

**AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2017 DEL  
TIPO DI  
OPERAZIONE 16.2.01 "SUPPORTO PER PROGETTI PILOTA E PER LO  
SVILUPPO DI NUOVI  
PRODOTTI, PRATICHE, PROCESSI E TECNOLOGIE NEL SETTORE  
AGRICOLO E  
AGROINDUSTRIALE"**

**FOCUS AREA 3A DGR N. 227 DEL 27 FEBBRAIO 2017**

**RELAZIONE TECNICA  INTERMEDIA  FINALE**

**DOMANDA DI SOSTEGNO :5050987**

**DOMANDA DI PAGAMENTO: 5169396**

**FOCUS AREA: 3A**

Titolo Piano	Innovazione genetica, adeguamento colturale, analisi qualitative e supporti informatici per lo sviluppo delle colture portaseme.
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	<b>Consorzio SATIVA Soc. Coop. Agricola Via Calcinaro, 2425, 47521 Cesena FC Cooperativa a Mutualità Prevalente Iscrizione all'Albo il 17/01/2005 con il nr. A101504 - Reg. Impr. FC P.IVA 01244650402</b>

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	18
Data inizio attività	01/01/2018
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	31/01/2020

Relazione relativa al periodo di attività dal	01/01/2018	31/01/2020
Data rilascio relazione	27/05/2020	/

Autore della relazione	Chiara Milanese		
telefono		email	<a href="mailto:cmilanesi@sativa.it">cmilanesi@sativa.it</a>

Sommaro	
<b>1 -</b>	<b>DESCRIZIONE DELLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PIANO</b> <b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>STATO DI AVANZAMENTO DELLE AZIONI PREVISTE NEL PIANO</b> <b>4</b>
<b>2 -</b>	<b>DESCRIZIONE PER SINGOLA AZIONE</b>
	<b>Azione 1- Esercizio della cooperazione</b> <b>.5</b>
<b>2.1</b>	Attività e risultati <b>5</b>
<b>2.1.2</b>	Personale <b>6</b>
<b>2.1.3</b>	Collaborazione..... <b>9</b>
	<b>Azione 3 – Specifiche azioni legate alla realizzazione del Piano</b> <b>9</b>
<b>2.3.1.</b>	Attività e risultati <b>9</b>
<b>2.3.2</b>	Personale <b>96</b>
<b>2.3.3</b>	Collaborazione <b>96</b>
	<b>Azione 4 – Divulgazione</b> <b>98</b>
<b>2.4.1.</b>	Attività e risultati <b>98</b>
<b>2.4.2</b>	Personale <b>103</b>
<b>2.4.3</b>	Collaborazione <b>103</b>
<b>3 -</b>	<b>CRITICITÀ INCONTRATE DURANTE LA REALIZZAZIONE DELL'ATTIVITÀ</b> <b>103</b>
<b>4 -</b>	<b>ALTRE INFORMAZIONI</b> <b>103</b>
<b>5 -</b>	<b>CONSIDERAZIONI FINALI</b> <b>103</b>
<b>6 -</b>	<b>RELAZIONE TECNICA</b> <b>104</b>

## **ELENCO ALLEGATI**

Allegato 1 Azione 1- Verbale Riunione

Allegati Az. 3.1- 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-15-16-17-18-19-20-21

Allegato 1 Az.3.5

Allegato 1 Az.4 – Divulgazione

Allegato 2 Az.4 -Relazione Consorzio Sativa incontro del

Allegato 3 Az.4 – Presentazione Sicural

Allegato 4 Az.4 – Presentazione Agrinnova

Allegato 5 Az.4 Presentazione CRPV

Allegato 6 Az.4 Presentazione LaRAS

Allegato 7 Az.4 Presentazione ASTRA Centro di saggio

Allegato 8 Az.4 Presentazione ASTRA

Allegato 9 Az.4 Schede tecniche.

## 1 - Descrizione dello stato di avanzamento del Piano

Nel complesso tutte le attività sono state realizzate seguendo i protocolli tecnici come presentato nel Piano stesso. Non sono emerse criticità e tutte le attività sono state svolte come previsto dal Piano.

Di seguito una sintesi di ciascuna azione

### **Azione 1: Esercizio della cooperazione**

Il CRPV Soc. Coop su incarico del beneficiario il Consorzio Sativa, ha svolto il ruolo di coordinatore e gestore delle azioni del Piano d'innovazione attuando tutte le necessarie iniziative alla realizzazione e al conseguimento degli obiettivi e risultati previsti.

Il CRPV ha realizzato l'attività come previsto seguendo i percorsi e utilizzando i diversi strumenti indicati nel piano come riportato nel paragrafo 2.1 coinvolgendo proprio personale tecnico, amministrativo e di segreteria dotato di esperienza pluriennale nel coordinamento tecnico organizzativo di progetti di ricerca sperimentazione e divulgazione.

### **Azione 2 : Azioni studi necessari alla realizzazione del Piano**

Non era prevista e non è quindi stata svolta alcuna attività.

### **Azione 3 Azioni specifiche legate alla realizzazione del Piano.**

#### **3.1 ) Sviluppo di linee di basilico maggiormente resistenti alle fitopatie con maggiori caratteristiche aromatiche.**

L'attività ha riguardato la selezione di linee di basilico provenienti da precedenti incroci realizzati dal Consorzio Sativa allo scopo di valutare la presenza di materiale resistente a peronospora e fusarium dotate delle caratteristiche qualitative oggi richieste dal mercato. L'attività svolta in parte all'interno di fitotroni, in serra e presso i laboratori Agrinova, Sicural e Verde Lab hanno portato all'individuazione di alcuni materiali interessanti che sono in corso di valutazione per poter individuare poche linee con cui avviare l'attività di moltiplicazione. La fase di selezione è più avanzata per quanto riguarda la breomia mentre per fusarium occorrono ancora dei reincroci.

#### **3.2) Implementazione all'interno della piattaforma "mappatura sementi" di applicazioni per gestire DSS, monitoraggi del territorio e dello sviluppo colturale e archiviazione dati.**

Nell'ambito dell'azione si è attuata l'implementazione della piattaforma "mappatura sementi" utilizzata per gestire gli isolamenti spaziali delle colture allogame portaseme che oggi grazie al progetto consente di collegare agli appezzamenti georeferenziati i dati meteo necessari per una corretta gestione dell'irrigazione, per l'interfacciamento a DSS previsionali delle malattie crittogamiche e, mediante immagini satellitari, consente un controllo periodico delle colture presenti sull'appezzamento". L'attività richiesta in particolare per le colture portaseme di barbabietola da zucchero potrà essere estesa ad altre colture da seme orticole che già utilizzano il software "mappatura sementi" per assolvere alle prescrizioni della legge 2/98.

#### **3.3) Riconoscimento varietale in erba medica**

Questa attività realizzata dal LARAS dell'Università di Bologna su seme di medica prodotto in Emilia-Romagna, prevedeva la messa a punto di metodi di analisi in grado di discriminare geneticamente varietà commerciali di medica così da poter valorizzare la produzione locale evitando la concorrenza di quella estera. Altro obiettivo era quello di poter identificare le varietà attraverso marcatori specifici.

Come risultati si è giunti alla messa a punto di un metodo di analisi che però è risultato poco discriminante per le varietà nel tempo selezionate dall'ecotipo romagnolo che sono geneticamente vicine. Il metodo di analisi messo a punto sarà verificato analizzando varietà nostrane con materiale proveniente da paesi esteri quali Turchia, Australia, Canada, Polonia per valutare le differenze geniche e potere così distinguere e valorizzare le nostre produzioni mettendo in luce anche possibili truffe commerciali.

#### **3.4) Messa punto di strategie di controllo delle malerbe per la medica da seme.**

La recrudescenza della cuscuta negli ultimi anni e la ridotta disponibilità di principi attivi per effettuare un diserbo efficace della medica da seme ha spinto ad effettuare due prove che hanno permesso di mettere

a punto la strategia per un controllo più efficace della cuscuta su medica da seme grazie all'impiego del pendimetalin in alternativa alla propizamide. I dati sono stati forniti alle ditte distributrici del pendimetalin affinché possano nel giro di un paio d'anni ottenere l'estensione di etichetta per l'impiego su medica. Nel frattempo COAMS, Assosementi e CRPV hanno richiesto per il 2020 l'uso eccezionale al Ministero della Salute che è stato concesso per un periodo di 120 giorni.

### 3.5) Definizione di tecniche colturali per produzione di seme da consumo diretto e per produzione di gemogli (sprouting) caratterizzato da basso residuo di fitofarmaci ed elevata qualità sanitaria.

L'attività sperimentale ha permesso di verificare le strategie di difesa e di controllo post-raccolta da utilizzare sulle colture destinate a produrre seme per germogli ad uso alimentare e di monitorare il seme lungo le fasi di selezione e conservazione all'interno del magazzino fino alla sua commercializzazione, al fine di garantirne l'idoneità dal punto di vista mercantile e microbiologico.

#### Azione 4: **Divulgazione**

Durante la realizzazione dell'attività il personale del CRPV ha organizzato e gestito diverse iniziative come previste nel Piano. In specifico i prodotti di questa azione sono stati almeno 14: n.4 articoli tecnici, n. 4 visite guidate; n. 4 incontri tecnici; n. 1 video dedicato al Piano, 5 schede tecniche sulla produzione di seme per germogli.

Inoltre, all'interno del portale CRPV ([www.crpv.it](http://www.crpv.it)) in "Piani Innovativi" è inserita una pagina dedicata al Piano (<https://progetti.crpv.it/Home/ProjectDetail/45>) dove sono caricati i dati identificativi del Piano insieme al materiale divulgativo realizzato nel corso dell'attività.

