafroditi, con spiccata proterandria, che favorisce la fecondazione incrociata (Figura 10). I semi sono regolari, angolosi e raggrinziti di colore nero. Il peso di mille semi è di 3-4 g con la facoltà germinativa di 1-2 anni. Per legge la germinabilità ammessa è pari al 70%.



Figura 10 - Scapo fiorale di cipolla (*Allium cepa* L.).

La cipolla è un ortaggio da bulbo che può essere usato sia per il consumo fresco o dopo conservazione durante la cottura per aromatizzare altri alimenti. È

originario dell'Asia centrale e si è diffuso nel resto del mondo. In Italia è coltivato su 12851 ha, concentrate nelle regioni del sud Italia e dell'Emilia- Romagna (Istat, 2021). Nelle Marche la coltivazione del bulbo delle cipolle si diffonde su circa 32 ha con una produzione di 8713 t (Istat, 2021). La superficie totale in Italia per la produzione delle sementi per la cipolla è di 920 ha sia nel 2020 sia nel 2021 (ASI, 2021).

3.1. LE PRINCIPALI MALATTIE CRITTOGAMICHE DELLA CIPOLLA

3.1.1. Infezioni di *Botrytis* spp. su cipolla

Le principali specie di *Botrytis* associate alle malattie delle colture di *Allium cepa* sono *Botrytis squamosa* J.C. Walker e *Botrytis allii* Munn, Bull., sono funghi appartenenti alla famiglia delle sclerotiniaceae e si distinguono dall'origine dell'infezione. *Botrytis* spp. genera un sintomo bianco-grigiastro attraverso lo stelo e si sviluppano piccoli sclerozi neri (Figura 11) (Du Toit *et al.*, 2004).

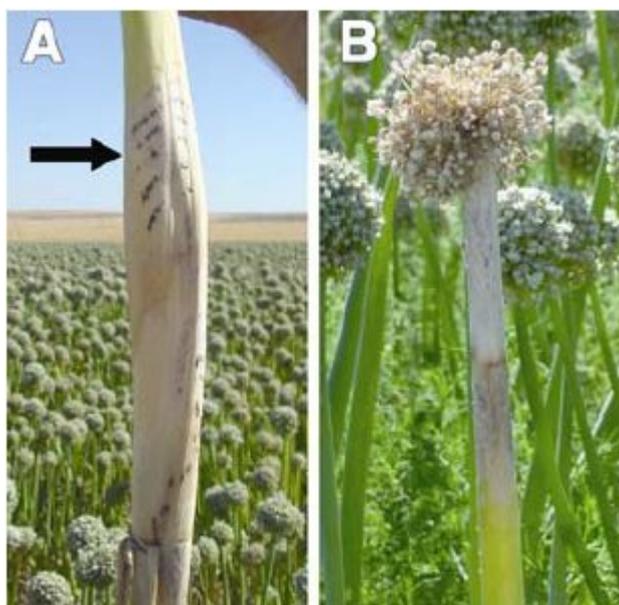


Figura 11 - Sintemi e segni di *Botrytis* spp su stelo di cipolla. (A) Gli sclerozi sono presenti tra le squame nella regione del collo. (B) Sintomi di marciume del collo della cipolla causati da *Botrytis* spp. (Du Toit *et al.*, 2004).

La fonte primaria dell'inoculo proviene dalla germinazione degli sclerozi o del micelio dormiente che si trova nel terreno, sui bulbi, sui residui colturali o dalla sporulazione delle piante attaccate nelle colture vicine con il ciclo colturale più avanzato. Gli sclerozi germinano a una temperatura compresa tra 3 e 27 °C, *optimum* a 9 °C (Wordell Filho *et al.*, 2006). Da questi si originano i conidi che

trasportati dal vento o della pioggia giungono sulle foglie dove inizia l'infezione, che può portare al disseccamento della foglia. I conidi hanno breve sopravvivenza in forma libera nei periodi caldi e/o secchi. La produzione e la dispersione dell'inoculo sono elementi chiave da tenere in considerazione nella determinazione del periodo di infezione, al fine di prevedere epidemie di malattie policicliche, come nel caso di *B. squamosa* (Wordell Filho *et al.*, 2006) (Figura 12).

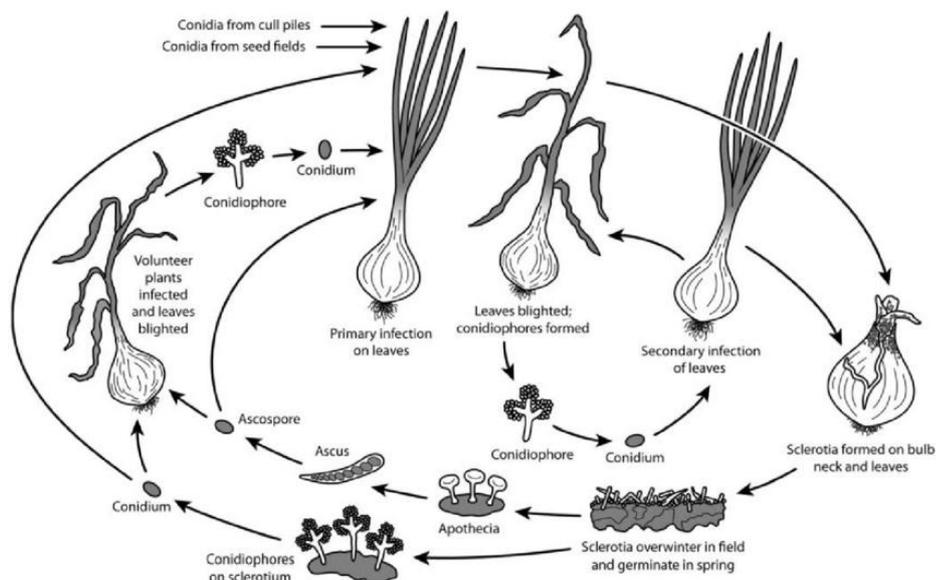


Figura 12 - Rappresentazione schematica del ciclo biologico di *Botrytis squamosa* su cipolla (Carisse *et al.*, 2011).

Le epidemie di *Botrytis* spp. nelle colture di cipolla si registrano con maggiore intensità nelle stagioni umide, con basse temperature e poca luce (Wordell Filho *et al.*, 2006). I semi come mezzo di sopravvivenza e diffusione di *B. squamosa* sono stati studiati per la prima volta da Ellerbrock e Lorbeer nel 1977, i quali hanno rilevato il patogeno nei semi conservati fino a 17 mesi (Wordell Filho *et al.*, 2006). *Botrytis* spp. attacca i tessuti fogliari integri determinando la comparsa di tacche depresse, biancastre, di ampiezza e forma variabili, sovente confluenti, con successivo disseccamento dei tessuti e della parte distale delle foglie. Nei casi più gravi si giunge alla pressoché totale distruzione della vegetazione fogliare (Pollini, 2017). Oltre ai convenzionali trattamenti chimici, per la gestione di *Botrytis* spp., è una buona pratica effettuare rotazioni culturali ed evitare ristagno idrico. È stato dimostrato che l'applicazione di *Bacillus subtilis* riduce la gravità della malattia e protegge le piante durante la stagione di crescita (Abo-Elyousr *et al.*, 2020).

3.1.2. Peronospora della cipolla

La peronospora della cipolla è presente a livello globale, essendo segnalata nei principali paesi produttori di ortaggi. La prima segnalazione documentata risale al 1841 in Inghilterra (Rockenbach *et al.*, 2016).

La peronospora è causata dall'oomicete *Peronospora destructor* (Berk.) Casp. ex Berk, patogeno policiclico. *P. destructor* produce due tipi di spore, gli sporangi cui è affidata la diffusione della malattia in condizioni ambientali favorevoli e le oospore che consentono al patogeno di superare le condizioni avverse di anno in anno. La disseminazione nell'ambiente avviene per opera degli sporangi trasportati dal vento e dalla pioggia; una volta giunti a contatto con la pianta richiedono un velo d'acqua e una temperatura non superiore a 28 °C per iniziare l'infezione. Il tubo germinativo penetra attraverso gli stomi e si accresce occupando gli spazi intercellulari e assorbendo il contenuto del citoplasma delle cellule vegetali. Trascorso il periodo d'incubazione, si formano nuovi sporangi in grado di dare inizio ad altri cicli infettivi (Figura 13).

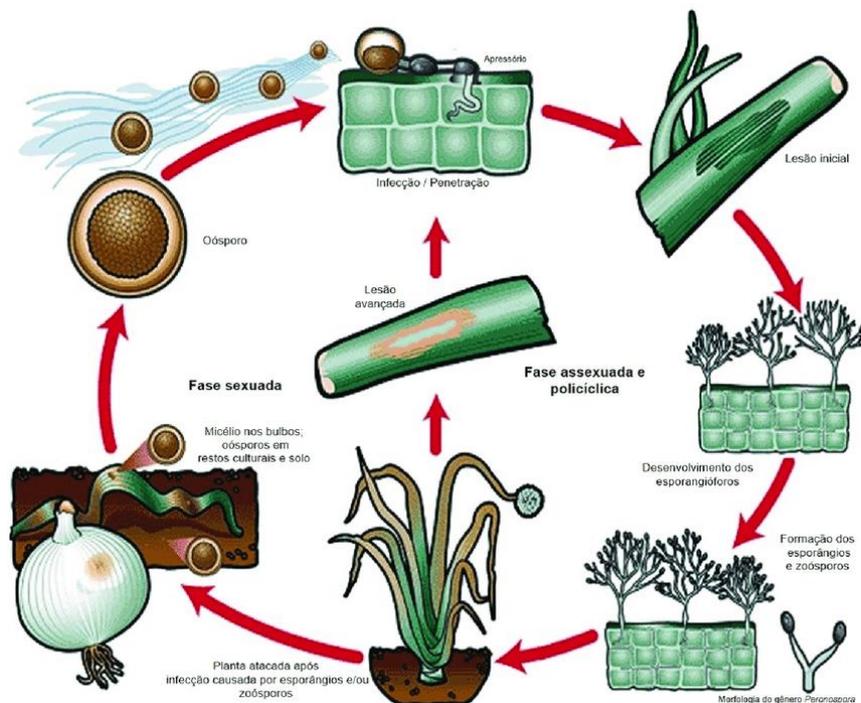


Figura 13 - Rappresentazione schematica del ciclo vitale di *Peronospora destructor*, agente responsabile della peronospora della cipolla (Rockenbach *et al.*, 2016).

In condizioni favorevoli, la malattia può causare una riduzione della produttività fino al 75% (Rockenbach *et al.*, 2016). La malattia può essere

trasmessa attraverso il materiale di propagazione, in questo caso semi e bulbi. I sintomi della malattia possono essere osservati in qualsiasi fase dello sviluppo delle colture, sia sulle foglie sia sugli steli dei fiori (Wordell Filho *et al.*, 2006; Rockenbach *et al.*, 2016). Sulle foglie le infezioni danno origine a macchie decolorate, allungate di dimensioni variabili. In condizioni di elevata umidità atmosferica, queste lesioni tendono a espandersi e si ricoprono di una muffa grigio-violacea. Le foglie colpite ingialliscono, disseccano all'apice e tendono a piegarsi andando incontro a processi di marcescenza (Figura 14).

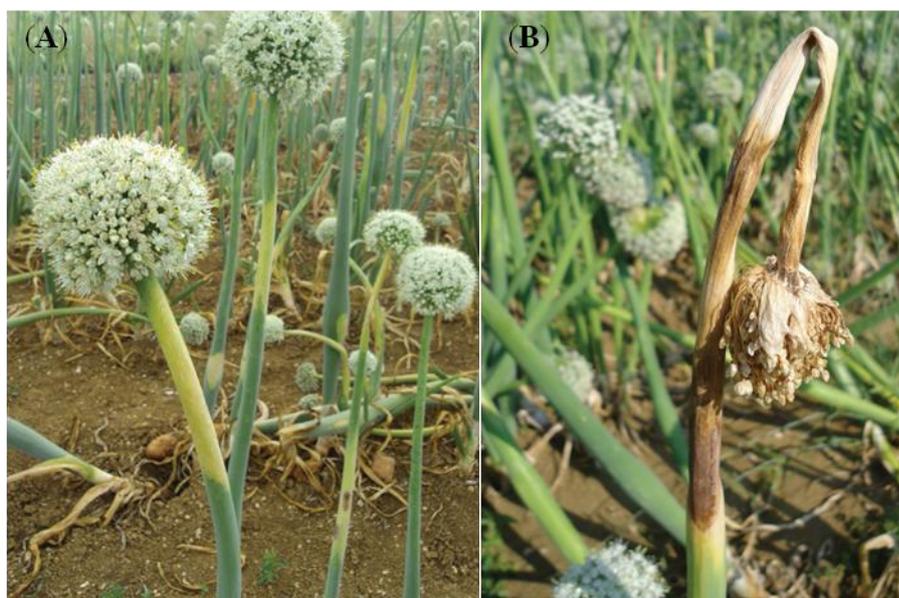


Figura 14 - (A) Piante di cipolla con sintomi e segni di peronospora sugli scapi fiorali. (B) Attacco alla base dell'infiorescenza e successiva piegatura e disseccamento del gambo e dell'infiorescenza (Murolo e Romanazzi, 2021).

È comune, dopo l'infezione da *P. destructor* la formazione di eventuali lesioni necrotiche che derivano dalla colonizzazione da parte dei funghi saprofiti come *Stemphylium spp.*, che possono causare qualche incertezza sulla diagnosi (Rockenbach *et al.*, 2016). Trattandosi di un organismo biotrofico, è improbabile che *P. destructor* causi la morte della pianta, ma causa un deperimento generale della pianta con conseguenze negative sulla produzione, sia da un punto di vista quantitativo che di scadimenti qualitativi. (Rockenbach *et al.*, 2016). Le infezioni di peronospora possono essere dannose per le colture da seme in quanto, può danneggiare anche gli scapi fiorali in corrispondenza delle lesioni, lo scapo tende a spezzarsi compromettendo la produzione del seme.

La gestione della peronospora della cipolla si basa principalmente sul controllo chimico (Rockenbach *et al.*, 2016), con numerosi trattamenti preventivi durante la stagione. Molecole alternative come il fosfito di potassio, l'acibenzolar-s-metile e l'estratto di alghe marine hanno mostrato una bassa efficienza nel controllo delle infezioni (Wordell Filho *et al.*, 2007).

3.1.3. Disseccamento fogliare

Il disseccamento fogliare causato da *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons, è un'importante malattia della cipolla in tutto il mondo. L'agente patogeno è policiclico e sverna negli pseudotecii prodotti su foglie sia malate che asintomatiche lasciate nel suolo. Nella primavera successiva, le ascospore vengono rilasciate dai detriti fogliari, considerati la principale fonte di inoculo. (Misawa *et al.*, 2012). In primavera con un clima piovoso, umido e tendenzialmente caldo i conidi si sviluppano e si diffondono nell'ambiente raggiungendo l'organo suscettibile e iniziando il processo infettivo. La germinazione dei conidi avviene tra i 4-35 °C con un'elevata umidità. Il fungo provoca macchie su foglie, brattee e talvolta su petali e steli. Le macchie delle foglie giovani sono marroni e quasi circolari, man mano che si ingrandiscono, l'area che circonda la macchia bruna originale diventa di colore più chiaro, sebbene il margine in avanzamento rimanga scuro (Barker *et al.*, 1950) (Figura 15). La morte delle foglie dovuta da *Stemphylium* riduce la fotosintesi, di conseguenza, la qualità dei bulbi o dei semi di cipolla (Basallote-Ureba *et al.*, 1999).

Per evitare l'insorgere della malattia è bene allontanare o eliminare i residui colturali, praticare rotazioni colturali, ridurre la densità di semina, favorire il drenaggio del terreno ed evitare ristagni idrici. Si è visto che l'utilizzo del fungo *Piriformospora indica* è stato efficace nel ridurre la gravità del marciume fogliare di *Stemphylium* spp. (Roylewar *et al.*, 2021).

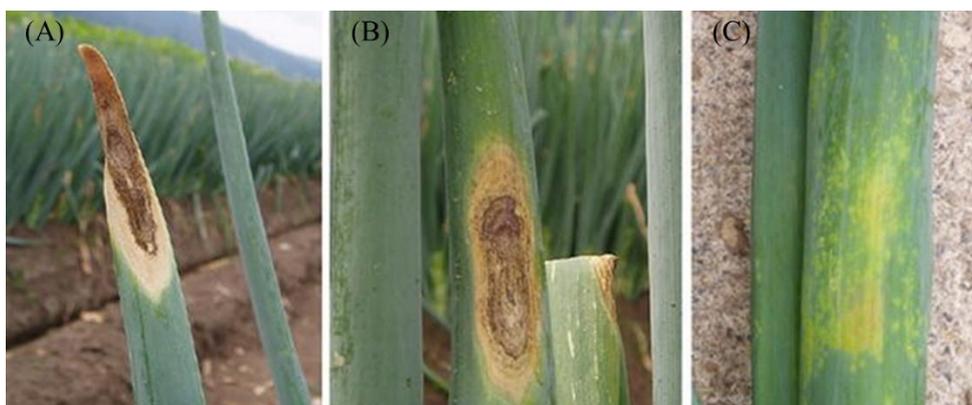


Figura 15 - Sintomi di *Stemphylium vesicarium* su foglie di cipolla: (A) lesioni ovali marroni formate sulla punta della foglia; (B) lesioni nel centro della foglia; (C) lesione screziata gialla formata sulle foglie interne (Misawa *et al.*, 2012).

4. AGRICOLTURA SOSTENIBILE

L'ATTRA (un'agenzia statunitense per l'informazione e sull'agricoltura sostenibile) definisce l'agricoltura sostenibile come “una produzione in abbondanza senza impoverire le risorse o inquinare l'ambiente”. Le risorse non sono solo legate alle piante, alla biodiversità e al suolo ma sono legate anche all'economia e allo stato psico-fisico di chi lavora in agricoltura. Definizioni più puntuali di agricoltura sostenibile sono state date sia dal governo degli Stati Uniti d'America (*US Congress, 1990 Farm Bill Legislation*) sia dalla Commissione Europea (*Sustainable agriculture for the future we want*, Commissione Europea, 2012) e possono essere sintetizzate come segue: “Agricoltura sostenibile è un sistema di produzione vegetale e animale integrato, caratterizzato da pratiche sito-specifiche che nel lungo termine:

- soddisfa i fabbisogni per l'alimentazione umana e per la produzione di fibre, attraverso prodotti di alta qualità, sani e sicuri;
- aumenta la qualità dell'ambiente e permette il più efficiente utilizzo delle risorse naturali e delle risorse agrarie;
- ha un ruolo nel mitigare i cambiamenti climatici e nell'adattamento ad essi;
- fornisce servizi per l'ecosistema favorendo la fertilità del suolo, la sua capacità di ritenere acqua e nutrienti e di stoccare carbonio;
- preserva la biodiversità (ecosistemi, patrimonio genetico, specie) e habitat preziosi, mantenendo paesaggi attraenti che altrimenti non esisterebbero;

- sostiene gli impegni economici delle operazioni agricole, rafforza l'economia e contribuisce a uno sviluppo equilibrato del territorio;
- innalza la qualità della vita dei produttori e della società nel suo complesso, ad esempio fornendo occupazione e condizione di lavoro dignitose;
- garantisce il benessere degli animali che vengono trattati con rispetto e sono ben curati.”

L'agricoltura sostenibile comprende sia l'agricoltura integrata sia quella biologica.

4.1. PROTEZIONE DELLE COLTURE IN AGRICOLTURA INTEGRATA

L'agricoltura integrata prevede un uso coordinato e razionale di tutti i fattori della produzione in modo da ridurre l'impiego dei mezzi che comporterebbero degli impatti negativi sull'ambiente e sulla salute dei consumatori. Per fare ciò, s'integrano tutte le pratiche, le tecniche e gli strumenti a disposizione al fine di ridurre gli impatti negativi dell'agricoltura sull'ambiente. La difesa integrata è divenuta obbligatoria nel territorio europeo con la Direttiva CE n.128 del 21 ottobre 2009 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei prodotti fitosanitari e definisce la protezione integrata come «l'attenta considerazione di tutti i metodi di protezione fitosanitaria disponibili e la conseguente integrazione di tutte le misure appropriate, volte a scoraggiare lo sviluppo di popolazioni di organismi nocivi e che mantengono l'uso dei prodotti fitosanitari e altre forme d'intervento a livelli che siano giustificati in termini economici ed ecologici, riducendo o minimizzando i rischi per la salute umana e per l'ambiente. L'obiettivo prioritario della protezione integrata è la produzione di colture difese con metodi che perturbino il meno possibile gli ecosistemi agricoli e che promuovano i meccanismi naturali di controllo fitosanitario» (articolo 3, Decreto Legislativo n. 150/2012).

In Italia, i principi della protezione integrata si sono concretizzati in specifici programmi regionali riuniti nei “Disciplinari di produzione integrata” che ne regolano la corretta applicazione. Per far sì che la protezione integrata risulti efficiente sono necessari diversi accorgimenti quali: la prevenzione attraverso misure agronomiche, la conoscenza della biologia dell'organismo infestante, il monitoraggio per verificarne l'effettiva presenza e stabilirne la densità, l'individuazione del momento di intervento più opportuno, la valutazione della soglia di tolleranza o danno, l'attribuzione della priorità degli interventi

agronomici, biologici, fisici e in caso di intervento chimico necessario, la scelta di composti meno tossici, meno persistenti e più selettivi. Con questi criteri quindi si definisce l'obbligo di puntare verso sistemi agricoli sostenibili e a basso impatto ambientale. L'evoluzione tecnica da protezione integrata (*Integrated Pest Management* - IPM) a produzione integrata (*Integrated Production* - IP) è stato un passaggio fondamentale sancito dall'esigenza di trovare tutte le possibili sinergie fra metodi agronomici di prevenzione delle avversità, con particolare riferimento a uso di varietà resistenti, avvicendamento colturale, fertilizzazioni, irrigazioni equilibrate e infrastrutture ecologiche. Allo stesso tempo si è cercato di garantire migliori performance agroambientali attraverso la riduzione dell'impiego di fitofarmaci, ma anche di fertilizzanti, acqua ed energia. Studi recenti hanno dimostrato che l'applicazione delle tecniche di produzione integrata possono contribuire alla riduzione delle emissioni di gas ad effetto serra attraverso la riduzione del consumo dei principali prodotti agrochimici, con particolare riferimento ai fertilizzanti e all'impiego di energia (Malavolta, 2017). Per quanto riguarda l'applicazione della protezione integrata, l'evoluzione delle tecniche adottate ha seguito i principi fondamentali di sviluppo di tutti gli strumenti di supporto disponibili, a partire dalla giustificazione degli interventi basati su monitoraggio, applicazione delle soglie di intervento e in alcuni casi anche su interventi preventivi. La scelta dei principi attivi è stata basata sull'efficacia, la selettività verso gli organismi utili, l'impatto sull'uomo e sull'ambiente (Malavolta, 2017).

4.2. PROTEZIONE DELLE COLTURE IN AGRICOLTURA BIOLOGICA

Rispetto all'agricoltura integrata, in quella biologica si deve fare un ulteriore passo in avanti: infatti, l'agricoltura biologica si basa sul principio di autoregolazione degli agroecosistemi. In questo caso vengono impiegati i meccanismi e le risorse naturali cercando di eliminare gli interventi esterni applicando delle ampie rotazioni, facendo un "uso" più adeguato e completo della biodiversità, mantenendo l'attenzione sulla sostanza organica come fonte di fertilità del suolo ed eliminando l'uso di prodotti di sintesi. L'agricoltura biologica è normata sia a livello europeo sia a livello nazionale. Per quanto riguarda i vari regolamenti comunitari che hanno regolato l'agricoltura biologica, questi sono i seguenti:

- Reg. C.E. 834/2007 e Reg. C.E. 889/2008 (in vigore fino al 31/12/2021);
- Reg. C.E. 848/2018 (in vigore dal 01/01/2022).

L'agricoltura biologica consiste in un sistema di produzione compatibile con l'ambiente che si prefigge come obiettivo di mantenere l'equilibrio nell'agroecosistema salvaguardando la biodiversità, la fertilità del terreno, in generale l'ecosistema agrario, difendendo le colture mediante l'applicazione di tecniche di protezione biologiche e l'uso di pratiche agronomiche tradizionali o di prodotti fitosanitari di origine naturale o chimica non di sintesi.

Le ortive rappresentano il 2% della superficie agricola in biologico: queste sono principalmente pisello, pomodoro e cavolfiore seguite, poi, da broccolo, carciofo e patata. Per quanto riguarda il settore sementiero, la produzione di seme biologico risulta particolarmente difficile. Infatti, le coltivazioni di ortaggi biologiche devono spesso chiedere semente in deroga da agricoltura non biologica. Questo perché, come accennato in precedenza, le coltivazioni per la produzione di seme sono particolarmente esposte a una serie di patologie difficilmente controllabili senza *input* chimici.

5. MEZZI DI PROTEZIONE CHIMICI

I mezzi chimici per la protezione delle piante sono dei prodotti fitosanitari (o agrofarmaci) che agiscono direttamente sul patogeno e in cui la sostanza attiva può essere costituita da molecole di sintesi o naturali, addizionata in genere con uno o più coformulanti. Purtroppo, queste sostanze spesso non agiscono solo sulle specie *target*, ma possono avere effetti anche su altri organismi, nonché causare danni alla nostra salute e all'ambiente. L'uso non controllato e scriteriato dei prodotti fitosanitari rischia danneggiare seriamente l'ecosistema. La persistenza dei fitofarmaci nel suolo e nelle acque è davvero pericolosa perché provocano fenomeni di tossicità sulla micro-, meso- e macro-fauna nel suolo; possono contaminare le acque superficiali e sotterranee, inquinando gli ecosistemi più delicati. I fitofarmaci, infatti, sono in genere tossici per tutti gli organismi viventi, a causa delle loro caratteristiche intrinseche. In particolare, in questi ultimi anni si è verificato una diminuzione di api e altri insetti impollinatori, e più in generale di molti vertebrati, invertebrati e microrganismi nemici naturali degli organismi nocivi delle piante. Inoltre, il loro uso improprio può determinare rischi e pericoli per gli agricoltori, gli operatori del settore, i consumatori finali e in generale per la

salute umana con la contaminazione dei prodotti alimentari. Nella stragrande maggioranza delle situazioni, i mezzi di lotta chimici sono insostituibili al momento e, quindi, si deve cercare di utilizzarli al meglio anche per preservarne la loro efficacia nel futuro prendendo in considerazione che bisogna minimizzare i loro effetti negativi. Per quanto riguarda l'ottimizzazione delle quantità di prodotto impiegato e necessario:

- perfezionare le tecniche di applicazioni, ovvero ottimizzare le dosi e i volumi d'irrorazione;
- ridurre la deriva, la dispersione nell'ambiente del principio attivo, si deve evitare che il prodotto non raggiunga il bersaglio o, quantomeno limitare la quantità di prodotto che non raggiunge il bersaglio;
- prestare attenzione a scelta, controllo e manutenzione dell'attrezzatura per l'applicazione, le macchine irroratrici devono essere soggette a una taratura periodica;
- effettuare una scelta idonea dei tempi di intervento e, quindi, si deve tenere in considerazione che, nella maggior parte dei casi, si devono sostituire gli intervalli cautelativi con degli interventi flessibili.

La corretta scelta del tempo d'intervento è importante perché i patogeni sono difficili da controllare e il loro sviluppo è dipendente dall'andamento climatico. In diversi casi è necessario fare dei trattamenti cautelativi-preventivi perché ci sono delle situazioni in cui, i patogeni s'insediano nel campo e diventano incontrollabili, creando danni importanti sulla produzione e sul reddito. Quella di fare trattamenti dopo l'accertamento dei sintomi della malattia è una strategia che potrebbe eliminare i trattamenti superflui ma può essere fatta solo nelle condizioni in cui si ha la certezza di poter bloccare il patogeno. In quest'ambito, c'è la possibilità di utilizzare delle soglie quantitative d'intervento, quindi, intervenire quando la malattia ha raggiunto un determinato livello di tolleranza. Questo però richiede dei controlli accurati e tempestivi in campo con dei prodotti in grado di bloccare le infezioni in atto come, ad esempio, per l'oidio delle cotture ortive se interessano le porzioni non eduli oppure per le maculature fogliari non distruttive sulle culture ortive quando anch'esse non interessano le porzioni eduli. Inoltre, è bene utilizzare i vari principi attivi, soprattutto quelli curativi in rotazione, e andrebbero evitati fungicidi a elevato rischio di resistenza, in quanto si rischia l'insorgenza dei ceppi resistenti fra le popolazioni di organismi patogeni. È importante conoscere le caratteristiche degli agrofarmaci che vengono utilizzati,

in particolare, un sistema di classificazione ampiamente utilizzato li divide in base alla modalità d'azione in: fungicidi di superficie, che rimangono all'esterno del vegetale e svolgono un'azione preventiva; citotropici e translaminari, i quali vengono assorbiti dal vegetale e si ridistribuiscono localmente all'interno dei tessuti fino ad attraversare la lamina fogliare, svolgendo un'azione curativa nei confronti delle infezioni in atto; mentre i sistemici entrano nei tessuti conduttori e possono essere traslocati a distanza notevole dal punto di applicazione raggiungendo i vari organi vegetali.

L'applicazione di prodotti fitosanitari è ancora oggi il sistema principale per proteggere le colture da agenti patogeni, parassiti ed erbe infestanti (Dietz-Pfeilstetter *et al.*, 2021). Attualmente l'uso di agrofarmaci di natura chimica rappresenta una preoccupazione per gli effetti negativi collaterali legati alla loro eccessiva utilizzazione. Ridurre l'uso e quindi la dispersione nell'ambiente di queste molecole è un'importante sfida nei paesi sviluppati. Gli Stati membri dell'Unione Europea sono tenuti ad attuare piani d'azione nazionali che stabiliscono obiettivi quantitativi, calendari e indicatori relativi alla riduzione dell'impatto derivante dall'uso di prodotti fitosanitari (direttiva 2009/128/CE; Marchand *et al.*, 2019). In aggiunta, dal 1° febbraio 2021 sono revocate tutte le autorizzazioni all'immissione in commercio rilasciate su territorio nazionale di prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva mancozeb (direttiva 2009/128/CE), una delle ultime sostanze attive organiche di sintesi, ampiamente utilizzata in agricoltura integrata nei confronti della peronospora di numerose colture. Inoltre, i prodotti a base di rame, ovvero la molecola più importante per la protezione delle colture biologiche, sono rientrati nella lista dei candidati alla sostituzione. Questa situazione d'incertezza preoccupa il settore agricolo, in particolare gli agricoltori, che si trovano a dover fronteggiare le stesse avversità del passato (o in alcuni casi anche altre nuove in più) con sempre meno "armi" a disposizione, dato che spesso non ci sono soluzioni alternative efficaci come le molecole che vengono eliminate dal mercato e se ci sono, spesso sono molte costose o poco pratiche. Questo porta alla non remuneratività di alcune colture e, di conseguenza, al possibile abbandono delle stesse.

5.1. RIDUZIONE DEI MEZZI TECNICI NELL'ERA DEL GREEN DEAL: LA SITUAZIONE DEL RAME

Il rame è uno dei più antichi principi attivi utilizzati nella protezione delle colture. La scoperta dell'attività biocida dello ione rame risale al 1807 (Pertot, 2012). Una particolarità del rame rispetto ad altri fungicidi è il fatto di essere un biocida ad ampio spettro in grado di coprire anche i batteri (Pertot, 2012). Grazie al suo ampio spettro d'azione, ha il vantaggio di controllare contemporaneamente numerose malattie. Agisce su più livelli interferendo con i processi respiratori, frenando la biosintesi delle proteine, diminuendo l'attività della membrana cellulare con il rallentamento nel trasferimento di ioni e bloccando i processi ossido riduttivi, agendo a livello dei gruppi sulfidrilici degli enzimi. L'attività antifungina funziona grazie ai legami del metallo con le spore germinanti del fungo e sulle quali si verifica un accumulo di Cu^{++} . (Martelli, 1984). Questa concentrazione di Cu^{++} sviluppa due tipi di azione: (i) agisce a livello della membrana del fungo modificandone la permeabilità mediante la denaturazione delle proteine strutturali ed enzimatiche che la compongono; (ii) interferisce con numerose azioni enzimatiche, alterando i processi respiratori e ossido-riduttivi provocando la morte della cellula del parassita. I composti rameici, proprio per il loro meccanismo d'azione multisito (agiscono su più funzioni vitali delle cellule), non danno origine a fenomeni di resistenza, come invece può capitare a quelli ad azione mono o oligo sito che penetrano all'interno della pianta e agiscono esclusivamente su uno o pochi bersagli specifici delle funzioni cellulari. Inoltre, i composti rameici sono facili da utilizzare e con un costo basso per gli operatori agricoli. Tutto questo lo rende essenziale sia in agricoltura integrata (perché sono sempre meno i fungicidi di copertura organici di sintesi vista la loro pericolosità) che, soprattutto, in agricoltura biologica (dove non è possibile utilizzare fungicidi curativi e spesso è l'unico prodotto ammesso e di comprovata efficacia).

