Programma di Sviluppo Rurale dell'Emilia-Romagna 2014-2020
UNIONE EUROPEA Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale
Regione Emilia-Romagna
L'Europa investe nelle zone rurali
Autorità di gestione: Direzione Generale "Agricoltura, caccia e pesca" della Regione Emilia-Romagna
Responsabile dell'informazione: Cooperativa Agricola Voghierese a r.l.

MIGLIORAMENTO FITOSANITARIO AGLIO DI VOGHIERA DOP

Relazione Finale

a cura di V. Brandolini e A. Maietti

PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE 2014-2020 REGIONE EMILIA-ROMAGNA

Piano di innovazione misura 16.2.01: Supporto per progetti pilota e per lo sviluppo di nuovi prodotti, pratiche, processi e tecnologie nel settore agricolo e agroindustriale

Tipo di operazione

PSR 2014-2020. MISURA 16.2.02 – FOCUS AREA 3A "Migliorare la competitività dei produttori primari integrandoli meglio nella filiera agroalimentare attraverso regimi di qualità, la creazione di un valore aggiunto per i prodotti agricoli, la promozione dei prodotti nei mercati locali, le filiere corte, le associazioni e organizzazioni di produttori e le organizzazioni interprofessionali" attivata nell'ambito dei progetti di filiera

Finalità

Obiettivo principale del progetto è quello di avviare un piano di miglioramento fitosanitario del seme da riproduzione dell'Aglio di Voghiera DOP conservandone le originali caratteristiche genetiche, organolettiche e nutrizionali.

Importo del sostegno ricevuto dall'Unione europea

Importo richiesto: € 232.813,50
Importo ammesso: € 162.969,45
Percentuale finanziamento: 70%

Localizzazione geografica

Livello NUTS3 ITD56

PROGETTO DI FILIERA | Lo staff di progetto

Responsabile tecnico-organizzativo

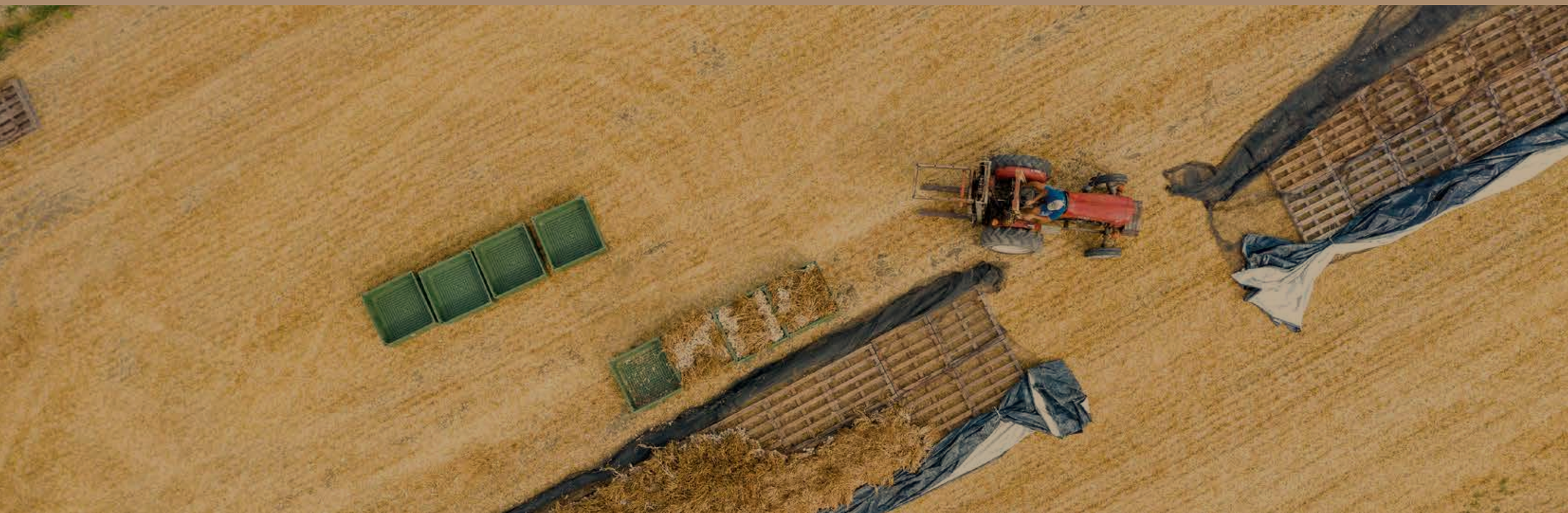
Dott. Agr. Emanuele Coletti – Cooperativa Agr. Voghierese a R.L.