## 1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività reale	Mese termine attività previsto	Mese termine attività reale
1- Cooperazione	Consorzio Sativa (con supporto CRPV Soc.Coop.)	Esercizio della cooperazione	01/01/2018	03/09/2018	30/06/2019	31/01/2020
2 Studi necessari alla realizzazione del Piano	--	--	--	--	--	--
3.1 Realizzazione del piano	Consorzio Sativa Lab. Sicura-Lab Agrinnova-Lab.Verdelab	Sviluppo linee di basilico	01/01/2018	01/01/2019	30/06/2019	31/12/2019
3.2 Realizzazione del piano	Agronica Group S.r.l.	Implementazione piattaforma "mappatura sementi"	01/01/2018	03/09/2018	30/06/2019	15/01/2020
3.3 Realizzazione del piano	LaRas -Uni.BO	Tracciabilità varietale erba medica	01/01/2018	23/04/2019	30/06/2019	31/01/2020
3.4 Realizzazione del piano	CRPV in collaborazione con ASTRA	Controllo malerbe medica da seme	01/01/2018	03/09/2018	30/06/2019	31/01/2020
3.5 Realizzazione del piano	Consorzio Sativa (con supporto CRPV Soc.Coop. e ASTRA)	Produzione di seme per consumo diretto	01/04/2018	03/09/2018	30/06/2019	31/01/2020
4 .Divulgazione	Consorzio Sativa (con supporto CRPV Soc.Coop.)	Divulgazione	01/07/2018	03/09/2018	30/06/2019	31/01/2020

## 2 - Descrizione per singola azione

### 2.1 Azione 1 - Esercizio della cooperazione

#### 2.1.1 Attività e risultati

<b>Azione 1</b>	<b>1- Esercizio della cooperazione</b>
<b>Unità aziendale responsabile</b>	<b>CRPV Soc. Coop. Agricola – Consorzio Sativa</b>
<b>Descrizione delle attività</b>	<p>Il CRPV, su incarico del <b>Consorzio Sativa</b>, ha svolto il ruolo di coordinatore e gestore delle azioni del Piano d'innovazione, mettendo in atto tutte le iniziative necessarie alla realizzazione e al conseguimento dei risultati previsti. Il CRPV si è avvalso di proprio personale tecnico, amministrativo e di segreteria qualificato e dotato di esperienza pluriennale nel coordinamento tecnico-organizzativo di progetti di ricerca, sperimentazione e divulgazione.</p> <p><u>Attivazione del Piano d'innovazione</u> Il CRPV su incarico del Beneficiario, ha avviata la fase di attivazione del Piano che ha riguardato sia gli aspetti amministrativi e formali, sia il consolidamento degli obiettivi con l'intero gruppo di referenti coinvolti a vario titolo nel Piano stesso. In merito agli aspetti formali, con particolare riferimento alle attività del Piano e ai relativi costi ammessi, il CRPV, unitamente al Responsabile Scientifico (<b>RS</b>) e al Responsabile del Piano (<b>RP</b>), ha verificato la congruenza dei budget approvati rispetto alle attività da svolgere. Con questo passaggio si è autorizzata l'attivazione del Piano, comunicata a tutte le Unità Operative. Una volta soddisfatti gli aspetti formali, è stata indetta una riunione di attivazione (Cesena, 06/08/2018), alla presenza quindi di tutte le figure coinvolte per ogni Unità Operativa. In questa sede, il Responsabile Organizzativo (CRPV) ha riproposto i contenuti e gli obiettivi del Piano, al fine di avere la più ampia condivisione possibile delle informazioni e impostare le modalità di realizzazione delle azioni d'innovazione.</p> <p><u>Costituzione del Comitato di Piano</u> In occasione della riunione di attivazione si è anche proceduto alla costituzione del Comitato di Piano (<b>CP</b>), che è così composto:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Responsabile del coordinamento (<b>RC</b>) (CRPV)</li><li>• Responsabile del Piano (<b>RP</b>) (Consorzio Sativa)</li><li>• Responsabile Scientifico (<b>RS</b>) (LaRAS-Uni.BO)</li><li>• Rappresentante per la parte agronomica (Consorzio Sativa)</li></ul> <p><u>Gestione del Piano d'innovazione</u> Dalla data di attivazione del Piano, il Responsabile coordinamento (<b>RC</b>) ha svolto una serie di attività funzionali a garantire la corretta applicazione di quanto contenuto nel Piano stesso, e in particolare:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Il monitoraggio dello stato d'avanzamento dei lavori;</li><li>• La valutazione dei risultati in corso d'opera;</li><li>• L'analisi degli scostamenti, comparando i risultati intermedi raggiunti con quelli attesi;</li></ul>

- La definizione delle azioni correttive.

Il Responsabile del coordinamento di Piano (**RC**), in stretta collaborazione con il Responsabile Tecnico-Scientifico (**RS**), si è occupato di pianificare una strategia di controllo circa il buon andamento delle attività del Piano, attraverso un sistema basato sull'individuazione delle fasi decisive, cioè momenti di verifica finalizzate al controllo del corretto stato di avanzamento lavori.

L'attività di cooperazione ha previsto ed organizzato nel corso della vita del progetto una serie di riunioni in totale n.6 come da preventivo del Piano.

Le riunioni sono state svolte nelle seguenti date:

1. 6 agosto 2018
2. 19 ottobre 2018
3. 20 marzo 2019
4. 29 maggio 2019
5. 29 ottobre 2019
6. 18 dicembre 2019 (

Si allega come esempio il verbale di attivazione (Vedi allegato 1 Az. 1 Verbale ) i restati documenti sono archiviati in sede CRPV.

Allo stesso modo, l'**RC** e l'**RS** si sono occupati di valutare i risultati/prodotti intermedi ottenuti in ciascuna fase.

Tutto ciò agendo in coerenza con quanto indicato dalle procedure gestionali del CRPV (v. Autocontrollo e Qualità).

#### Verifica dei materiali, strumenti e attrezzature impiegate in campo e in laboratorio

A campione, l'**RC** ha verificato la congruenza tra le caratteristiche dei materiali e prodotti impiegati dai partner, rispetto a quanto riportato nel Piano. A tal fine l'**RC** ha eseguito alcune verifiche ispettive presso le U.O., in coerenza con quanto indicato dalle procedure gestionali del Sistema Gestione Qualità del CRPV.

#### Preparazione dei documenti per le domande di pagamento

In occasione della domanda di pagamento, l'**RC** e l'**RS**, insieme al Responsabile del Piano (**RP**), hanno completato l'analisi dei risultati intermedi ottenuti, nonché l'analisi della loro conformità a quanto previsto dal Piano.

In particolare è stata verificata la completezza della documentazione relativa alle spese affrontate dai singoli soggetti operativi e raccolta la documentazione per la redazione del rendiconto tecnico ed economico.

#### Altre attività connesse alla gestione del Piano

Oltre alle attività descritte in precedenza, il CRPV ha svolto una serie di attività di supporto al Beneficiario, come le attività di interrelazione con la Regione Emilia-Romagna, l'assistenza tecnico-amministrativa, le richieste di chiarimento e la redazione e l'inoltro di eventuali richieste di proroga e/o varianti.

#### Autocontrollo e Qualità

Attraverso le Procedure Gestionali e le Istruzioni operative approntate nell'ambito del proprio Sistema Gestione Qualità, il CRPV ha lavorato al fine di garantire efficienza ed efficacia all'azione di Esercizio della cooperazione, come segue:

- Requisiti, specificati nei protocolli tecnici, rispettati nei tempi e nelle modalità definite;

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rispettati gli standard di riferimento individuati per il Piano;</li> <li>- Garantita la soddisfazione del cliente tramite confronti diretti e comunicazioni scritte;</li> <li>- Rispettate modalità e tempi di verifica in corso d'opera definiti per il Piano;</li> <li>- Individuati i fornitori ritenuti più consoni per il perseguimento degli obiettivi.</li> </ul> <p>La definizione delle procedure, attraverso le quali il <b>RC</b> ha effettuato il coordinamento e applicato le politiche di controllo di qualità, sono la logica conseguenza della struttura organizzativa del CRPV. In particolare sono state espletate le attività di seguito riassunte.</p> <p><i>Attività di coordinamento</i></p> <p>Le procedure attraverso le quali si è concretizzato il coordinamento delle UO si sono sviluppate attraverso riunioni e colloqui periodici con il Responsabile Scientifico (<b>RS</b>) e con quelli delle Unità Operative coinvolte.</p> <p><i>Attività di controllo</i></p> <p>La verifica periodica dell'attuazione progettuale si è realizzata secondo cadenze temporali come erano state individuate nel Piano. Più in particolare è stata esercitata sia sul funzionamento operativo che sulla qualità dei risultati raggiunti; in particolare è stata condotta nell'ambito dei momenti indicati di seguito:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verifiche dell'applicazione dei protocolli operativi in relazione a quanto riportato nel Piano;</li> <li>- Visite ai campi sperimentali e ai laboratori coinvolti nella conduzione delle specifiche attività.</li> </ul> <p><i>Riscontro di non conformità e/o gestione di modifiche e varianti</i></p> <p>Non si sono verificate situazioni difformi a quanto previsto dal Piano. Tutte le attività svolte come previsto nella procedura specifica di processo sono registrate e archiviate nel fascicolo di progetto e certificate attraverso visite ispettive svolte dal Responsabile Gestione Qualità del CRPV.</p> <p>Il Sistema Qualità CRPV, ovvero l'insieme di procedure, di misurazione e registrazione, di analisi e miglioramento e di gestione delle risorse, è monitorato mediante visite ispettive interne e verificato ogni 12 mesi da Ente Certificatore accreditato (DNV-GL).</p>
<p><b>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</b></p>	<p>Gli obiettivi previsti nell'ambito di questa azione sono stati completamente raggiunti.</p> <p>Nessuna criticità tecnico-scientifica è stata evidenziata durante l'attività svolta.</p>

### 2.1.2 Personale Azione 1- Esercizio della cooperazione

Cognome e nome	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	Responsabile del Piano	Esercizio della cooperazione	48	€ 2.010,42
	Responsabile-Tecnico	Partecipa alle riunioni come responsabile ricerca e qualità delle attività di laboratorio di Sativa e in qualità di Tecnico di laboratorio	64	€ 1.331,26
	Tecnico	Partecipa alle riunioni come tecnico referente delle attività sperimentali in campo.	22	€ 370,48

		Partecipa alle riunioni come tecnico referente delle attività sperimentali in campo.	26	€ 464,44
			<b>Totale:</b>	€ 4.178,60

### 2.1.3 Consulenze – Azione 1- Esercizio della cooperazione

#### CONSULENZE – SOCIETÀ

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
CRPV Soc. Coop.	Personale CRPV	€ 20.200,00	Coordinamento e monitoraggio delle azioni del Piano.	€ 20.200,00
				<b>Totale:</b> € 20.200,00

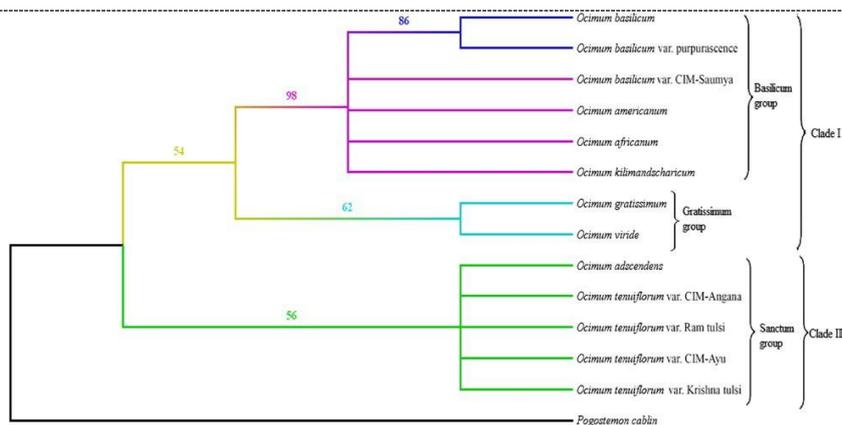
#### Azione 2 – STUDI NECESSARI ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

Azione non prevista.