Tuttavia, il rame è un metallo pesante che per sue caratteristiche è soggetto a innescare fenomeni di tossicità residua, di riduzione della microflora e della fauna nel terreno, fenomeni di fitotossicità su colture sensibili e residui persistenti. Inoltre, nonostante il rame sia classificato come un microelemento della nutrizione vegetale, alte concentrazioni possono portare a fitotossicità. Non ultimo per importanza, gli agrofarmaci a base di rame possono rappresentare un pericolo per la salute degli operatori del settore agricolo, i quali sono spesso esposti al contatto con questi prodotti. Considerando i rischi legati all'impiego di prodotti

contenenti rame, l'Unione Europea ha fissato un limite medio all'impiego di rame in agricoltura di 4 kg/ha per anno, ovvero 28 kg ammessi nei 7 anni di rinnovo con un massimo assoluto di 6 kg/ha per annata, e ha inserito i sali di rame fra le sostanze attive candidate alla sostituzione (Reg. UE 1981/2018).

6. SOSTANZE ATTIVE ALTERNATIVE AI FUNGICIDI TRADIZIONALI

La protezione delle colture è basata ancora oggi soprattutto sull'utilizzo di sostanze chimiche che agiscono direttamente contro i patogeni per poterne contenere la loro diffusione. Purtroppo, però, l'uso di agro farmaci ha effetti negativi sulla salute umana e ambientale. Proprio sulla base dei rischi legati all'utilizzazione dei mezzi chimici per la protezione delle colture, la Commissione europea sta applicando delle strategie come, ad esempio, la strategia *Farm to Fork*, per ridurre l'uso dei pesticidi di sintesi chimica o pericolosi. Sempre di più, la sperimentazione è quanto mai indirizzata verso la ricerca di soluzioni alternative che possano sostituire o ridurre l'uso di agrofarmaci, come ad esempio l'utilizzo del rame, il quale è utilizzato in agricoltura integrata, ma soprattutto in agricoltura biologica dove, a oggi, è il solo in grado di garantire dei livelli di protezione accettabili da alcune malattie fungine. I ricercatori stanno sperimentando diverse possibilità come l'ingegneria genetica, con l'introduzione di geni di resistenza in piante che ne sono sprovviste; la possibilità di aumentare le difese naturali della pianta attraverso l'induzione di resistenza, l'utilizzo di agenti di biocontrollo (microrganismi antagonisti), che possano contrastare lo sviluppo dei patogeni. Tutto ciò deve esser fatto senza ridurre l'efficacia della protezione delle colture, a costi accettabili per gli agricoltori e mantenendo elevata la qualità e la quantità delle produzioni. Per raggiungere questi obiettivi, sono necessarie ulteriori ricerche per far progredire la progettazione di migliori sistemi di coltivazione e lo sviluppo di alternative ai pesticidi sintetici (Romanazzi *et al.*, 2022).

6.1. LE SOSTANZE DI BASE

Le sostanze di base sono delle sostanze innovative per la protezione delle piante in alternativa agli agrofarmaci di sintesi, poiché sono delle sostanze che non provocano problemi nei confronti dell'uomo, degli animali e degli altri organismi associati, in quanto, sono già utilizzate in altri ambiti, quali l'alimentazione o la medicina umana. Le sostanze di base grazie al loro pressoché nullo impatto

ecologico e sulla salute umana, possono essere utilizzate nella protezione delle piante, ma non hanno nessun limite massimo di residui (LMR), in genere nessun intervallo di sicurezza e non sono immesse nel mercato come prodotti fitosanitari perché (Charon *et al.*, 2019; Romanazzi *et al.*, 2022). Grazie alla mancanza di LMR si possono effettuare i trattamenti con le sostanze di base in prossimità della raccolta e anche in post raccolta, proprio perché non sono tossiche per l'uomo.

L'uso di sostanze di base è approvato nell'Unione Europea ai sensi dell'articolo 23 del regolamento CE n. 1107/2009 e sono elencate nella parte C dell'allegato del regolamento (CE) n. 540/2011 (EU Commission, 2011). La maggior parte di queste sostanze ha attività fungicida, come ad esempio: idrossido di calcio, chitosano, *Equisetum arvense* L., perossido d'idrogeno, lecitine, latte vaccino, polvere di semi di senape, *Salix* spp., olio di girasole, cloruro di sodio, carbonato acido di sodio, *Urtica* spp., aceto e siero di latte (Romanazzi *et al.*, 2022). L'uso di queste sostanze deve essere integrato nell'istruzione professionale, nella formazione e nella consulenza tecnica agli agricoltori in quanto sono conosciute, facili da usare, meno pericolose per l'uomo e meno impattanti sull'ambiente (Romanazzi *et al.*, 2022).

6.1.1. Il chitosano

Il chitosano è derivato dalla chitina, uno dei polimeri organici più abbondanti in natura; essa, infatti, è alla base dello scheletro d'insetti e crostacei oltre che delle pareti cellulari dei funghi. L'utilizzo del chitosano cloridrato in agricoltura è normato a livello europeo e autorizzato in agricoltura biologica. Il chitosano cloridrato è stata una delle prime sostanze di base ad essere approvate in Europa (Reg. di esecuzione EU 563/2014).

Il chitosano può essere ottenuto industrialmente sia dalla chitina presente nella parete cellulare di alcuni funghi, che dalla chitina presente nell'esoscheletro dei crostacei. Nella lavorazione industriale, la chitina viene estratta mediante trattamento acido per dissolvere il carbonato di calcio seguito da soluzione alcalina per sciogliere le proteine. Inoltre, una fase di decolorazione viene spesso aggiunta per rimuovere i pigmenti e ottenere una chitina pura incolore (Younes e Rinaudo, 2015). Tutti quei trattamenti devono essere adattati alla fonte di chitina, a causa delle differenze nell'ultrastruttura del materiale iniziale per produrre prima una chitina di alta qualità, e poi chitosano (dopo parziale deacetilazione). La chitina è scarsamente solubile durante la trasformazione in diverse conformazioni.

La chitina ha più applicazioni durante la trasformazione in chitosano (mediante deacetilazione parziale in condizioni alcaline) (Figura 16). Il grado di acetilazione del chitosano è caratterizzato dalla frazione molare di unità N-acetilate o come percentuale di acetilazione (Younes e Rinaudo, 2015). Nel processo chimico, gli acidi o gli alcali (NaOH) sono usati per deacetilare la chitina. In caso di preparazione enzimatica, chitina deacetilasi viene utilizzata per catalizzare l'idrolisi dell'N-acetammido legami in chitina per convertirlo in chitosano (Hassan *et al.*, 2017).

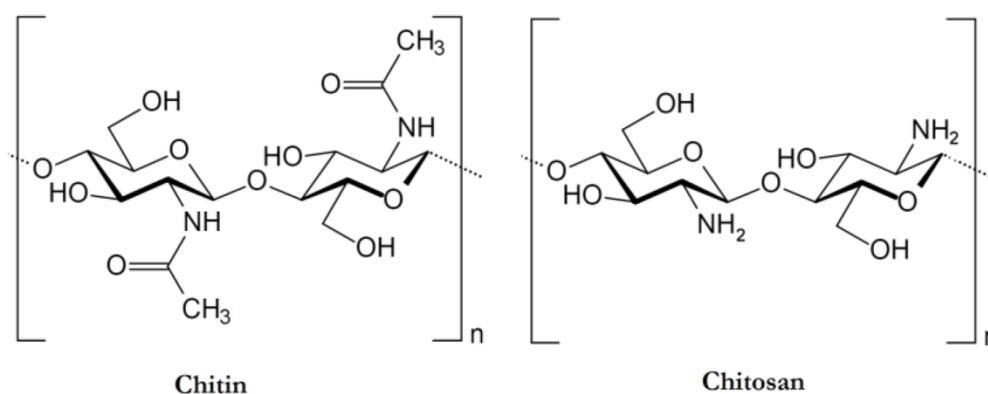


Figura 16 - Struttura chimica di chitina e chitosano (Younes e Rinaudo, 2015).

Sia la chitina che il chitosano hanno dimostrato proprietà antivirali, antibatteriche e antimicotiche e sono stati esplorati per molti usi agricoli. Sono stati utilizzati per controllare le malattie o ridurre la diffusione, per chelare nutrienti e minerali, impedendo agli agenti patogeni di accedervi o per migliorare le difese innate delle piante (El *et al.*, 2010). Quando applicato sui tessuti vegetali, il chitosano mostra una triplice attività (Romanazzi *et al.*, 2018):

- elicitazione delle difese dell'ospite;
- attività antimicrobica;
- formazione di film sulla superficie trattata.

L'attività elicitante del chitosano rappresenta dal 30 al 40% della sua efficacia nel controllo del decadimento post raccolta della frutta fresca. L'entità di quest'attività stimolante dipende dalla reattività dei tessuti del frutto, ed è ben noto che le risposte del frutto allo stress diminuiscono con la maturazione (Romanazzi *et al.*, 2016). Questa proprietà può essere utilizzata per l'induzione della resistenza ai fitopatogeni. È stato dimostrato, ad esempio, che il trattamento delle piante con chitosano, porta all'inibizione della propagazione sistemica di

virus o viroidi su una pianta e migliora la risposta d'ipersensibilità delle piante all'infezione virale (Kulikov *et al.*, 2006).

L'attività antimicrobica del chitosano è una delle sue principali proprietà, e questa dipende dalla concentrazione alla quale viene applicato (Romanazzi *et al.*, 2016), nonché dalle caratteristiche della molecola (peso molecolare, lunghezza catena ecc.). Il chitosano esercita un'azione inibitoria sulla crescita delle ife di numerosi funghi patogeni, inclusi patogeni radicali e necrotrofici, come *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Monilina laxa*, *Alternaria alternata* e *Pythium aphanidermatum* oltre inibendo la germinazione delle spore in alcuni di essi (El *et al.*, 2010). Nel controllo dei marciumi postraccolta della frutta fresca, l'attività antimicrobica può rappresentare il 35-45% della sua efficacia (Romanazzi *et al.*, 2018).

Le proprietà filmogene del chitosano rappresentano il 20-30% dell'efficacia nel controllo del decadimento post-raccolta di frutta e verdura. Il rivestimento, oltre a rappresentare un ostacolo alla crescita dei patogeni, crea una barriera per gli scambi gassosi e riduce la respirazione e rallenta la maturazione dei frutti rendendoli meno suscettibili ai patogeni (Romanazzi *et al.*, 2018).

Il chitosano può essere utilizzato per la crescita e la valorizzazione delle colture orticole. L'applicazione di chitosano come rivestimento sui cavoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) ha ridotto il numero di batteri mesofili e psicotrofi, prolungando così la durata di conservazione dei cavoli tagliati (Moreira *et al.*, 2011). È stato studiato che nella coltivazione dei broccoli, il chitosano ha ostacolato il marciume batterico della testa, (causato da *Pseudomonas fluorescens*); indipendentemente dal tempo di applicazione (pre o postraccolta). Sei diverse combinazioni di sei soluzioni di chitosano hanno ridotto significativamente l'incidenza della malattia e il diametro delle lesioni in broccoli inoculati con *P. fluorescens* (Wang *et al.*, 2012).

6.2. SOSTANZE ATTIVE A BASSO RISCHIO

Le sostanze a basso rischio (sono state introdotte per la prima volta nel Reg. (UE) n. 1107/2009 (insieme alle sostanze di base e alle sostanze candidate alla sostituzione) Le sostanze a basso rischio sono registrate nei prodotti fitosanitari soltanto ove sia stato dimostrato che presentano un chiaro beneficio per la protezione vegetale ovvero, devono essere sufficientemente efficaci e che non si prevede alcun effetto nocivo sulla salute umana o degli animali o sull'ambiente.

Le sostanze a basso rischio in questione sono approvate per 15 anni. Alcune sostanze a basso rischio sono d'interesse per l'agricoltura biologica (Marchand e Robin, 2019). All'interno dell'agricoltura biologica, secondo il Regolamento (CE) n. 889/2008, è permesso l'uso di sostanze a basso rischio. Inoltre, non devono essere usati come erbicidi, ma unicamente per il controllo delle malattie.

6.2.1. Chito-oligosaccaridi ed oligo-galatturonidi (COS-OGA)

COS-OGA è una nuova sostanza attiva, costituita da un complesso brevettato di oligosaccaridi di origine naturale, messa a punto da FytoFend SA, spin-off dell'Università di Namur (Belgio). Questo complesso zuccherino è formato da una parte "COS" (chito-oligosaccaridi) derivata da chitosano, componente anche delle pareti cellulari fungine ed estratto dalla chitina dell'esoscheletro dei crostacei, e da una parte "OGA" (oligo-galatturonidi) derivata da pectine, componenti delle pareti cellulari vegetali ed estratte dalla buccia di agrumi e mele (Benvenuti *et al.*, 2016) (Figura 17).

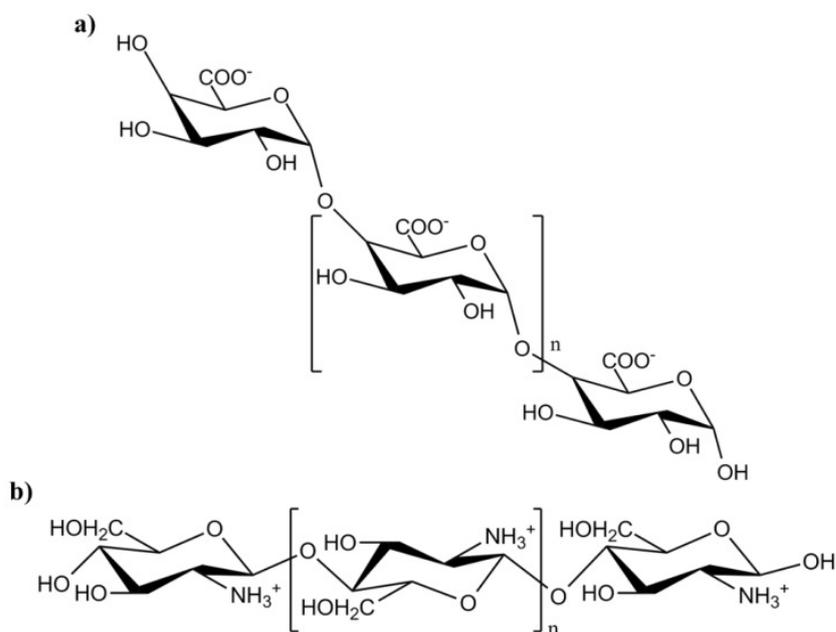


Figura 17 - (a) Struttura generale "OGA" (b) struttura generale "COS" (Fürstenberg *et al.*, 2013).

Il prodotto non ha un'azione diretta sugli organismi patogeni, ma agisce preventivamente come induttore di resistenza, scatenando i meccanismi naturali di autodifesa della pianta, che diventa così in grado di contrastare gli eventuali attacchi fungini. I frammenti COS e OGA legandosi ai ricettori della membrana vegetale producono un doppio segnale biochimico d'allarme, molto rapido e

intenso che si diffonde in maniera sistemica ascendente e discendente nella pianta e accende diverse risposte fisiologiche di difesa. La pianta è quindi più reattiva e pronta nel riconoscere, con un minor tempo di risposta e contrastare efficacemente eventuali attacchi patogeni. Le risposte della pianta coinvolgono diversi meccanismi di autodifesa:

- Ispessimento delle pareti vegetali attraverso la deposizione di callosio e lignina;
- Effetti sull'attività perossidasi, con un'intensa attivazione degli enzimi perossidasi e nitroreductasi coinvolti in diversi processi ossidativi, tossici per i funghi;
- Biosintesi di proteine associate ai fenomeni di patogenesi (*PR protein*), coinvolte nel meccanismo di resistenza sistemica acquisita (SAR) anche attraverso una maggior produzione di acido salicilico.

Grazie ai diversi processi coinvolti non c'è rischio di sviluppare resistenze da parte dei patogeni.

6.3. AGENTI DI LOTTA BIOLOGICA

Un'alternativa affidabile all'uso di composti chimici sono proprio i microrganismi che, sottoforma di appropriati inoculi, fungono da bio-fertilizzanti, bio-erbicidi, e agenti di biocontrollo. I microrganismi utilizzati nelle formulazioni sono di origine ambientale, opportunamente selezionati, per i quali sono state individuate specifiche potenzialità benefiche (Sellitto *et al.*, 2020). Gli organismi più utilizzati per la lotta biologica sono i funghi e i batteri. Vengono utilizzate diverse specie come mezzo biologico: per quanto riguarda i funghi, si ha disposizione le specie del genere *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Candida* e le specie non patogene di *Fusarium* contro le specie di *Fusarium* agenti di tracheomicosi. Tra le specie fungine utilizzate come mezzi biologici sono presenti anche le specie *Ampelomyces quisqualis*, *Coniothyrium minitans*, *Pythium oligandrum*, *Phlebiopsis gigantea*. Infine, *Metschnikowia pulcherrima* viene utilizzata contro gli agenti di malattia post-raccolta. Per quanto riguarda i batteri utilizzati sono presenti l'*Agrobacterium radiobacter* (nei ceppi K84 e K1026), diverse specie del genere *Bacillus* (tra cui *Bacillus subtilis* che ha un ampio spettro di azione), *Burkholderia cepacia*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *Streptomyces griseoviridis*, etc.

Nella lotta biologica contro le malattie, la competizione tra gli agenti di malattia e i loro antagonisti è fortemente influenzata dai fattori climatici, inoltre, alcuni agenti fitopatogeni possono svilupparsi molto velocemente sfuggendo o rendendo ininfluenza il loro utilizzo dal punto di vista epidemiologico. Bisogna ricordare anche che l'agente di malattia spesso si sviluppa all'interno della pianta e, quindi, non è raggiungibile dall'agente di controllo e, quindi, l'antagonista deve essere presente prima che il patogeno arrivi sulla pianta. Sono diversi i meccanismi di azione attraverso cui gli antagonisti si oppongono ai patogeni:

- competizione con i patogeni nell'area di competenza per quanto riguarda sia lo spazio sia i nutrienti; questa competizione si può avere nella rizosfera (radici), nella fillosfera (foglie) e nella carposfera (frutti);
- Produzione di sostanze tossiche come gli antibiotici e sostanze similari;
- Attacco diretto al patogeno e, quindi, predazione e parassitismo (all'interno del parassitismo si può individuare l'iperparassitismo e l'ipovirulenza);
- Stimolazione delle autodifese della pianta, quindi si ha un'induzione di resistenza. Gli agenti di biocontrollo inducono una resistenza nella pianta nei confronti degli agenti di malattia aumentando, nella pianta, la produzione di alcuni enzimi.

Questi microrganismi sono delle ottime alternative sostenibili dal punto di vista ambientale rispetto all'uso dei prodotti chimici di sintesi perché si ha a che fare con delle risorse naturali e rinnovabili in quanto sono degli organismi viventi, hanno un ridotto impatto ambientale e contribuiscono alla biodiversità. Le criticità che possiamo riscontrare con l'utilizzo dei microorganismi derivano:

- dall'azione fitoiatrica lenta e quasi mai risolutiva è per questo motivo devono essere presenti prima dell'arrivo del patogeno;
- elevata dipendenza dalle condizioni ambientali: come conseguenza di questo aspetto, i mezzi biologici di lotta vengono utilizzati nel post-raccolta o per risanare il terreno, mentre l'applicazione risulta più difficile per la parte aerea;
- aspetti critici a livello di produzione e commercializzazione: costa molto produrre e formulare un nuovo agente di lotta biologica;
- difficoltà alla conservazione e all'utilizzo; la possibilità di usarli in miscela è dubbia;

- possibile pericolosità dei metaboliti prodotti nei confronti dell'uomo;
- possibile pericolosità all'ecosistema, col rilascio dei microrganismi nell'ambiente possono anche minacciarle l'equilibrio dell'ambiente.

6.3.1. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens è un batterio cosmopolita, antagonista naturale di diversi funghi e batteri fitopatogeni (Figura 18). Il suo meccanismo d'azione prevede diverse modalità, tra cui la competizione per spazio e nutrienti nei confronti dei patogeni e la produzione di sostanze fungicidi come i lipopetidi e le proteasi. I formulati commerciali a base di questo batterio vanno distribuiti preventivamente sulla vegetazione e quando espressamente indicato sulla confezione commerciale può essere distribuito sul suolo per arrivare a colonizzare le radici della pianta da proteggere. Alcuni studi hanno evidenziato anche la sua capacità d'induzione di resistenza sulla pianta trattata, essendo in grado di attivare preventivamente le difese che la pianta normalmente adotta in presenza di un'infezione. L'uso di questo microrganismo, come quasi in tutti gli altri casi di mezzi biologici, è consentito in agricoltura biologica.



Figura 18 - Popolazione di *Bacillus amyloliquefaciens* osservata al microscopio (Scimat, 2016).

6.4. ESTRATTI VEGETALI

Gli estratti vegetali costituiscono il più grande gruppo all'interno dei prodotti biochimici e sono utilizzati per il controllo degli organismi nocivi. Queste molecole si ottengono sottoponendo la pianta o parti di essa a un processo che può essere la spremitura, la macinazione, la frantumazione, la distillazione e/o l'estrazione. Le molecole sono prevalentemente metaboliti secondari prodotti dalle

piante per difendersi dagli erbivori e dagli agenti patogeni e comprendono steroidi, alcaloidi, tannini, terpeni, fenoli, flavonoidi e resine. L'estratto vegetale con azione fungicida può inibire la sintesi di chitina, inibire la crescita del micelio e la germinazione dei conidi. Gli estratti di origine botanica utilizzati in agricoltura, in genere non contengono sostanze tossiche per gli animali e l'uomo. Inoltre, i diversi meccanismi d'azione riducono di molto le possibilità che si sviluppino resistenze. Grazie alla loro natura biologica si degradano molto rapidamente e non si accumulano nell'ambiente.

6.4.1. Terpeni

I terpeni sono composti organici che derivano da unità di isoprene, in base al numero di unità di isoprene che hanno, sono classificati come mono, di, tri, tetra e sesquiterpeni (Cox-Georgian *et al.*, 2019). Nel mondo vegetale, sono proprio queste sostanze a donare il tipico aroma alla pianta, svolgendo un ruolo prezioso anche nei meccanismi riproduttivi della stessa. I monoterpeni possono infatti attirare gli impollinatori o servire allo scopo di respingere altri organismi. Possono anche essere correlati al processo di fioritura delle piante (Loreto *et al.*, 1998).

Nella famiglia dei terpeni l'eugenolo, il timolo e il geraniolo sono particolarmente efficaci nei confronti di diversi ascomiceti, tra cui *B. cinerea* ed *Erysiphaceae*. Hanno effetto diretto sulle pareti, le membrane e gli organelli delle cellule dei microrganismi (Di Pasqua *et al.*, 2007). I terpeni agiscono sulla germinazione delle spore, la penetrazione delle ife e la crescita di miceli e ife. La modalità d'azione dei composti consiste nella disgregazione della membrana cellulare dei funghi, che è associata alla capacità di dissolvere i lipidi con conseguente fuoriuscita delle sostanze cellulari, lisi e morte della cellula (Querzola *et al.*, 2016). Questo meccanismo d'azione ne suggerisce l'inclusione da parte del FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*) al codice 46, target site F7 “*cell membrane disruptor*” (Querzola *et al.*, 2016). Eugenolo, timolo e geraniolo sono sostanze attive che possiedono un profilo tossicologico, ecotossicologico ed ambientale favorevole. Sono classificate come GRAS (“generalmente riconosciute come sicure”) sia in campo alimentare che cosmetico ed oggi riconosciute come tali anche per l'impiego nella protezione vegetale (per questa ragione incluse nell'Allegato IV del Regolamento 396/2005) (Querzola *et al.*, 2016).

6.5. SOSTANZE AD AZIONE DISINFETTANTE

L'igiene è un requisito fondamentale per la riuscita della produzione agricola, le misure igieniche attuate in via preventiva nella coltivazione delle piante riducono la pressione derivante dalle infezioni, con conseguente diminuzione dell'uso dei fitofarmaci e aumento delle possibilità di successo nel controllo biologico dei microrganismi. I disinfettanti sono utilizzati soprattutto per la pulizia dei materiali come le serre, i substrati per la coltivazione o per il lavaggio dei frutti o delle sementi. I disinfettanti hanno uno spettro d'azione completo contro molti fitopatogeni, spesso mostrano azione rapida, sono facili da utilizzare ed economici. Solitamente molte molecole utilizzate come disinfettanti sono biodegradabili, non fitotossici e non lasciano residui chimici e soprattutto contribuiscono significativamente alla riduzione dei fitofarmaci utilizzati in agricoltura. La rapida azione e l'assenza di residui tossici, apre interessanti prospettive sull'impiego in agricoltura di disinfettanti chimici al fine di ridurre le occasioni di trasmissione di agenti patogeni e di contaminazione in diversi contesti della filiera agroalimentare (Myrta *et al.*, 2010).

6.5.1. Acido peracetico

L'acido peracetico, una miscela di acido acetico e di idrogeno perossido, è un potentissimo agente ossidante con ampio spettro di azione. Il suo principale utilizzo è quello disinfettante sia in campo industriale, medico e anche in agricoltura (Myrta *et al.*, 2010). In sistemi di coltivazione fuori suolo numerosi patogeni tellurici sono capaci di colonizzare i substrati di coltivazione (perlite, lana di roccia, fibra di cocco) rendendo necessaria l'adozione di efficaci misure di disinfezione prima di un loro reimpiego (Slurarski, 2005). In postraccolta, l'acido peracetico è stato utilizzato per limitare lo sviluppo di agenti fitopatogeni (Mari *et al.*, 2004). Più recentemente, in Australia, è stato utilizzato per la decontaminazione di frutti di agrumi affetti da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e come sanitizzante in agricoltura biologica (Parra, 2007).

7. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Le sementi di qualità sono importanti per ottenere raccolti ad alto rendimento, garantendo così la sicurezza alimentare per le popolazioni. Oltre ai requisiti di qualità, esse devono anche essere sane poiché i semi rappresentano un mezzo di diffusione ideale per diversi organismi fitopatogeni. Le colture ortive destinate alla produzione di semente per la propagazione, necessitano generalmente di un numero più elevato di trattamenti fitosanitari per garantire l'elevata qualità sanitaria dei semi. Inoltre, occupando il suolo per buona parte dell'anno e non essendo destinate al consumo umano, i principi attivi utilizzati si rivelano spesso pericolosi per la salute degli operatori e dannosi per l'ambiente. D'altro canto, nell'ambito del *Green Deal* europeo, la Commissione Europea ha promosso la strategia *Farm to Fork*, la quale pone una serie di obiettivi da raggiungere entro il 2030, come la riduzione del 50% di pesticidi considerati pericolosi e l'aumento al 25% delle superfici agricole da destinare ai sistemi di agricoltura biologica. Nel caso delle ortive da seme in agricoltura integrata ma soprattutto biologica le problematiche fitosanitarie non sono facili da risolvere, anche a causa della riduzione delle sostanze attive in atto e del ridotto numero di formulati commerciali registrati per queste colture. Da questa situazione nasce la necessità di sperimentare a livello aziendale nuovi prodotti e di sviluppare nuove strategie di protezione fitosanitaria, che possano sostituire le pratiche tradizionali, per evitare l'abbandono di determinate coltivazioni perché ritenute non più remunerative.

La regione Marche rappresenta un territorio di elevazione a livello nazionale e internazionale per la produzione di specie ortive da seme. L'orografia della regione, con vallate ortogonali alla costa, permette una buona ventilazione e quindi uno sviluppo più limitato di malattie fungine, che possono compromettere la buona riuscita della coltura. Secondo i dati AMAP - Marche Agricoltura Pesca,

il settore delle sementi ortive è più sviluppato nell'area centro-nord della regione. L'attività di ricerca è stata condotta nell'ambito del progetto “*CleanSeed*” realizzato col contributo del PSR Marche Misura 16.1 “Agricoltura biologica ed integrata: strategie di protezione a basso impatto ambientale e biologiche delle malattie per le colture ortive da seme”.

La sperimentazione ha avuto un duplice obiettivo: (i) valutare l'efficacia, a livello aziendale, di strategie di protezione innovative per l'agricoltura biologica ed integrata che prevedano l'impiego di composti a basso impatto ambientale nei confronti di malattie fungine che colpiscono cavolo cappuccio e cipolla da seme; (ii) identificare gli agenti causale delle principali malattie riscontrate nei campi sperimentali, mediante degli approfondimenti di laboratorio.

8. MATERIALI E METODI

La prova sperimentale in oggetto si può dividere in due fasi: la valutazione dell'efficacia di diverse strategie di protezione innovative in campi dislocati nelle principali aree produttive di ortive da seme della regione Marche e approfondimenti di laboratorio condotti su campioni sintomatici rinvenuti negli appezzamenti sperimentali.

8.1. DESCRIZIONE DEGLI APPEZZAMENTI PER CAVOLO CAPPUCCIO DA SEME

In questa tesi le prove, per cavolo cappuccio da seme, sono state condotte in due diverse aziende agricole:

- L'azienda agricola Marco Morbidelli, adibita alla coltivazione del cavolo cappuccio per la produzione di semente standard. L'appezzamento usato per la sperimentazione dell'azienda agricola M. Morbidelli è ubicato presso Monterado, Trecastelli (AN). L'appezzamento si trova nell'immediato entroterra dal mare adriatico, in pianura a circa 161 m sul livello del mare, vicino al fiume Cesano. La superficie destinata alla sperimentazione è di circa 1,34 ha con sesto di impianto 0,35 m x 0,80 m (Figura 19).



Figura 19 - Appezamento dell'azienda Marco Morbidelli, adibito alla produzione di semente standard di cavolo cappuccio, ubicato presso Monterado, Trecastelli (AN).

- L'azienda agricola Steca Daniela, adibita alla coltivazione del cavolo cappuccio per la produzione di semente ibrida. L'appezzamento usato per la sperimentazione dell'azienda agricola Steca Daniela è ubicato presso Montefiore dell'Aso (AP). L'appezzamento si trova a 1,3 km circa dal centro abitato e a 412 m sul livello del mare, sulla collina che divide le valli dell'Aso e del Menocchia. La superficie destinata alla sperimentazione è di circa 1,34 ha con sesto d'impianto 0,35 m x 0,80 m (Figura 20). Per la produzione di seme ibrido, le file sono state separate in linee maschili e femminili, con la linea femminile sempre tra due linee maschili. Dopo la fioritura (fine maggio) le file maschili sono state estirpate, mentre le file centrali (femmine) sono state sostenute con tutori per semplificare la raccolta.

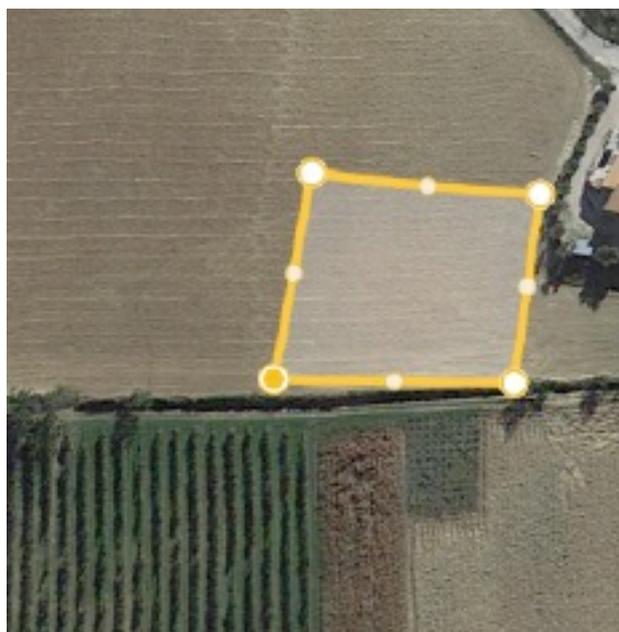


Figura 20 - Appezzamento dell'azienda Azienda Agricola Steca Daniela, adibito alla produzione di seme ibrido di cavolo cappuccio, ubicato presso Montefiore dell’Aso (AP).

8.1.1. Disegno sperimentale e strategie saggiate per cavolo cappuccio da seme

Tutte le strategie sono state distribuite in campo secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni, in modo da ridurre la variabilità ambientale fra i vari blocchi e l’influenza di fattori diversi dai trattamenti sullo sviluppo delle malattie, rendendo confrontabili le tesi.

Su cavolo sono state saggiate diverse strategie di protezione innovative, inizialmente ipotizzate per la gestione del marciume nero del cavolo, utilizzando formulati contenenti sostanze a basso impatto ambientale di origine naturale, quali sostanze di base, sostanze a basso rischio, oli essenziali e agenti di biocontrollo. Nello specifico, chitosano cloridrato, COS-OGA, miscela di terpeni e *Bacillus amyloliquefaciens*. L’efficacia di questi trattamenti è stata confrontata con un testimone non trattato, con fungicidi a base di rame e con la strategia di protezione aziendale (nei confronti di *Xanthomonas campestris*, agente causale del marciume nero su cavolo). In entrambi i casi sono state pianificate sette diverse strategie, ripetute due volte dividendo in due metà l’appezzamento sperimentale: una dove sono stati effettuati anche trattamenti nei confronti di altre avversità, in modo tale da verificare la validità dei composti innovativi anche inserendoli negli ordinari protocolli di gestione aziendale (metà trattata -T), l’altra trattando solo con i prodotti in prova durante tutta la stagione (metà non trattata -NT). Per ogni strategia saggiata sono state trattate tre file per una lunghezza di 40 m.