Responsabilità tecnico-scientifica:

Prof. Vincenzo Brandolini, Dr.ssa Annalisa Maietti – Università degli Studi di Ferrara, Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche

Enti e Aziende partecipanti:

Cooperativa Agricola Voghierese a r.l.
Consorzio Futuro in ricerca
Venturi Società Agricola S.S.
Floricoltura Boarini di Boarini Michele
Dinamica Media s.r.l.



L'ATTIVITÀ SCIENTIFICA | Tutela e stabilizzazione delle caratteristiche genetiche

Attività di ricerca relativa alla verifica della stabilità dei caratteri genetici ed organolettici del prodotto Aglio di Voghiera in un progetto finalizzato al risanamento del prodotto stesso mediante il processo di riproduzione meristematica.

RELAZIONE FINALE CONSORZIO FUTURO IN RICERCA

Fra le colture orticole, l'importanza dell'aglio risulta, in Italia, quantitativamente marginale sia per la limitata incidenza della superficie interessata sia per la valenza macroeconomica che questa coltura rappresenta. Tuttavia l'interesse per questa specie è decisamente e notevolmente aumentata in questi ultimissimi anni per effetto di studi più approfonditi sui componenti del bulbo e sulle loro caratteristiche. In tale ambito sono state effettuate numerose ricerche sull'aglio e va comunque sottolineato che, a livello economico, questa coltura può rappresentare per alcune comunità locali una realtà di estremo interesse. È questo il caso del territorio di Voghiera dove, in presenza di una antica tradizione produttiva che rappresenta la produzione di oltre il 50% dell'aglio ferrarese con circa 100 ettari ogni anno dedicati alla produzione di aglio DOP (G.U 127 del 14/10/2010, serie n.136).

Il 25 febbraio 2019 sono stati consegnati al Laboratorio di Chimica degli Alimenti bulbi di aglio di Voghiera D.O.P di tre diversi lotti: 3M 907, 3M 434, 2M 452, per le analisi chimiche e genetiche del prodotto. I campioni 3M e 2M provengono dall'appezzamento situato tra Voghenza e Masi Torello. (N.B. 3M e 2M sono gli appezzamenti, uno attaccato all'altro, 907, 434, 452 sono i bins in cui sono stati raccolti i campioni dell'appezzamento).

Prodotto del lotto 3M è stato poi consegnato alla Azienda Venturi di Cesena per effettuare selezione e micropropagazione vitro.

Aglio Voghiera	Proteine%±sd	Ceneri%±sd	Umidità%±sd	Sostanza secca %±sd	Lipidi %±sd
3M 907	21.08±0.32	3.46±0.05	62.29±0.03	37.71±0.03	0.25±0.01
3M 434	19.51±0.84	3.59±0.12	61.73±0.69	38.27±0.69	0.19±0.01
2M 452	18.68±0.58	3.91±0.18	62.69±0.21	37.31±0.21	0.14±0.01

Tabella 1. Contenuto proteico, minerale e lipidico dei tre diversi lotti di aglio di Voghiera in bulbo.

Aglio Voghiera	Ca µg/g±sd	Mg µg/g±sd	Na µg/g±sd	K µg/g±sd
3M 907	62.47±0.01	801.29±41.94	50.88±14.79	17552±918
3M 434	37.93±0.01	733.73±118.17	30.79±0.12	14757±1606
2M 452	27.10±0.01	1101.74±258.42	21.56±3.42	17788±516

Tabella 2. Contenuto in macronutrienti (Ca, Mg, Na, K) in campioni di aglio di Voghiera in bulbo.