## 2.2. Azione 3: Realizzazione del Piano

### 2.3.1 Attività e risultati

<b>Azione</b>	<b>3.1 Sviluppo di linee di basilico maggiormente resistenti alle fitopatie con maggiori caratteristiche aromatiche.</b>
<b>Unità aziendale responsabile</b>	<b>Consorzio Sativa</b>
<b>Descrizione delle attività</b>	<p><b>Premessa</b></p> <p>Il basilico ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) appartiene alla famiglia delle Lamiaceae, genere <i>Ocimum</i>, del quale fanno parte approssimativamente 64 specie erbacee, annuali e perenni. Il principale centro di diversificazione è stato identificato nell’Africa tropicale, ed un secondo centro nell’Asia tropicale.</p> <p>Le molteplici specie appartenenti a questo genere differiscono notevolmente per caratteristiche aromatiche oltre che per caratteri fenotipici. Va sottolineato che le diverse specie appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae differenziano anche a livello genomico come ploidia, infatti è ben noto che ci sono specie diploidi, tetraploidi, esaploidi e addirittura ottaploidi.</p>  <p>Fig.1 Tipologie di basilico.</p> <p>Il basilico coltivato, <i>Ocimum basilicum</i> L., detto Sweet basil, è una specie allogama in presenza di insetti, però si autofeconda facilmente in loro assenza senza incorrere in problematiche di inbreeding, ossia perdita di vigore e depressione. Questa sua caratteristica lo rende facilmente utilizzabile in piani di incrocio, grazie alla sua allogamia, ma lo rende anche facilmente utilizzabile in programmi di breeding per l’ottenimento di varietà-linee pure.</p> <p>A livello genomico si configura come una specie tetraploide, questo ne impedisce l’inter-incrocio con altre specie appartenenti alla stessa famiglia.</p> <p><i>Diversi studi</i> sono stati condotti per valutare la relazione tra le diverse specie:</p>



All'interno della specie *Ocimum basilicum* c'è una notevole variabilità, sia naturale sia derivante da attività di miglioramento genetico attuato da ditte sementiere che già da diversi decenni si sono focalizzate su questa specie.



Fig. 2 Varietà di basilico commerciali

Infatti pur essendo una specie minore rispetto a quelle di forte interesse economico, quali pomodoro, peperone, patata, zucchino, tra le aromatiche riveste comunque un certo impatto mondiale e questa importanza della specie sta aumentando notevolmente con la globalizzazione e il maggiore interesse verso il made in Italy.

Ecco che il basilico genovese che inizialmente era un semplice ecotipo locale inizia a rivestire sempre più interesse, per le sue peculiarità di aroma e fragranza.

I genetisti si sono concentrati per adattare tale varietà a diverse tecniche di allevamento ed esigenze produttive, quindi cercando di ridurre la taglia della pianta, la lunghezza degli internodi; cercando di aumentare la superficie della lamina fogliare per avere una resa produttiva al taglio maggiore. Si è però cercato di mantenere inalterato l'aroma e il colore per conservare la tipicità del prodotto.

Ecco che le varietà si sono moltiplicate repentinamente, sia tra le ditte italiane che straniere.

Fino a qualche decennio fa l'attività di miglioramento genetico e selezione artificiale era volta principalmente a caratteri morfologici della pianta, anche se centrale, soprattutto nell'ecotipo genovese, è sempre stato l'aroma.

Infatti è noto ormai da decenni che la composizione aromatica del basilico è assai complessa e diversi sono gli elementi che lo caratterizzano. Sono stati identificati oltre 80 composti che ne determinano l'aroma.

Di questi però i quantitativi maggiori che ne valorizzano la qualità nella tipologia genovese sono rivestiti da due composti, il linalolo e l'eugenolo. Mentre ne vanno a ridurre la qualità finale l'eucaliptolo, l'estragolo ed il methyleugenolo.

In particolare:

**Eucalyptol (difetto):**

E' un composto organico dal liquido incolore, facente parte della famiglia degli eteri ciclici, ed è un monoterpene. I dati tossicologici dell'Eucaliptolo sono piuttosto limitati. Per gli esseri umani, la morte è stata riportata dopo

l'ingestione di 3.5 - 5ml di olio essenziale di Eucalipto, ma un numero considerevole di recuperi sono stati accertati anche dopo l'assunzione di quantitativi maggiori di olio.

Di seguito, si riporta il link a una banca dati di riferimento, nella quale si possono consultare, diverse informazioni relative al composto identificato:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol>

**Linalolo (pregio):**

E' un composto facente parte degli alcoli terpenici presente anche in numerosi frutti e piante aromatiche. Trova diverse applicazioni commerciali dovute al suo gradevole profumo. Negli ultimi anni è stato preso in considerazione anche da alcuni studi neurofarmacologici, perché si pensa possa avere effetti sui meccanismi della memoria.

Di seguito, si riporta il link a una banca dati di riferimento, nella quale si possono consultare, diverse informazioni relative al composto identificato:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linalool>

**Estragolo (difetto):**

E' un composto facente parte della famiglia dei fenilpropeni. Sotto forma liquida incolore, ha l'odore pungente di menta ed anice. Alcune pubblicazioni scientifiche (es. Food and Chemical Toxicology), dimostrano che i livelli di estragolo assunti, per alcuni decotti, sono eccessivamente alti, tanto, da poter classificare la sostanza come probabile cancerogena se assunta in elevate quantità.

Di seguito, si riporta il link a una banca dati di riferimento, nella quale si possono consultare, diverse informazioni relative al composto identificato:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estragol>

**Eugenolo (pregio):**

E' un composto aromatico idrossilato, facente parte della classe chimica degli allilbenzeni. E' un liquido incolore o giallo chiaro che trova largo uso in profumeria, per il suo aroma attribuibile ai chiodi di garofano. In medicina trova uso come anestetico e antisettico.

Di seguito, si riporta il link a una banca dati di riferimento, nella quale si possono consultare, diverse informazioni relative al composto identificato:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/eugenol>

**Methyleugenolo (difetto):**

E' utilizzato come agente aromatizzante, ed in alcuni studi è stato considerato mutageno negli animali, classificandolo ragionevolmente come una sostanza cancerogena per l'uomo sulla base degli studi effettuati sulla cancerogenicità negli animali. Va sottolineato che gli studi effettuati nei topi erano con quantitativi di 100 volte superiori a quelle ingeriti mediamente dall'uomo, e perciò potrebbe non porre rischi significativi per l'uomo.

Di seguito, si riporta il link a una banca dati di riferimento, nella quale si possono consultare, diverse informazioni relative al composto identificato:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methyleugenol>

**T-Cadinolo (pregio):**

Di seguito, si riporta il link a una banca dati di riferimento, nella quale si possono consultare, diverse informazioni relative al composto identificato:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1230222>

Molti studi sono stati condotti sulle proprietà di questi composti e sui possibili utilizzi finali.

Numerosi sono gli effetti benefici sia come agenti antimicrobici contro diversi batteri gram positivi e negativi, che come repellenti per un possibile utilizzo in campo antiparassitario naturale; inoltre è stata comprovata la proprietà antiossidante di alcuni composti. Centrale e attuale è poi lo studio degli effetti che questi composti hanno in campo medicale e molto si sta approfondendo su questo tema.

Negli ultimi decenni una grossa problematica è emersa nella coltivazione del basilico ed un nuovo patogeno è arrivato nel nostro paese, si tratta della *Peronospora belbaharii*.

Tale fungo si manifesta con la presenza massiccia di spore nella pagina inferiore della lamina fogliare che causa un forte ingiallimento delle foglie e caduta delle stesse fino alla morte della pianta.

Per la prima volta citata in letteratura in Uganda nel 1933, è stata rilevata in Europa in Svizzera nel 2001 ed in Italia nel 2003. Inizialmente era stata confusa come *Peronospora lamii*, ma ben presto è stata classificata a parte come un'altra specie dal gruppo dell'Università di Torino facente capo al prof. Garibaldi.

Le principali problematiche che rendono questo fungo particolarmente aggressivo e di difficile gestione sono collegate ad alcuni aspetti epidemiologici. Infatti questo fungo si trasmette facilmente per seme ed anche bassi livelli di contaminazione comportano una rapida diffusione del patogeno. (Garibaldi et al. 2004).

Inoltre a temperatura ottimale di 20°C, bastano poche ore di bagnatura (6-12h) per avere una forte diffusione della malattia (Garibaldi et al. 2007).

Per la prima volta citata in letteratura in Uganda nel 1933, è stata rilevata in Europa in Svizzera nel 2001 ed in Italia nel 2003.



Fig.3 Sintomi di peronospora sulle foglie di basilico

Tutte le varietà di *Ocimum basilicum* L. sono altamente suscettibili e ci sono pochi prodotti chimici registrati su basilico efficaci.

La *Peronospora belbaharii* è un parassita obbligato, cioè necessita dell'ospite per replicarsi e concludere il suo ciclo vitale. Altre labiate ornamentali come il **coleus** (*Solenostemon scutellarioides*) e diverse specie di **Agastache** sp., piante erbacee perenni rizomatose originarie dell'America settentrionale e centrale (Henricot et al., 2009; Thines et al. 2009). La salvia invece non è ospite di questa *Peronospora*.

Recenti studi hanno anche dimostrato che a livello epidemiologico necessita di 7.5h di buio per poter sporulare. (Cohen et al., 2013b)

Con queste premesse si può facilmente intuire la facilità di diffusione della malattia soprattutto in alcune tecniche agronomiche, per esempio la semina diretta per l'industria che prevede alte densità di semina, irrigazione sopra-

chioma e scarsa ventilazione; se poi si aggiunge che le ultime annate hanno visto estati abbastanza piovose, risulta difficile il contenimento.

Studi effettuati da un gruppo israeliano hanno dimostrato che ci sono tecniche innovative che possono aiutare a ridurre la diffusione del patogeno quando il basilico è coltivato in ambiente controllato, come per esempio in serra; tali tecniche sono l'illuminazione notturna a led (Cohen et al. 2013), che ne riduce la sporulazione; la ventilazione notturna (Cohen et al. 2016) ed il riscaldamento solare diurno (Cohen et al. 2015).

Oltre alla *Peronospora belbahrii* un altro patogeno è una minaccia grossa per questa coltura, specialmente in alcune tecniche agronomiche, come la semina diretta per l'industria; si tratta del *Fusarium oxysporum* sp. basilici.

Questa malattia fungina è conosciuta dal 1956, ed è presente a livello globale. Si diffonde anche questa per seme e causa nella pianta occlusione dei vasi e appassimento della pianta fino alla completa defogliazione e morte della stessa. Studi effettuati su questo patogeno hanno individuato una forma di resistenza il che ne dimostra il tipo di controllo genico dominante secondo i rapporti classici mendeliani. (Chaimovitsh et al. 2006).

Le condizioni ambientali hanno un forte effetto sulla diffusione del fungo, infatti in annate piovose e umide la problematica può raggiungere livelli di incidenza notevoli.