Le Tabelle 2 riassumono i prodotti saggiati e le relative dosi d'impiego per ogni strategia, rispettivamente negli appezzamenti delle aziende M. Morbidelli e D. Steca.

Tabella 2 - Dettaglio delle strategie testate con relative dosi saggiate e formulati commerciali nell'appezzamento adibito alla produzione di seme di cavolo delle aziende Marco Morbidelli a Trecastelli (AN) e Steca Daniela a Montefiore dell'Asso (AP).

Strategie	Principi attivi (concentrazione)	Nome commerciale, distributore	Dosi saggiate
Chitosano -NT*	Chitosano cloridrato (50%)	Chitosano denso, Agrilaete s.r.l.	1% di p.a.
COS-OGA -NT	COS-OGA 12,5 (g/L)	Ibisco, Gowan Italia s.r.l.	500 mL/hL
Miscela di terpeni -NT	Eugenolo (3,2%); geraniolo (6,4%); timolo (6,4%)	3Logy, Sipcam Italia s.p.a.	4L/ha
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -NT	<i>B. amyloliquefaciens</i> , subspecie plantarum, ceppo D747 (25 g)	Amylo - X, Biogard division s.r.l.	2,5 Kg/ha
Rame -NT	Ossicloruro (25%) ¹	Pasta siapa f blu, Sumitomo chemical	270 mL/hL;
	Idrossido di rame (20%) ²	Coprantol HI Bio 2.0, Syngenta Italia s.p.a	220 g/hL
Aziendale -NT	Ossicloruro (25%) ¹	Rame, Sumitomo chemical italia s.r.l	200 mL/hL
	Ipcloclorito di sodio (1,5 g/L) ^{1,2}	Amuchina, Angelini Pharma s.p.a	5 mL/L
Testimone non trattato -NT	-	-	-
Chitosano -T**	Chitosano cloridrato (50%)	Chitosano denso, Agrilaete s.r.l.	1% di p.a.
COS-OGA -T	COS-OGA (12,5 g/L)	Ibisco, Gowan Italia s.r.l.	500 mL/hL
Miscela di terpeni -T	Eugenolo (3,2 %), geraniolo (6,4 %), timolo (6,4%)	3Logy, Sipcam Italia s.p.a.	4 L/ha
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> -T	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , subspecie plantarum, ceppo D747 (25 g)	Amylo - X, Biogard division s.r.l.	2,5 Kg/ha
Rame -T	Ossicloruro (25%) ¹	Pasta siapa f blu, Sumitomo chemical	270 mL/hL
	Idrossido di rame (20%) ²	Coprantol HI Bio 2.0, Syngenta Italia	220 g/hL
Aziendale -T	Ossicloruro (25%) ¹	Rame, Sumitomo chemical italia s.r.l.	200 mL/hL
	Ipcloclorito di sodio (1,5 g/L) ^{1,2}	Amuchina, Angelini Pharma s.p.a	5 mL/L
Testimone non trattato -T	Solo programma di gestione aziendale	-	-

*NT= metà dell'appezzamento trattata solo con i prodotti innovativi, senza trattamenti per *X. campestris*; **T= metà trattata con il programma aziendale completo in aggiunta ai prodotti in prova.

¹Impiegato nell'azienda Marco Morbidelli; ²Impiegato nell'azienda Steca Daniela.

➤ *Trattamenti*

I trattamenti negli appezzamenti sperimentali sono stati eseguiti circa ogni 15 giorni, con sospensione di durata variabile durante il periodo della fioritura delle colture. Negli appezzamenti dei cavoli i trattamenti sono iniziati da metà marzo in corrispondenza dell'apertura dei cappucci. In totale, sono stati effettuati sei trattamenti su cavolo cappuccio standard (nelle seguenti date: 16/03/2021, 31/03, 16/04, 11/05, 26/05, 10/06), sette trattamenti su cavolo cappuccio ibrido (24/03/2021, 07/04, 22/04, 06/05, 21/05, 03/06, 22/06). I trattamenti sono stati eseguiti con delle pompe irroratrici a spalla, modello Honda GX 25, 25cc, con motore a 4 tempi e potenza di kW 0,81 (CV 1,1) (Figura 21). La pressione massima è di 25 bar (2,5 Mpa) e la sua regolazione avviene tramite comando manuale a manopola con 5 posizioni impostate da 5 a 25 bar. La portata massima è di 7,1 L/minuto, la lancia è provvista di 2 spruzzatori e valvola di erogazione con sfera a comando a leva. Per la sperimentazione è stato adottato un volume d'irrorazione di riferimento di 500 L/Ha.



Figura 21 - Irroratrice a spalla utilizzata durante i trattamenti.

8.2. DESCRIZIONE DELL'APPEZZAMENTO SPERIMENTALE PER CIPOLLA DA SEME

Per cipolla da seme, la sperimentazione è stata condotta nell'azienda agricola Tenti Carlo e Coreani Giulietta S.S., adibita alla coltivazione della cipolla per la produzione di semente ibrida. L'appezzamento usato per la sperimentazione dell'azienda Tenti Carlo e Coreani Giulietta S.S. è ubicato presso San Lorenzo in Campo (PU). L'appezzamento si trova nell'entroterra pesarese a circa

209 m sul livello del mare, in collina. La superficie destinata alla sperimentazione è di circa 1,2 ha con sesto di impianto 0,70 m x 0,75 m (Figura 22).

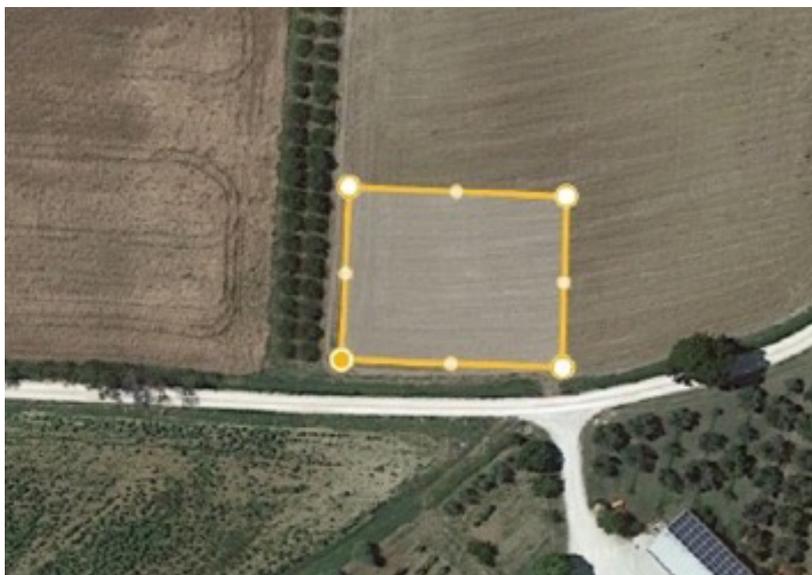


Figura 22 - Appezamento dell'azienda Tenti Carlo e Coreani Giulietta S.S., adibito alla coltivazione della cipolla da seme, ubicato presso San Lorenzo in Campo (PU).

8.2.1. Disegno sperimentale e strategie saggate per cipolla da seme

Su cipolla, tutte le strategie sono state distribuite in campo secondo un disegno sperimentale a blocchi randomizzati con due ripetizioni, in modo da ridurre la variabilità ambientale fra i vari blocchi e l'influenza di fattori diversi dai trattamenti sullo sviluppo delle malattie, rendendo confrontabili le tesi.

In entrambi i casi sono stati saggate sette strategie di protezione nei confronti di *Botrytis* spp.

Nello specifico sono stati aggiunti al programma di protezione aziendale nei confronti delle altre malattie (peronospora in particolare), le seguenti sostanze attive: chitosano cloridrato, COS-OGA, miscela di terpeni, *Bacillus* spp. e un disinfettante a base di acido peracetico, idrogeno perossido e acido acetico. Queste strategie sono state confrontate con la strategia aziendale completa e un testimone non trattato per *Botrytis* spp. o altre malattie dello scapo fiorale. In Tabella 3 sono riportati i dettagli delle strategie saggate su cipolla.

Tabella 3 - Dettaglio delle strategie testate, con relative dosi saggiate e formulati commerciali, nell'appezzamento adibito alla produzione di seme di cipolla dell'azienda Tenti Carlo e Coreani Giulietta S.S. a San Lorenzo in Campo (PU).

Strategie	Principi attivi (concentrazione)	Nome commerciale, distributore	Dosi saggiate
Miscela di microrganismi	<i>Bacillus</i> spp.	Amylo - X, Biogard division s.r.l.	250 ml/ha
Miscela di terpeni	Eugenolo (3,2%); geraniolo (6,4%); timolo (6,4%)	3logy, Sipcam Italia s.p.a.	4L/ha
COS-OGA	COS-OGA (12,5 g/L)	Ibisco, Gowan Italia s.r.l.	500 ml/hl
Chitosano	Chitosano cloridrato (50%)	Chitosano denso, Agrilaete s.r.l.	1% di p.a.
Disinfettante	Acido peracetico (5%); idrogeno perossido (20%); acido acetico (10%)	Jet5, Certis Europe b.v.	0,7 L/ha
Aziendale	Dimetomorf (72 g/L); pyraclostrobin (40 g/L)	Cabrio duo, BASF italia s.p.a.	2L/ha
Testimone non trattato	-	-	-

➤ *Trattamenti*

I trattamenti sono iniziati a fine marzo, e venivano effettuati anche essi ogni 15 giorni, poi l'intervallo fra un trattamento e l'altro è stato ridotto a sette giorni prima della sospensione della fioritura per avere una maggiore protezione da *Botrytis* spp. In totale, sono stati effettuati sei trattamenti sulla cipolla (29/03/21, 16/04, 11/05, 18/05, 26,05/20). I trattamenti sono stati eseguiti con delle pompe irroratrici a spalla come per cavolo cappuccio da seme (Figura 23). Per la sperimentazione è stato adottato un volume d'irrorazione di riferimento di 300 L/Ha.



Figura 23 - Trattamenti sull'appezzamento di cipolle nel campo sperimentale dell'azienda Tenti Carlo e Coreani Giulietta S.S. a San Lorenzo in Campo (PU).

8.3. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI IN CAMPO

Per tutto il periodo in cui sono stati effettuati i trattamenti fitosanitari, sono stati effettuati dei monitoraggi in campo per l'individuazione dei sintomi di malattia. I sintomi osservati in campo nelle diverse parti di pianta sono stati poi oggetto di approfondimenti di laboratorio, volti ad associare il sintomo osservato con uno o più agenti eziologici. Inoltre, è stato monitorato anche l'andamento meteorologico della stagione, grazie all'elaborazione dati meteorologici forniti dalle stazioni dell'AMAP, così da rapportare il livello d'infezione all'andamento meteorologico. I dati meteo sono stati raccolti attraverso il Bollettino Agrometeorologico che elabora settimanalmente il Servizio Agrometeo Regionale dell'AMAP (<http://www.meteo.marche.it/notiziario.aspx>). Il Bollettino fornisce dati su temperatura, umidità, precipitazioni e indicazioni per quanto riguarda la difesa delle principali specie vegetali. Sono state prese come riferimento le stazioni

meteo più vicine ai rispettivi campi e dunque la stazione meteorologica Montefiore dell'Aso (AP) per il campo dell'azienda Steca (cavolo cappuccio ibrido) e la stazione meteorologica di San Lorenzo in Campo (PU) per le aziende Morbidelli (cavolo cappuccio) e Tenti (cipolla).

➤ ***Cavolo cappuccio da seme***

A causa della mancata comparsa di sintomi di marciume nero sulla nuova vegetazione di cavolo cappuccio in entrambi gli appezzamenti, non è stato possibile effettuare rilievi batometrici per la quantificazione di *X. campestris*. Tuttavia, sono stati osservati sintomi di malattie fungine di tipo necrotico, anch'esse causate da agenti trasmissibili per seme e quindi d'interesse per l'indagine. I rilievi sono stati quindi condotti a carico di queste malattie.

La scelta delle piante di cavolo sulla quale sono stati eseguiti i rilievi è avvenuta in modo casuale, ma comunque rappresentativo dell'intera area, escludendo quelle a crescita stentata o eccessivamente vigorose rispetto alla media, oltre alle prime e alle ultime piante di ciascuna fila. All'interno di ciascun blocco sono state scelte dieci piante per effettuati i rilievi, per un totale di 30 piante/strategia. In totale sono stati effettuati due rilievi negli appezzamenti di cavolo cappuccio da seme:

- Nell'appezzamento per la coltivazione del cavolo cappuccio da seme standard (azienda M. Morbidelli) sono stati effettuati nei giorni: 10/06/2021; 21/06/21;
- Nell'appezzamento per la coltivazione del cavolo cappuccio da seme ibrido (azienda D. Steca) sono stati effettuati nei giorni: 17/06/2021; 1/07/21.

I rilievi sono stati condotti su foglie, steli e silique sui cavoli, mentre su cipolla sono stati considerati solo gli scapi fiorali. Su cavolo, per quando riguarda le foglie è stata utilizzata una scala suddivisa in sette classi di gravità alla percentuale colpita dai sintomi della malattia (Tabella 4). Ai fini dello studio sono state osservate cinque foglie per pianta, per un totale di 30 piante/strategia. Un esempio di classificazione dei sintomi su foglie in base alla gravità è riportato in Figura 24.

Tabella 4 - Scala empirica utilizzata per il rilievo della malattia sulle foglie di cavolo.

Classe	Superficie infetta (%)
0	Foglia sana
1	1-5%
2	4-10%
3	11-20%
4	21-30%
5	31-40%
6	41-50%
7	>50%

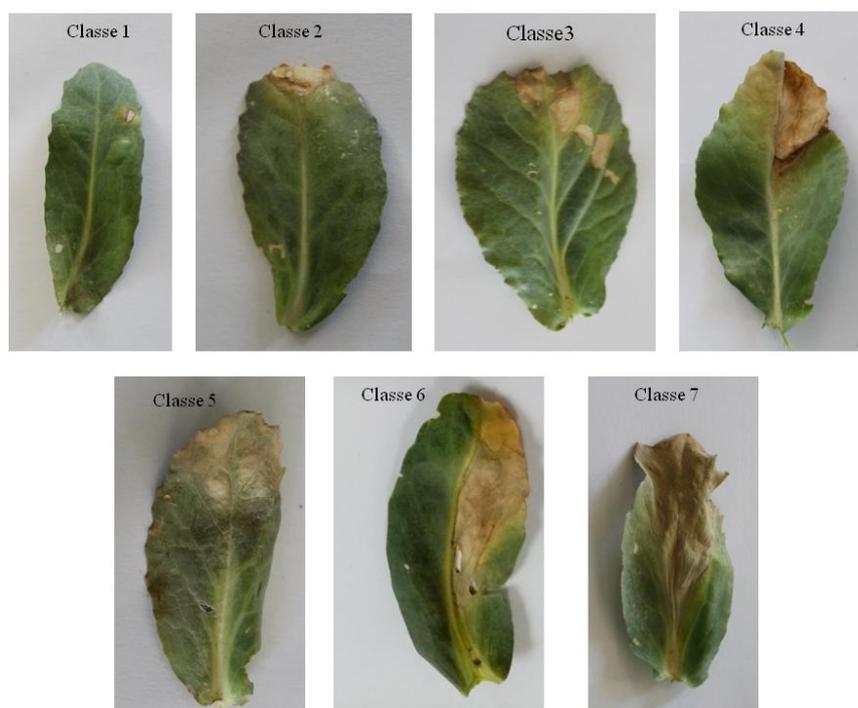


Figura 24 - Foglie di cavolo infette da funghi necrotrofi. Per ogni foglia è riportata la corrispondente classe di gravità attribuita.

Per quando riguarda gli steli è stata utilizzata una scala suddivisa in quattro classi di gravità in base alla percentuale di stelo colpita dai sintomi della malattia

(Tabella 5 e Figura 25). Il numero degli steli presenti è stato contato per ogni pianta, per un totale di 30 piante/strategia.

Tabella 5 - Scala empirica utilizzata per il rilievo della malattia sullo stelo.

Classe	Superficie infetta (%)
0	Stelo sano
1	1-10%
2	11-25%
3	26-50%
4	>50%

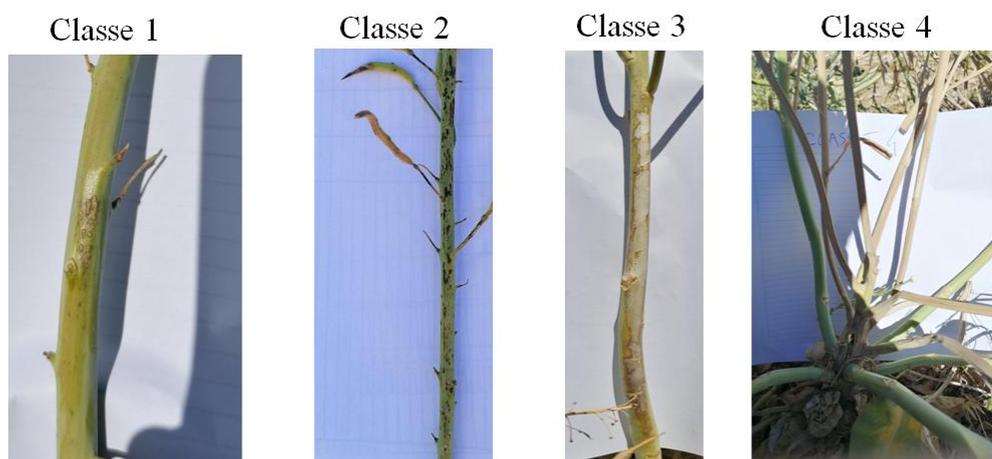


Figura 25 - Steli di cavolo infetti da funghi necrotrofi. Per ogni stelo è riportata la corrispondente classe di gravità attribuita.

Per quando riguarda le silique è stata utilizzata una scala suddivisa in quattro classi di gravità in base alla percentuale di siliqua colpita dai sintomi della malattia (Tabella 6 e Figura 26). Ai fini dello studio sono state osservate 15 silique per pianta, per un totale di 30 piante/strategia.

Tabella 6 - Scala empirica utilizzata per il rilievo della malattia delle silique.

Classe	Superficie infetta (%)
0	Silique sana
1	1-10%
2	11-25%
3	26-50%
4	>50%



Figura 26 - Silique di cavolo infette da funghi necrotrofi. Per ogni siliqua è riportata la corrispondente classe di gravità attribuita.

➤ **Cipolla da seme**

Su cipolla, sono stati osservati sintomi associabili a infezioni di *Botrytis* spp. La scelta delle piante di cipolla sulla quale sono stati eseguiti i rilievi è stata come è scritto sopra per il cavolo. Nell'appezzamento di cipolla da seme è stato effettuato un solo rilievo (12/07/2021).

Il rilievo è stato condotto su stelo e scapo florale ed è stata utilizzata una scala suddivisa in cinque classi di gravità in base alla percentuale di scapo colpita dai

sintomi della malattia (Tabella 7). Ai fini dello studio sono stati considerati diversi scapi fiorali con una media di tre scapi per pianta.

Tabella 7 - Scala empirica utilizzata per il rilievo della malattia sullo scapo florale.

Classe	Superficie infetta (%)
0	Scapo florale
1	1-5%
2	6-10%
3	10-30%
4	31-60%
5	>60

L'adozione delle scale empiriche, sia per cavolo cappuccio e per la cipolla da seme, permette di calcolare la diffusione della malattia (D), la gravità (G) e l'intensità media ponderata o indice d'infezione di McKinney (I) (McKinney, 1923; Romanazzi *et al.*, 2016). La diffusione (D) esprime la percentuale di superficie fogliare, superficie degli steli, superficie delle silique o scapo florale infetta sull'intera pianta

La formula per calcolare tale parametro è la seguente:

$$D = n * 100 / N$$

n: numero di /foglie/steli/silique/scapo infette

N: numero totale di /foglie/steli/silique/scapo esaminate.

La gravità (G) della malattia, valore che esprime l'intensità media della malattia riferita sia alle foglie, steli, silique e scapo infetti, è stata calcolata tramite la seguente formula:

$$G = \sum(c * f) / n$$

c: valore classe empirica

f: frequenza della classe

n: numero foglie/steli/silique/scapo infette.

Infine, l'indice di McKinney (o intensità media ponderata della malattia) esprime la gravità della malattia in valore percentuale rispetto a quella massima possibile ed è stato calcolato attraverso la formula:

$$I = \sum (c * f) / (N * X)$$

c: valore classe empirica

f: frequenza della classe

N: numero totale delle osservazioni

X: valore della classe massima della scala empirica.

Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica secondo il disegno sperimentale a blocchi randomizzati. Tutti i dati sono stati prima testati per la normalità secondo il test di Shapiro-Wilk con $P \leq 0,05$. In presenza di dati con distribuzione non normale, anche in seguito alla trasformazione $f(x) = \arcsin(\sqrt{x}/100)$ sono stati applicati test non parametrici. In particolare, il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Mann-Whitney (sempre con $P \leq 0,05$) per determinare le differenze statisticamente significative tra le strategie saggiate. Quando la distribuzione normale è stata confermata, i dati sono stati testati per l'omogeneità delle varianze secondo il test di Levene ($P \leq 0,05$). Con omogeneità confermata, è stata eseguita l'analisi ANOVA unidirezionale e le medie sono state separate in base al test LSD di Fisher ($P \leq 0,05$). Quando l'omogeneità delle varianze non è stata confermata, è stata eseguita l'analisi di Welch e le medie sono state separate utilizzando il test post hoc di Games-Howell ($P \leq 0,05$). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS (*Statistical Package for Social Science*, versione 20, IBM, Ar-monk, NY, USA) e il software "RStudio".

8.4. PROVE DI LABORATORIO: ANALISI MORFOLOGICA E MOLECOLARE DELLE PRINCIPALI MALATTIE RISCONTRATE NEI CAMPI DI CAVOLI E CIPOLLE

8.4.1. Isolamento e identificazione dei principali funghi

I campi sperimentali sono stati monitorati durante tutta la stagione; è stato inoltre organizzato un sopralluogo con il Servizio Fitosanitario regionale per monitorare lo stato fitosanitario delle colture, e i principali quadri sintomatologici presenti in campo di cavolo e cipolla. Questo lavoro è stato utile al fine di definire le malattie sulle quali condurre i rilievi per la valutazione d'efficacia. A partire dai campioni sintomatici, sono stati effettuati degli isolamenti su substrati artificiali e quindi condotte delle analisi morfologiche in laboratorio, per identificare i generi fungini

associabili ai sintomi osservati in campo di cavolo e cipolla. Le parti infette sono state frammentate in piccoli pezzi di 2 mm. I frammenti sono stati immersi in una soluzione d'ipoclorito di sodio all'1% per 2 minuti, risciacquati con tre lavaggi con acqua distillata sterilizzata e asciugati all'aria per 30 minuti su carta assorbente sterile; tutte queste operazioni sono state effettuate sotto cappa a flusso laminare per limitare le contaminazioni dei campioni; successivamente i frammenti sono stati inseriti nelle piastre Petri, su tre diversi substrati: PDA (*potato dextrose agar*), *water agar* e carta assorbente inumidita (Figura 27). Questi sono stati poi incubati per 7 giorni a 22 ± 2 °C. L'identificazione dei funghi è stata effettuata inizialmente con delle osservazioni allo stereomicroscopio dei corpi fruttiferi, del micelio sviluppatosi sui frammenti. Successivamente, sono state asportate le strutture riproduttive dei funghi per un'ulteriore osservazione al microscopio ottico. Infine, i propaguli dei funghi sono stati insemiati in piastre Petri contenenti PDA, in modo da poter avere un'ulteriore conferma dell'identificazione, basandosi anche su caratteri morfologici della colonia (forma, colore).



Figura 27 - Colonie fungine in crescita su diversi substrati prima dell'isolamento e della successiva identificazione, (a sinistra) piastra Petri con agar, (al centro) piastra Petri con carta assorbente, (a destra) piastra Petri con PDA.

8.4.2. Analisi molecolari per piante affetta da fitoplasmi

Durante i trattamenti nell'appezzamento del cavolo cappuccio per la produzione di seme ibrido, a Montefiore dell'Aso, sono state osservate delle piante che presentavano delle malformazioni. Il 21 maggio 2021 sono stati prelevati 11 campioni e inseriti in sacchetti di plastica, conservati a circa 5°C e portati in laboratorio per effettuare delle analisi molecolari a fini diagnostici.

Dai campioni giunti in laboratorio sono stati asportati frammenti vegetali da cui sono stati prelevati circa 0,5 g. Questi sono stati macerati in un mortaio in 5

mL di tampone di estrazione a base di CTAB 3% (100 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 100 mM EDTA) in presenza di un antiossidante ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Le provette, contenenti il succo grezzo, sono state poste a incubare a 65°C per circa 20-30 min, successivamente è stata effettuata una centrifugazione a bassa velocità (5000 rpm) per favorire la sedimentazione delle parti più grossolane e sono stati prelevati 700-800 μL del surnatante, a cui è stato aggiunto cloroformio in ugual volume. Le provette ripetutamente ed energicamente agitate su vortex, sono state centrifugate a 10000 rpm per 8 min, successivamente sono state prelevati (circa 600 μL) a cui è stato aggiunto un ugual volume di isopropanolo. Le provette, dopo essere state agitate delicatamente, sono state lasciate a 4°C per 10 min e successivamente centrifugate a 12000 rpm per 15 min. Infine, dalle provette è stata allontanata la fase liquida ed è stato fatto asciugare il pellet, che è stato poi riportato in sospensione con 60 μL di acqua sterile. I campioni sono stati conservati a -20°C in attesa di essere analizzati tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Il DNA totale estratto è stato sottoposto ad amplificazione generica utilizzando una prima coppia di primer universali per i fitoplasmi (P1/P7). A questa prima reazione di amplificazione effettuata con i primer universali, è seguita una seconda PCR (*nested-PCR*) che ha utilizzato come template l'amplificato ottenuto nella prima PCR (diluito 1:30) e la coppia di primer R16F2n/R2. Aliquote (10 μL) del prodotto di amplificazione sono state caricate su gel all'1,5% di agarosio (*Molecular Biology Certified Agarose, Bio-Rad Laboratories*) e fatte correre in tampone TAE (45 mM di Tris-borato; 1 mM EDTA, pH 8,0) a 110 Volts per 10 min in camera elettroforetica per gel orizzontale sommerso (*Bio-Rad Laboratories*). Per la stima delle dimensioni dei prodotti di amplificazione è stato utilizzato come standard il 100 pb DNA Ladder (*New England Bio-Labs, Beverly, USA*) che origina 12 bande di dimensioni da 100 a 1500 pb. I gel, precolorati con *GelRed 10,000 \times* (*Biotium*), sono stati visualizzati e acquisiti mediante Gel Doc 1000 (*Bio-Rad Laboratories*).

9. RISULTATI

9.1. ANDAMENTO METEOROLOGICO

Allo scopo di inquadrare la prova sperimentale in oggetto, quindi studiare l'evoluzione e la diffusione delle malattie, risulta di centrale importanza un'attenta valutazione dell'andamento meteorologico dell'intera stagione vegetativa 2021 in quanto, l'umidità portata dalle precipitazioni favorisce la propagazione dei patogeni. I dati necessari per l'elaborazione dei grafici di seguito riportati sono stati acquisiti dai bollettini agrometeorologici del servizio agrometeorologico dell'AMAP. Ogni grafico riportato nei tre paragrafi seguenti contiene i dati relativi alle temperature massime (°C) e minime (°C), l'umidità relativa (%) e le precipitazioni totali (mm) in forma settimanale in riferimento al periodo che va dalla prima decade di marzo fino alla prima decade di luglio.

➤ *Montefiore dell'Aso (AP)*

L'andamento meteorologico registrato nella stazione di Montefiore dell'Aso nel periodo compreso tra primo marzo e primo luglio 2021 (Figura 28) evidenzia soli quattro eventi piovosi di media intensità nelle prime settimane marzo, aprile, maggio e metà mese di giugno. I restanti mesi invece sono stati caratterizzati da precipitazioni inferiori alla norma che hanno provocato anche fenomeni di siccità sul territorio. In concomitanza col regime termico i livelli di umidità relativa oscillano intorno al'60% non ha rappresentato buone condizioni per lo sviluppo dei patogeni.

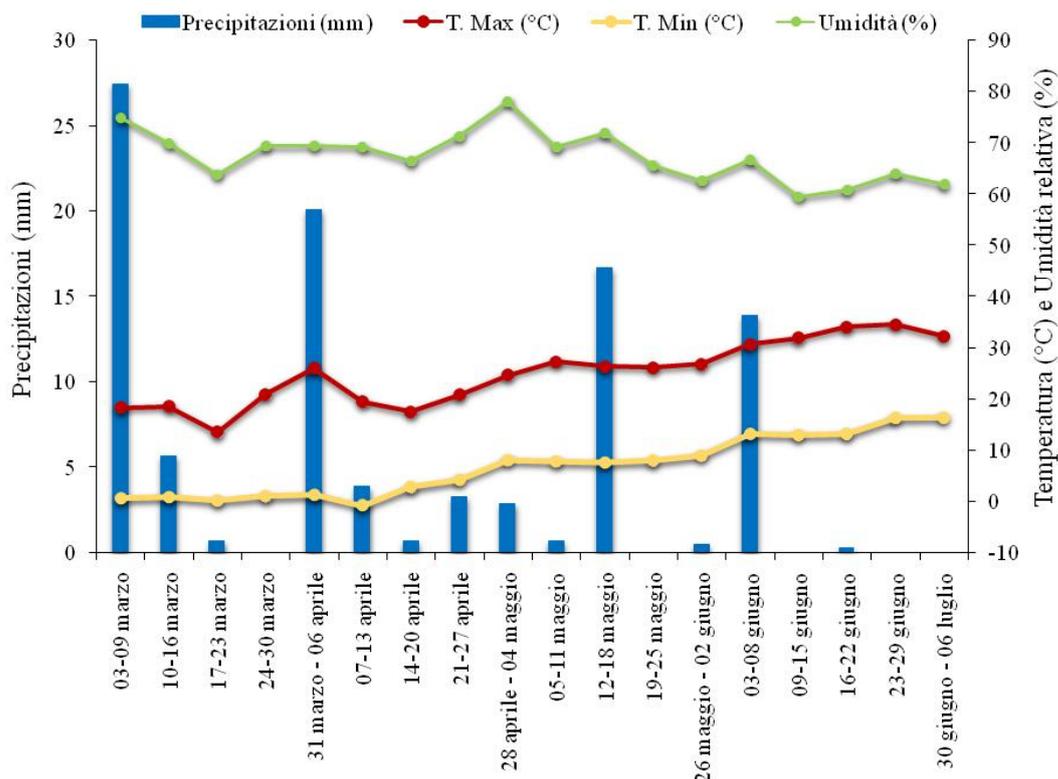


Figura 28 - Grafico dell'andamento meteorologico registrato nel periodo che va dal 03 marzo al 06 luglio 2021. Fonte dati: AMAP - Servizio agrometeorologico di Montefiore dell'Asso (AP).

➤ **Monterado, Trecastelli (AN) e San Lorenzo in Campo (PU)**

La stazione meteorologica di San Lorenzo in Campo comprende l'aria geografica dove sono collocate l'azienda Marco Morbidelli e l'azienda Tenti Carlo e Coreani Giulietta S.S. L'andamento meteorologico registrato nella stazione nel periodo compreso tra marzo e giugno 2021 (Figura 29) evidenzia eventi piovosi nelle prime settimane marzo, aprile, giugno. I restanti mesi invece sono stati caratterizzati da precipitazioni inferiori alla norma soprattutto nel periodo di maggio. In concomitanza col regime termico i livelli di umidità relativa si verifica una diminuzione verso i mesi più caldi.