Aglio Voghiera	Fe µg/g±sd	Mn µg/g±sd	Cu µg/g±sd	Zn µg/g±sd
3M 907	27.74±0.01	7.00±1.58	10.31±4.45	1.44±0.48
3M 434	9.96±1.75	4.44±0.15	6.07±0.10	0.72±0.01
2M 452	25.35±0.01	5.32±0.22	5.85±0.69	1.80±0.11

Tabella 3. Contenuto in micronutrienti (Fe, Mn, Cu, Zn) in campioni di aglio di Voghiera in bulbo.

Acidi grassi %		Aglio 3M 907	Aglio 3M 434	Aglio 2M 452
C16:0	Palmitico	28.68	33.04	28.80
C18:0	Stearico	9.24	9.35	9.24
C18:1	Oleico	19.09	13.50	17.84
C18:2	Linoleico	39.96	39.92	40.12
C18:3	Linolenico	0.64	0.894	0.69
C20:0	Arachico	2.40	3.317	2.92
C22:0	behenico	0.0	0.0	0.48

Tabella 4. Pattern gascromatografico di acidi grassi contenuti nella frazione lipidica dell'aglio di Voghiera.

Aglio Voghiera	µg/g catechina eq. ±sd	µmol/g Trolox eq. ±sd
3M 907	540±12.37	0.419±0.005
3M434	535.63±11.25	0.564±0.002
2M 452	541.83±48.73	0.421±0.000

Tabella 5. Contenuto in fenoli totali espressi in catechina equivalente (metodo Folin Ciocalteu) e capacità antiossidante totale espressa in Trolox equivalente (metodo DPPH).

Solforati %	Aglio 3M 907	Aglio 3M 434	Aglio 2M 452
Diallildisolfuro %	8.38	4.97	4.44
Dipropendildisolfuro %	4.61	3.66	3.81
3-vinil-4H-1,2 ditiino %	22.78	23.35	23.92
Diallilitrisolfuro %	3.03	3.70	3.55
2-vinil-4-H1,3 ditiino %	61.21	64.33	64.28

Tabella 6. Contenuto in composti solforati nei tre diversi lotti di aglio di Voghiera (espressi in percentuale sul totale delle aree).

CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE

Il lavoro sperimentale è iniziato con l'estrazione e il clean-up del DNA genomico dai campioni di aglio. Per quantificare il DNA estratto e verificarne la purezza degli estratti è stata fatta la lettura spettrofotometrica a 260 e a 280 nm. La concentrazione è espressa in µg/mL ed è definita dai valori di assorbanza a 260 nm tipica del DNA mediante la formula di conversione specifica per le molecole di DNA double-strand.

Concentrazione = A260 × 50 × fattore di diluizione

Il rapporto A260/A280 è un indice del grado di purezza o clean-up del DNA genomico estratto, in quanto alla lunghezza d'onda di 280 nm si ha il picco di assorbimento tipico di tutte le proteine. Il valore ottimale di tale rapporto per avere DNA considerabile di buona qualità è circa 1,8; i DNA genomici ottenuti da bulbilli sono risultati di buona qualità e non degradati.

A scopo esemplificativo in Tabella 7 vengono riportati i valori di assorbanza e di concentrazione di alcuni estratti di DNA genomico.

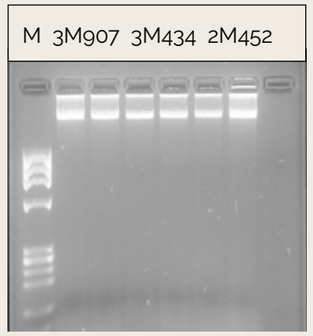


Figura 1. DNA estratto dai tre diversi lotti di aglio di Voghiera.

Aglio di Voghiera	Assorbanza λ=260	Assorbanza λ=280	A_{260}/A_{280}	Concentrazione DNA µg/mL
3M 907	1.015	0.593	1.713	1416
3M 434	0.578	0.267	2.166	807
2M 452	0.767	0.369	2.082	1070

Tabella 7. Valori di assorbanza a 260 nm; concentrazione del DNA e rapporto A260/280 dei campioni di aglio.

Amplificazione con primer RAPD

La tecnica RAPD si basa sull'uso di singoli decameri a sequenza casuale come primer nella reazione di amplificazione. Punto di forza della RAPD è proprio la lunghezza dei primer, che essendo lunghi solo 10 paia di basi, hanno la possibilità di individuare più sequenze complementari disposte casualmente sul DNA genomico.