Fig.4 Danni da fusarium su piante di basilico

#### **ATTIVITA' SVOLTA NELL'AMBITO DEL PROGETTO.**

La presente relazione pur descrivendo tutte le attività svolte secondo quanto stabilito dal progetto iniziale, lo fa in sequenza temporale così come sono state realmente effettuate descrivendo prima le attività inerenti l'inserimento delle resistenze a peronospora e fusarium (attività 3.1.3), poi le altre attività relative alla Valutazione del materiale genetico per caratteri fenotipici di campo (3.1.1) e alla Valutazione del materiale genetico per caratteri chemiotipici, composti aromatici (attività 3.1.2).

**Le attività 3.1.1 e 3.1.3 sono strettamente collegate e vengono accorpate nel punto 3.1.1 di seguito riportato.**

#### **3.1.1 INSERIMENTO RESISTENZA A PERONOSPORA BELBHARII, VALUTAZIONE DEGLI ASPETTI DI RESISTENZA E DELLE CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE, INSERIMENTO RESISTENZE A FUSARIUM.**

L'attività è stata avviata già a partire da gennaio 2018 con la valutazione di ibridi F1 prodotti in campo durante l'estate 2016 tra 5 varietà di pregio di basilico genovese di proprietà di Consorzio Sativa ben note per le elevate

performance qualitative e 2 varietà di basilico reperite come fonte di resistenza a *Peronospora belbahrii* (*Ocimum basilicum* L. var. *Mirhanii* e *Ocimum americanum* var. *Blue spice*). Le singole piante delle varietà commerciali erano state incappucciate durante l'estate 2016 insieme alle singole piante delle varietà fonte di resistenza, pareggiate come fioritura, per permettere l'inter-incrocio. All'interno del sacco sono state posizionate larve di *Lucillia*, una mosca impollinatrice (Bioplanet) che è un ottimo impollinatore per il basilico; avendo questi insetti un ciclo vitale abbastanza corto ed essendo l'inter-incrocio fortemente vincolato all'attività dei pronubi, settimanalmente venivano depositate nuove larve in ogni sacchetto. Alla fine dell'estate 2016 sono stati raccolti 15 incroci. Durante la stessa estate la medesima attività di incrocio sulle stesse varietà è stata effettuata manualmente per essere certi della buona riuscita dell'ibridazione. Tale attività prevede la demascolazione del fiore prima della apertura in modo da riuscire a rimuovere le antere prima della produzione del polline; l'impollinazione del fiore è stata poi effettuata manualmente con il polline del parentale donatore di riferimento. Alla maturazione fisiologica del seme i rametti sono stati raccolti e trebbiati a mano. L'attività di incrocio e reincrocio sperimentale è assai impegnativa date le dimensioni assai ridotte del fiore di basilico e il tipo di infiorescenza che ha tempi ottimali per la castrazione assai ridotti. Però dalla generazione F1BC1 è stato necessario procedere con questa attività totalmente in modo manuale per essere certi dell'effettivo reincrocio e limitare al massimo il rischio di autofecondazione.



Fig.4-Infiorescenza basilico

Fig.5- Fiore pronto per la demascolazione



Fig.6 - Pistillo demascolato

A partire da gennaio 2018 si è proceduto a testare le singole progenie ottenute da incrocio e back cross con inoculazione naturale di *Peronospora belbahrii* presso Agroinnova, questo perché andando a reincrocicare con il parentale ricorrente occorreva poi discriminare e selezionare le singole piante resistenti a peronospora.

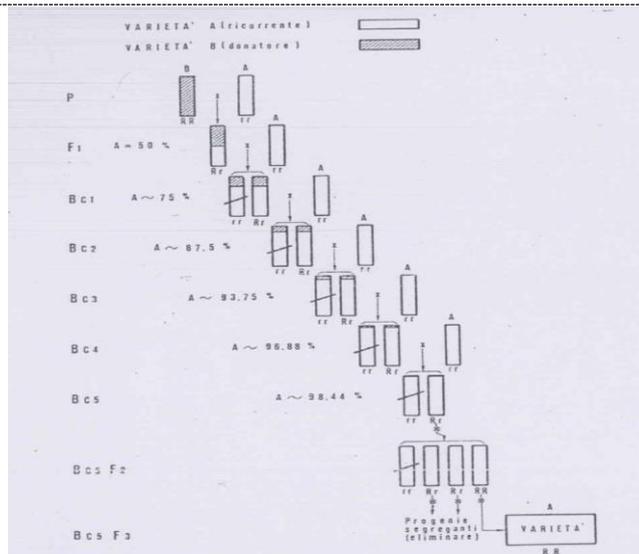


Fig.7 Schema di reincontro per l'inserimento di un gene di resistenza dominante

L'obiettivo del back cross è quello di introdurre nelle nostre varietà commerciali la resistenza senza però variare il fenotipo finale. Va infatti precisato che i due parentali donatori sono assai poco interessanti dal punto di vista fenotipico, sia come caratteristiche morfologiche che aromatiche.

Nella foto seguente si può vedere la varietà donatrice Mirahnii, bene evidente è la distanza fenotipica dalle varietà di basilico genovese comuni:



Fig.8. Parentale donatore di resistenza a peronospora *mirahnii*



Fig.10 Parentale ricorrente, varietà'1



Fig.11 Ibrido f1 derivante da incrocio varietà' 1 e mirahnii

Già in F1BC1 aumentano le somiglianze al parentale ricorrente, ma occorre almeno arrivare alla generazione F1BC3 per garantire una netta somiglianza al parentale ricorrente (circa 94% di patrimonio genetico del parentale ricorrente) Ovviamente ad ogni generazione occorre testare in serra sotto inoculazione artificiale la resistenza al patogeno per selezionare le piante resistenti e non perdere il carattere introgressito.

#### **Inoculazione artificiale con peronospora belbahrii:**

Sativa si è occupata di seminare in alveoli da 104 fori le progenie mano a mano derivanti dalla attività di introgressione della resistenza, tramite back cross.

I semi sono stati posizionati per favorire la germinazione in sale di coltura a temperatura, umidità e luce controllata, in alveoli di torba. Essendo le condizioni di crescita molto favorevoli i tempi di germinazione sono stati piuttosto rapidi.

Allo stadio di 3-4 foglia vera, cioè circa dopo 10 gg le plantule erano pronte per essere ripicchettate in alveoli più grandi, del 40 fori, ed essere consegnate a Torino ad Agroinnova per l'ambientamento e l'inoculazione.

Come ben noto la Peronospora belbahrii manifesta le sue condizioni ottimali a circa 20°C, ma ha un range abbastanza ampio di sviluppo. I fattori limitanti sono la luce, ed infatti in periodi di scarsa luminosità, Novembre- Dicembre-Gennaio, cresce molto lentamente ed ha una sporulazione assai scarsa.

L'attività di screening per resistenza è iniziata a Gennaio 2018 (consegna campioni il 19/1/2018), con i primi 16 polistiroli da infettare. Logicamente in ogni prova di inoculo sono state inserite le varietà testimoni di riferimento, Mirahnii come varietà resistente e la varietà Mammolo come varietà suscettibile.

Presso Agroinnova le piante erano ambientate ed inoculate in serra di vetro a temperatura di 18-27°C con un fotoperiodo di 10-12h di luce e una umidità prossima alla saturazione.

L'inoculazione veniva fatta allo stadio di 3-4 foglia vera con una sospensione fungina di  $1 \times 10^5$  sporangi/ml.

In caso di scarsa manifestazione e sporulazione è stata effettuata una seconda e a volte anche una terza inoculazione.

Già dopo una settimana-dieci giorni dalla inoculazione, questo margine temporale era in funzione anche dalla stagione dell'anno, venivano effettuate diverse osservazioni delle piante per valutare la sporulazione del patogeno. Tali osservazioni erano visive, come presenza di spore sulla pagina inferiore della foglia e a volte anche con l'utilizzo di stereomicroscopio e microscopio ottico, questo perché in alcuni casi a livello visivo sono state rilevate spore biancastre anomale che allo stereomicroscopio sono risultate anormali.

Il personale di Sativa è sempre stato presente oltre che alla consegna del materiale alle fasi di valutazione della resistenza sulle piante per acquisire le conoscenze necessarie a portare avanti il lavoro di valutazione anche in serra e pieno campo.

Oltre alla presenza del patogeno sono stati valutati anche sintomi collaterali (reazione ipersensibilità), in piante resistenti che consistevano in necrosi fogliari a volte anche molto marcate che nel caso della specie in oggetto ne hanno comportato un forte limite essendo l'utilizzo primario la foglia e quindi si è proceduto all'eliminazione di alcune di queste piante.

A volte è stata rilevata una suscettibilità maggiore a *Fusarium oxysporum sp. basilici*, ed anche in questo caso sono state scartate le piante sensibili.

L'attività è stata scaglionata in diversi step, con l'esattezza tra il 2018 e il 2019 sono stati testati 143 campioni in 13 consegne distinte.

Ad ogni generazione si è provveduto a selezionare le singole piante resistenti, nelle prime generazioni BC1F1, BC2F1 è stata tenuta molto ampia la popolazione recuperando il maggior numero di piante possibili. A partire dalla

BC3F1 e BC4F1 è iniziata prima la selezione di tutte le famiglie con il maggior numero di individui resistenti e poi all'interno delle famiglie si sono scelte le piante più interessanti, sia come resistenza che come fenotipo.

**I risultati dell'attività di selezione per resistenza a Peronospora** sono illustrati negli **Allegati 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13 dell'azione 3.1**. In ciascun allegato sono riportati:

- Elenco dei materiali testati
- Numero di contenitori consegnati
- Risultati dei test per ogni contenitore

Peso del seme raccolto dalle piante selezionate e successivamente reincrociate. Già dalla generazione BC3F1 si è provveduto a raccogliere anche l'autofecondato, per ottenere la popolazione BC3F2 dalle progenie che già manifestavano un fenotipo interessante, tutto ciò per fissare la resistenza. Il seme raccolto da queste piante BC3F2 è stato riseminato ad opera del personale Sativa e ritestato per resistenza presso Agroinnova, a questo punto la parte di piante suscettibili è stata scartata e anche quelle con resistenza intermedia. Sono invece state allevate tutte le piante resistenti ed è stato raccolto il seme da queste per andare ad identificare quale presentasse il gene di resistenza in omozigosi.

E' emerso che la resistenza a peronospora sui materiali utilizzati e selezionati manifestava un comportamento di dominanza, infatti l'ibrido F1 è risultato completamente resistente, ma nella segregazione non era rispecchiata appieno la segregazione monogenica, anzi ci siamo trovati a valutare a volte piante con una sintomatologia intermedia; oltre a ciò c'erano casi di presenza di spore anormali che ci hanno lasciato qualche dubbio sulla valutazione del materiale.



Fig.12-Piante allo stadio di inoculo



Fig.13- Inoculazione col fungo ad umidità prossima alla saturazione.



Fig.14-Valutazione visiva dei sintomi



Fig. 15- Valutazione finale dei sintomi

Il tempo di infezione, dall'inoculo alla lettura finale dei risultati, è variato in funzione dell'epoca di allevamento ed inoculazione delle piante, potevano passare da 15 gg fino ad un mese di tempo prima che i sintomi fossero ben leggibili.