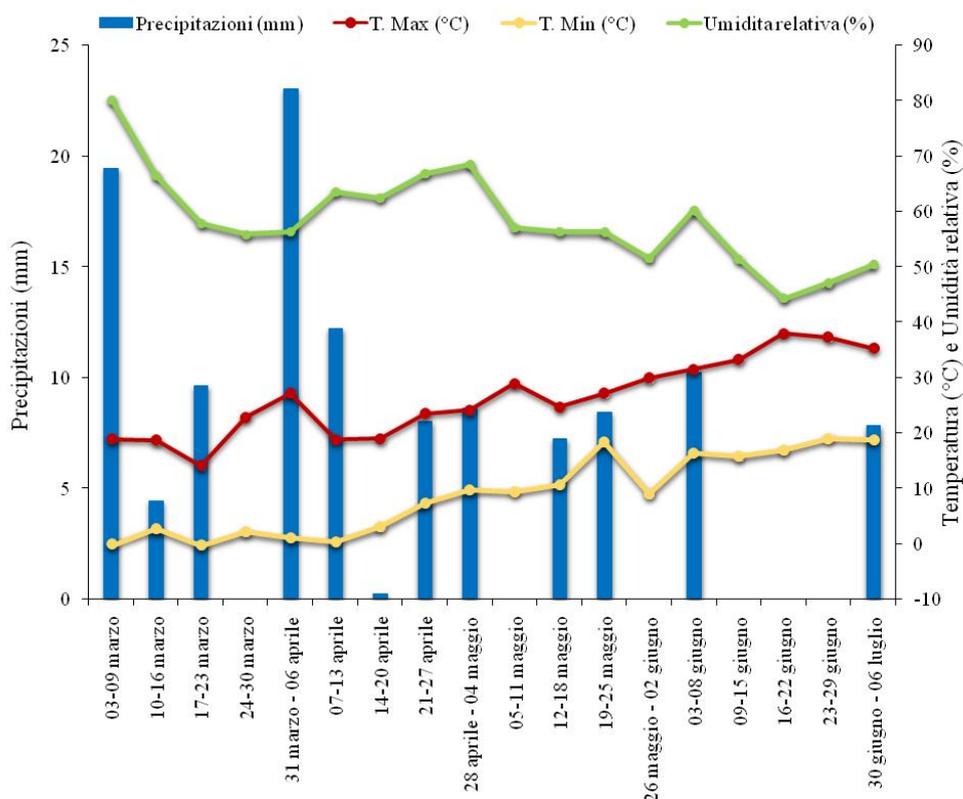


Figura 29 - Grafico dell'andamento meteorologico registrato nel periodo che va dal 03 marzo al 06 luglio 2021. Fonte dati: AMAP - Servizio agrometeorologico di San Lorenzo in Campo (PU).

9.2. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI IN CAMPO CAVOLO CAPPuccio DA SEME

Negli appezzamenti adibiti alla coltivazione del cavolo cappuccio (sia ibrido che non) sono avvenuti due rilievi. I rilievi e la successiva analisi dei dati sono stati condotti separatamente in base alla porzione di campo considerata: nella metà dell'appezzamento non trattata, dove sono stati eseguiti trattamenti soltanto con i prodotti a basso impatto ambientale durante tutta la stagione (metà non trattata - NT); e metà trattata -T, dove sono stati effettuati anche trattamenti nei confronti di *X. campestris*. I rilievi hanno riguardato i sintomi ascrivibili a malattie di tipo necrotico presenti su foglie steli, e silique.

9.2.1. Monterado, Trecastelli (AN): produzione di semente standard

9.2.1.1. Primo rilievo - 10 giugno 2021

➤ *Sulle foglie*

Dal primo rilievo avvenuto sulle foglie trattate solo con i prodotti in prova durante tutta la stagione, si osserva una diminuzione della percentuale di diffusione delle

malattie necrotiche da parte delle nuove strategie rispetto al testimone -NT. In questo caso, il chitosano -NT ha fornito livelli di protezione significativi nei confronti delle necrosi fogliari (Figura 30). Nel dettaglio, il grafico relativo alla diffusione dimostra come la diffusione massima si trovi nella tesi non trattata (Figura 30 A). Si è assistito ad una riduzione significativa dell'intensità della malattia sulle foglie rispetto al controllo nella metà non trattata nelle strategie: chitosano -NT, miscela di terpeni -NT e *B. amyloliquefaciens* -NT (Figura 30 A). In entrambe le situazioni, il COS-OGA -NT, rame -NT e la strategia aziendale -NT hanno ridotto la diffusione della malattia rispetto al testimone -NT ma non in maniera statisticamente significativa.

Nell'istogramma della gravità (Figura 30 B), la strategia chitosano -NT è stata l'unica strategia che ha avuto una riduzione significativa della gravità rispetto al testimone -NT.

Complessivamente, tutte le tesi hanno ridotto l'indice di McKinney (Figura 30 C) rispetto al testimone non trattato. Il chitosano -NT, la miscela di terpeni -NT e il *B. amyloliquefaciens* -NT sono le tre strategie in cui è stato determinato un effetto statisticamente significativo rispetto al testimone -NT. Il COS-OGA -NT, rame -NT e la strategia aziendale -NT hanno mostrato una diminuzione rispetto al testimone -NT, ma non statisticamente significativa (Figura 30 C).

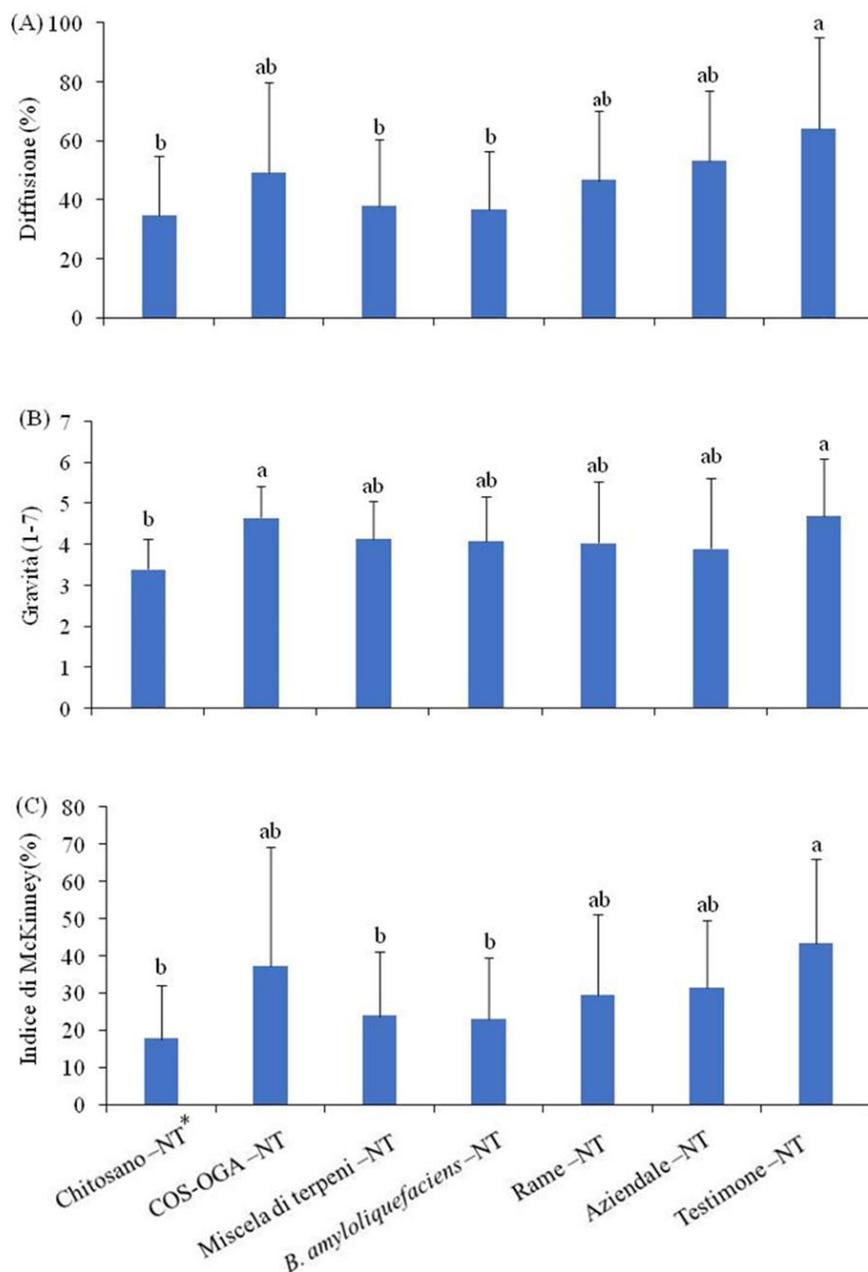


Figura 30 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio nella metà non trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di LSD di Fisher ($P \leq 0,05$). *NT: metà non trattata per altre avversità.

In linea generale nella porzione di campo dove sono stati mantenuti gli altri trattamenti, in associazione a quelli in prova, si osserva una diminuzione della percentuale di diffusione delle malattie rispetto al testimone -T da parte delle nuove strategie: COS-OGA -T, miscela di terpeni -T e *B. amyloliquefaciens* -T. Nell' aziendale -T si può notare un aumento della diffusione (Figura 31 A).

Dall'istogramma relativo alla gravità (Figura 31 B), la strategia COS-OGA -T è stata l'unica strategia che ha avuto una riduzione significativa rispetto al testimone -T.

Complessivamente, solo COS-OGA -T ha ridotto significativamente l'indice di McKinney rispetto al testimone -T e all'aziendale -T (Figura 31 C).

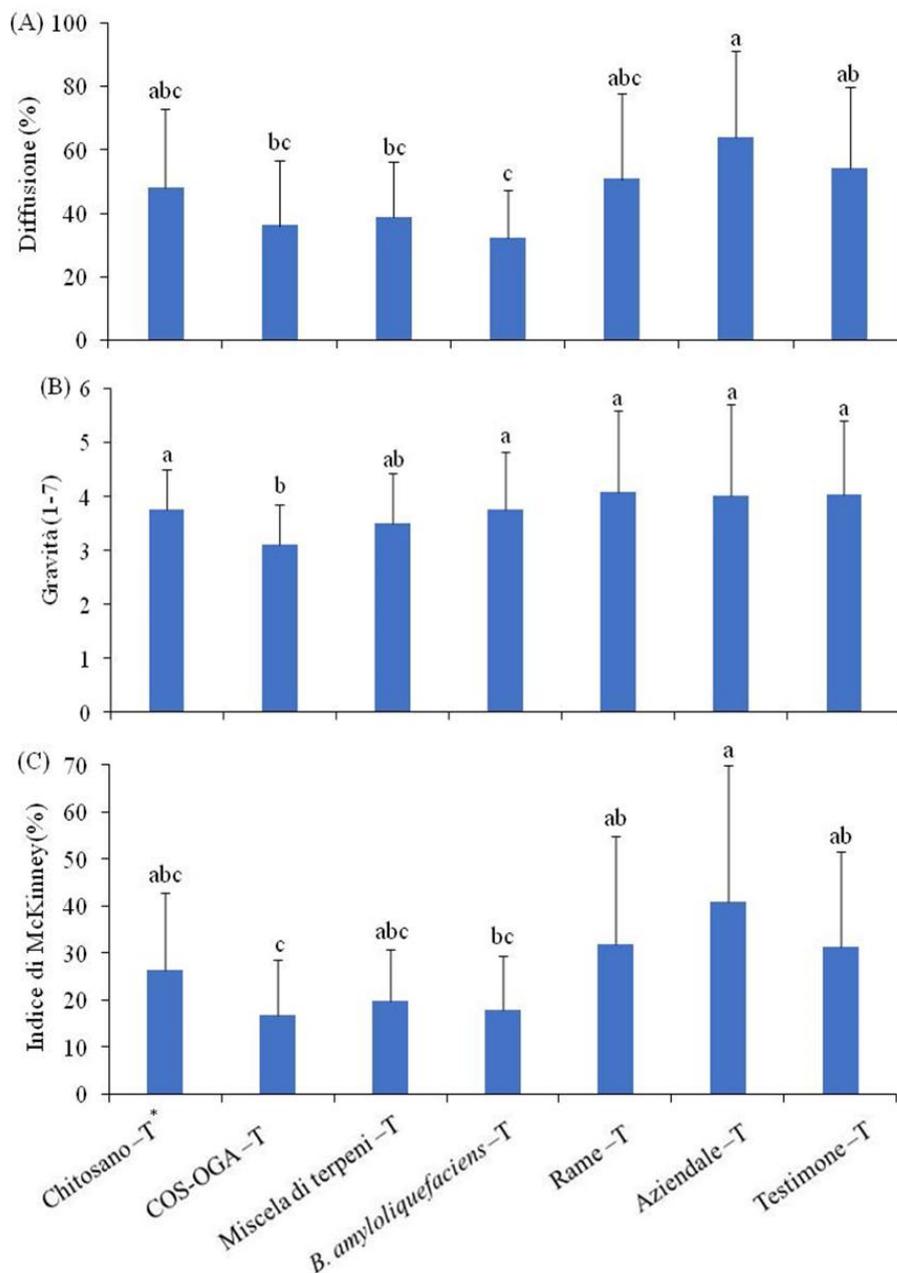


Figura 31 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio nella metà trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$). *T: metà trattata per altre avversità.

➤ **Sugli steli**

Al primo rilievo avvenuto sugli steli trattati solo con i prodotti innovativi durante tutta la stagione, *B. amyloliquefaciens* -NT ha fornito livelli di protezione significativi nei confronti delle necrosi sugli steli. In dettaglio, per questa strategia è stata osservata una maggiore diminuzione della percentuale dell'indice McKinney rispetto a tutte le altre strategie saggiate con una differenza statisticamente significativa rispetto al testimone -NT (Figura 32 C).

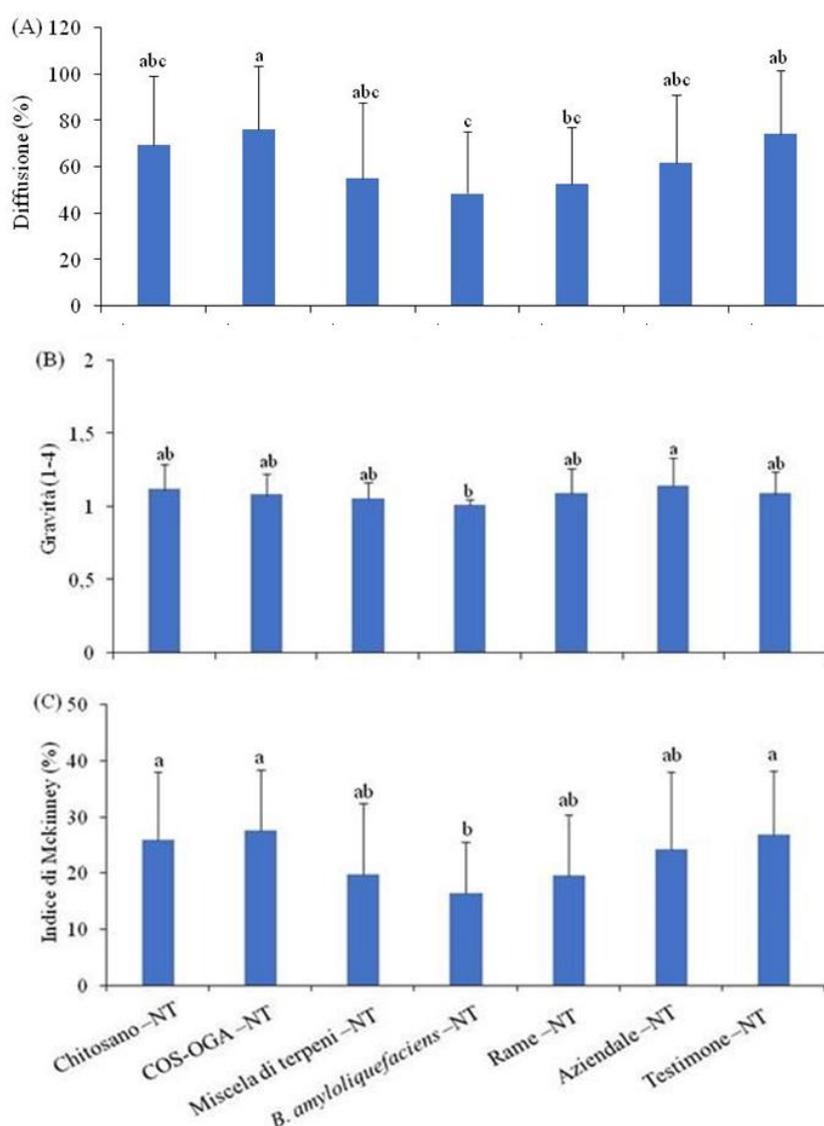


Figura 32 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio nella metà non trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel primo rilievo. I dati sono stati inizialmente testati per la normalità della varianza con il test di Shapiro-Wilk. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Dove i prodotti innovativi sono stati aggiunti al programma aziendale completo, nel primo rilievo sugli steli di cavolo cappuccio è stata osservata una riduzione significativa della diffusione della malattia sugli steli rispetto al controllo nelle strategie: chitosano -T e rame -T.

Nell'istogramma della gravità (Figura 33 B) si può notare come tutte le strategie abbiano riportato una gravità dei sintomi simile al testimone.

Complessivamente, tutte le tesi hanno registrato una riduzione per l'indice di McKinney. Le strategie: chitosano -T, COS-OGA -T, miscela terpenica -T e rame -T, hanno mostrato differenze significative rispetto al testimone -T (Figura 33 C).

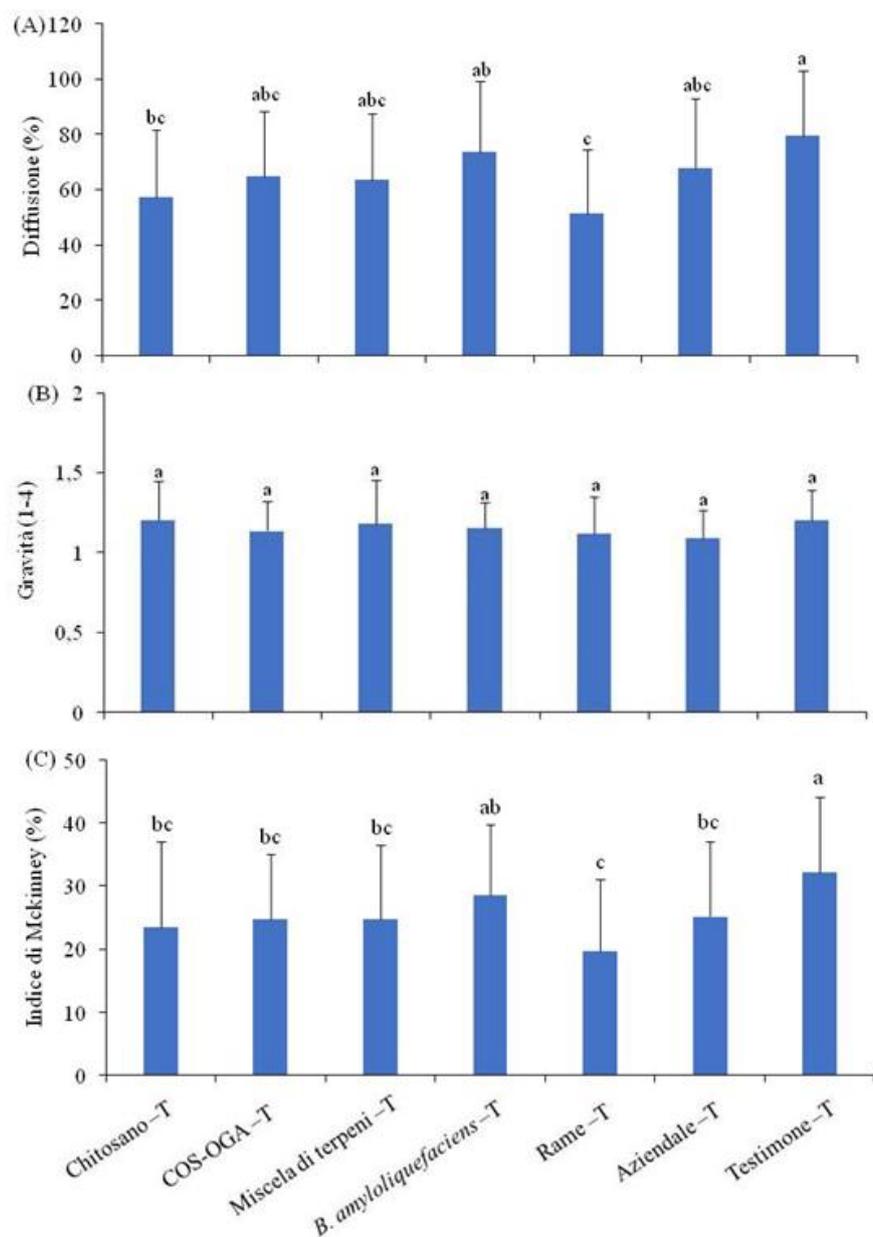


Figura 33 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio nella metà trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

➤ **Sulle silique**

Sulle silique, nella porzione di campo trattata solo con i prodotti innovativi, non sono emerse differenze statisticamente significative fra le strategie saggiate e in comparazione al testimone -NT (Figura 34).

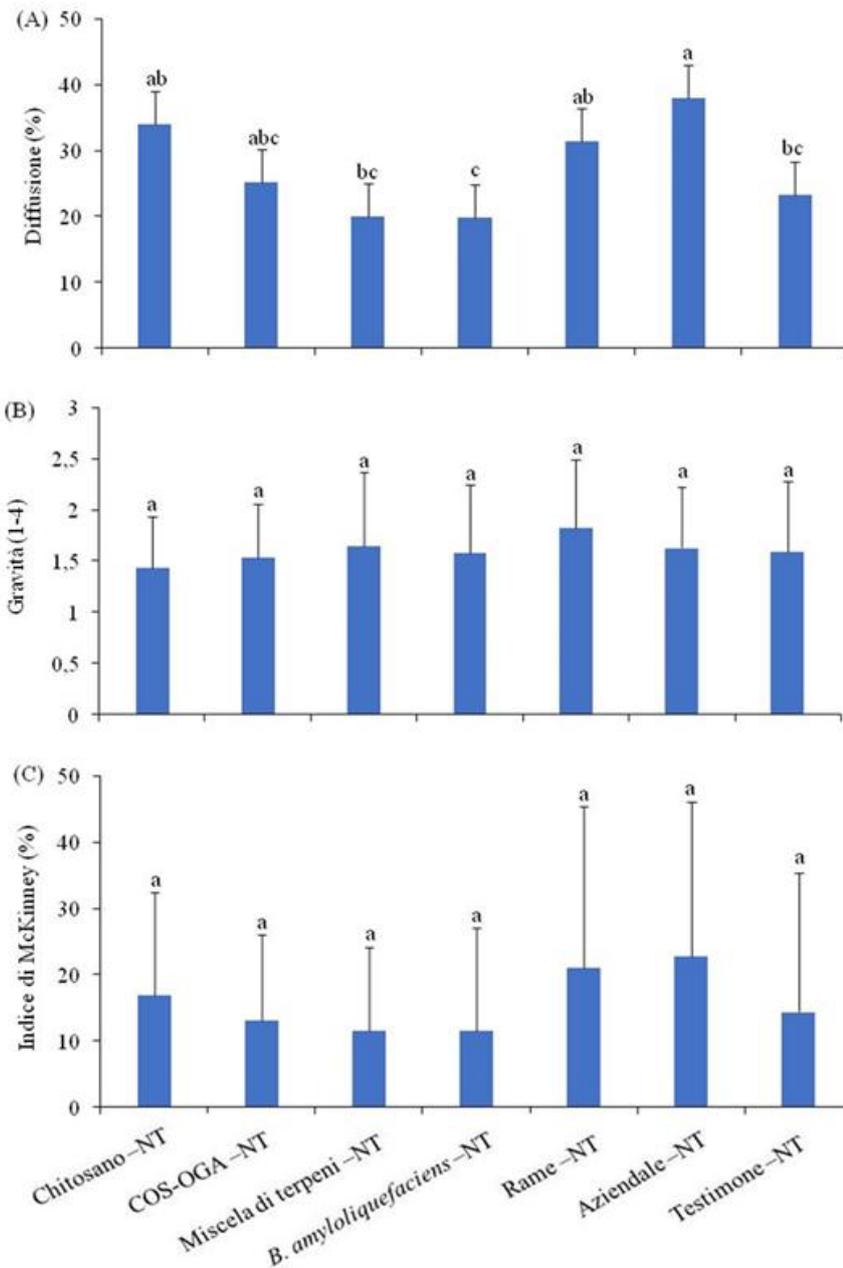


Figura 34 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio nella metà non trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Risultati diversi sono stati ottenuti nella porzione di campo dove i prodotti da saggiare sono stati aggiunti ai convenzionali trattamenti aziendali. Negli istogrammi della diffusione e dell'indice di McKinney, si osserva che le piante trattate con chitosano -T presentano i valori più bassi, con una differenza statisticamente significativa rispetto al testimone -T (Figura 35 A, C). Al contrario, le altre strategie: COS-OGA -T, miscela terpenica -T e *B.*

amyloliquefaciens -T non mostrano differenze significative tra loro e al testimone -T (Figura 35).

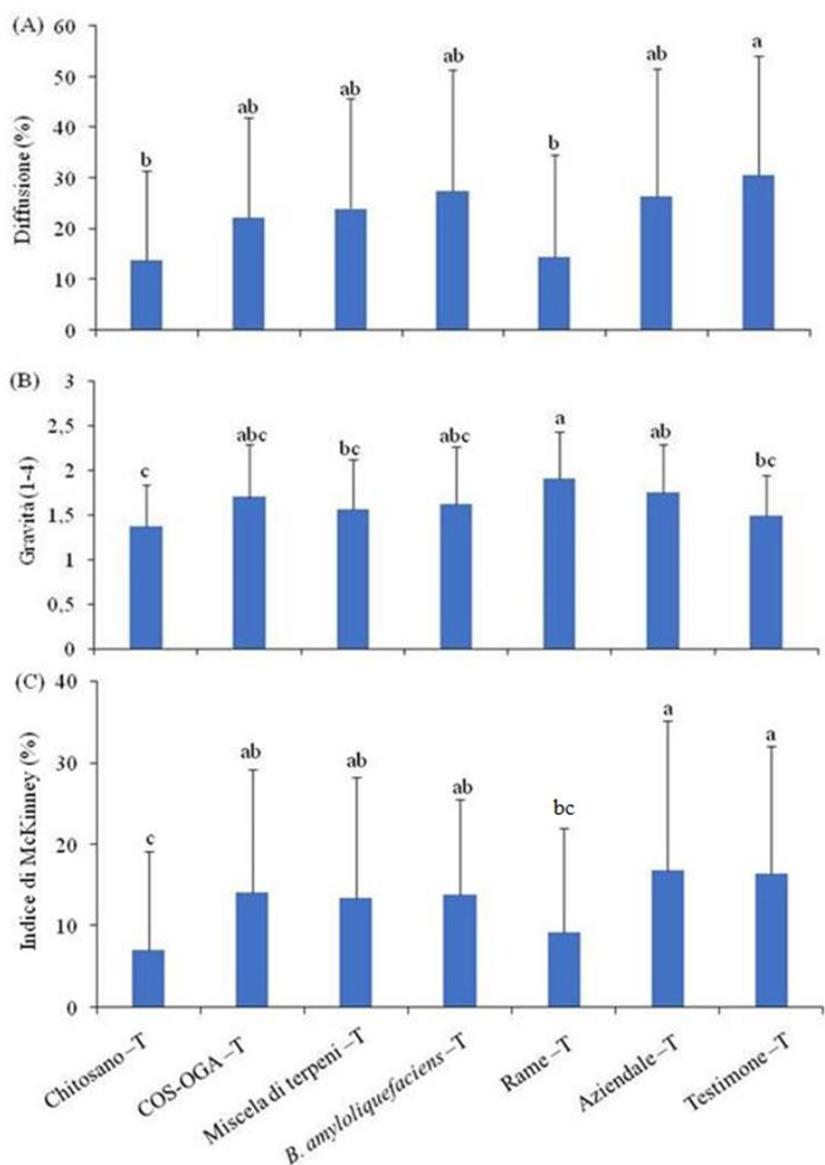


Figura 35 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio nella metà trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

9.2.1.2. Secondo rilievo - 21 giugno 2021

➤ Sulle foglie

Nel secondo rilievo avvenuto sulle foglie, dove sono stati applicati solo i prodotti in prova, si osserva come tutte le nuove strategie saggate non abbiano portato a

una diminuzione della diffusione delle malattie considerate rispetto al testimone - NT, ad eccezione di rame -NT (Figura 36 A).

Per quanto riguarda la gravità dei sintomi e l'indice di McKinney della malattia non sono emerse differenze statisticamente significative rispetto al testimone -NT (Figura 36 B, C).

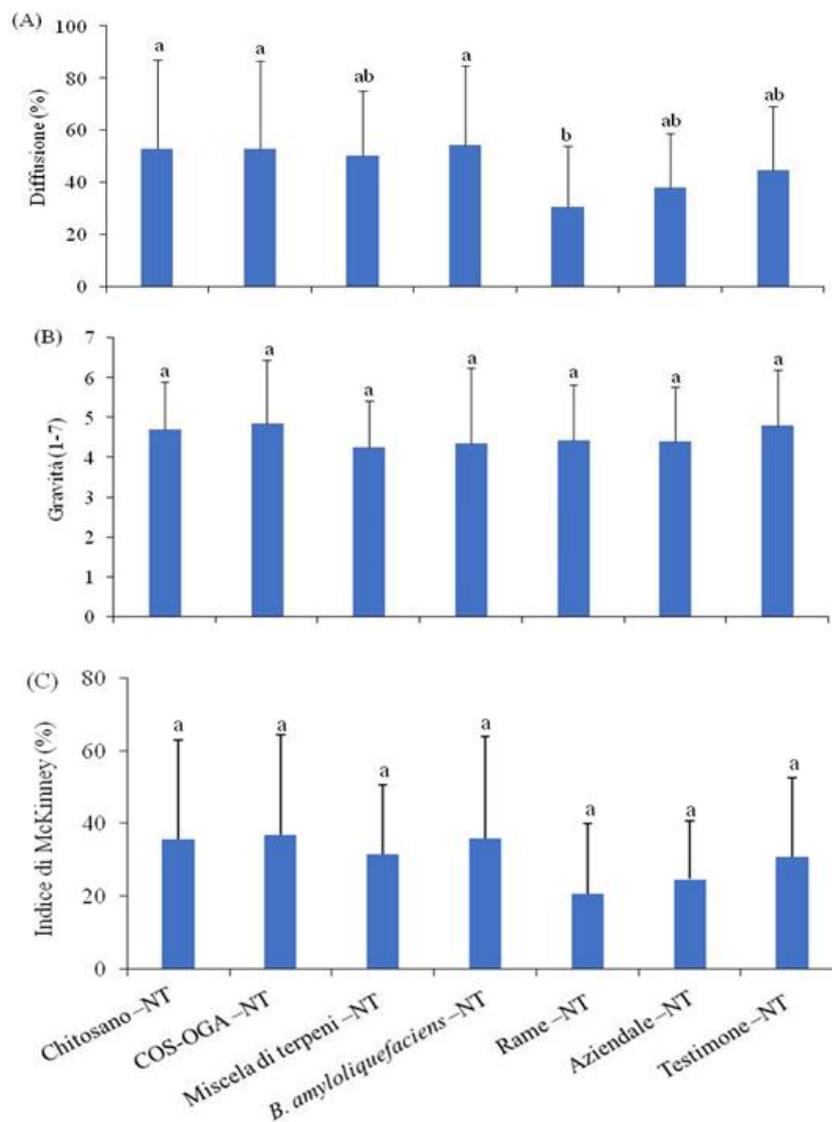


Figura 36 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio nella metà non trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Nel secondo rilievo avvenuto sulle foglie dove la strategia di protezione aziendale è stata affiancata dai prodotti in prova, è emerso come solo miscela di

terpeni -T e *B. amyloliquefaciens* -T abbiano mostrato riduzioni significative per la diffusione e l'indice di McKinney rispetto al testimone -T (Figure 37 A, C). Non sono emerse invece differenze importanti a carico della gravità dei sintomi (Figura 37 B).