Il numero e il tipo di frammenti che si ottengono dalla reazione di amplificazione dipendono esclusivamente dalla sequenza del primer e da quella del DNA genomico amplificato.

PRIMER RAPD	SEQUENZA (5'-3')
A01	CAGGCCCTTC
A08	GTGACGTAGG
B01	GTTTCGCTCC
B05	GTTTCGCTCC
B10	CTGCTGGGAC
D08	GTGTGCCCCA
K04	CCGCCCAAAC
O10	TCAGAGCGCC
U18	GAGGTCCACA
V19	GGGTGTGCAG

Tabella 8. Primer utilizzati per l'analisi genomica e relativa sequenza.

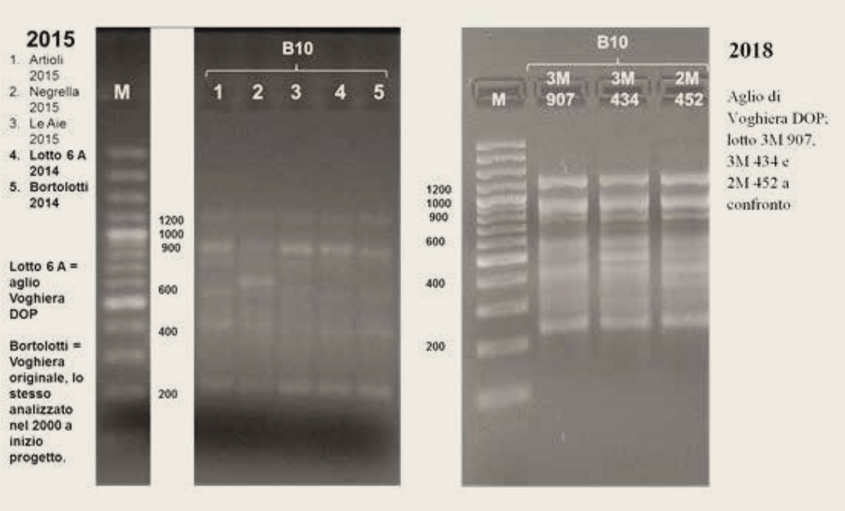


Figura 2. Prodotto di amplificazione RAPD con primer B10 sui tre campioni di aglio di Voghiera 2018, a confronto una amplificazione di campioni di aglio di Voghiera del 2015.

Le bande principali a 1200bp, 1000 bp, 400bp e 200 bp definiscono la corrispondenza tra campioni di Voghiera di diverse annate di coltivazione.

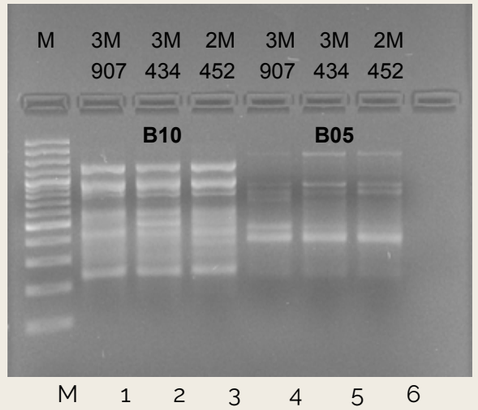


Figura 3. Prodotto di amplificazione RAPD con primer B10. Lane M: marker; lane 1: 3M 907 lane 2: 3M 434; lane 3: 2M 452. Prodotto di amplificazione RAPD con primer B05. lane 4: 3M 907 lane 5: 3M 434; lane 6: 2M 452.

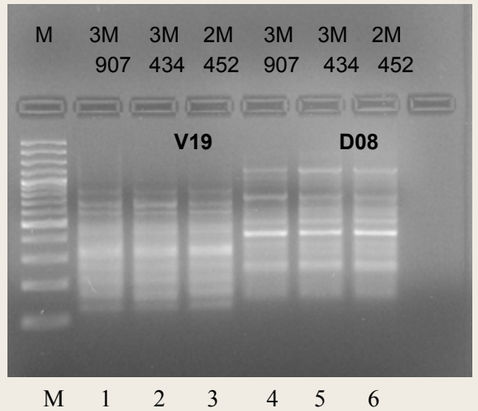


Figura 4. Prodotto di amplificazione RAPD con primer V19. Lane M: marker; lane 1: 3M 907 lane 2: 3M 434; lane 3: 2M 452. Prodotto di amplificazione RAPD con primer D08. lane 4: 3M 907 lane 5: 3M 434; lane 6: 2M 452.