Dalla esperienza maturata durante il progetto abbiamo evidenziato anche effetti collaterali alla resistenza genetica, a volte irrilevanti, altre volte invece vincolanti sulla scelta dei materiali; infatti essendo il basilico una specie da

foglia ogni reazione collegata all'aspetto esterno poteva inficiare la qualità del prodotto stesso. Di seguito alcuni esempi:



Fig 16-17 -Esempi di reazione di ipersensibilità su foglia



Fig.18-Spore deformate e ridotta sporulazione Fig.19- Necrosi fogliari.

#### **Attività di selezione in pieno campo (Prova 1)**

Durante l'estate 2019 68 progenie/parcelle in BC3F2 e BC4F1 sono state valutate in campo, la semina in alveoli da 104 fori è stata effettuata il 30/4/2019 presso il vivaio "Garattoni Umberto" ed il trapianto presso i campi sperimentali all'interno dell'azienda Alac a Gattolino di Cesena è stato effettuato il 3/06/2019. Sono state trapiantate 36 piante per parcella.

Le piante sono state messe a dimora su pacciamatura bianca con un sesto di 70 x 70 cm; l'irrigazione è stata effettuata tramite manichetta e trattamenti contro Fusarium e Peronospora sono stati effettuati nei primi periodi post trapianto.

Durante l'estate quotidianamente è stato valutato l'aspetto fenotipico delle piante, il portamento, la lamina fogliare, come colore, spessore, lucentezza e forma. Ogni parcella è stata attentamente valutata per uniformità e resistenza alla salita a fiore.

#### **I risultati dell'attività di selezione per resistenza a Peronospora in pieno campo sono riportati nell'allegato 14 dell'Azione 3.1**

Sulle parcelle migliori sono state selezionate diverse piante perché, essendo ancora materiali segreganti per resistenza a peronospora, era necessario tenere ampia la progenie per non rischiare di perdere eventuali individui resistenti.

Un numero totale di 99 piante erano state selezionate su 40 progenie considerate interessanti, in alcune era stata selezionata solo una pianta per parcella, mentre nelle linee più interessanti sono state selezionate fino a 6 piante.

Tutte le piante scelte sono state cartellate ed incappucciate con sacchi di rete prima della fioritura per consentire l'isolamento dalle altre piante vicine. Per favorire l'impollinazione e l'autofecondazione all'interno di ogni sacco settimanalmente sono state poste larve di mosca Lucillia che è un ottimo impollinatore per il basilico.

Sotto ai sacchi di rete l'umidità era molto alta e questo ha favorito lo sviluppo della peronospora, quindi circa dopo 20 giorni dall'incappucciamento è stata

effettuata una verifica pianta per pianta della presenza di spore. Le piante sintomatiche sono state scartate. In totale sono state raccolte 47 piante sane. La raccolta del seme è stata effettuata manualmente pianta per pianta a completa maturazione del seme a partire da settembre, tagliando al colletto l'intera pianta che è stata posizionata su bancali e successivamente in forno per completare la maturazione del seme.

La trebbiatura è avvenuta a mano sgranando le pannocchie fiorali singolarmente e passando il seme in valli per scartare le impurità.

**I quantitativi di seme prodotto sono indicati negli allegati da 1 a 13 dell'Azione 3.1.**

#### **Selezione in pieno campo (Seconda prova)**

Sempre nell'ottica di valutare in condizioni naturali la resistenza delle progenie è stato predisposto un ulteriore campo prova di valutazione su materiale ad avanzato livello di stabilità fenotipica, BC4F1, con semina il 24/6/2019 e trapianti il 15/7/2019.

La prova è stata effettuata in doppio, alcune piante sono state consegnate ad Agroinnova per la valutazione in condizioni di inoculo artificiale.

In campo per favorire la malattia non sono stati previsti trattamenti antiperonosporici e la sera le piante venivano irrigate sopra-chioma con gli sprinkler. Sono stati trapiantati anche i testimoni di riferimento, sia resistente che suscettibile.

Delle 21 parcelle a dimora, la prima ad ammalarsi è stata quella del testimone suscettibile, a seguire altre hanno manifestato i primi sintomi. Una linea, la numero 505, ha manifestato un'ottima tolleranza e un fenotipo molto interessante; anche se al suo interno c'erano piante suscettibili.



Fig.20- **Campo estivo di valutazione, da sinistra testimone sensibile, testimone resistente, linea segregante interessante.**

Nel campo sono state selezionate giornalmente le piante più sane all'interno delle parcelle migliori, sono state raccolte 20 piante scelte su 9 parcelle.

**I risultati dell'attività di selezione per resistenza a Peronospora in pieno campo sono riportati nell'allegato 14 e 15 dell'Azione 3.1. Nell'allegato 15 az.3.1 sono riportate invece le foto delle migliori linee selezionate.**

**Selezione in vaso in serra fuorisuolo:**

A fine estate 2019, si è proceduto anche a testare in condizioni di inoculo naturale tutto il materiale ottenuto fino a quel momento, questo per verificare la reale resistenza delle linee.

Sono stati seminati 97 campioni con un numero di piante variabile a seconda della disponibilità di seme e della generazione della linea. Le varietà erano miste, sono stati aggiunti come sempre i testimoni resistenti e suscettibili.

La semina è avvenuta nei contenitori da 104 fori, allo stadio di 2-3 foglie vere le piante sono state trapiantate ciascuna in vasi del diametro di 10 cm, tutte singolarmente cartellinate.

I vasetti sono stati posizionati in una serra di 500m<sup>2</sup> di superficie dove lateralmente erano state collocate delle piante di basilico molto infette di peronospora, utilizzate come fonte di inoculo.

Per favorire la dispersione naturale delle spore, la sera venivano accesi gli sprinkler per irrigare sopra-chioma i vasetti, infatti l'elevata umidità e l'assenza di luce sono i fattori di maggiore importanza per la diffusione del patogeno.

Dopo circa una settimana era già ben evidente la sporulazione nella pagina inferiore delle varietà sensibili.

Per favorire ulteriormente la manifestazione della malattia la sera, dopo l'irrigazione, si provvedeva a coprire le piante con tessuto non tessuto, in modo da mantenere un ambiente umido e caldo.

I sintomi sono stati molto evidenti, anche nel testimone resistente si è manifestata la sporulazione, anche se in percentuale molto minore, va però sottolineato che le condizioni erano abbastanza estreme.



Fig.21 Piantine in serra trapiantate in vaso Fig.22. Selezione piante resistenti



Fig.23-Lettura sintomi su singola pianta.

**Selezione materiali per resistenza a fusarium oxysporum sp. basilici:**

Dopo il lungo lavoro di inserimento di resistenze a peronospora e di valutazione delle linee migliori si è proceduto con l'introduzione della resistenza a *Fusarium oxysporum sp. basilici*. La scelta di lasciare per ultima questa attività è legata al fatto che il tipo di carattere è più semplice da introgredire avendo già alcune varietà commerciali dotate di tale resistenza ed essendo il processo di inoculazione più semplice da effettuare anche se lungo nella manifestazione dei sintomi, inoltre il controllo genico di tale carattere è più semplice da introgredire essendo di natura monogenica dominante. La scelta di ritardare gli incroci per resistenza a *Fusarium*. è stata quella di aspettare di avere materiale con resistenza a peronospora fissata e poi andare ad introgredire direttamente in questi materiali anche la resistenza a *Fusarium*.

Già nella fase di introduzione della resistenza a peronospora erano stati utilizzati materiali potenzialmente resistenti a *Fusarium*.

L'attività di introgressione della resistenza a *Fusarium oxysporum sp. basilici* è iniziata pertanto nell'autunno del 2019 avendo nel frattempo individuato alcune fonti di resistenza al fusarium ritenute attendibili. Queste varietà sono state incrociate con alcune piante di una linea resistente a peronospora.

La prova è stata condotta presso il laboratorio Verdelab.

L'8/11/2019 il personale di Sativa ha seminato direttamente 13 materiali, costituiti da F1 derivanti da incroci di varietà resistenti a fusarium con piante resistenti a peronospora, da varietà commerciali per verificare la fonte di resistenza migliore da utilizzare in futuri incroci e da piante provenienti dalla segregazione di ibridi ottenuti in precedenza utilizzando negli incroci per la resistenza a peronospora anche materiale resistente o tollerante al fusarium.

Le piante sono state ripicchettate e consegnate al Verdelab il 22 Novembre 2019.

Il 28/11/2019 il Verdelab ha proceduto all'inoculazione delle piante.

Il fungo era stato precedentemente rimoltiplicato su PDA. Una miscela di acqua e fungo è stata preparata per provvedere agli inoculi.

Il cubetto con le radici di basilico è stato tagliato a circa 1-2 cm per favorire l'assorbimento radicale del fungo; le piante sono state in immersione circa 10 minuti e successivamente sono state trapiantate in vaschette contenenti torba e sabbia ben bagnata.

Le vaschette sono state posizionate in sala di coltura a 25°C per circa un mese.

La rilevazione dei sintomi è stata condotta su singola pianta a livello visivo.

La scala di valutazione utilizzata è stata la seguente:

- 1- pianta con apice vegetativo compromesso e/o necrotizzato
- 2- pianta con sviluppo fortemente ridotto o gravi avvizzimenti, ingiallimenti e/o perdita delle foglie
- 3- pianta con sviluppo ridotto, leggeri ingiallimenti con o senza perdita delle foglie
- 4- pianta con sviluppo regolare con eventuale perdita di poche foglie.

L'attività di valutazione delle resistenze ha richiesto un tempo più lungo del previsto pertanto gli ibridi F1 resistenti che dovevano essere posti in segregazione per selezionare al loro interno singole piante con entrambe le resistenze piramidate (peronospora + fusarium), sono stati seminati a gennaio e la loro crescita necessaria per effettuare il secondo ciclo di analisi si completerà in primavera quando verranno eseguite le restanti analisi.

Tutto ciò ha portato ad analizzare nella prima fase un numero inferiore di materiali per resistenza a *Fusarium*. presso il laboratorio VERDELAB (15 contro i previsti 50) prevedendo di fare le analisi mancanti quando le piante avranno raggiunto il necessario sviluppo. I costi del laboratorio Verdelab per le analisi mancanti saranno in tal modo completamente a carico di SATIVA.

**La lista dei materiali testati, le foto degli stessi e gli esiti delle analisi effettuate sono riportati negli allegati 16-17-18 dell'az. 3.1**

### **3.1.2 Valutazione del materiale genetico per caratteri chemiotipici, composti aromatici. (Selezione materiali per contenuto in olii essenziali)**

Per dare valore aggiunto alle varietà commerciali, non è ormai più sufficiente lavorare sulla architettura della pianta, sulla resa, sulle resistenze. Diventa ormai imprescindibile operare anche sulla caratterizzazione e valutazione dei composti aromatici.