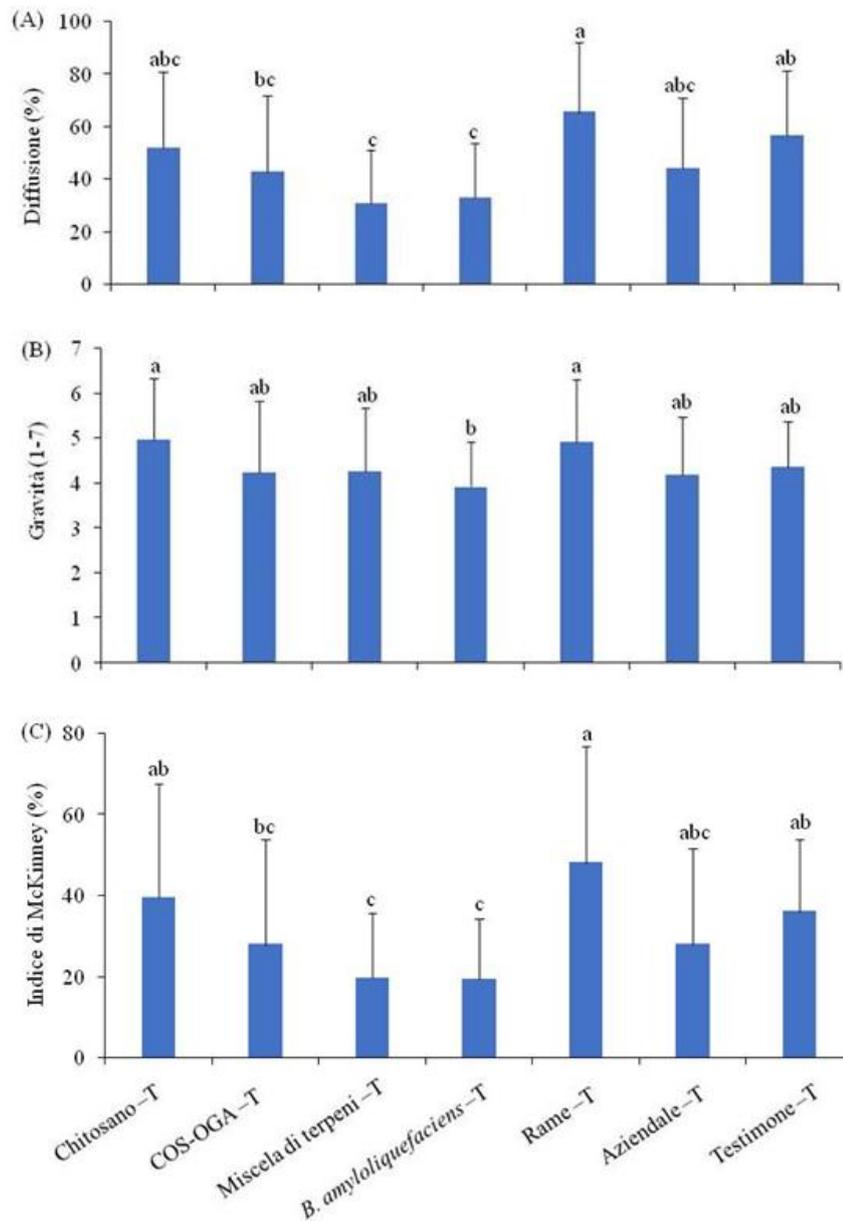


Figura 37 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio nella metà trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti da lettere diverse sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

➤ ***Sugli steli***

Dall'istogramma della diffusione (Figura 38 A) del secondo rilievo avvenuto sugli steli dove le piante sono state trattate solo con i prodotti in prova durante tutta la stagione, si osserva una riduzione significativa nelle strategie rame -NT e miscela di terpeni -NT. La strategia aziendale -NT è risultata con la diffusione maggiore rispetto a tutte le strategie saggiate.

Nessuna strategia è riuscita a contenere significativamente la gravità dei sintomi rispetto agli steli non trattati.

Mentre, nell'istogramma dell'indice di McKinney, le strategie miscela di terpeni -NT, *B. amyloliquefaciens* -NT e rame -NT hanno avuto una riduzione significativa rispetto all'aziendale -NT. Tuttavia, tali riduzioni non sono risultate statisticamente significative rispetto al testimone -NT (Figura 38 B, C).

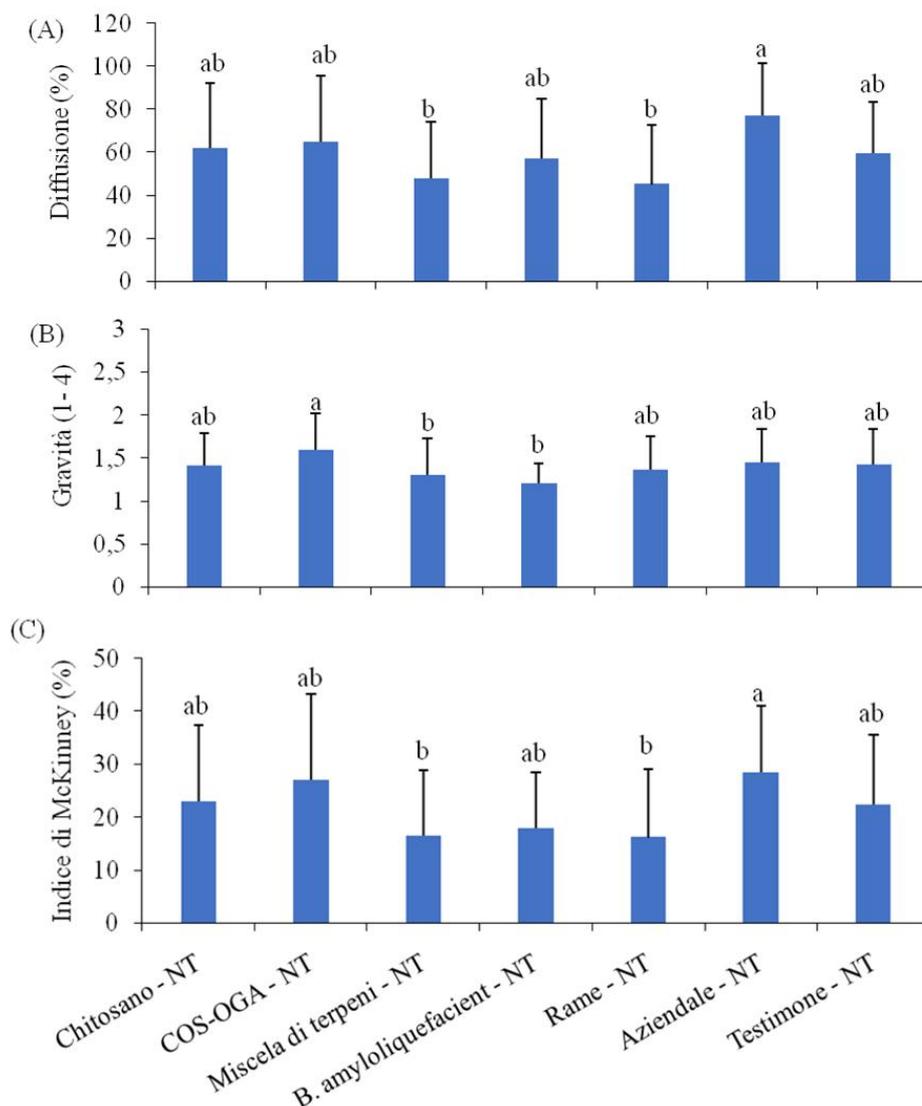


Figura 38 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio nella metà non trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Dal secondo rilievo avvenuto sugli steli dove le nuove strategie sono state affiancate ai trattamenti per altre patologie, si osserva una diminuzione della percentuale di diffusione con tutte le strategie saggiate (Figura 39 A). Tuttavia, le uniche due strategie dove le riduzioni sono risultate statisticamente significative rispetto al testimone -T sono chitosano -T e rame -T. Nessuna riduzione significativa è stata osservata in merito alla gravità dei sintomi, mentre per l'indice di McKinney i risultati sono simili a quanto osservato per la diffusione. Ovvero, nonostante tutte le strategie abbiano contenuto l'intensità della malattia,

solo chitosano -T e rame -T hanno mostrato riduzioni significative da un punto di vista statistico (Figura 39 A, C).

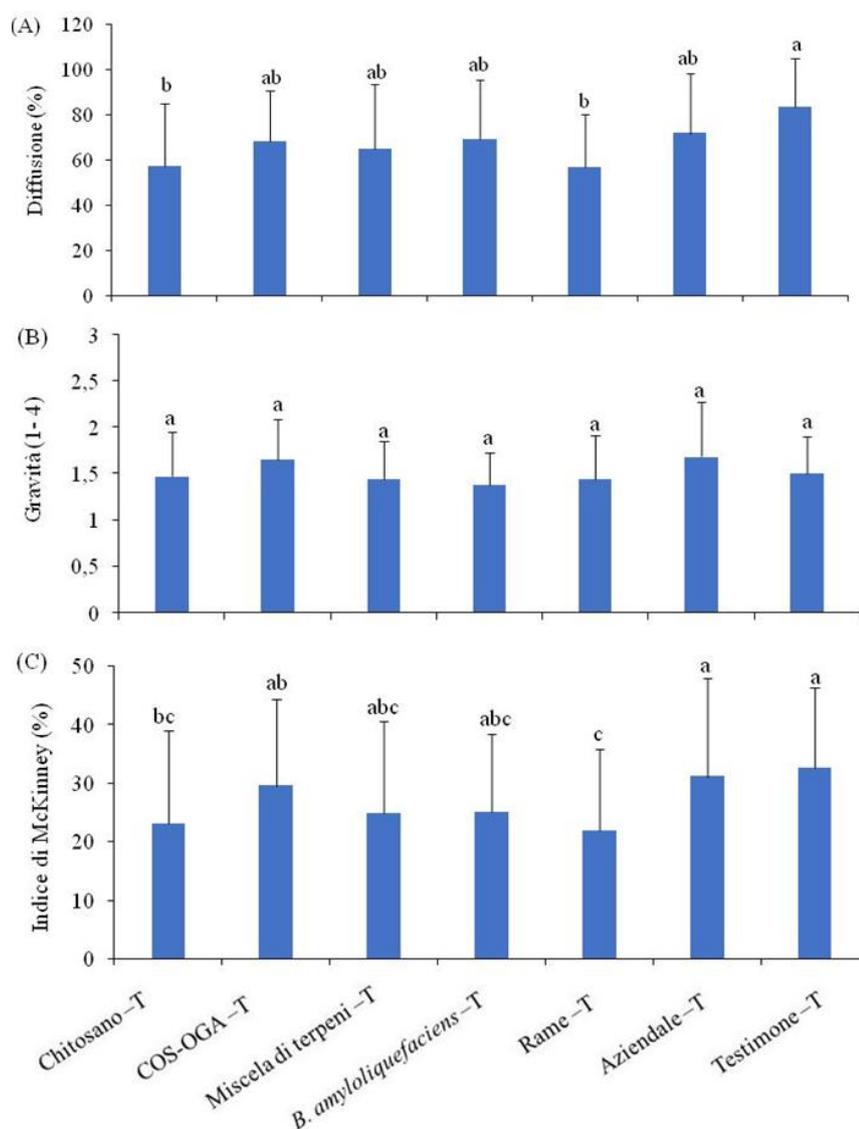


Figura 39 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio nella metà trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

➤ *Sulle siliques*

Nel secondo rilievo avvenuto sulle siliques trattate durante tutta la stagione solo con i prodotti in prova nei confronti delle malattie fungine necrotiche è emerso come tutte le strategie abbiano ridotto l'indice di McKinney rispetto al testimone -

NT, ma tali riduzioni non sono risultate statisticamente significative (Figura 40 C).

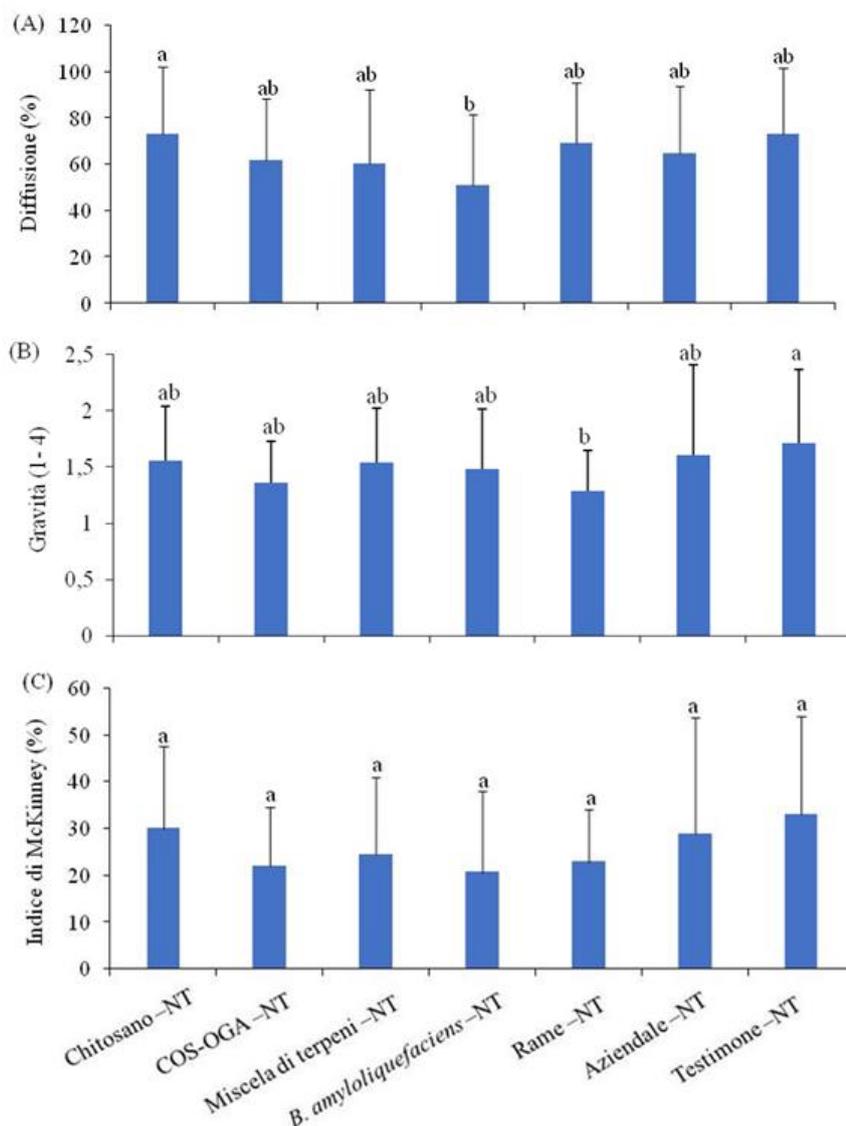


Figura 40 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio nella metà non trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Nel secondo rilievo avvenuto nella metà di campo dove i composti innovativi sono stati applicati in aggiunta agli altri trattamenti, si evidenzia una riduzione significativa della diffusione delle malattie sulle silique per le strategie COS-OGA-T e miscela di terpeni -T rispetto al testimone -T. Riduzioni significative a carico dell'indice di McKinney rispetto al testimone -T, sono state invece registrate nelle

strategie: COS-OGA -T, miscela di terpeni -T e *B. amyloliquefaciens* -T (Figura 41 A, C).

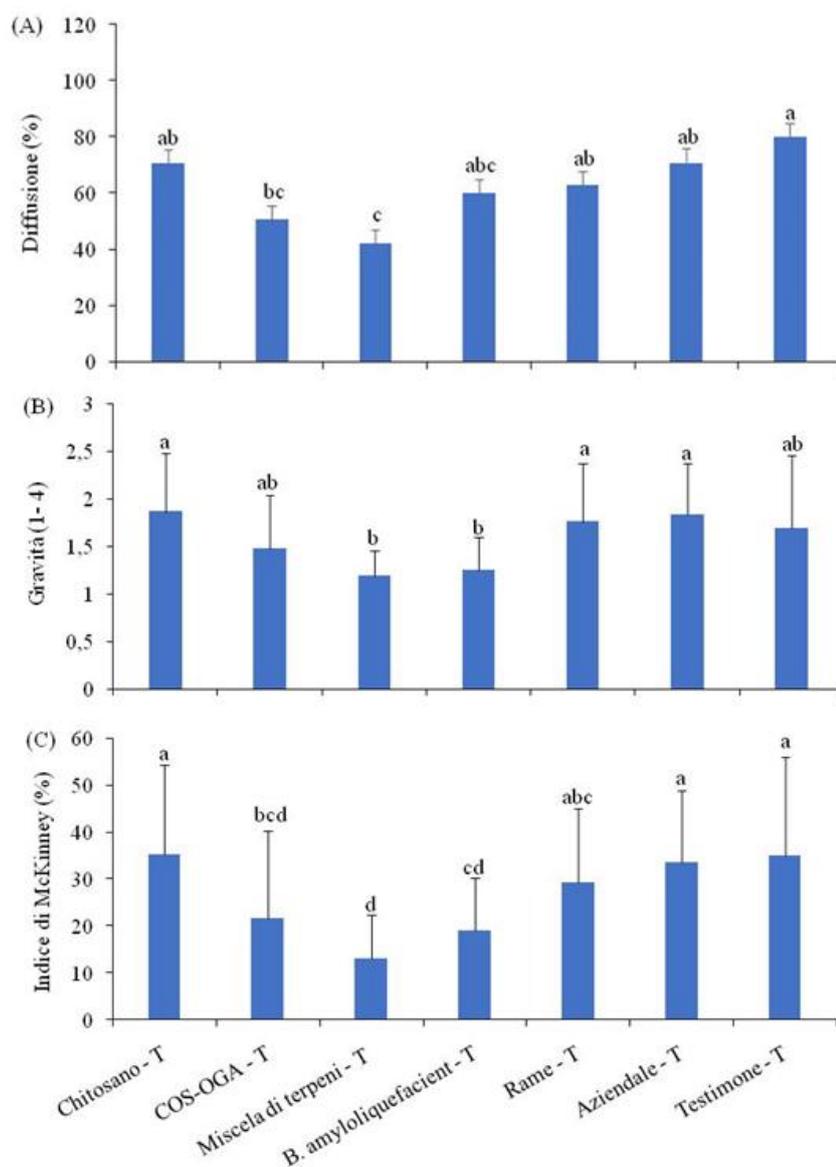


Figura 41 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio nella metà trattata per altre avversità, a Monterado, Trecastelli (AN) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti da lettere dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

9.2.2. Montefiore dell’Aso (AP): produzione di seme ibrido

9.2.2.1. Primo rilievo - 17 giugno 2021

➤ Sulle foglie

Nel primo rilievo avvenuto sulle foglie di cavolo cappuccio coltivato per la produzione di seme ibrido, dove sono stati applicati solo i prodotti in prova durante tutta la stagione, per tutti le strategie si evidenzia una diminuzione della percentuale della diffusione e dell'indice di McKinney rispetto al testimone -NT. Tuttavia, tali riduzioni non sono risultate statisticamente significative (Figura 42 A, C). Nessuna differenza è emersa anche per quanto riguarda la gravità delle lesioni.

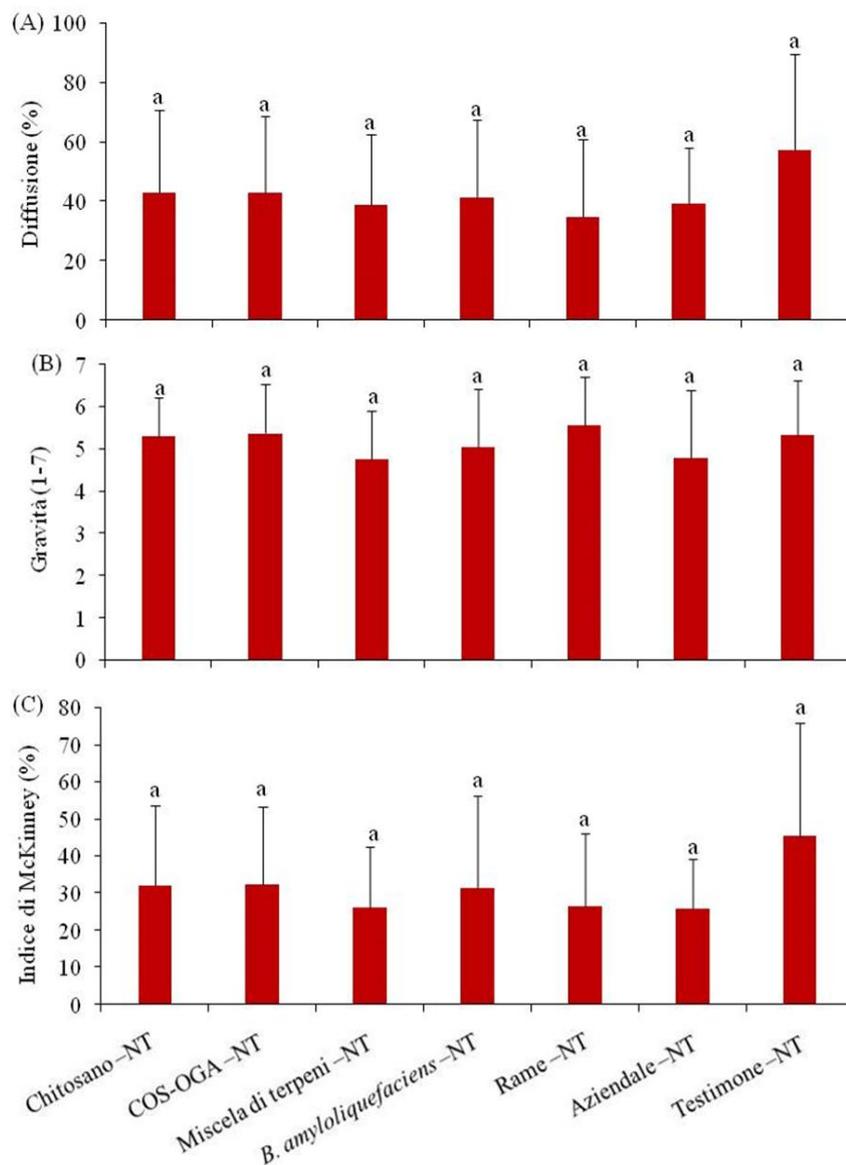


Figura 42 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio ibrido nella metà non trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Risultati diversi sono stati osservati sulla metà trattata, dove i composti innovativi sono stati affiancati dai trattamenti aziendali per altre patologie. In questo caso, il chitosano -T ha fornito livelli di protezione significativi nei confronti della diffusione delle necrosi fogliari. Anche tutte le altre strategie hanno ridotto tale parametro, non risultando però significative, tranne nel caso del rame -T e dell'aziendale completo (Figura 43 A).

COS-OGA T-, miscela di terpeni -T e rame -T, abbinati alla strategia aziendale hanno contenuto in maniera significativa la gravità dei sintomi rispetto all'aziendale -T senza l'aggiunta dei composti innovativi (Figura 43 B). Complessivamente, si sono osservate riduzioni statisticamente significative dell'indice di McKinney nelle piante trattate con: chitosano -T, COS-OGA -T e rame -T in aggiunta al programma aziendale, rispetto al testimone -T (Figura 43 C).

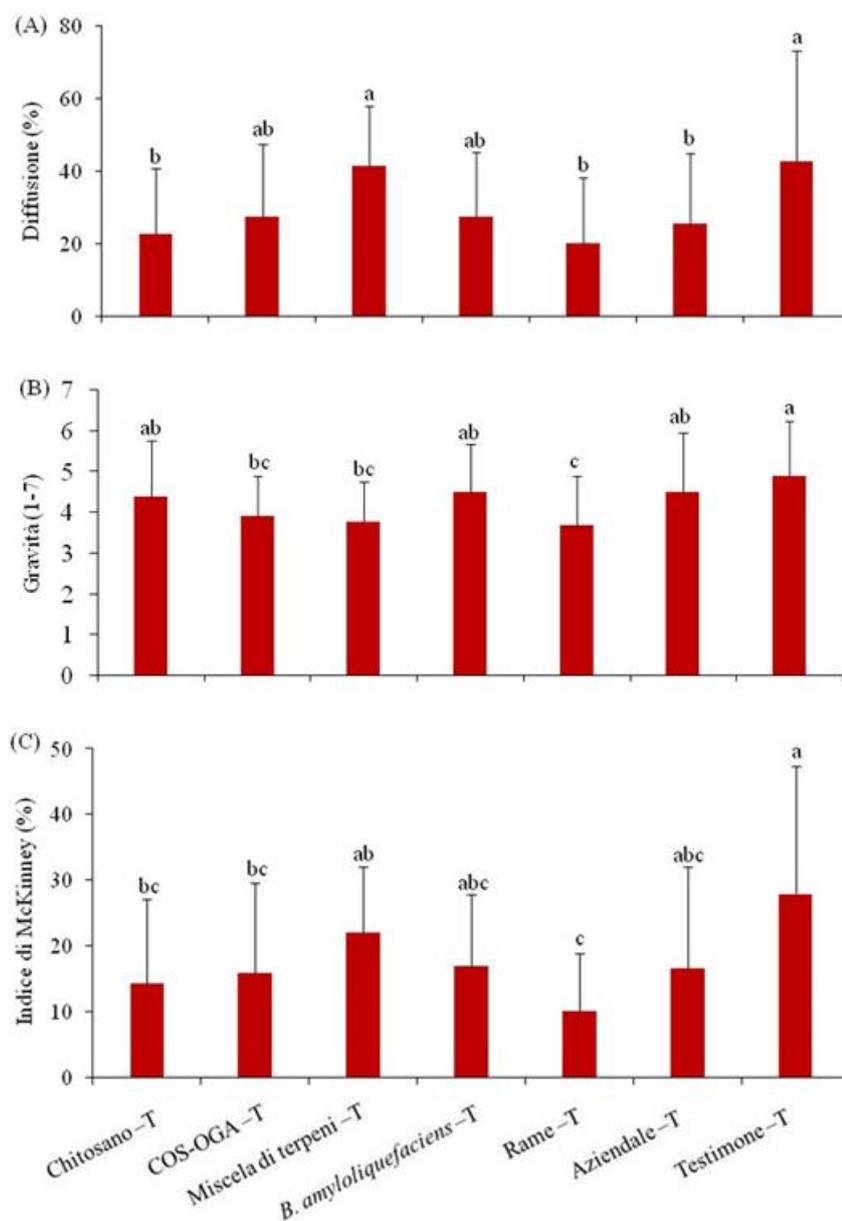


Figura 43 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio ibrido nella metà trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

➤ **Sugli steli**

Nel primo rilievo, tutte le strategie saggiate hanno mostrato una riduzione dell’indice di McKinney delle malattie sugli steli del cavolo cappuccio ibrido nella metà non trattata, rispetto al testimone. La strategia rame -NT ha mostrato una riduzione significativa a carico dell’indice di McKinney (Figura 44 C). Al

contrario, non sono state osservate differenze statisticamente significative per quanto riguarda il contenimento della gravità (Figura 44 B).

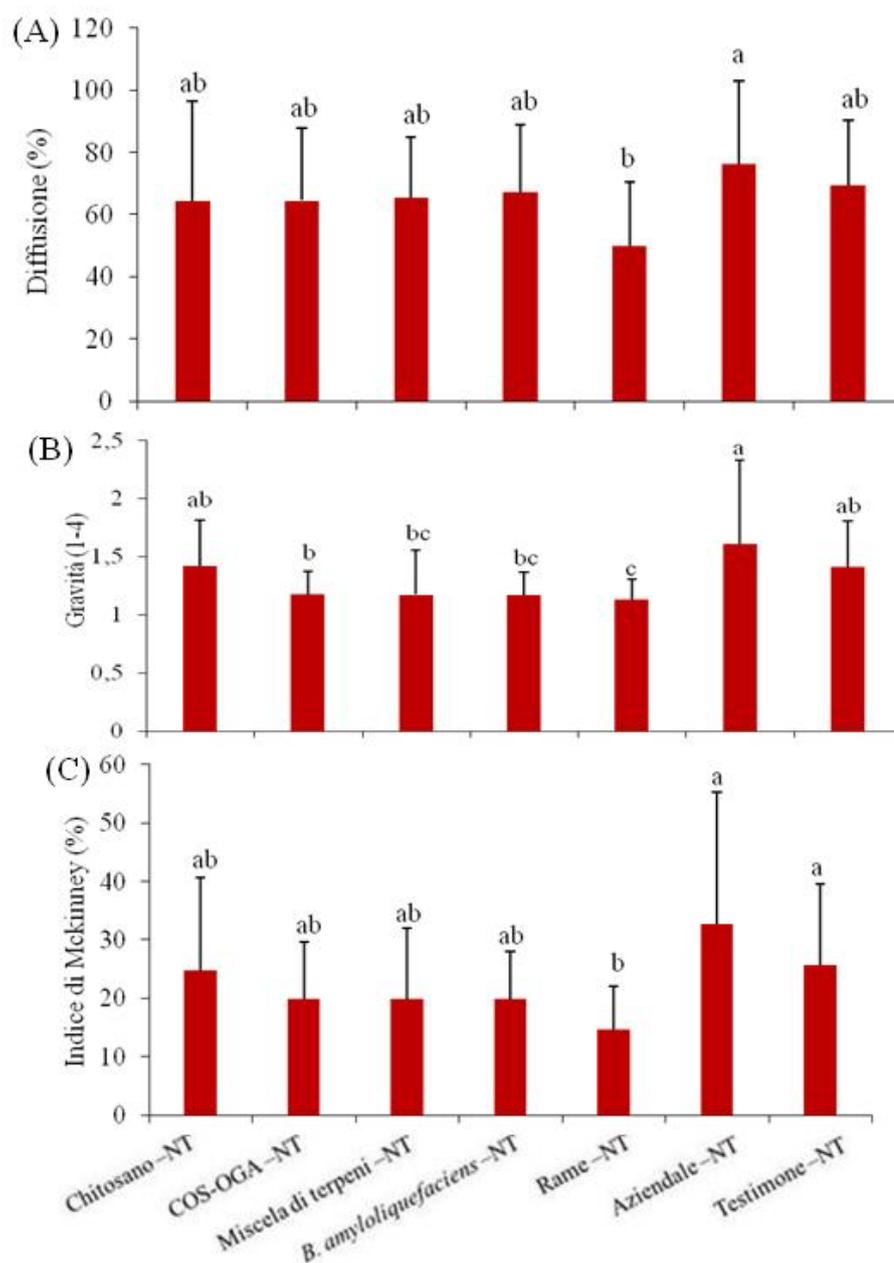


Figura 44 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio ibrido nella metà non trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Nella metà trattata dove le strategie innovative effettuate insieme agli altri trattamenti, si osserva che tutte le strategie hanno mostrato una diminuzione della diffusione, della gravità e dell’indice di McKinney rispetto al testimone -T, ma

non statisticamente significativa, ad eccezione del rame -T che ha mostrato una percentuale maggiore rispetto al testimone -T (Figura 45 C).

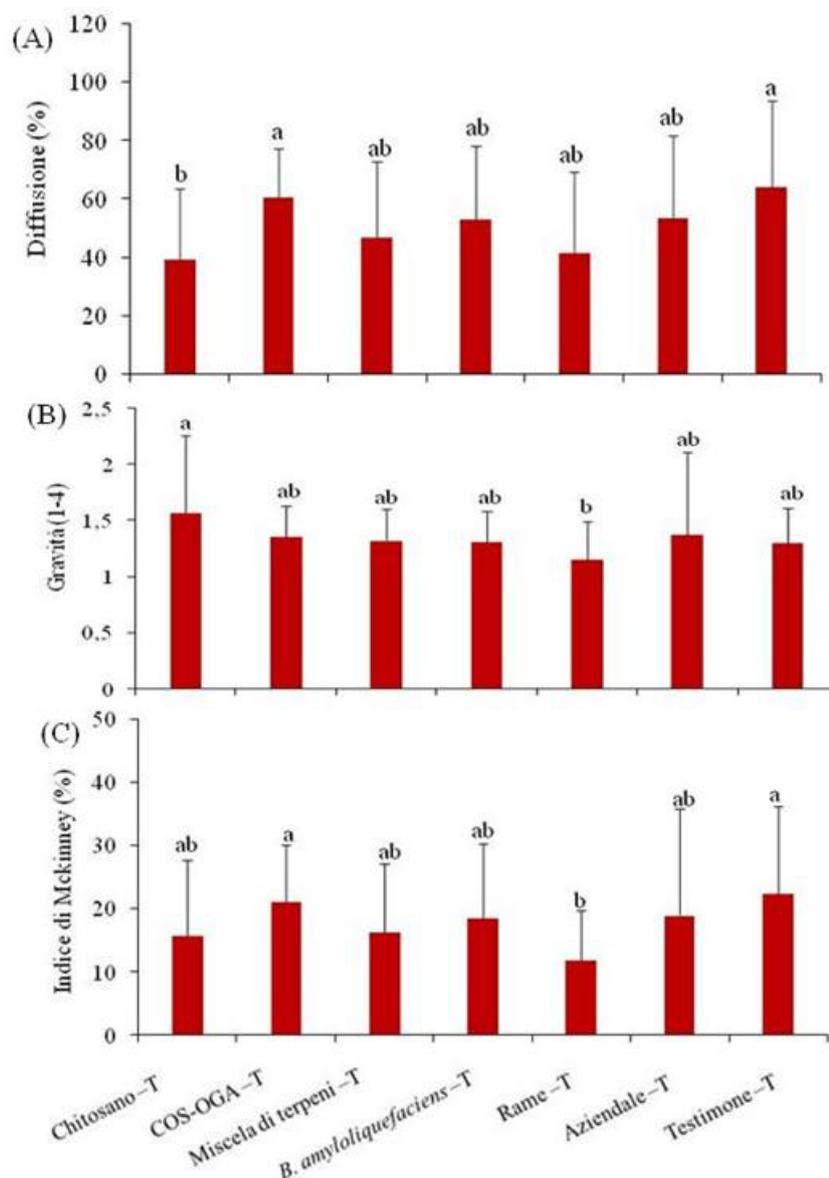


Figura 45 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio ibrido nella metà trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

➤ *Sulle siliques*

Nel primo rilievo avvenuto sulle siliques trattate solo con i prodotti in prova durante tutta la stagione nei confronti delle malattie fungine necrotiche, tutte le nuove strategie hanno avuto una riduzione significativa della diffusione e indice di

McKinney rispetto al testimone -NT ad eccezione del chitosano -NT, il quale ha mostrato una riduzione ma non statisticamente significativa (Figura 46 A, C).