A titolo esemplificativo sono state indicate le amplificazioni con 4 primer B10, B05, V19, D08, dei campioni di aglio di Voghiera, amplificati con tutti i 10 primers indicati in tabella 8

Le corse elettroforetiche evidenziano la presenza dei medesimi ampliconi in tutti i campioni non evidenziando così polimorfismo tra i tre lotti.

Dai lotti 3M è stato selezionato l'aglio da micropropagare.

I campioni sono stati propagati presso l'azienda Venturi di Cesena.

Figura 5. Prelievo meristematico e sviluppo della plantula in cella climatica.

A crescita del bulbillo adeguata, i campioni sono stati prelevati (ci sono stati forniti 5 vasetti con 1 o 2 piante ciascuno, tutte proveniente da 3M), è stato estratto il DNA e amplificati con i medesimi primers utilizzati per l'identificazione varietale nella prima parte del lavoro.

In figura 6 un campione di aglio micropropagato, di cui è stato sezionato la parte del bulbillo e da questa è stato estratto il DNA.

Figura 6. Aglio di Voghiera micropropagato e sezione del bulbillo da cui è stato estratto il DNA.

Il DNA dei campioni micropropagati è stato amplificato con i medesimi primers utilizzati in precedenza per verificare il mantenimento delle caratteristiche genotipiche. A titolo di esempio si indicano 4 dei 10 primer RAPD utilizzati per la ricerca.

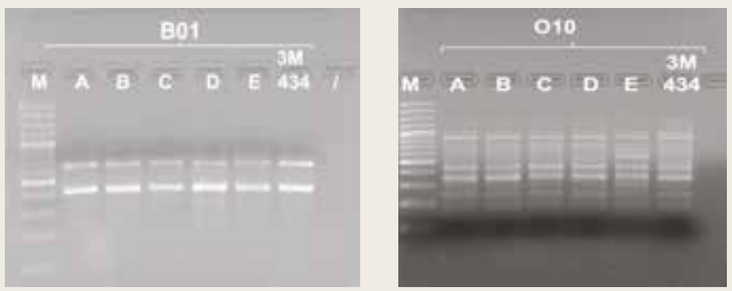


Figura 7. Prodotto di amplificazione RAPD con primer B01 (a sinistra) e O10 (a destra) di aglio micropropagato. Lane M: marker, Lanes A-E, campioni di aglio micropropagato, Lane 3M 434, aglio in bulbo di partenza utilizzato per recuperare il germoplasma.

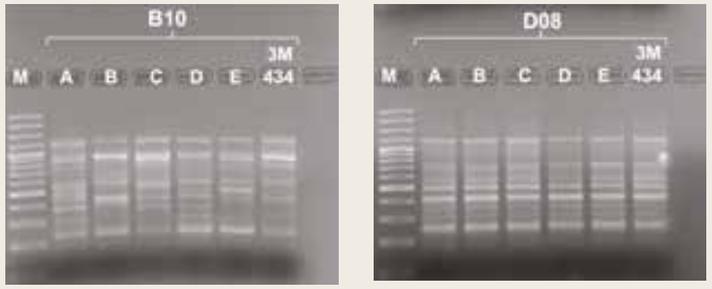


Figura 8. Prodotto di amplificazione RAPD con primer B10 (a sinistra) e D08 (a destra) di aglio micropropagato. Lane M: marker, Lanes A-E, campioni di aglio micropropagato, Lane 3M 434, aglio in bulbo di partenza utilizzato per recuperare il germoplasma.

Dalla caratterizzazione genetica dei campioni di aglio micropropagato risulta come non ci siano evidenti polimorfismi a confronto con il bulbo di partenza. La selezione e la relativa micropropagazione mantiene le caratteristiche genotipiche del prodotto di partenza.