Da bibliografia è noto che sono molti i composti che entrano nell'aroma del basilico, e il rapporto tra questi composti va ad influire notevolmente sul risultato finale.

Ben noto però è che alcuni sono più caratteristici di altri e che alcuni composti invece ne vanno a peggiorare la percezione finale.

Due tipi di analisi sono state condotte, una qualitativa e una quantitativa.

L'analisi qualitativa ha consentito di rilevare tutti i composti presenti, mentre l'analisi quantitativa ha permesso di valutare il quantitativo assoluto di alcuni composti considerati i più rappresentativi dell'aroma del basilico.

Per le due tipologie di analisi sono stati utilizzati rispettivamente un Gascomatografo Agilent (Fig.23) e un Gascomatografo con rilevatore FID (Fig.23)



Fig.23. Gascomatografo modello Agilent HP 6890 (*Analisi qualitative*)



Fig.24. Gascomatografo con rilevatore FID (*Analisi quantitative*)

A fine 2018, in data 23/09/2018, è iniziata la verifica analitica sui composti aromatici.

L'analisi è stata condotta su singola pianta di diversi materiali in fase BC3F2, costituito dalle piante resistenti, recuperate da Agroinnova, su una singola progenie che a livello fenotipico risultava uniforme. Le analisi sono state effettuate in 4 sedute successive.

#### **Analisi 23/09/2018.**

I campioni erano contenuti in 25 sacchetti e all'interno di ogni sacchetto erano presenti circa una trentina di foglie.

La campionatura è stata omogenata in apposito omogenizzatore a lame, al fine di ottenere una purea uniforme.

Si è quindi passati alla pesata dell'omogenato in appositi vials di vetro da 20ml, che sono stati successivamente chiusi ermeticamente, per l'analisi con autocampionatore di spazio di testa in GC-MS.

L'analisi è stata effettuata su 21 campioni più 4 testimoni di riferimento. Il campionamento è stato effettuato direttamente da Sativa, raccogliendo 20 foglie su ogni singola pianta, cercando di selezionare foglie giovani possibilmente della stessa dimensione.

In questa prima fase si è preferito un tipo di analisi qualitativa anche per verificare la composizione aromatica generale dei materiali a disposizione, tenendo ben presenti come riferimento i 4 testimoni commerciali. I risultati delle analisi sono riportati **nell'allegato 19 Az.3.1.**

**Commento ai dati.** Dall'indagine delle componenti caratterizzanti il basilico si evince che i composti presenti in maggiore %, risultano essere alcuni di quelli indicati inizialmente dal cliente secondo il proprio storico.

Dall'elaborazione dei dati ottenuti, si può notare come la corrispondenza qualitativa dei composti rilevati nella prima fase di studio sia pressoché totale.

Il composto maggiormente caratterizzante il basilico, nelle condizioni sperimentali adottate risulta essere il **Linalool**, con una media % dei dati ottenuti pari al 48.1%; i campioni in cui risulta essere in maggiore quantità in confronto agli altri composti ottenuti sperimentalmente risultano essere: *N°15*, *N°16* e *N° 18*, con una % sul totale dei composti identificati >60%.

L'**Eucalyptol** presenta una media % dei dati ottenuti pari al 27%; i campioni in cui risulta essere in maggiore quantità in confronto agli altri composti ottenuti sperimentalmente risultano essere: *N°1*, *N°4* e *N° 23*, con una % sul totale dei composti identificati >36%.

L'**Estragol ed il T-Cadinol** non sono stati rilevati nelle condizioni sperimentali adottate; va comunque sottolineato, che fatta eccezione per il campione *N° 35* che presentava un 35% di estragolo sulla totalità dei composti ottenuti, le % dei due composti presi in considerazione risultavano comunque estremamente basse.

**Eugenol e Methyleugenol** Sui campioni analizzati si sono ottenute % estremamente basse sulla totalità dei composti ottenuti per il **Methyleugenol**, con il valore più elevato in termini % nel campione *N° 14* (4%).

L'**Eugenol** è stato rilevato in proporzioni variabili, che toccano % estremamente basse nei campioni *N° 22*, *N° 24* e *N° 25* con una % sul totale dei composti identificati <2%, e % elevate sul totale dei composti identificati (>19%) nei campioni *N° 1*, *N° 5* e *N° 12*.

#### **Analisi 26/10/2018.**

Sono stati consegnati 18 campioni, in fase BC3F2 sui quali effettuare uno Screening qualitativo dei composti aromatici valutati anche attraverso le analisi eseguite l'11/10/2018). Si sono applicate le stesse metodologie operative. I risultati sono riportati **nell'allegato 20 Az.3.1.**

**Commento ai dati.** Dall'elaborazione dei dati ottenuti si può notare come la corrispondenza qualitativa dei composti rilevati nella prima e seconda fase di studio sia pressoché totale.

Il composto maggiormente caratterizzante il basilico, nelle condizioni sperimentali adottate, risulta essere il **Linalool**. I campioni in cui risulta essere in maggiore quantità in confronto agli altri composti ottenuti sperimentalmente risultano essere: N°32, N°35 e N°41, con una % sul totale dei composti identificati >60%.

L'**Eucalyptol** presenta una media % dei dati ottenuti pari al 28%. I campioni in cui risulta essere in maggiore quantità in confronto agli altri composti ottenuti sperimentalmente risultano essere: N°28, N°30 e N°40, con una % sul totale dei composti identificati >30%.

Il **T-Cadinol** non è stato rilevato nelle condizioni sperimentali adottate. Sui campioni analizzati si sono ottenute % nulle sulla totalità dei composti ottenuti per il **Methyleugenol**, con l'unico valore riscontrato presente nel campione N° 43 (0.2%).

L'**Eugenol** è stato rilevato in proporzioni variabili, che rimangono al di sotto del 10% per tutti i campioni ad eccezione del campione N° 26, che presenta una % pari al 20.3%

Il campione che differisce maggiormente a livello di caratterizzazione rispetto a tutti gli altri sottoposti ad analisi risulta essere il N°43; esso infatti presenta un elevato quantitativo di **Estragolo**, pari al 80.1% sul totale dei composti identificati sperimentalmente.

#### **Analisi del 07/11/2019**

Sono stati analizzati 25 campioni allo scopo di associare all'analisi qualitativa una quantificazione assoluta in termini di concentrazione, espressa in mg/kg, con l'ausilio di un gascromatografo con rivelatore FID (rivelatore a ionizzazione di fiamma).

La campionatura è stata omogenata in apposito omogenizzatore a lame, al fine di ottenere una purea uniforme.

Si è passati quindi alla fase estrattiva degli analiti in esame mediante acetone, e successiva determinazione analitica in GC-FID.

#### **Commento ai dati.**

La determinazione gascromatografica con rivelatore a ionizzazione di fiamma ha permesso la determinazione dei 5 composti ricercati.

La quantificazione è avvenuta mediante interpolazione dati sulla curva di calibrazione ottenuta con STD analitici certificati.

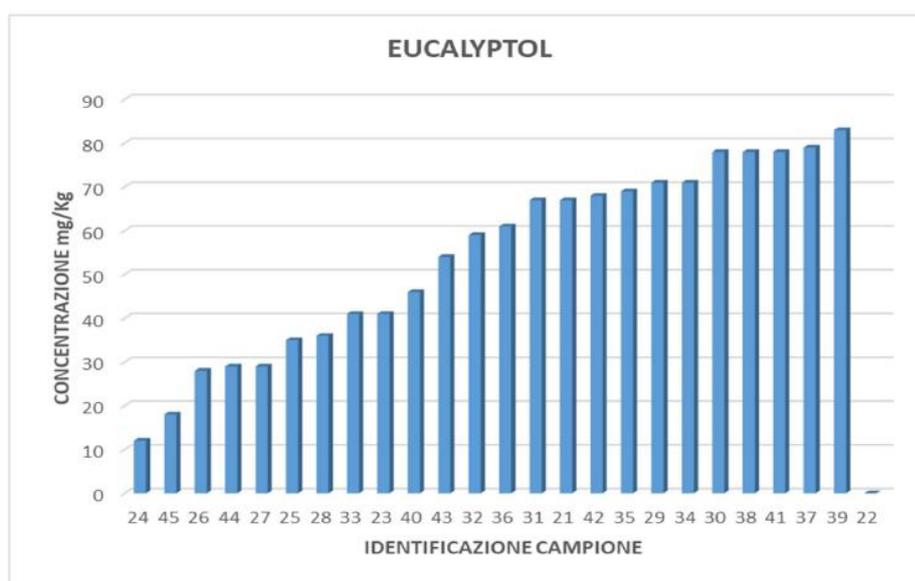
È stato definito un limite di quantificazione pari a 10 mg/Kg valutando la risposta in termini di rapporto segnale/rumore di ogni singolo analita.

campione	Eucalyptol (mg/Kg)	Linalool (mg/Kg)	Estragol (mg/Kg)	Methyleugenol (mg/Kg)	Eugenol (mg/Kg)
21	67	422	12	10	539
22	< 10	2350	22	< 10	31
23	41	606	12	< 10	462
24	12	495	< 10	< 10	358
25	35	1197	16	< 10	27
26	28	586	< 10	< 10	458
27	29	377	< 10	11	371
28	36	625	< 10	< 10	487
29	71	116	20	< 10	608
30	78	173	21	< 10	665
31	67	120	15	< 10	533
32	59	90	15	< 10	445
33	41	62	12	< 10	334
34	71	131	18	< 10	548
35	69	142	17	< 10	533
36	61	120	17	< 10	549
37	79	294	13	< 10	645
38	78	283	12	< 10	580
39	83	321	15	< 10	820
40	46	170	< 10	< 10	352
41	78	285	13	< 10	583
42	68	181	< 10	< 10	439
43	54	185	< 10	11	378
44	29	12	10	175	108
45	18	84	11	< 10	312

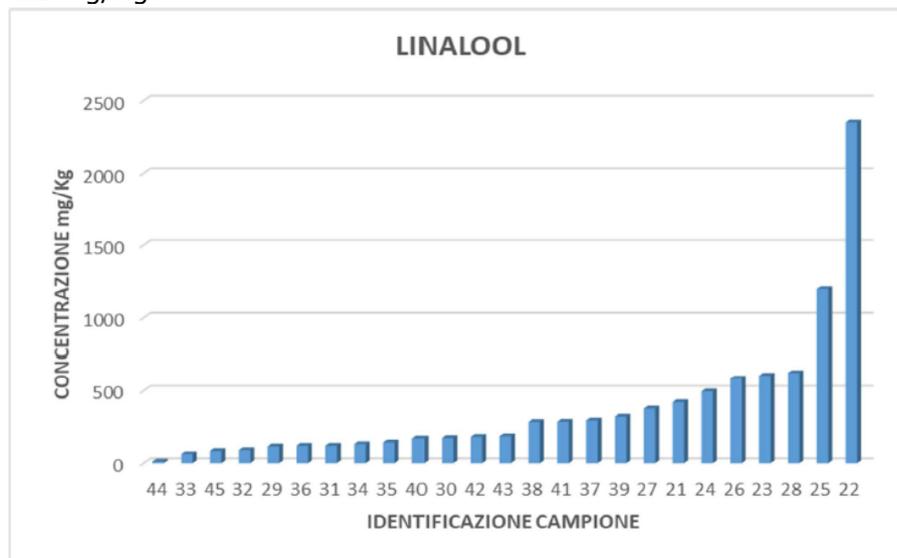
Tab.1 Risultati analitici

Dall'indagine delle concentrazioni assolute dei componenti caratterizzanti il basilico si evince una concentrazione maggiore dei componenti considerati di pregio (Linalool, Eugenol), rispetto ai componenti identificati come difetto (Eucalyptol, Estragol, Methyleugenol).