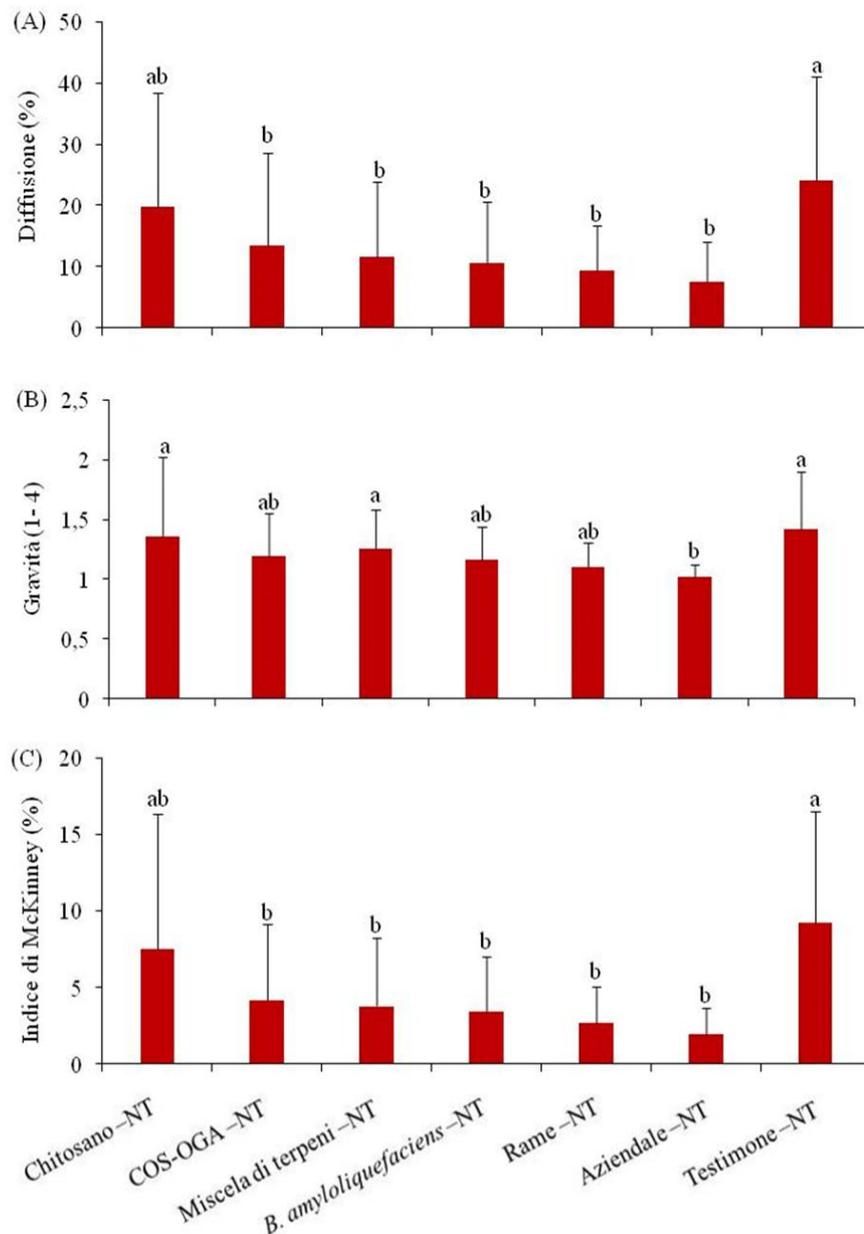


Figura 46 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio ibrido nella metà non trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel primo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Nella metà dove le strategie innovative sono state effettuate insieme agli altri trattamenti nei confronti delle altre avversità, si osservata una riduzione della diffusione e indice di McKinney con le strategie miscela di terpeni -T, *B.*

amyloliquefaciens -T e rame -T rispetto a tutte le strategie in prova (Figura 47 A, C). Tuttavia, non sono state registrate differenze significative tra le varie strategie saggiate e il testimone -T per quanto riguarda la gravità (Figura 47 B).

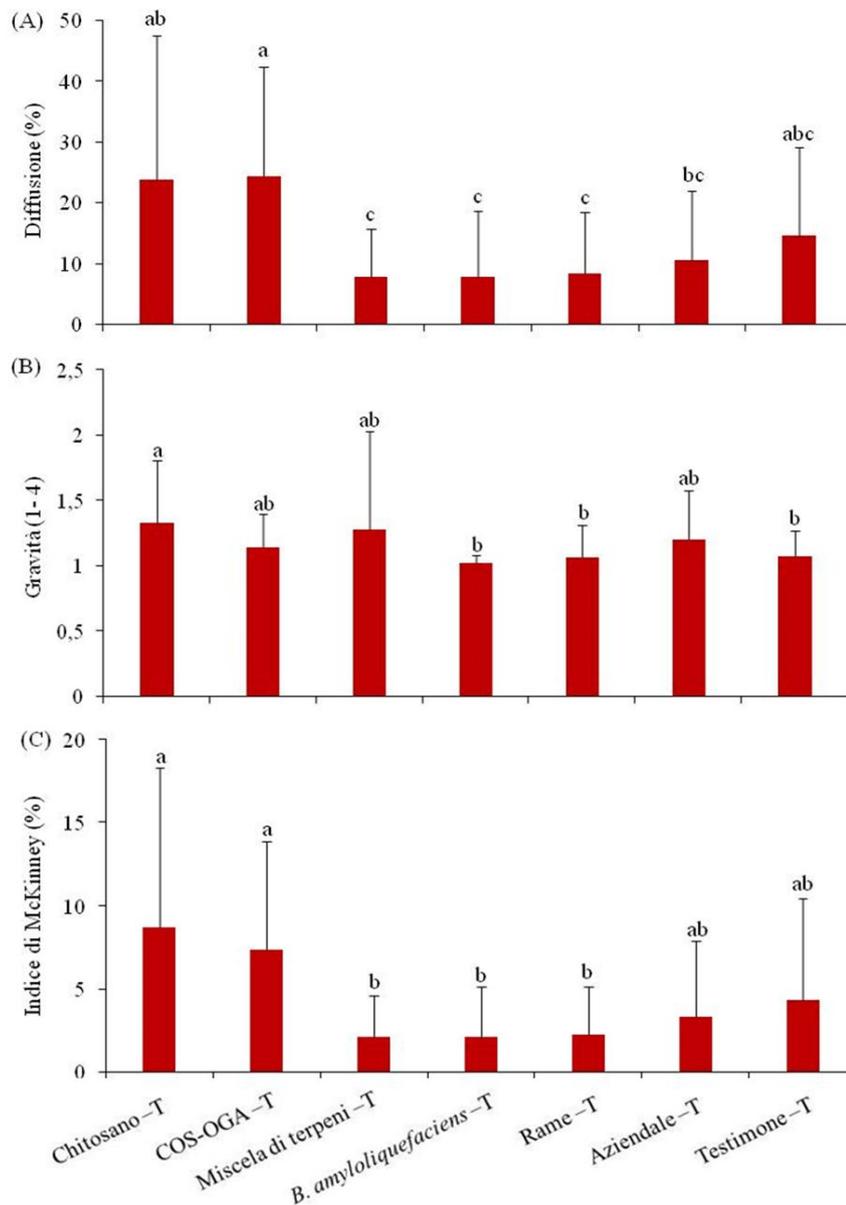


Figura 47 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio ibrido nella metà trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel primo rilievo. Gli Istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

9.2.2.2. Secondo rilievo - 1 luglio 2021

➤ Sulle foglie

Sulle foglie trattate solo con i prodotti a basso impatto ambientale, si osserva che le nuove strategie testate non hanno ridotto la diffusione delle malattie rispetto al testimone -NT (Figura 48 A). In ogni caso, la strategia rame -NT è risultata essere la migliore (Figura 48).

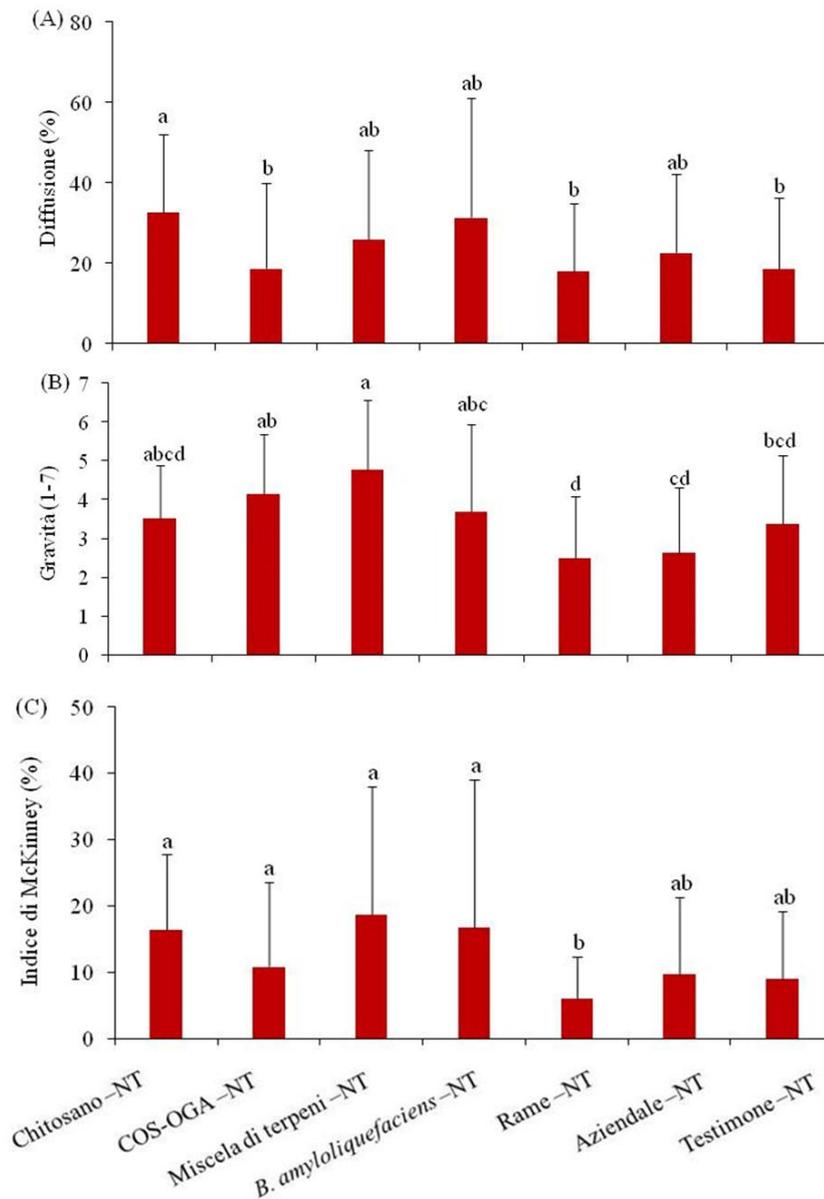


Figura 48 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio ibrido nella metà non trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel secondo rilievo. Gli Istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Nel secondo rilievo sulle foglie dove le strategie innovative sono state effettuate nella porzione di campo trattata anche per altre avversità, è possibile osservare risultati simili a quelli emersi nella metà non trattata. Nessuna strategia è risultata statisticamente diversa rispetto al testimone -T e all' aziendale -T (Figure 49).

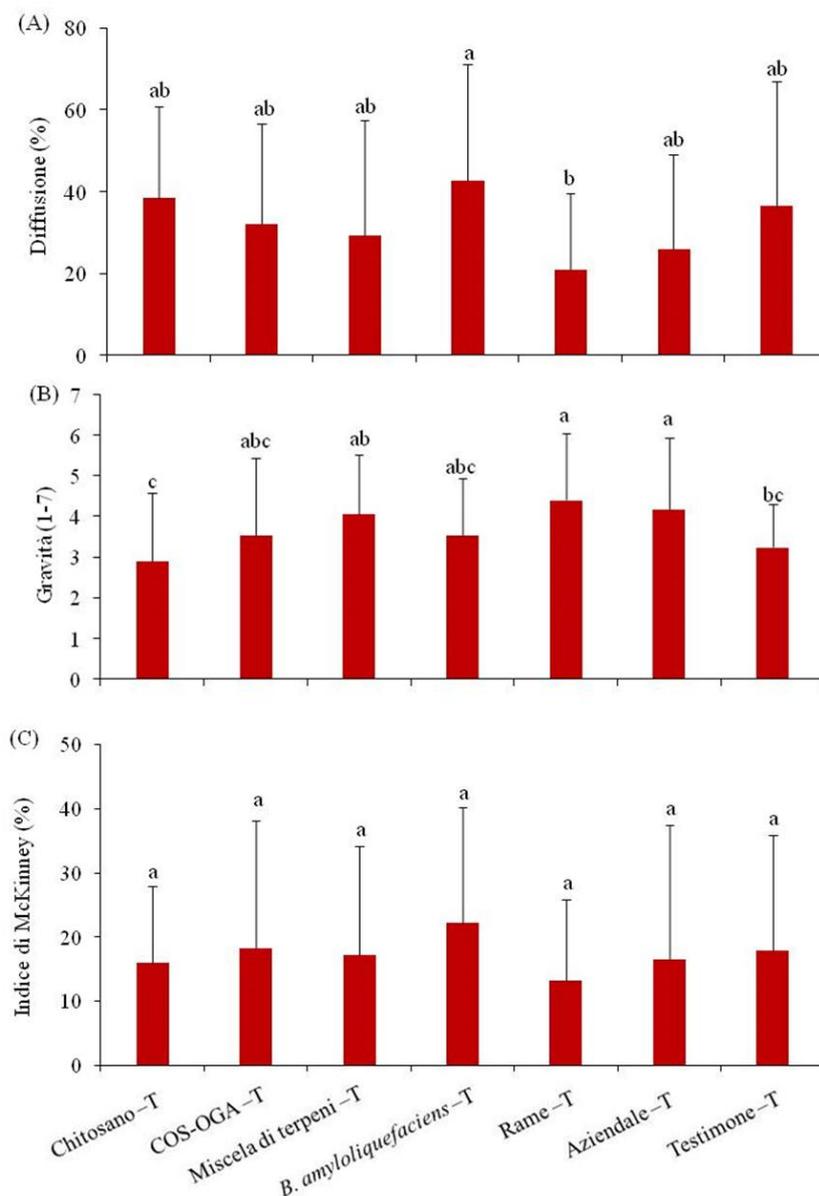


Figura 49 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su foglie di cavolo cappuccio ibrido nella metà trattata per altre avversità, a Montefiore dell'Aso (AP) nel secondo rilievo. Gli stogrammi seguiti dalla stessa lettera non significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

➤ **Sugli steli**

Sugli steli dove sono stati applicati solo i prodotti in prova durante tutta la stagione, è emerso che le percentuali di diffusione e indice di McKinney della malattia sono risultate più basse nelle strategie chitosano -NT e rame -NT, rispetto a tutte le altre strategie saggiate. Confrontano tutte le strategie, tuttavia, si può notare come non siano emerse differenze statisticamente significative rispetto al testimone non trattato (Figura 50).

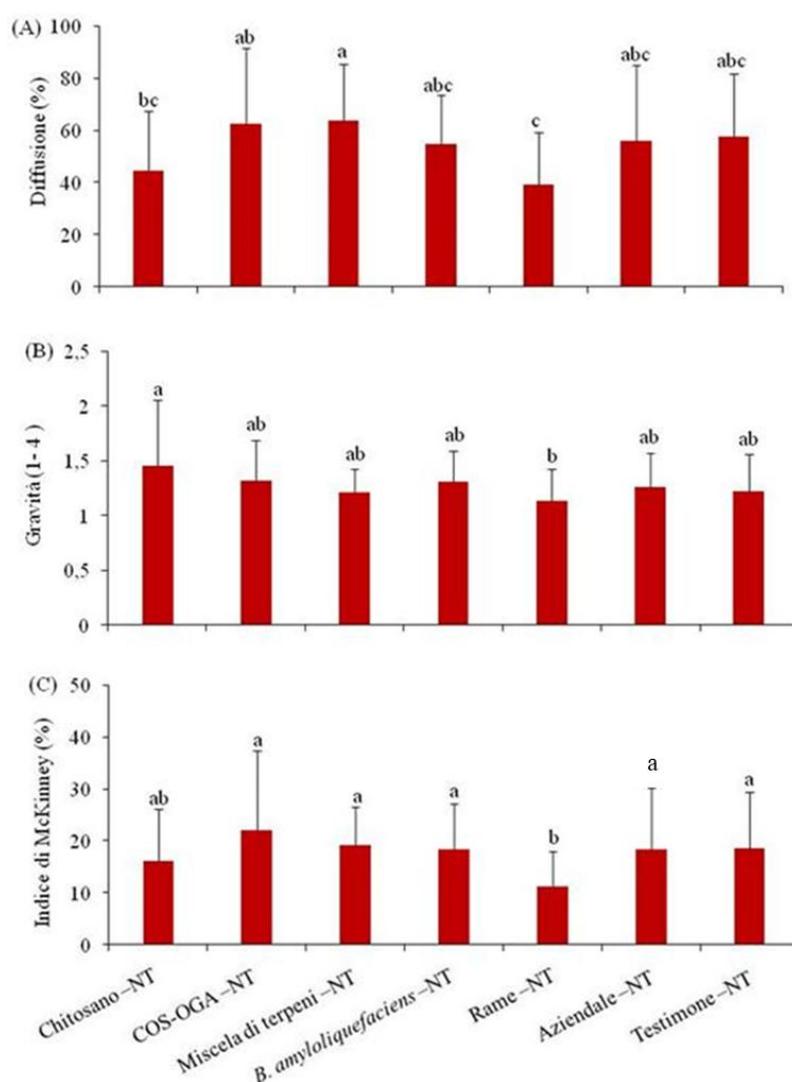


Figura 50 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio ibrido nella metà non trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti

dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Nella porzione dell'appezzamento dove i trattamenti innovativi sono stati effettuati insieme agli altri trattamenti nei confronti delle altre avversità, sono emerse differenze statisticamente significative fra le strategie solo a carico della diffusione. Chitosano -T ha mostrato una diffusione più bassa rispetto a tutte le altre strategie, riducendo significativamente questo parametro anche in confronto ai testimoni (Figura 51).

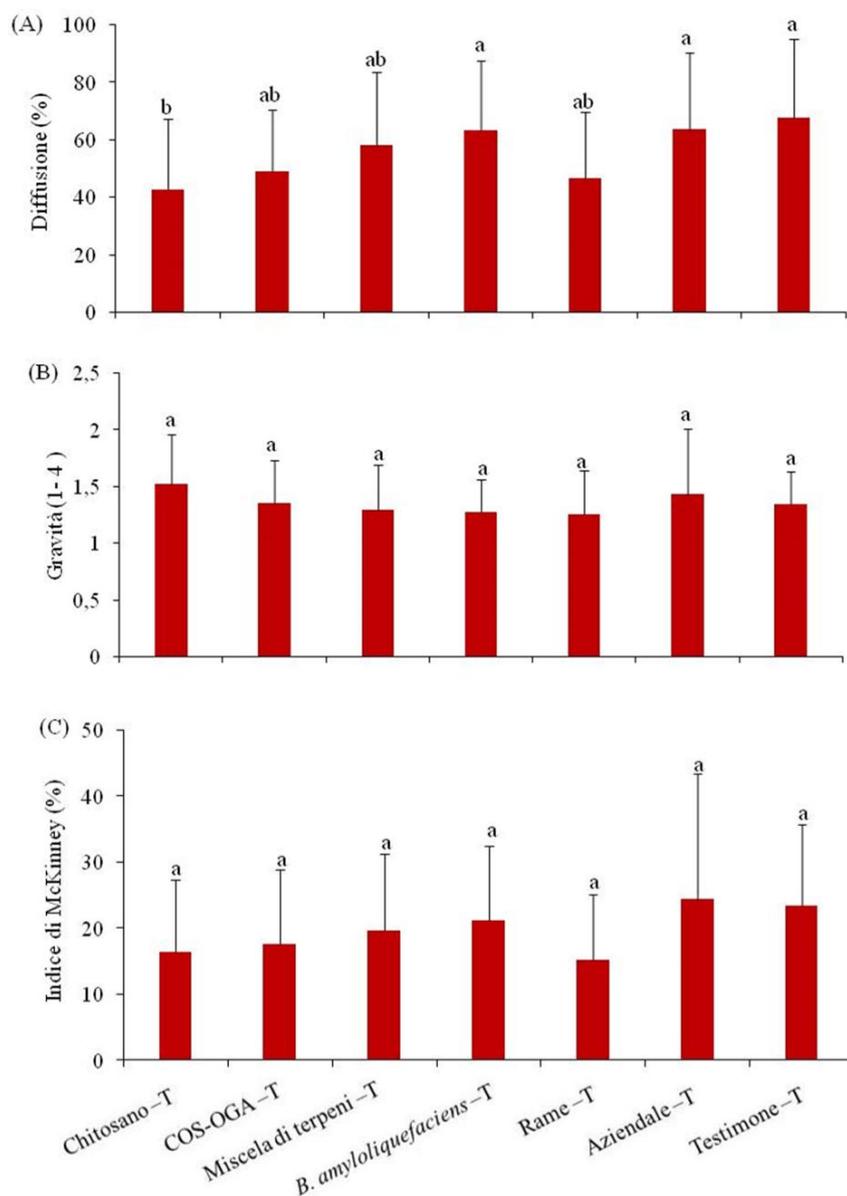


Figura 51 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su steli di cavolo cappuccio ibrido nella metà trattata per altre avversità, a

Montefiore dell'Aso (AP) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

➤ ***Sulle siliques***

Per i rilievi effettuati sulle siliques, dove sono stati fatti trattamenti solo con i prodotti in prova, si osserva che le strategie COS-OGA -NT, miscela di terpeni -NT e rame -NT sono state quelle che hanno mostrato livelli di diffusione più bassi (Figura 52 A). In particolare, per COS-OGA -NT e rame -NT, si è assistito anche a riduzioni statisticamente significative rispetto al controllo.

Analizzando i dati della gravità (Figura 52 B), si evidenzia come la strategia chitosano -NT abbia fatto registrare i livelli più alti. Tutte le altre strategie hanno invece contenuto la gravità dei sintomi, pur senza registrare significatività statistica rispetto al testimone non trattato.

Quasi tutte le strategie saggiate hanno ridotto l'indice di McKinney rispetto al testimone -NT ad eccezione di chitosano -NT e *B. amyloliquefaciens* -NT. Le strategie COS-OGA -NT, miscela di terpeni -NT e rame -NT hanno mostrato la riduzione maggiore, differenziandosi in maniera statisticamente significativa rispetto al testimone -NT (Figura 52 C).

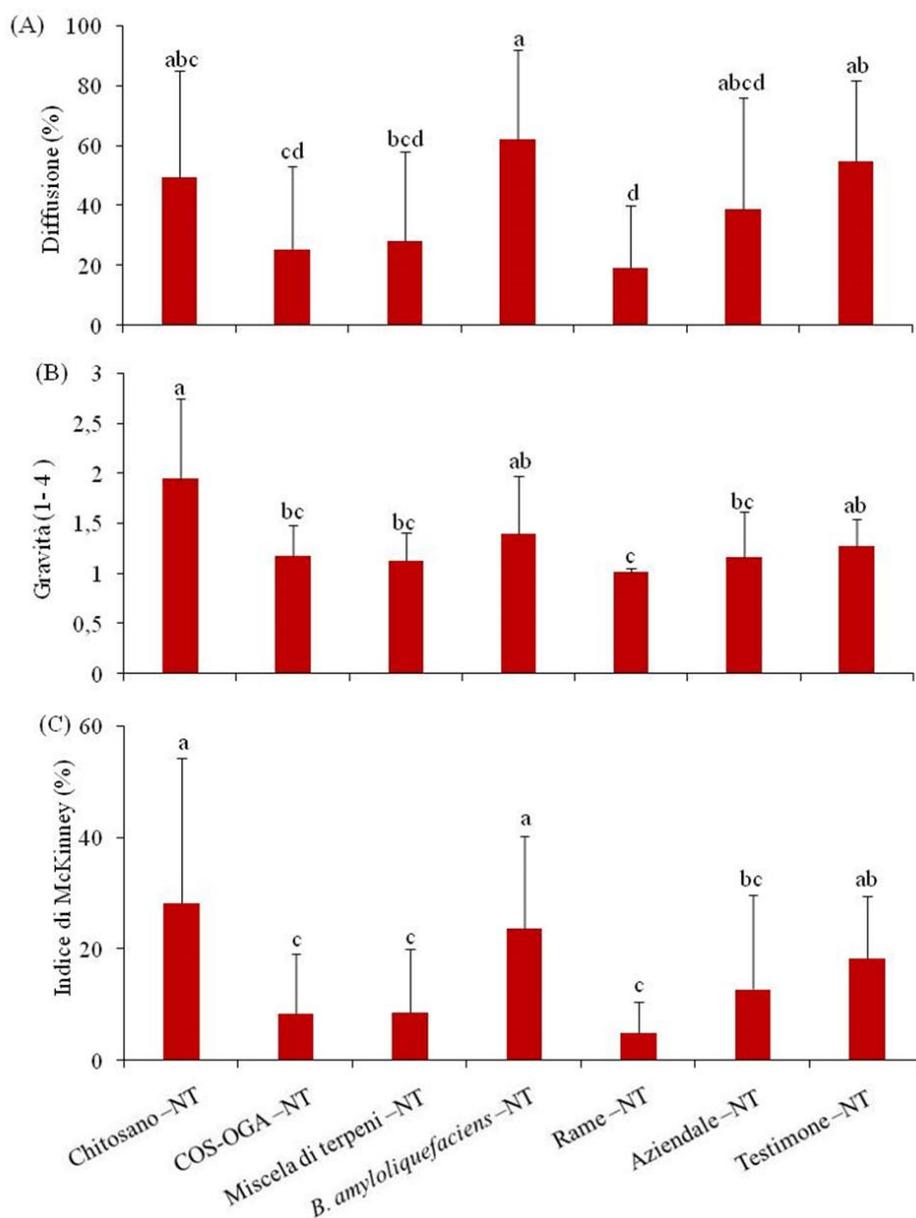


Figura 52 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio ibrido nella metà non trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel secondo rilievo. Gli Istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

Nel rilievo effettuato sulle silique dove i prodotti innovativi sono stati aggiunti agli altri trattamenti, *B. amyloliquefaciens* -T, rame -T hanno ridotto significativamente il livello di diffusione rispetto al testimone -T (Figura 53 A).

Complessivamente, quasi tutte le tesi saggate hanno ridotto l’indice di McKinney rispetto al testimone -T ad eccezione del chitosano -T. Le strategie *B.*

amyloliquefaciens -T, rame -T e aziendale -T hanno avuto una riduzione maggiore e significativa rispetto al testimone -T (Figura 53 C).

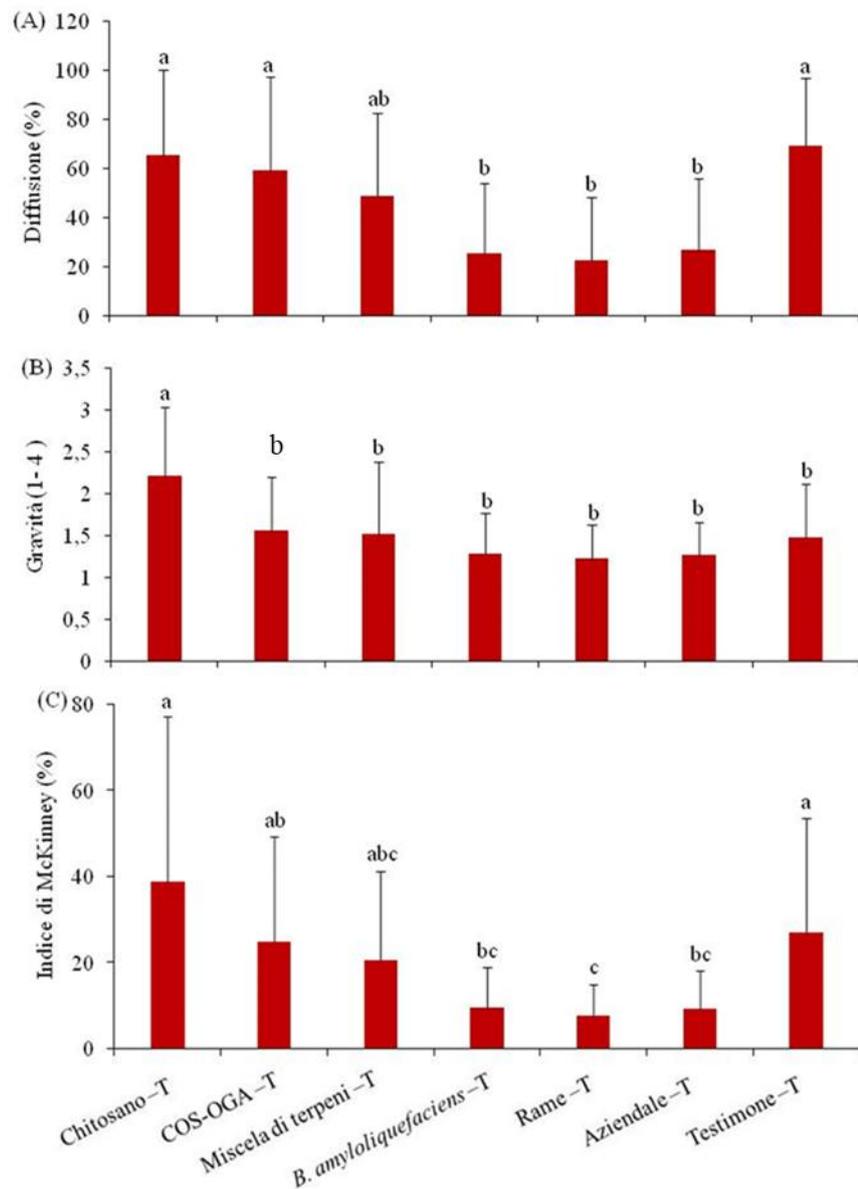


Figura 53 - (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su silique di cavolo cappuccio ibrido nella metà trattata per altre avversità, a Montefiore dell’Aso (AP) nel secondo rilievo. Gli istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

9.3. VALUTAZIONE DELLE INFEZIONI IN CAMPO DI CIPOLLA DA SEME

9.3.1. Rilievo a San Lorenzo in Campo (PU)

Su cipolla, verso la prima settimana di luglio sono stati individuati sintomi associabili ad infezioni di *Botrytis* spp. (Figura 54). Nel rilievo condotto il 12 luglio 2021, si osserva che il chitosano ha fornito livelli di protezione significativi nei confronti del *Botrytis* spp. I risultati mostrano che chitosano e disinfettante hanno portato a una riduzione significativa della diffusione e dell'intensità media ponderata della malattia rispetto alla strategia col livello di malattia più alto. Inoltre, tutte le tesi, tranne *Bacillus* spp. e miscela di terpeni hanno contenuto significativamente la gravità dei sintomi rispetto al testimone non trattato (Figura 55).



Figura 54 - Sintomi di marciume del collo della cipolla causati da *Botrytis* spp.

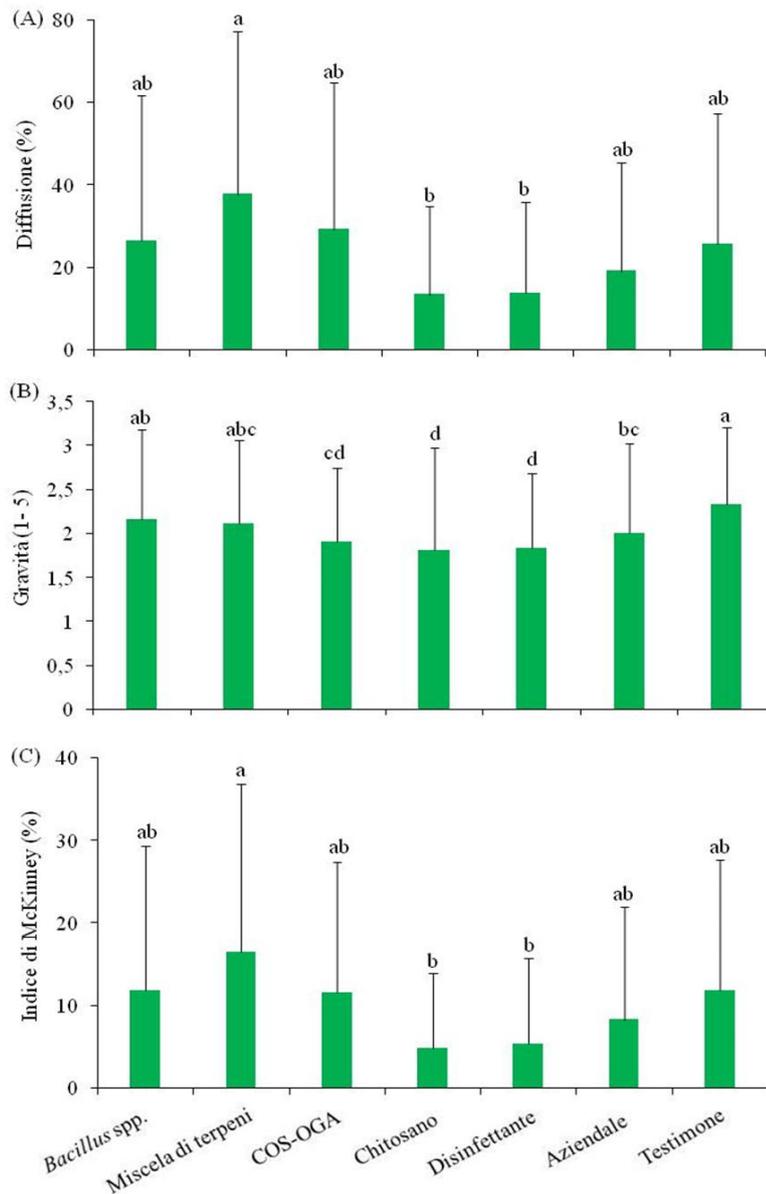


Figura 55- (A) Diffusione (%); (B) Gravità (1-7); (C) Indice di McKinney della malattia su scapo fiorale e steli, a San Lorenzo in campo (PU). Istogrammi seguiti dalla stessa lettera non sono significativamente diversi secondo il test *post hoc* di Mann-Whitney ($P \leq 0,05$).