Febbraio 2020

Infine l'ultima parte del lavoro prevede il controllo bromatologico di campioni di aglio della nuova raccolta (Luglio 2019) e la valutazione genetica di bulbilli di aglio sottoposto a micropropagazione e pronti per essere portato in pre-base e successivamente in campo.

Aglio di Voghiera	Proteine%±sd	Ceneri%±sd	Umidità%±sd	Sostanza secca %±sd	Lipidi %±sd
Voghiera 1 (Raccolta 2019)	18.32±0.20	3.78±0.02	62.69±0.23	37.30±0.23	0.04±0.005
Voghiera 2 (raccolta 2019)	16.17±0.30	3.34±0.03	62.40±0.61	37.60±0.61	0.18±0.01

Tabella 9. Composizione bromatologica di bulbi di aglio di Voghiera raccolta 2019. Analisi su due ripetizioni (Voghiera 1 e Voghiera 2).

Acidi grassi		Aglio Voghiera raccolta luglio 2019
C16:0	Palmitico	29.15 %
C18:0	Stearico	5.24 %
C18:1	Oleico	32.22 %
C18:2	Linoleico	32.42 %
C18:3	Linolenico	0.400 %
C20:0	Arachico	0.445 %
C22:0	behenico	0.093 %

Tabella 10. Profilo in acidi grassi di bulbi di aglio di Voghiera, raccolta 2019.
Sugli stessi campioni sono stati poi analizzati i polifenoli totali ed il relativo potere antiossidante mediante metodica DPPH, lettura spettrofotometrica a 515 nm.

Aglio Voghiera	µg/g catechina eq. ±sd	µmol/g Trolox eq. ±sd
Bulbi raccolta 2019	1061.09±32.96	0.66±0.03
Bulbi raccolta 2019	1052.31±60.78	0.69±0.04

Tabella 11. Contenuto in polifenoli (µg/g catechina eq) e capacità antiossidante totale (µmol/g Trolox eq) in bulbi di aglio di Voghiera raccolta 2019.

Se si confrontano i dati di analisi sui campioni della raccolta 2018 (Tabella 1,4,5) con i dati ottenuti sui campioni di aglio raccolta 2019, si possono notare differenze composizionali solamente dal punto di vista quantitativo; dato probabilmente imputabile al differente territorio di coltivazione, così come alle diverse condizioni ambientali dell'annata di coltivazione.
Infine per valutare in mantenimento dei caratteri intrinseci dell'aglio di Voghiera, su bulbilli selezionati dalla raccolta 2018, micropropagati e posti in pre-base è stata fatta una caratterizzazione genetica, ponendoli a confronto con i rispettivi bulbi di provenienza (coltivazione 2018) e con i bulbi di aglio di Voghiera della raccolta 2019.
Di questi tre campioni è stato estratto il DNA, verificata la sua purezza su gel di agarosio e mediante lettura spettrofotometrica a 260 e 280 nm (rispettivamente per verificare quantità di DNA e proteine) e infine amplificato con gli stessi primer già utilizzati per i primi micropropagati e per la caratterizzazione iniziale del genoma Voghiera.

Figura 9. Plantule di aglio di Voghiera DOP micropropagato e mantenuto in pre-base.

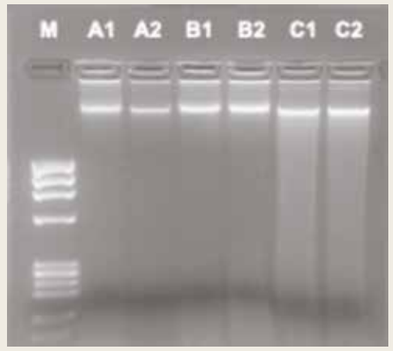


Figura 10. Corsa elettroforetica in gel di agarosio di DNA estratto da aglio di Voghiera.
A1 e A 2: DNA di bulbi raccolta 2019; B1e B2: DNA di bulbi raccolta 2018; C1 e C2 DNA di bulbilli micropropagati in pre-base.