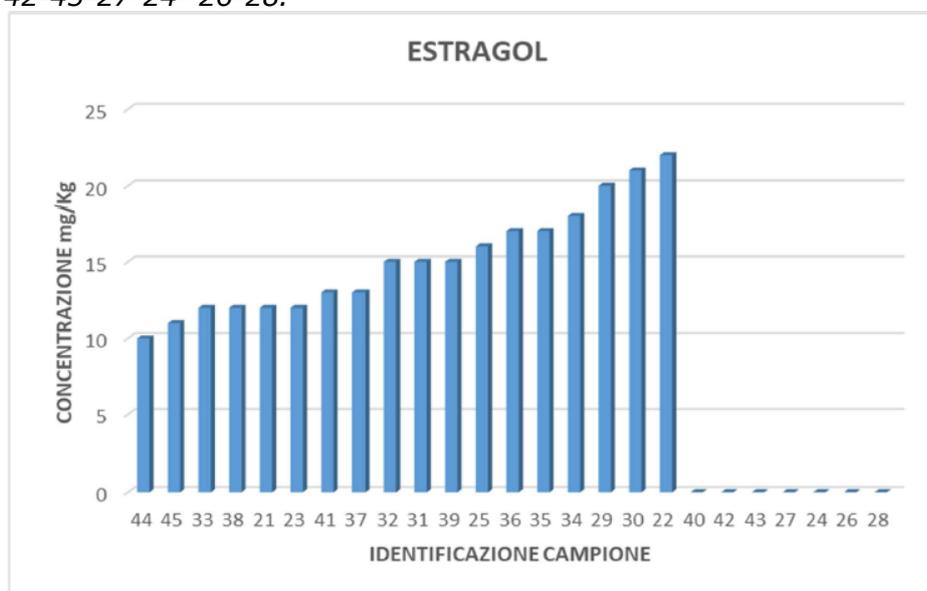
L'Eucalyptol è stato rilevato in maggior quantità nei campioni 39-37-41-38-30. Il valore più alto riscontrato è stato pari a 83 mg/Kg, con una valore medio di concentrazione sulle positività ottenute di 54mg/Kg. L'unico campione con Eucapyptol inferiore al limite di quantificazione risulta essere il 22.



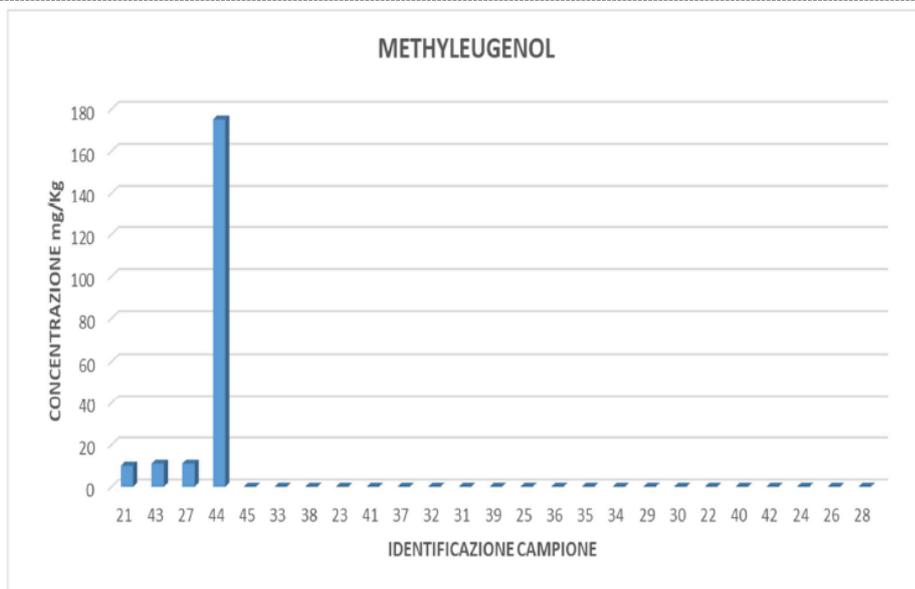
Il Linalool è il composto maggiormente caratterizzante la matrice in esame, in termini di concentrazione assoluta. I campioni con valori più elevati risultano essere il 22 ed il 25, con valori superiori ai 1000 mg/Kg. Più della metà dei campioni analizzati non supera la concentrazione di 500mg/Kg, con una media delle concentrazioni ottenute pari a 377 mg/Kg. Il campione con concentrazione più bassa risulta essere il 44, con un valore pari a 12 mg/Kg.



L'Estragolo è presente in concentrazioni estremamente basse rapportate al limite di quantificazione strumentale, con valori riscontrati nel range da 10 a 22 mg/Kg. I campioni in cui Estragolo è stato rilevato in valori inferiori al limite di quantificazione strumentale risultano essere 7, e nello specifico: 40-42-43-27-24- 26-28.

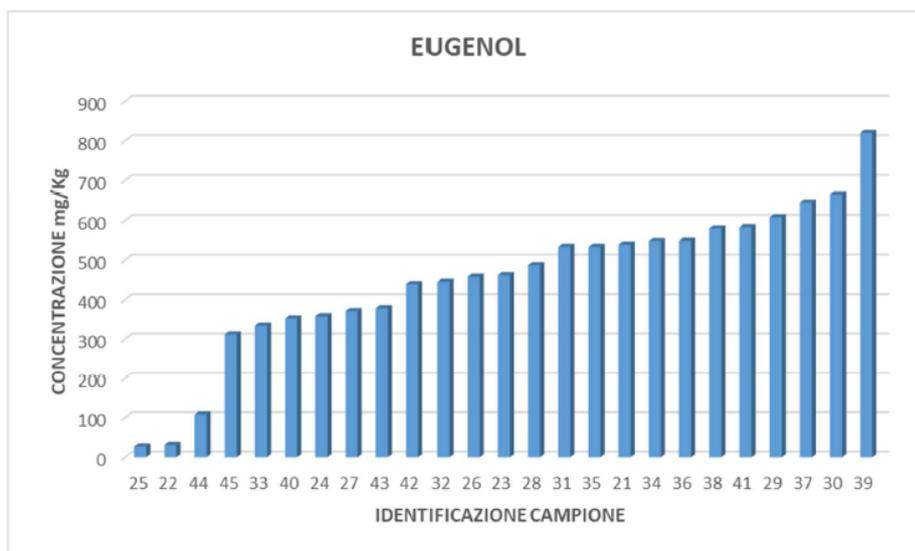


Il MethylEugenol è risultato essere inferiore al limite di quantificazione sulla maggior parte dei campioni sottoposti ad analisi, ad eccezione dei campioni: 21-43-27-44. Il valore più alto riscontrato, è risultato essere il campione 44 con una concentrazione pari a 175 mg/Kg.



L'Eugenolo è stato riscontrato in tutti i campioni analizzati; il valore più alto è relativo al campione 39 con una concentrazione pari a 820 mg/Kg. I campioni con valori inferiori a 100mg/Kg risultano essere il 25 ed il 22. La media delle concentrazioni rilevate è pari a 447 mg/Kg.

Nell'ultimo grafico infine si evidenzia il rapporto % dei 5 composti analizzati, tenendo in considerazione le concentrazioni riscontrate in mg/Kg.



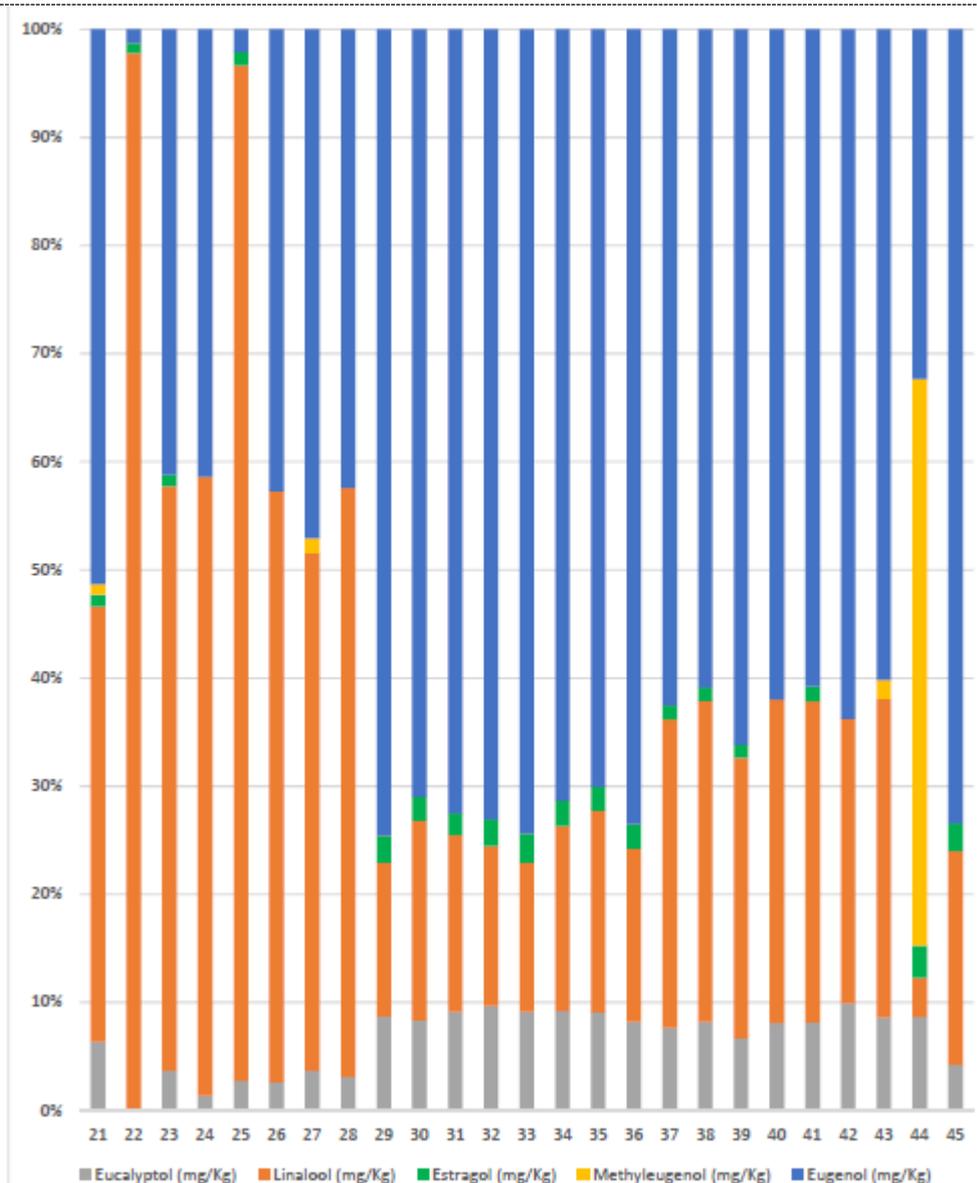


Grafico sulla % dei singoli composti.