9.4. PROVE DI LABORATORIO

9.4.1. Analisi morfologica di campioni sintomatici

Dai monitoraggi effettuati nei campi sperimentali sulle piante che manifestavano sintomi di malattie necrotiche è stata accertata la presenza di diversi agenti di malattia trasmissibili per seme. Dopo un periodo d'incubazione dalle piastre Petri con i tre substrati: PDA (*potato dextrose agar*), *water agar* e carta assorbente inumidita, si sono osservate delle colonie ben distinguibili. Dall'analisi

morfologica macro e microscopica sono state identificate diverse specie fungine sia per i cavoli che per la cipolla.

Dall'analisi morfologica condotta su campioni sintomatici di cavolo cappuccio sono stati identificati i seguenti funghi:

➤ *Alternaria alternata*

Al microscopio si possono osservare i conidi che formano lunghe catene di colore che va da marrone al nero (Figura 56 A). Le catene sono generalmente semplici, ma possono essere ramificate. I conidi di *A. alternata* sono molto variabili nella forma (da ovale a cilindrica), dimensione e numero di setti (trasversali e longitudinali) (Figura 56 B).

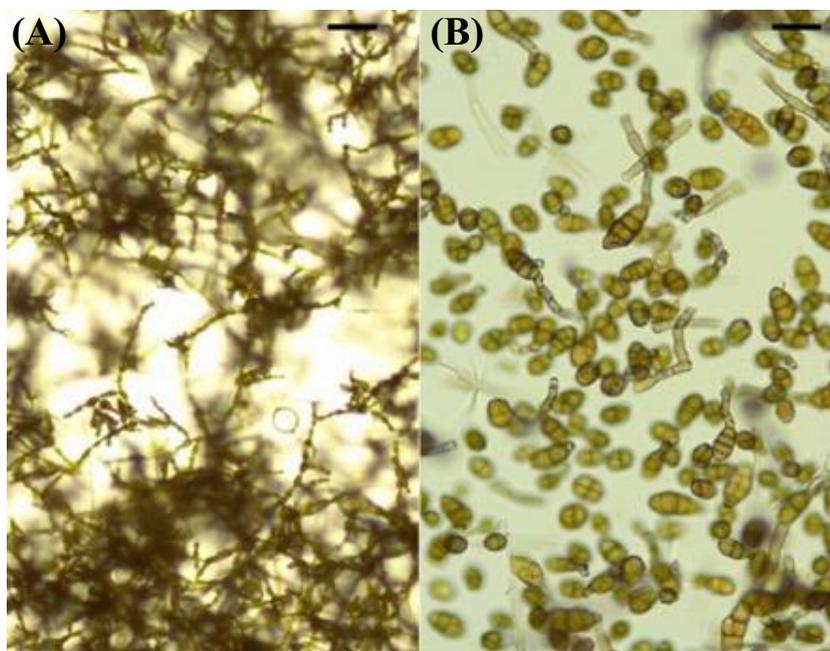


Figura 56 - Dettaglio al microscopio ottico dei conidi di *Alternaria alternata* rinvenuti sui campioni di foglie prelevati durante il monitoraggio a Monterado, Trecastelli. (A) Conidi di *A. alternata* in catena. (B) Conidi di *Alternaria alternata* con diversi forme, barra della scala = 20 μ m.

➤ *Alternaria brassicicola*

La caratteristica principale per riconoscere la specie è data dalla forma dei conidi in catene lunghe e strette. In questo caso i conidi sono dritti, cilindrici e di solito si assottigliano leggermente verso l'apice mentre alla base sono rotondeggianti, di colore marrone oliva chiaro a scuro. I setti sono trasversali, lisci o verrucosi con l'età (Figura 57).

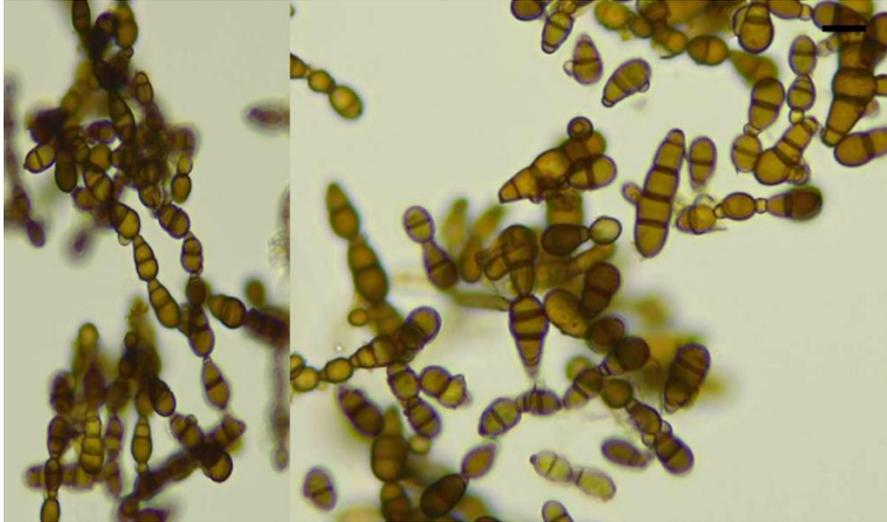


Figura 57 - Dettaglio al microscopio ottico dei conidi di *Alternaria brassicicola* rinvenuti sui campioni di foglie prelevati durante il monitoraggio a Monterado, Trecastelli. Conidi di *A. brassicicola* in catena e con diverse forme, barra della scala = 20 μm .

➤ *Stemphylium* spp.

Il fungo è costituito da conidiofori di colore marrone che si sviluppano singolarmente, ciascuno con un singolo conidio di colore variabile dal marrone al nero. I conidi sono di forma quadrata a rettangolare di diverse dimensioni, solitamente con 3 setti trasversali e 1-3 longitudinali da marrone chiaro a marrone scuro (Figura 58).

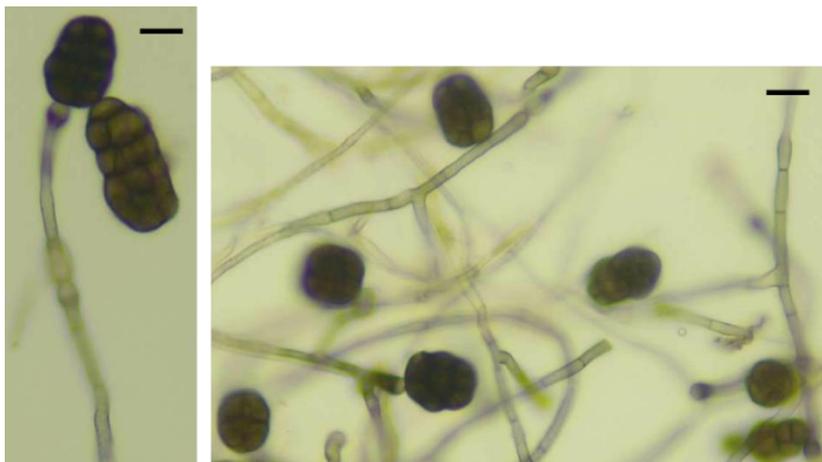


Figura 58 - Dettaglio al microscopio ottico dei conidi di *Stemphylium* spp. rinvenuti sui campioni di foglie prelevati durante il monitoraggio a Monterado, Trecastelli. Conidi con setti trasversali e longitudinali e conidiofori di *Stemphylium* spp. barra della scala = 20 μm .

➤ ***Cladosporium* spp.**

Il fungo è costituito da conidiofori scuri generalmente non ramificati o ramificati corti, che portano conidi in catene ramificate. Le catene ramificate dei conidi appaiono come “punte di pennello” come si vede nella. I conidi sono di diverse forme con colore marrone oliva medio a scuro (Figura 59 A, B).

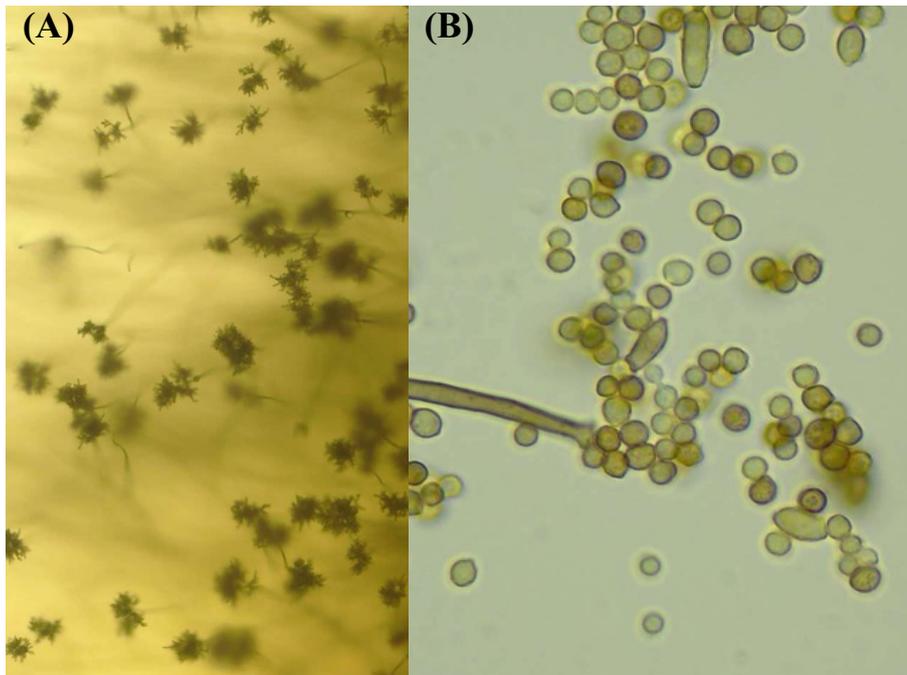


Figura 59 - Dettaglio al microscopio ottico dei conidi di *Cladosporium* spp. rinvenuti sui campioni di foglie prelevati durante il monitoraggio a Monterado, Trecastelli. (A) Teste conidiali a forma di “pennelli” di *Cladosporium* spp., (B) conidi di *Cladosporium* spp. con diverse forme.

➤ ***Phoma lingam***

Sono stati osservati dei picnidi di colore marrone sulle silique di cavolo (Figura 60 A). I picnidi, contenenti le picnidiospore appaiono cilindrici e con le estremità arrotondate (Figura 60 B). Queste caratteristiche morfologiche peculiari delle specie afferenti al *P. lingam* (Figura 60).

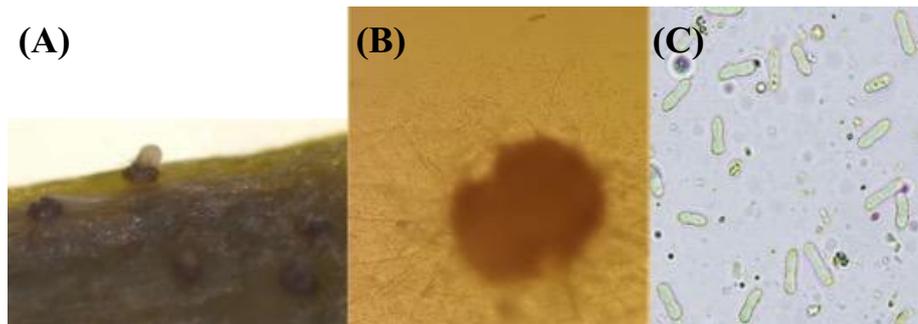


Figura 60 - (A) Picnidi di *Phoma lingam* visti allo stereomicroscopio. (B, C) Dettaglio al microscopio ottico dei picnidi e Picnidi o spore di *P. lingam* rinvenuti sui campioni di silique prelevati durante il monitoraggio a Monterado, Trecastelli.

Nell'appezzamento adibito alla produzione di semente standard di cavolo cappuccio dalle foglie sono stati identificati i seguenti funghi: *Stemphylium* spp seguito da *A. brassicicola*, *Cladosporium* spp., *P. lingam* in fine *A. alternata* (Figura 61).

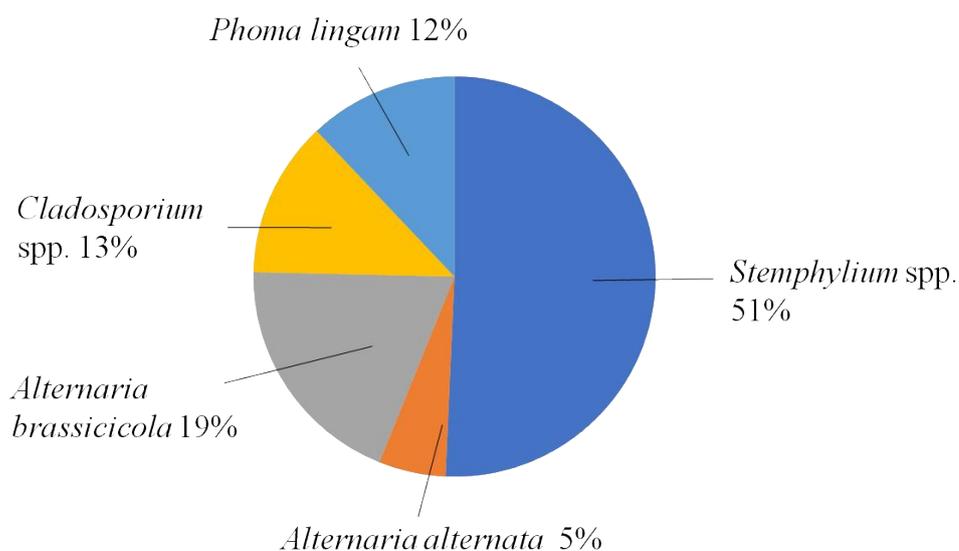


Figura 61 - Percentuale di rilevamento dei funghi ritrovati nelle foglie nell'appezzamento dell'azienda Marco Morbidelli, adibito alla produzione di semente standard di cavolo cappuccio, ubicato presso Monterado, Trecastelli (AN).

Negli appezzamenti della coltivazione del cavolo, dai grafici (Figura 62) si può notare che *P. lingam* è risultato il patogeno con un'incidenza maggiore sugli steli su tutti e due appezzamenti adibiti alla coltivazione del cavolo, seguito da *A. alternata*. Nel campo per la produzione di seme di cavolo cappuccio ibrido

(Figura 62 B) sono state identificate alcune specie appartenenti al genere *Fusarium*, che nel campo adibito nella coltivazione del cavolo cappuccio standard non sono state individuate.

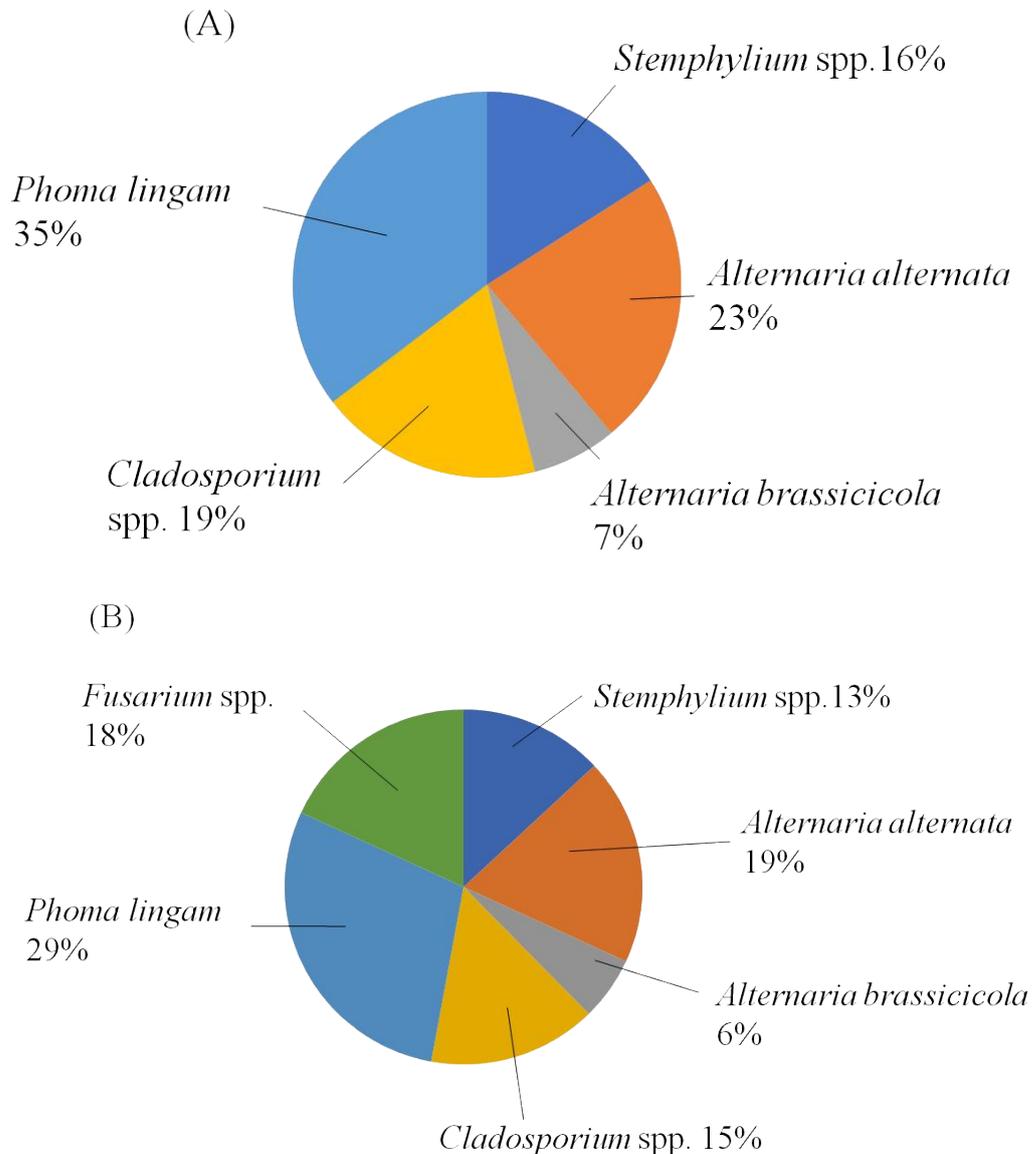


Figura 62 - Percentuale di rilevamento dei funghi ritrovati negli steli. (A) Steli prelevati nell'azienda Marco Morbidelli, adibito alla produzione di semente standard di cavolo cappuccio, ubicato presso Monterado, Trecastelli (AN). (B) Steli prelevati nell'azienda Agricola Steca Daniela, adibito alla produzione di seme ibrido di cavolo cappuccio, ubicato presso Montefiore dell'Asso (AP).

Dai grafici riguardanti le silique (Figura 63) si può notare che l'appezzamento adibito alla coltivazione del cavolo cappuccio è risultato con un minore numero di patogeni rispetto all'appezzamento adibito alla coltivazione del cavolo cappuccio ibrido. Nell'appezzamento della coltivazione del cavolo cappuccio standard, *P.*

lingam e *A. alternata* sono risultati patogeni più diffusi (Figura 63 A). Nell'appezzamento per la produzione del cavolo cappuccio ibrido *A. alternata* è il patogeno con un tasso d'infezione più alto, circa 60%, mentre gli altri patogeni si trovano al di sotto del 14% (Figura 63 B).

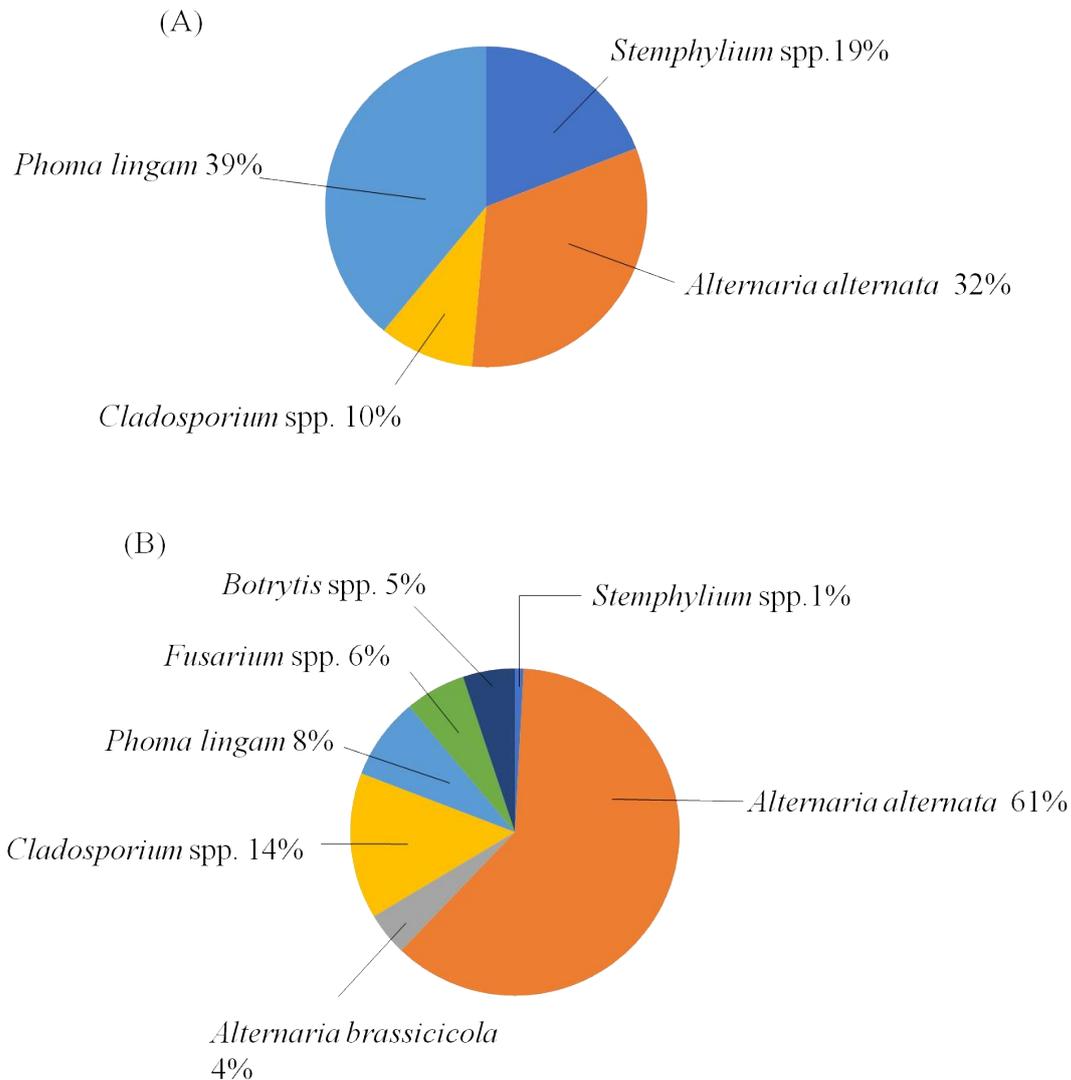


Figura 63 - Percentuale dei funghi ritrovati nelle siliques. (A) Siliques prelevate nell'appezzamento dell'azienda Marco Morbidelli, adibito alla produzione di semente standard di cavolo cappuccio, ubicato presso Monterado, Trecastelli (AN). (B) Siliques prelevate nell'appezzamento dell'azienda Agricola Steca Daniela, adibito alla produzione di seme ibrido di cavolo cappuccio, ubicato presso Montefiore dell'Asso (AP).

Nell'appezzamento della cipolla, sugli scapi fiorali e steli sintomatici sono state identificate soltanto colonie di *Botrytis* spp. Il fungo produce conidiofori bianchi molto lunghi che si ramificano ripetutamente e portano grappoli di conidi

(Figura 64 B). I conidi sono di forma ellissoidali, lisci, unicellulari, spesso leggermente sporgenti (Figura 64 C). I conidiofori mostrano una caratteristica “torsione” in molti punti (Figura 64 D).

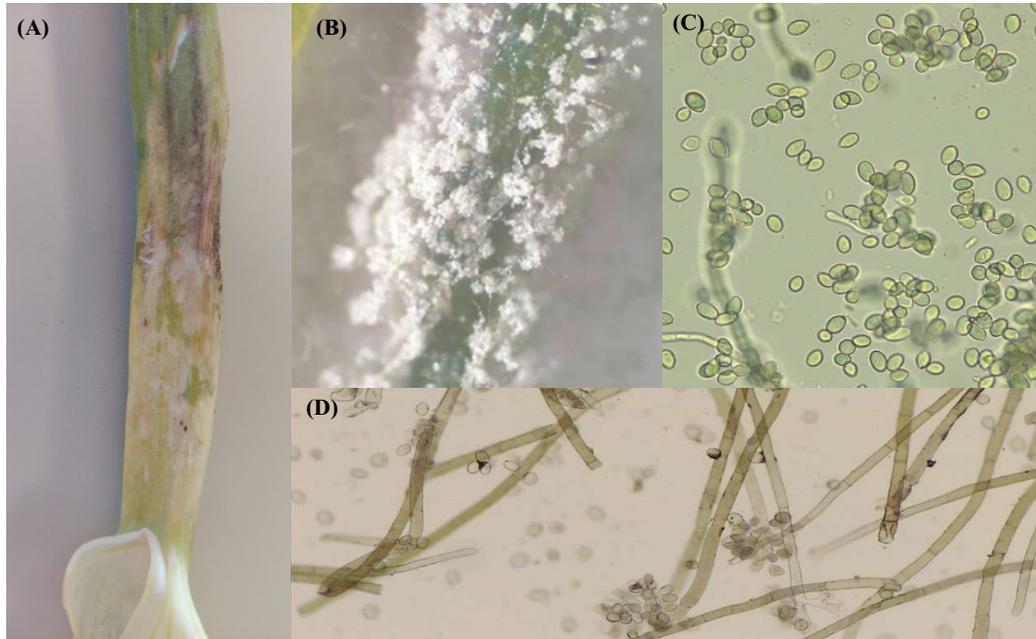


Figura 64 - (A) Sintomo *Botrytis* spp. su stelo di cipolla. (B) Corpi fruttiferi di *Botrytis* spp. visti allo stereomicroscopio. (C, D) Conidi e conidiofori di *Botrytis* spp. visti al microscopio ottico.

9.4.2. Analisi molecolari su piante affette da fitoplasmosi

Dall’osservazione di alcune piante nel campo per la produzione di seme di cavolo cappuccio ibrido sono state notate delle malformazioni sulle infiorescenze, foglie e steli tipiche di fitoplasmosi (Figura 65). L’incidenza della malattia è stata stimata all’inizio di maggio, quando nell’appezzamento erano presenti sia le piante femminili e le piante maschili con un tasso d’infezione intorno all’1-3%.

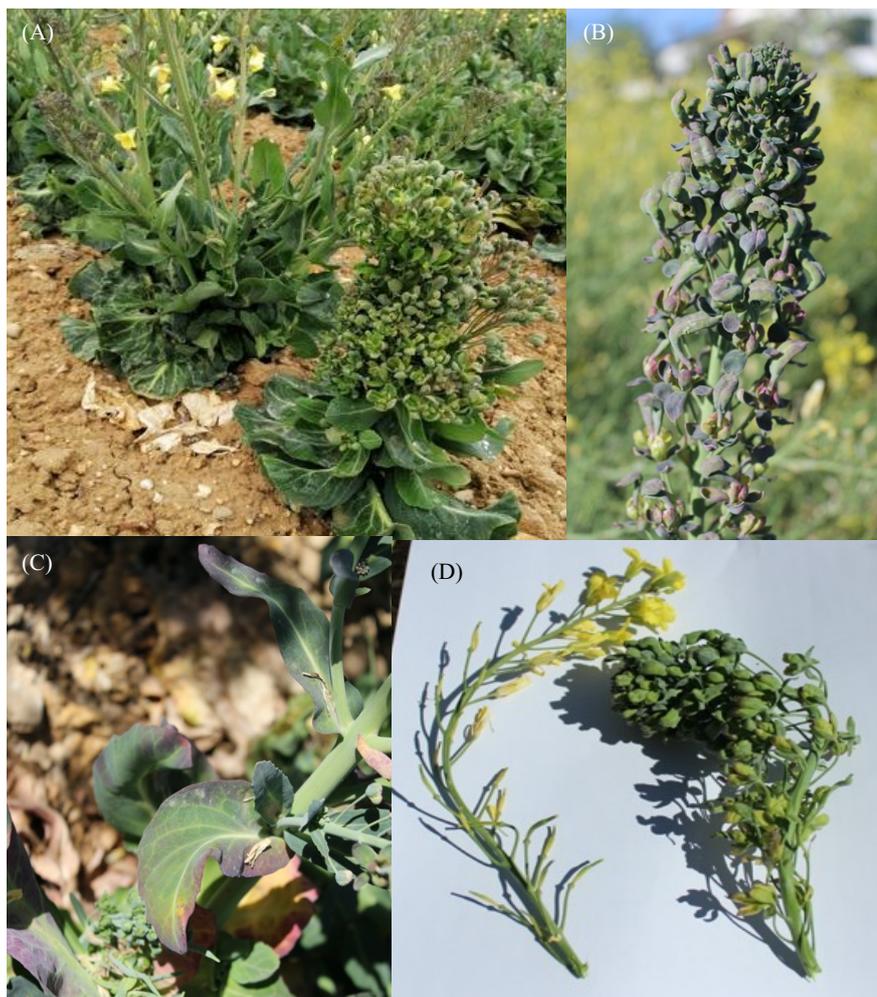


Figura 65 - Sintomi tipici di infezioni da fitoplasmi osservati su piante di cavolo cappuccio per la produzione di seme ibrido. (A) Differenza tra pianta sana e pianta malata; (B) malformazioni degli organi fiorali con fillodia; (C) arrossamenti su foglie; (D) differenze tra infiorescenze: a sinistra infiorescenza sana, mentre a destra infiorescenza con sintomi riconducibili a fitoplasmi.

Dai campioni sintomatici raccolti si è proceduto a estrarre il DNA che è stato sottoposto a amplificazione genica utilizzando primer universali per la diagnosi dei fitoplasmi (primer universali R16F2n/R2). La natura fitoplasmatica delle sintomatologie osservate è stata confermata per tutti gli undici campioni sintomatici tramite la tecnica *nested* PCR, con amplificazioni della dimensione attesa di 1200 pb (Figura 66).

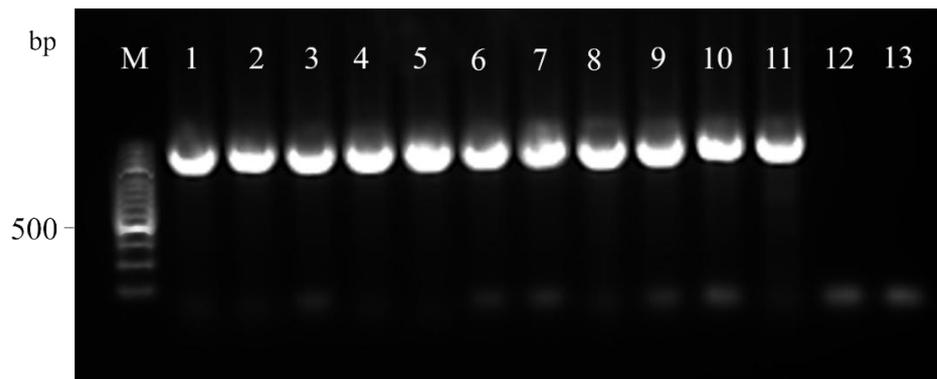


Figura 66 - Elettroforesi su gel di agarosio (all'1,5%) dei campioni sintomatici amplificati con primer universali (R16F2n/R2) per l'identificazione di fitoplasmi (1-11: campioni; 12 e 13: controllo acqua).

10. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La maggior parte delle piante ortive coltivate per il consumo fresco viene propagata attraverso il seme e la qualità della semente commercializzata assume pertanto una cruciale importanza per l'intero settore (Koch e Groot, 2015). La produzione di sementi è affidata a delle ditte altamente specializzate le quali devono garantire, fra le altre cose, sia la purezza della varietà propagata che la sanità della semente, in quanto semi infetti o contaminati sono un efficace mezzo di diffusione per diversi organismi fitopatogeni, in grado di innescare pericolose epidemie in nuovi areali.