Aglio di Voghiera	Assorbanza λ=260	Assorbanza λ=280	A260/A280	Concentrazione DNA (µg/mL)
A (bulbi raccolta 2019)	0.423	0.222	1.902	611.383
B (bulbi raccolta 2018)	0.735	0.405	1.817	1062.331
C (bulbilli di micro-propagato in pre base)	0.167	0.099	1.682	241.373

Tabella 12. Valori di assorbanza a 260, 280 nm, rapporto tra le due letture ad indicare la purezza del DNA estratto e la relativa concentrazione.

Il DNA dei tre diversi estratti, risultato di buona qualità e non degradato (come indicato in tabella 12) è stato amplificato utilizzando i primer RAPD indicati in tabella 13.

PRIMER RAPD	SEQUENZA (5'-3')
A01	CAGGCCCTTC
A08	GTGACGTAGG
B01	GTTTCGCTCC
B05	GTTTCGCTCC
B10	CTGCTGGGAC
D08	GTGTGCCCCA
K04	CCGCCCAAAC
O10	TCAGAGCGCC
U18	GAGGTCCACA
V19	GGGTGTGCAG

Tabella 13. Elenco dei primer RAPD utilizzati per l'amplificazione del DNA genomico di aglio di Voghiera.

A titolo di esempio vengono di seguito riportate alcune amplificazioni RAPD. Per alcuni primer, come si può osservare dalla figura 11 e 12, presentano numerose bande di amplificazione, mentre altri (B01, M13 e B20) mostrano solo alcuni ampliconi.

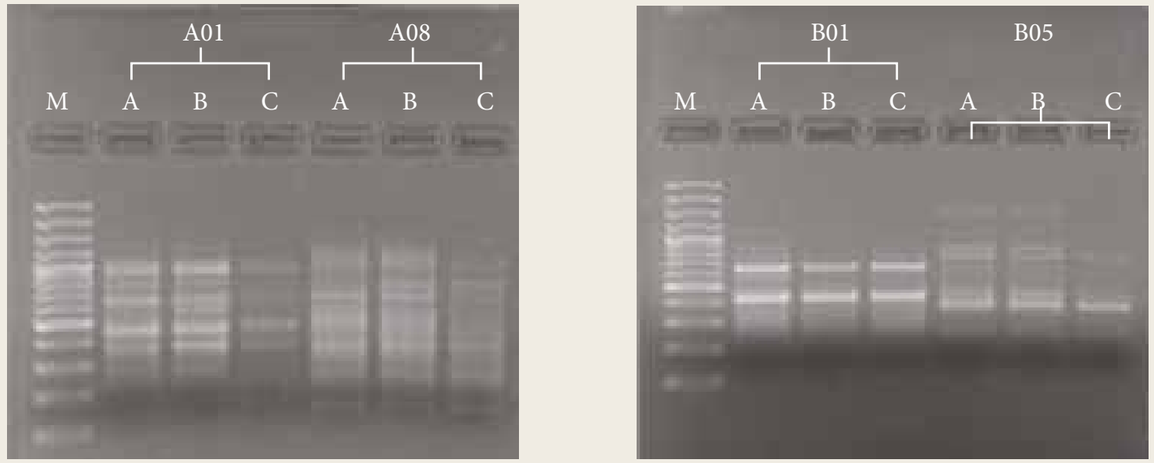


Figura 11. Prodotto di amplificazione RAPD con primer A01e A08 (a sinistra) e B01 e B05 (a destra) di aglio di Voghiera. Lane M: marker, Lanes A: aglio di Voghiera DOP, raccolta 2019; Lane B: aglio di Voghiera DOP, raccolta 2018; Lanes C: aglio di Voghiera DOP, micropropagato e in pre-base.

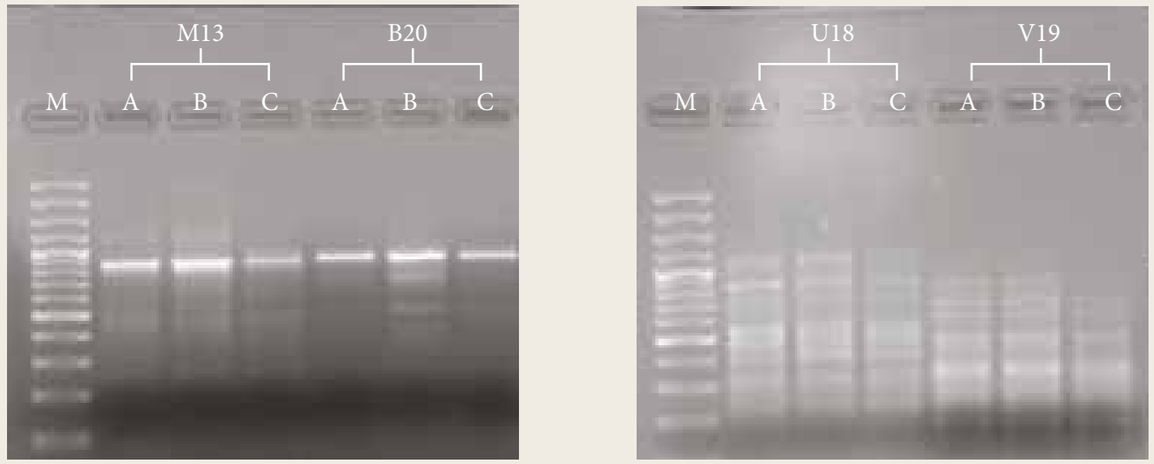


Figura 12. Prodotto di amplificazione RAPD con primer M13 e B20 (a sinistra) e U18 e V19 (a destra) di aglio di Voghiera. Lane M: marker, Lanes A: aglio di Voghiera DOP, raccolta 2019; Lane B: aglio di Voghiera DOP, raccolta 2018; Lanes C: aglio di Voghiera DOP, micropropagato e in pre-base.

Tutti i primer utilizzati per l'analisi RAPD hanno evidenziato come l'aglio di Voghiera mantenga stabile il genotipo tra le due raccolte (2018 e 2019) e come anche a seguito di prelievo meristematico, micropropagazione e crescita in pre-base le caratteristiche genotipiche si mantengono costanti.

I campioni micropropagati, geneticamente controllati e identificati come Voghiera DOP sono stati fatti radicare in terreno e poi trasferiti in serra per un primo ambientamento e crescita del bulbo.

Figura 13.
Aglio Voghiera DOP micropropagato proveniente dalla Azienda Venturi di Cesena.

Figura 14.
Aglio Voghiera DOP micropropagato dopo sviluppo radicale. Prodotto pronto per essere trasferito in serra per la crescita.

Figura 15.
Aglio di Voghiera DOP micropropagato, in serra per la crescita della pianta al fine di un trasferimento in campo.

Figura 16.
Bins con plantule di aglio di Voghiera DOP micropropagato, radicato e pronto per la crescita in campo.

Figura 17.
Aglio di Voghiera DOP micropropagato in campo.

I risultati ottenuti riportati in questa relazione a conclusione del progetto hanno evidenziato come l'aglio di Voghiera DOP ha conservato immutato nel tempo il pattern genetico, inoltre le caratteristiche intrinseche del prodotto rimangono stabili anche a seguito del prelievo meristematico, micropropagazione e crescita in pre-base. Infine, come indicato dalle immagini allegate, le plantule micropropagata dimostrano una buona crescita, radicazione e bulbificazione in campo.
Questi buoni risultati permettono perciò di costituire una piccola banca del germoplasma con materiale da seme risanato, in purezza, a disposizione dei coltivatori.

Prof. Vincenzo Brandolini

Dr.ssa Annalisa Maietti

Foglio appunti

Programma di Sviluppo Rurale dell'Emilia-Romagna 2014-2020
UNIONE EUROPEA Fondo Europeo Agricolo per lo Sviluppo Rurale
Regione Emilia-Romagna
L'Europa investe nelle zone rurali

Autorità di gestione: Direzione Generale "Agricoltura, caccia e pesca" della Regione Emilia-Romagna
Responsabile dell'informazione: Cooperativa Agricola Voghierese a r.l.

SOC. COOPERATIVA AGRICOLA VOGHIERESE a.r.l.
Via Pontida, 5 – 44019 Ducentola di Voghiera (FE)
Tel. +39 0532 815599
Partita IVA 01946960380
coopvoghierese@gmail.com
www.cooperativavoghierese.it

Seguici anche su:
www.fitosanitario.cooperativavoghierese.it
www.emiliatasting.it
www.agliodelnonno.it
@agliodivoghieraDOP