L'Italia, per caratteristiche geografiche, orografiche e di specializzazione delle aziende sementiere, è da sempre uno dei paesi leader nella produzione di sementi da orto, con una superficie di oltre 33.000 ettari destinata alla coltivazione di specie ortive e aromatiche per la produzione di sementi (Assosementi, 2020). In particolare, la dorsale adriatica e, ancor più in dettaglio la regione Marche, rappresenta un territorio di elezione a livello nazionale ed internazionale per tale tipologia di produzioni. All'interno del sistema agricolo regionale, caratterizzato dalla rotazione di un numero esiguo di colture e quindi di agroecosistemi a ridotta biodiversità, le colture ortive da seme rappresentano una valida alternativa alle colture tradizionali, nonché una potenziale fonte di reddito alternativa ai seminativi estensivi per gli agricoltori che dispongono di superfici più limitate. Queste colture richiedono delle conoscenze tecniche generalmente più elevate, e garantiscono quindi possibilità occupazionali per operatori specializzati. Infatti, il

valore della produzione può raggiungere valori economici importanti, soprattutto se si tratta di semente ibrida.

D'altro canto, bisogna però considerare che queste colture richiedono più manodopera rispetto ad altre, alla produzione deve seguire un adeguato posizionamento sul mercato e in genere occupano il terreno per periodi più lunghi rispetto alle stesse specie destinate al consumo fresco per poter completare il loro ciclo biologico. Inoltre, è necessaria un'attenta gestione sia delle contaminazioni genetiche (isolamento geografico) che delle avversità in campo. Quest'ultimo aspetto risulta particolarmente importante poiché l'impatto ambientale di queste colture dovuto alla difesa fitosanitaria non è trascurabile, dato che non essendo destinate direttamente al consumo umano spesso vengono eseguiti un numero maggiore di trattamenti antiparassitari, anche a ridosso della raccolta, e con principi attivi non sempre favorevoli da un punto di vista ambientale. Altro aspetto di fondamentale importanza, è dato proprio dal controllo delle malattie trasmissibili per seme, le quali possono essere sfruttate come barriere commerciali, portando al blocco di interi lotti, con ingenti perdite economiche.

Ancora oggi, la protezione delle piante agrarie dalle malattie si basa prevalentemente sull'applicazione di prodotti fitosanitari di natura chimica, specialmente di sintesi (Dietz-Pfeilstetter *et al.*, 2021). Tuttavia, soprattutto nei paesi più sviluppati, è in corso un periodo di transizione che sta portando alla riduzione d'uso degli agrofarmaci. In particolare, in Europa, attraverso l'*European Green Deal* e più in particolare con la strategia *Farm to Fork*, la Commissione Europea ha fissato degli obiettivi da raggiungere entro il 2030, quali la riduzione del 50% dell'uso dei pesticidi più pericolosi e il raggiungimento del 25% di superfici agricole destinate ad agricoltura biologica. Inoltre, Stati membri dell'Unione Europea sono tenuti ad attuare piani d'azione nazionali che stabiliscono obiettivi quantitativi, calendari e indicatori relativi alla riduzione dell'impatto derivante dall'uso di prodotti fitosanitari (Direttiva 2009/128/CE; Marchand *et al.*, 2019). Ad oggi, alcune sostanze attive considerate cardini della protezione delle colture sono state eliminate dal mercato o sono soggette a stringenti limitazioni. Ad esempio, dal 1 febbraio 2021 sono state revocate tutte le autorizzazioni all'immissione in commercio sul territorio nazionale di prodotti fitosanitari contenenti la sostanza attiva mancozeb (Reg. UE 2020/2087), una delle ultime sostanze attive organiche di sintesi, ampiamente utilizzata in

agricoltura integrata nei confronti della peronospora di numerose colture. Inoltre, i prodotti a base di rame, ovvero la molecola più importante per la protezione delle colture biologiche, sono rientrati nella lista dei candidati alla sostituzione ed è previsto un limite annuo medio alle quantità ammesse agricoltura di 4 kg/ha/anno di rame (Reg. (UE) 2018/1981). Altro aspetto da non sottovalutare riguarda la registrazione dei nuovi agrofarmaci, per i quali le industrie agrochimiche non sono sempre disposte a investire per l'estensione delle etichette a colture considerate "minori", per via delle superfici esegue.

Considerando l'elevato periodo di esposizione delle colture da seme e la recrudescenza di alcune malattie trasmissibili per seme in seguito alle riduzioni di agrofarmaci attuate sul territorio europeo, nonché la mancanza di mezzi di lotta di comprovata efficacia, risulta particolarmente difficile produrre semente di qualità, soprattutto certificata biologica. Di conseguenza, gli agricoltori biologici sono spesso costretti a ricorrere a deroghe per poter impiantare le colture.

Questa situazione di incertezza minaccia la resilienza dei produttori del settore, ai quali viene praticamente chiesto di innalzare o mantenere elevato lo standard qualitativo, con sempre meno strumenti a disposizione per farlo. Da qui nasce quindi la necessità di sperimentare, possibilmente a livello aziendale, nuove strategie di gestione delle malattie per le colture da seme che siano in grado di assicurare la redditività di alcune colture e rendere più competitive le aziende europee nel mercato globale. Per raggiungere questi obiettivi, tali strategie devono sia dimostrarsi efficaci nei confronti dei patogeni trasmissibili per seme, che avere un impatto ambientale pressoché nullo, ad un costo che sia il più basso possibile per le aziende.

Recentemente, diversi ricercatori hanno dimostrato l'efficacia di composti a basso impatto ambientale, come ad esempio le sostanze di base (Romanazzi *et al.*, 2022), nei confronti delle malattie delle piante, sia in campo che in trattamenti postraccolta (Rajestary *et al.*, 2021). Fra le sostanze di base, il chitosano è una sulla quale è stato attirato maggiormente l'interesse. Questo biopolimero è stata una fra le prime sostanze di base approvate in Europa, con il Regolamento UE n. 563 del 2014. Grazie alla sua triplice attività (Romanazzi *et al.*, 2018), sono stati ottenuti risultati promettenti sia in ambito viticolo, con applicazioni in campo nei confronti della peronospora della vite (Romanazzi *et al.*, 2016, 2018), che su frutti per il contenimento di malattie postraccolta (Rajestary *et al.*, 2021). Alcuni

ricercatori hanno dimostrato anche una sua efficacia nei confronti di patogeni che colpiscono le crucifere e che possono essere trasmessi con la semente, come ad esempio *A. brassicicola* su cavolo (Ounchokdee e Dethoup 2020; Lin *et al.*, 2020), *Pseudomonas fluorescens* su broccolo (Wang *et al.*, 2012). Inoltre, Moreira *et al.* (2011), hanno dimostrato l'efficacia del chitosano nei confronti di numerosi batteri mesofili e psicotrofi che possono proliferare in fase di conservazione dei cavoli.

Gli estratti vegetali sono un'altra categoria di composti emergente in questo ambito e di notevole interesse (Gurjar *et al.*, 2012). Ad esempio, la miscela di terpeni, già impiegati in formulazioni commerciali, ha mostrato una notevole efficacia soprattutto nel contenimento della muffa grigia e di altri agenti di marciume (Di Pasqua *et al.*, 2007).

Notevole interesse hanno riscosso anche gli agenti di biocontrollo (Raymaekers *et al.*, 2020). Generalmente con questo termine vengono considerati gli organismi viventi che possono avere un'efficacia verso i parassiti o gli agenti di malattie delle piante, grazie alla loro attività antagonista nei confronti dell'organismo target. Anche se la lotta biologica trova maggiore applicazione per la gestione dei fitofagi, in alcuni casi l'impiego di microrganismi antagonisti risulta efficace per la gestione di malattie delle piante. *B. amyloliquifaciens*, ad esempio, è uno fra i più studiati e diffusi microrganismi per la protezione delle piante dalle malattie fungine. Questo batterio si è dimostrato efficace su diverse colture, nel controllo di patogeni radicali come *Ralstonia solanacearum* (Tan *et al.*, 2015), *Pythium* spp. (Zouari *et al.*, 2016), *Rhizoctonia solani* (Yu *et al.*, 2002) e *Fusarium* spp. (Zhao *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2022). Tuttavia, si è dimostrato efficace anche in trattamenti sulla parte aerea delle piante, come su foglie di girasole contro *A. alternata* (Kgatle *et al.*, 2020), e contro *B. cinerea* su pomodoro (Salvatierra-Martinez *et al.*, 2018).

Il Regolamento UE 1107 del 2009 ha introdotto, oltre alle sostanze di base, un'altra categoria di composti: le sostanze attive a basso rischio. Tali sostanze attive vengono impiegate nella formulazione di prodotti fitosanitari, ma godono di alcuni *benefit* per l'immissione nel mercato grazie al loro profilo eco tossicologico favorevole. Rientrano in questo gruppo numerose sostanze che agiscono come induttori di resistenza, quali ad esempio il COS-OGA. Questa sostanza, dopo aver dimostrato efficacia nei confronti degli agenti di oidio su diverse colture (Van

Aubel *et al.*, 2014; Calderone *et al.*, 2022), vite in particolare, è stata la prima sostanza attiva a basso rischio brevettata in Europa ed è stato recentemente impiegato in una formulazione commerciale come induttore di resistenza.

Infine, da non trascurare anche la potenziale efficacia di sanitizzanti impiegati nell'industria alimentare, quali ad esempio l'acido peracetico, utilizzato per la decontaminazione di agrumi affetti da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Parra, 2007), nei confronti degli organismi nocivi che possono infettare o contaminare i semi.

Le principali criticità da affrontare nella validazione e nella diffusione di nuovi composti sono generalmente date dal costo, tendenzialmente più elevato dei mezzi tecnici convenzionali, e dal fatto che spesso non si tratta di una semplice sostituzione di prodotti, ma l'intera strategia aziendale va rivista in funzione delle caratteristiche e della natura dei prodotti che vengono introdotti.

Questa sperimentazione ha valutato l'efficacia di composti a basso impatto ambientale, a livello aziendale, nei confronti di malattie fungine trasmissibili per seme che colpiscono il cavolo cappuccio e la cipolla. La valutazione di efficacia è avvenuta testando i prodotti innovativi sia da soli, che in aggiunta ai trattamenti aziendali. Per l'interpretazione dei risultati ottenuti con i rilievi condotti negli appezzamenti di cavolo cappuccio e di cipolla da seme, è doveroso considerare l'andamento meteorologico stagionale. In linea generale, tutta la stagione 2021, in particolare il periodo primaverile-estivo, è stata caratterizzata da precipitazioni inferiori alla norma, fenomeno che ha provocato segni di siccità su tutto il territorio regionale. Di conseguenza, le condizioni sono risultate poco favorevoli allo sviluppo di diversi patogeni, sia fungini che batterici, i quali spesso necessitano di precipitazioni frequenti ed umidità alta.

I risultati ottenuti, a seguito di opportune elaborazioni statistiche, stimando diffusione, gravità e indice di McKinney di malattie di tipo necrotico presenti su steli, foglie e silique di cavolo cappuccio e sullo scapo florale per quanto riguarda la cipolla, mostrano un'efficacia variabile dei composti saggiati. In particolare, nei due appezzamenti di cavolo cappuccio le strategie hanno mostrato livelli di efficacia variabili in funzione dell'organo valutato e del tipo d'impiego dei composti (a prodotto singolo o in aggiunta al programma aziendale). Sulle foglie, nella porzione di campo dove i prodotti innovativi sono stati applicati da soli, la miscela di terpeni e il chitosano hanno in genere mostrato livelli di efficacia più

elevati. Al contrario, ad esempio, COS-OGA ha fornito livelli di protezione nei confronti delle necrosi fogliari più significativi abbinato ai trattamenti aziendali. Risultati simili erano già stati osservati in precedenti sperimentazioni su *Solanaceae* nei confronti di *A. solani* e *Phytophthora infestans* (Clinckemaillie, 2017). Per quanto riguarda steli e silique, invece, le strategie basate sull'impiego di *B. amyloliquefaciens* e miscela di terpeni hanno mostrato risultati più promettenti rispetto a quelle basate su altri composti innovativi. D'altro canto, il chitosano, che sulle foglie aveva mostrato ottimi risultati anche quando applicato da solo per tutta la stagione, ha mostrato efficacia su steli e silique quasi esclusivamente quando abbinato agli altri trattamenti aziendali.

Le strategie basate sul rame hanno confermato l'ampio spettro d'azione di queste molecole e la loro importanza per gli agricoltori biologici, con riduzioni spesso significative nei diversi organi di pianta. Non sempre la strategia aziendale nei confronti di *X. campestris* ha assicurato buoni livelli di protezione dalle malattie necrotiche valutate in queste prove. Le strategie basate sull'impiego di chitosano cloridrato e acido peracetico hanno generalmente mostrato i risultati migliori nei confronti delle infezioni di *Botrytis* spp. sullo scapo florale di cipolla.

Nonostante una elevata variabilità, i risultati ottenuti evidenziano la validità dei composti a basso impatto ambientale saggiati, con livelli di protezione in alcuni casi paragonabili a quelli ottenuti con prodotti convenzionali. Ad esempio, dal rilievo condotto sulle foglie di cavolo il 14 giugno, tutte le strategie con singolo prodotto hanno ridotto l'indice di McKinney rispetto al testimone non trattato. Le riduzioni osservate sono risultate tendenziali per COS-OGA, rame e strategia aziendale, significative per chitosano, miscela di terpeni e *B. amyloliquefacens*. Anche su cavolo ibrido, il 18 giugno, nella porzione di campo dove sono stati mantenuti i trattamenti aziendali in associazione a quelli in prova, tutte le strategie innovative hanno ridotto l'intensità media ponderata della malattia sulle foglie rispetto al testimone. Tuttavia, in questo caso solo le piante trattate con chitosano e COS-OGA associati al programma aziendale completo hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto al controllo. Su cipolla, la pressione della malattia è risultata particolarmente bassa e spesso non sono emerse differenze significative fra i trattamenti.

La sperimentazione fu inizialmente impostata per la validazione di strategie di protezione nei confronti di *X. campestris*, agente causale del marciume nero su

cavolo, nonché organismo particolarmente temuto per la commercializzazione di semente di *Brassicaceae*. La stagione non è risultata favorevole alla comparsa di tale malattia e quindi non sono stati osservati sintomi in nessuno dei due campi sperimentali di cavolo. Tuttavia, a seguito di monitoraggi (avvenuti anche in collaborazione con il Servizio Fitosanitario Regionale) sono stati individuati sintomi di malattie necrotiche in entrambi gli appezzamenti. Essendo malattie generalmente causate da organismi trasmissibili per seme sono state ritenute d'interesse e i rilievi sono stati condotti a carico di queste malattie. Grazie ad approfondimenti di laboratorio sui sintomi osservati nei campi sperimentali, è stato possibile stimare la presenza di uno o più agenti patogeni nei diversi quadri sintomatologici osservati. I sintomi di malattie potenzialmente trasmissibili per seme rinvenuti più diffusamente su cavolo hanno riguardato necrosi della vegetazione aerea, mentre su cipolla sono stati osservati principalmente disseccamenti dello scapo florale. Nei diversi organi di cavolo (foglie, steli e siliques), i patogeni più frequentemente osservati mediante analisi morfologiche micro e macroscopiche sulle necrosi, sulle foglie principalmente afferivano ai seguenti fungini: *A. alternata*, *A. brassicicola*, *Stemphylium* spp. e *Cladosporium* spp. (Crescenzi *et al.*, 2015). Su cipolla è stata prevalentemente osservata la presenza di *Botrytis* spp. (Du Toit *et al.*, 2004). Questo lavoro di diagnosi ha permesso di individuare i principali agenti patogeni presenti in importanti aree produttive del territorio regionale, che possono rappresentare una minaccia per via della loro potenziale trasmissibilità tramite seme.

I dati ottenuti aprono la strada a nuove strategie di protezione basate sull'impiego di sostanze naturali nella gestione delle avversità fungine che colpiscono il cavolo cappuccio e la cipolla per la produzione di seme. Nonostante siano necessarie ulteriori validazioni, in più annate e su più areali, i risultati ottenuti sembrano promettenti. Inoltre, la sperimentazione a livello aziendale ha permesso anche di evidenziare criticità o limiti nell'impiego e nella diffusione di molecole innovative. Sono in corso delle analisi sulla qualità e sul livello di contaminazione della semente prodotta nei campi sperimentali. La correlazione fra i dati ottenuti nella prova di efficacia in campo e le analisi sul seme consentiranno di avere un quadro più completo sulla capacità delle sostanze saggiate di ridurre la trasmissibilità per seme dei patogeni valutati e di evidenziare eventuali effetti collaterali delle molecole innovative sulla qualità del seme.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abo-Elyousr, K., A., Alamri, S., A., Hussein, M., Hassan, M. A., El-Fatah, A., Bahaa, E. S., Hashem, M. (2020). Molecular disparities among *Botrytis* species involved in onion umbel blight disease and its management using *Bacillus subtilis* PHYS7. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0205-x>
- Assosementi. <http://www.sementi.it>. Accesso il 15 settembre 2022.
- Baker, K. F., Davis, L. H. (1950). *Stemphylium* leaf spot of China aster. *Mycologia*, 42, 477-486. <https://doi.org/10.2307/3755563>
- Basallote-Ureba, M. J., Prados-Ligero, A. M., Melero-Vara, J. M. (1999). Aetiology of leaf spot of garlic and onion caused by *Stemphylium vesicarium* in Spain. *Plant Pathology*, 48, 139-145. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00313.x>
- Benvenuti, A., Alessandri, S., Domenico, G., Scannavini, M., Serra, D. (2016). Ibisco, nuovo fungicida a base di chito-oligosaccaridi (COS) e oligo-galatturonidi (OGA) per la protezione della vite e delle colture orticole: risultati sperimentali su oidio. *Atti Giornate Fitopatologiche*, Chianciano Terme, (SI), 131-140.
- Bertaccini, A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience*, 12, 673-689. <https://doi.org/10.2741/2092>
- Bessey, E. A. (1911). Review of two recent important cabbage diseases of Ohio, by Th. F. Mann., Th. F. Manns. *Rivista di Patologia Vegetale*, 5, 150-152. <http://www.jstor.org/stable/42558757>
- Calderone, F., Vitale, A., Panebianco, S., Lombardo, M. F., Cirvilleri, G. (2022). COS-OGA applications in organic vineyard manage major airborne diseases and maintain postharvest quality of wine grapes. *Plants*, 11, 1763. <https://doi.org/10.3390/plants11131763>
- Charon, M., Robin, D., Marchand, P.A. (2019). The importance of substances without maximum residue limit (MRL) in integrated pest management (IPM). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 23, 22-29. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.17666>

- Chung, K. R. (2012). Stress response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Journals Scientifica*, 2012, 1-7. <https://doi.org/10.6064/2012/635431>
- Clinckemaillie, A. (2017). Effects and modes of action of COS-OGA based elicitors against late and early blight on *Solanaceae*. *Doctoral dissertation, Universite Catholique de Louvain*.
- Cox-Georgian, D., Ramadoss, N., Dona, C., Basu, C. (2019). Therapeutic and medicinal uses of terpenes. *Medicinal Plants*, 333-359. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15
- Crescenzi, A., Fanigliulo, A., Lahoz, E., Carrieri, R., D'Errico, F. P., Giacometti, R., D'Errico, G. (2015). Le avversità delle *Brassicaceae*. *Assosementi Associazione Italiana Sementi*, 62-67.
- Dietz-Pfeilstetter, A., Mendelsohn, M., Gathmann, A., Klinkenbuß, D. (2021). Considerations and regulatory approaches in the USA and in the EU for dsRNA-based externally applied pesticides for plant protection. *Frontiers in Plant Science*, 12, 974. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.682387>
- Dilmaghani, A., Gladieux, P., Gout, L., Giraud, T., Brunner, P. C., Stachowiak, A., Balesdent, M.H., Rouxel, T. (2012). Migration patterns and changes in population biology associated with the worldwide spread of the oilseed rape pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Ecology*, 21, 2519-2533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05535.x>
- Dilmaghani, A., Gout, L., Moreno-Rico, O., Dias, J.S., Coudard, L., Castillo-Torres, N., Balesdent, M.H., Rouxel, T. (2013), Clonal populations of *Leptosphaeria maculans* contaminating cabbage in Mexico. *Plant Pathology*, 62, 520-532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02668.x>
- Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compound from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4863-4870. <https://doi.org/10.1021/jf0636465>
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H. (1967). Mycoplasma - or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33, 259-266. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259>

- Du Toit, L. J., Derie, M. L., Pelter, G. Q. (2004). Prevalence of *Botrytis* spp. in onion seed crops in the Columbia basin of Washington. *Plant Disease*, 88, 1061-1068. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.10.1061>
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., Daayf, I. (2010). Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 4, 968-987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>
- European Commission. (2011). Commission Implementing Regulation (EU) No. 540/2011 of 25 May 2011 implementing regulation (EC) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the council as regards the list of approved active substances. *Official Journal of the European Union*, 153, 1-186. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2011/540/oj
- Fitt, B. D., Brun, H., Barbetti, M. J., Rimmer, S. R. (2006). World-wide importance of *Phoma* stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). Sustainable strategies for managing *Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (*Phoma* stem canker), *European Journal of Plant Pathology*, 114, 3-15. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2233-5>
- Forgiarini, M. N., Raggi, S., Casali, C. (1993) Botanica oggi. Ambiente, vegetazione, sviluppo. *Edagricole*, 178-179.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 10242-10297. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>
- Gorny, A., Kreis, R., Dillard, H. (2014) *Alternaria* leaf spot of cabbage and other cole crops. *Cornell University, Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology*, 1-2. https://www.academia.edu/39368212/Alternaria_Leaf_Spot_of_Cabbage
- Guillemette, T., Iacomi-Vasilescu, B., Simoneau, P. (2004). Conventional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. *Plant Disease*, 88, 490-496. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.490>
- Gurjar, M. S., Ali, S., Akhtar, M., Singh, K. S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*, 425-433. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2012.33050>

- Hassan, O., Chang, T. (2017). Chitosan for eco-friendly control of plant disease. *Asian Journal of Plant Pathology*, 11, 53-70. <https://scialert.net/abstract/?doi=ajppaj.2017.53.70>
- Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9, 403-423. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x>
- Howlett, B. J., Idnurm, A., Pedras, M. S. C. (2001). *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of brassicas. *Fungal Genetics and Biology*, 33, 1-14. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1274>.
- Istituto nazionale di statistica. <http://www.istat.it>. accesso il 15 settembre 2022.
- Kgatle, M. G., Flett, B., Truter, M., Aveling, T. A. S. (2020). Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Crop Protection*, 132, 105146. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105146>
- Lin, Y. C., Chung, K. R., Huang, J. W. (2020). A synergistic effect of chitosan and lactic acid bacteria on the control of cruciferous vegetable diseases. *The Plant Pathology Journal*, 36, 157. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.01.2020.0004>.
- Loreto, F., Förster, A., Dürr, M., Csiky, O., Seufert, G. (1998). On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. *Plant, Cell and Environment*, 21, 101-107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00268.x>
- Macioszek, V. K., Lawrence, C. B., Kononowicz A. K. (2018). Infection cycle of *Alternaria brassicicola* on *Brassica oleracea* leaves under growth room conditions. *Plant Pathology*, 67, 1088-1096. <https://doi.org/10.1111/ppa.12828>
- Malavolta, C. (2017). La protezione integrata delle colture: evoluzione tecnica, dei sistemi di supporto e della normativa. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LXV*, 69-71
- Mamgain, A., Roychowdhury, R., Tah, J. (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology*, 1, 01-09. https://www.researchgate.net/publication/305397582_Alternaria_pathogenicity_and_its_strategic_controls.

- Marchand, P. A., Robin D. (2019). Evolution of directive (EC) No 128/2009 of the European parliament and of the council establishing a framework for community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Journal of Regulatory Science*, 7, 1-7. <https://www.doi.org/10.21423/jrs-v07marchand>
- Mari M., Gregori R., Donati I., 2004. Postharvest control of *Monilia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in stone fruit by peracetic acid. *Postharvest Biology and Technology*, 33, 319-325. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.011>
- Martelli, R. (1984). Meccanismo d'azione degli antiparassitari a base di rame. *Vignevini*, 11, 51-53.
- Misawa, T., Yasuoka, S. (2012). The life cycle of *Stemphylium vesicarium*, the causal agent of welsh onion leaf blight. *Journal of General Plant Pathology*, 78, 18-29. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0352-8>
- Moreira, M. D. R., Roura, S. I., Ponce, A. (2011). Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 2335-2341. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.009>
- Murolo, S., Romanazzi, G. (2021). Patologia vegetale. *Edises Università*, 288.
- Moumni, M., Allagui, M. B., Mancini, V., Murolo, S., Tarchoun, N., Romanazzi, G. (2020). Morphological and molecular identification of seedborne fungi in squash (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*). *Plant Disease*, 104, 1335-1350. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-19-0741-RE>
- Myrta, A., Youssef, K., Dimartino, M., Cariddi, C., Vitale, A., Ippolito, A., Polizzi, G. (2010). Jet five, un nuovo disinfettante per le filiere agro-alimentari: valutazione dell'attività fungicida e battericida. *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 123-132.
- Nishikawa J., Nakashima, C. (2020). Japanese species of *Alternaria* and their species boundaries based on host range. *Fungal Systematics and Evolution*, 5, 197. <https://doi.org/10.3114/fuse.2020.05.13>
- Oshima, K., Maejima, K., Namba, S. (2013). Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 4, 230. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00230>
- Ounchokdee, U., Dethoup, T. (2020). Effects of plant extracts and chitosan against alternaria leaf spot of chinese kale. *Journal of Biopesticides*, 13, 159-166.

- Parra, G. (2007). Information regarding peroxyacetic acid and its efficacy to treat citrus canker bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Pest exclusion specialist*. Raleigh, North Carolina. https://irrec.ifas.ufl.edu/postharvest/pdfs/Peroxyacetic_Acid_Efficacy.pdf
- Pertot, I. (2012). Il progetto europeo CO-FREE: nuove strategie e prodotti per sostituire il rame in agricoltura. *Terra Trentina*, 58, 44-45. <http://hdl.handle.net/10449/20787>
- Pollini, A. (2003). La difesa delle piante da orto. *Edagricole*, 3-28.
- Pratibha, S., Pethybridge, S. J., Kikkert, J.R. (2021) Alternaria leaf spot of table beet. *College of Agriculture and Life Sciences*, 1-4.
- Querzola, P., Bellotto, D., Abbiati, C., Capriotti, M., Serratore, V., Noacco, A., Romanini, M., Guastamacchia, F., Capella, A., Ruiz, M. (2016). 3Logy®, new terpene fungicide against grape grey mold (*Botrytis cinerea*). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2, 141-146.
- Rajestary, R., Landi, L., Romanazzi, G. (2021). Chitosan and postharvest decay of fresh fruit: Meta analysis of disease control and antimicrobial and eliciting activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 563-582. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12672>
- Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., Cammue, B. P. (2020). Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management- a review. *Biological Control*, 144, 104-240. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240>
- Rockenbach, M., Freitas, M., Stadnik, M. J. (2016). RAPP - Revisão anual de patologia de plantas. *Brasília DF*, 24, 130-144.
- Romanazzi, G., Mancini, V., Feliziani, E., Servili, A., Endeshaw, S., Neri, D. (2016). Impact of alternative fungicides on grape downy mildew control and vine growth and development. *Plant Disease*, 100, 739-748. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0564-RE>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Sivakumar, D. (2018). Chitosan, a biopolymer with triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: Eliciting, antimicrobial and film-forming properties. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2745. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02745>
- Romanazzi G., Mancini V., Foglia R., Marcolini D., Kavari M., Piancatelli S. (2021). Use of chitosan and other natural compounds alone or in different

- strategies with copper hydroxide for control of grapevine downy mildew. *Plant Disease*, 105, 3261-3268. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1268-RE>
- Romanazzi, G., Orçonneau, Y., Moumni, M., Davillerd, Y., Marchand, P. A. (2022). Basic substances, a sustainable tool to complement and eventually replace synthetic pesticides in the management of pre and postharvest diseases: reviewed instructions for users. *Molecules*, 27, 3484. <https://doi.org/10.3390/molecules27113484>
- Rouxel, T., Balesdent, M. H. (2005). The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology*, 6, 225-241. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00282.x>
- Roylawar, P., Khandagale, K., Randive, P., Shinde, B., Murumkar, C., Ade, A., Singh, M., Gawande S., Morelli, M. (2021). *Piriformospora indica* primes onion response against stemphylium leaf blight disease. *Pathogens*, 10, 1085. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091085>
- Salvatierra-Martinez, R., Arancibia, W., Araya, M., Aguilera, S., Olalde, V., Bravo, J., Stoll, A. (2018). Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity-An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes. *Journal of Phytopathology*, 166, 601-612. <https://doi.org/10.1111/jph.12718>
- Scimat. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens*. *Science Photo Library*. <https://www.sciencephoto.com/>
- Sellitto, V. M. (2020). I microrganismi utili in agricoltura. *Edagricole*, 8
- Slurarski, C., (2005). Evaluation of chemical and biological control methods for their potential to reduce bacterial canker of tomato in a greenhouse stone wool cultivation system. *Acta Horticulturae*, 698, 299-304. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.698.40>
- Snyder, W. C., Hansen, H. N. (1940). The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 64-67. <http://www.jstor.com/stable/2436688>
- Tan, S., Gu, Y., Yang, C., Dong, Y., Mei, X., Shen, Q., Xu, Y. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 may prevent *Ralstonia solanacearum* infection through competitive exclusion. *Biology and Fertility of Soils*, 52, 341-351. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1079-z>
- Travadon, R., Bousset, L., Saint-Jean, S., Brun, H., Sache, I. (2007). Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg

- on oilseed rape. *Molecular Plant Pathology*, 56, 595-603.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01572.x>
- Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4, 225-236.
<https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- Van Aubel, G., Buonatesta, R., Van Cutsem, P. (2014). COS-OGA: A novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. *Crop Protection*, 65, 129-137.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.07.015>
- Valkonen, J. P. T., Koponen H. (1990). The seed borne fungi of chinese cabbage (*Brassica pekinensis*), their pathogenicity and control. *Molecular Plant Pathology*, 39, 510-516. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02527.x>
- Wang, B., Lou, T., Wei, L., Chen, W., Huang, L., Ding, L., Zhao, W., Zhang, W., Sun, P., Chen, C., Wang, K. (2021). Biochemical and molecular characterization of *Alternaria alternata* isolates highly resistant to procymidone from broccoli and cabbage. *Phytopathology Research*, 3, 1-14.
<https://doi.org/10.1186/s42483-021-00092-z>
- Wang, Y., Li, L., Li, B., Wu G., Tang, Q., Ibrahim, M., Li, H., Xie, G., Sun, G. (2012). Action of chitosan against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Molecules*, 17, 7028-7041.
<https://doi.org/10.3390/molecules17067028>
- Wordell Filho J. A., Rowe, E., Gonçalves, P.A. de S., Debarba, J. F., Boff P., Thomazelli, L. F. (2006). Manejo fitossanitário na cultura da cebola. *Epagri*, pp. 227, ISBN 85-85014-52-0
- Wordell Filho, J.A, Martins, D.A, Stadnik, M. J. (2007). Aplicação foliar de tratamentos para o controle do míldio e da podridão-de-escamas de bulbos de cebola. *Horticultura Brasileira*, 25, 544-549. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362007000400010>
- Xie, S., Jiang, L., Wu, Q., Wan, W., Gan, Y., Zhao, L., Wen, J. (2022). Maize root exudates recruit *Bacillus amyloliquefaciens* OR2-30 to inhibit *Fusarium graminearum* infection. *Phytopathology*, 112, 1886-1893.
<https://doi.org/10.1094/PHTO-01-22-0028-R>

- Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties, and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
- Yu, F., Zhang, W., Wang, S., Wang, H., Yu, L., Zeng, X., Fei, Z., Li, J. (2021). Genome sequence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*, the etiological agent of cabbage *Fusarium* wilt. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34, 210-213. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0245-A>
- Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman, G. L., Bertagnolli, B. L. (2002). Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 955-963. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5)
- Zhao, P., Quan, C., Wang, Y., Wang, J., Fan, S. (2014). *Bacillus amyloliquefaciens* Q426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 448-456. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200414>
- Zouari, I., Jlaiel, L., Tounsi, S., Trigui, M. (2016). Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain ceiz-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. *Biological Control*, 100, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.05.012>
- Zou, Z., Zhang, X., Parks, P., Du Toit, L. J., Van de Wouw, A.P., Fernando, W.G.D. (2019). A new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* identified from *Brassica rapa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1668. <https://doi.org/10.3390/ijms20071668>

11. RINGRAZIAMENTI



<https://drive.google.com/file/d/1Vu64Z5r5VqK4-0Ls0SVuR1pSFm9-59-k/view?usp=sharing>