### Analisi del 3/12/2019

Sono stati consegnati 12 campioni sui quali sono state effettuate entrambe le analisi sia qualitativa che quantitativa per verificare la riproducibilità dei risultati ottenuti.

Per quest'ultima fase del progetto sul basilico, si sono volute mettere in relazione le due tecniche analitiche strumentali utilizzate finora per la determinazione delle componenti aromatiche della matrice in esame, al fine di verificare se fosse possibile un confronto tra la tecnica qualitativa % e la quantificazione assoluta in mg/Kg dei 5 composti classificati come Pregio e come Difetto.

È stato necessario perciò eseguire sia una determinazione con autocampionatore con spazio di testa e conseguente tecnica GC-MS, sia una determinazione Gascromatografica con detector FID.

La campionatura, relativa a circa 60 foglie di basilico per campione, è stata omogenata in apposito omogenizzatore a lame, al fine di ottenere una purea uniforme.

Si è passati quindi alla fase di determinazione strumentale per ottenere uno screening qualitativo % dei composti, e ad una fase estrattiva degli analiti

caratterizzanti mediante acetone, per una determinazione quantitativa dei 5 composti selezionati:

- Eucalyptol
- Linalool
- Estragol
- Methyleugenol
- Eugenol

#### Commento ai dati.

La determinazione gascromatografica tramite autocampionatore con spazio di testa e la successiva rilevazione tramite spettrometria di massa, ha permesso, nelle condizioni sperimentali adottate, la identificazione di alcuni dei 32 composti rilevati negli studi precedenti. I valori riportati nella **Tabella AII.21 Azione 3.1** sono espressi come percentuale sul totale dei composti identificati. In grassetto sono riportati i composti considerati come maggiormente caratterizzanti, con colorazione arancione per i composti di difetto, e verde per quelli di pregio.

La determinazione gascromatografica con rivelatore a ionizzazione di fiamma ha permesso la quantificazione dei 5 composti ricercati.

La quantificazione è avvenuta mediante interpolazione dati sulla curva di calibrazione ottenuta con STD analitici certificati.

E' stato definito un limite di quantificazione pari a 10 mg/Kg valutando la risposta in termini di rapporto segnale/rumore di ogni singolo analita.

In "Tabella 2 - Quantificazione in mg/Kg" sono riportati i valori riscontrati in termine di concentrazione espressa in mg/Kg:

Campione	Eucalyptol (mg/Kg)	Linalool (mg/Kg)	Estragol (mg/Kg)	Methyleugenol (mg/Kg)	Eugenol (mg/Kg)
<b>1</b>	104	590	23	11	888
<b>2</b>	135	737	23	13	965
<b>3</b>	84	213	21	11	778
<b>4</b>	124	666	25	12	1105
<b>5</b>	179	1130	42	12	1290
<b>6</b>	341	1159	47	13	1806
<b>7</b>	264	1307	47	14	1553
<b>8</b>	52	263	19	11	775
<b>9</b>	109	187	13	18	684
<b>10</b>	116	629	22	13	126
<b>11</b>	120	483	23	16	1029
<b>12</b>	76	654	25	11	258

Tabella 2 - Quantificazione in mg/Kg"

Dall'indagine delle concentrazioni assolute dei componenti caratterizzanti il basilico si evince una concentrazione maggiore dei componenti considerati di pregio (Linalool, Eugenol), rispetto ai componenti identificati come difetto (Eucalyptol, Estragol, Methyleugenol). In seguito alcune considerazioni mettendo in relazione le % ottenute qualitativamente a livello di screening, con le quantificazioni in mg/Kg:

**Eucalyptol:** I campioni 8-12-1-5 sulla % totale dei picchi ottenuti cromatograficamente, hanno evidenziato una % più bassa rispetto ai 12 campionamenti ( < 20% ); le quantificazioni più basse si sono ottenute nei campioni 8 e 12 con valori < 80mg/Kg. I campioni con % più alta, sono stati

rispettivamente il 3-6-9 con valore > 25% sul totale dei picchi ottenuti sul cromatogramma; nella quantificazione assoluta i campioni 6 e 7 sono risultati i più elevati con valori >260 mg/Kg.

**Linalool:** I campioni 3-8-9-11 hanno evidenziato una % di Linalool < 20%; gli stessi campioni, nella quantificazione assoluta, hanno evidenziato valori più bassi ottenuti sui 12 campionamenti, ovvero < 500 mg/Kg. Non si ha lo stesso confronto a livelli alti di contrazione, poiché i campioni 1 -2 hanno la % in screening più elevata (> 30% ), mentre per la quantificazione in mg/Kg i campioni più alti risultano il 5-6-7 con valori >1100 mg/Kg.

**Estragol:**

Questo composto non è stato apprezzato in Screening qualitativo in rapporto alla % ottenuta sull'intero cromatogramma. Per quanto riguarda la quantificazione in mg/Kg, si sono ottenuti valori piuttosto bassi con concentrazioni più elevate nei campioni 6 - 7 (entrambi a 47 mg/Kg).

**Eugenol:** Nei campioni 10 e 12 si sono ottenuti % in Screening < 3%; negli stessi campioni la quantificazione rilevata in mg/Kg è stata < 300 mg/Kg, la più bassa dell'intero batch analitico. Nei campioni 9-3-8 si sono ottenute le % in Screening più elevate con valori > 20%, mentre per la quantificazione in mg/Kg i campioni con la concentrazione più alta sono risultati il 5 ed il 7 con valori > 1250mg/Kg.

**Methyleugenol:** Gli unici campioni con risultato positivo in termini di % sul totale dei composti ottenuti sono stati il 9 - 10 -11; per le quantificazioni in mg/Kg i valori sono relativamente bassi ed inferiore a 20mg/Kg.

Quello che si evince dal confronto tra le due tecniche analitiche, è che per diversi composti analizzati vi è correlazione tra le % ottenute e le concentrazioni in mg/Kg quando si tratta di basse concentrazioni degli analiti.

A livelli alti di concentrazione questa corrispondenza non è così ripetibile, poiché la quantificazione in mg/Kg consente di evidenziare la reale concentrazione del composto analizzato, rispetto allo Screening qualitativo che si basa su specifiche condizioni analitiche adottate.

Lo Screening % consente certamente di ottenere una visione globale delle 32 componenti, ed è qualitativamente più ampia come monitoraggio.

La quantificazione in mg/Kg risultata invece essere particolarmente interessante per focalizzare le minori e maggiori concentrazioni dei composti caratterizzanti la matrice in esame.

**Considerazioni finali sull'attività svolta nell'ambito della sub azione 3.1**

In fase di programmazione dell'attività è stato deciso di organizzare il lavoro seguendo un ordine ben preciso.

Prima ci si è focalizzati sulla problematica più complessa e dai risultati meno certi, cioè l'inserimento della resistenza a *Peronospora belbahrii*.

Quando il progetto è incominciato nel 2018 eravamo già ad una fase di reincrocio BC1F1, questo ha favorito il raggiungimento dei risultati, inoltre l'azienda aveva investito in sale di coltura con luci altamente tecnologiche a led e impianto di condizionamento che regolano sia la temperatura che l'umidità; questo ha consentito di effettuare fino a tre cicli produttivi l'anno, altrimenti comunemente il basilico nei nostri areali riesce a concludere solo 1 ciclo/anno.

Và inoltre sottolineata la notevole esperienza di Agroinnova che avevamo scelto come laboratorio al quale affidare l'esecuzione dei test di resistenza, infatti proprio il Team di Patologia diretto dal prof. Garibaldi et. al aveva identificato il fungo per primo e la Dr.ssa Giovanna Gilardi, che ha seguito tutte le inoculazioni e letture dei risultati, aveva una notevole esperienza sul patogeno. Questi fattori hanno consentito di arrivare alla fine del progetto con una serie di materiali in fase BC3F3-BC4F3-BC3F4-BC3F5 che sono nello step finale di valutazione per identificare in quale di questi la resistenza è fissata in omozigosi, il che significa che in fase di inoculazione tutte le piante rispondono ugualmente come resistenti.



Un altro punto di criticità è stato il periodo dell'anno in cui venivano effettuate le prove, per accelerare i tempi si è cercato di lavorare in continuo durante tutto l'anno, evitando le inoculazioni solo tra novembre e gennaio; però si è visto che la manifestazione del sintomo ed il buon esito dei risultati era particolarmente evidente in alcuni periodi, da marzo a settembre; a volte si è dovuto procedere a molteplici inoculazioni per avere dei risultati chiari.

Per quanto riguarda l'analisi sugli olii, dalla analisi qualitativa dei composti è emerso che nei materiali saggiati sono stati riscontrati 32 composti. Anche se il parentale donatore aveva un profilo assai differente rispetto al classico basilico genovese, nelle generazioni saggiate, tutti gli individui rispecchiavano il profilo dei testimoni, quindi si può stabilire che nei vari reincroci si è recuperato non solo il fenotipo esterno del ricorrente, ma anche la composizione aromatica.

Nella successiva analisi quantitativa invece il lavoro è stato focalizzato sulla quantificazione assoluta dei composti di pregio e difetto:

- Eugenolo
- Linalolo
- Estragolo
- Eucaliptolo
- Methyleugenolo

In questo tipo di analisi con soddisfazione si è confermato che il composto che più compromette la qualità dell'aroma del basilico, l'Estragolo, è assente o presente solo in tracce.

Mentre altri composti di pregio, linalolo ed eugenolo sono presenti in quantità elevate. Questa analisi ci ha consentito anche di identificare e selezionare all'interno di una famiglia le piante migliori come rapporto e composizione aromatica.

**Grado di raggiungimento o degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate**

**Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.**

Gli obiettivi che ricordiamo erano rappresentati da linee di basilico con maggiori composti positivi, riduzione di componenti negativi, valutati per resistenza a peronospora e fusarium e utilizzabili tal quale per avviarne la moltiplicazione o destinabili ad ulteriori piani d'incrocio sono stati raggiunti avendo avuto la possibilità di testare numerose linee fra le quali sono state selezionate quelle più interessanti per resistenza a peronospora e per caratteristiche aromatiche. Sono state riscontrate alcune criticità nella lettura della resistenza, in quanto la risposta al patogeno non era netta, presente assente, ma sono apparse molteplici risposte intermedie, oltre che a casi di spore anormali e ingiallimenti non riconducibili al patogeno, ciò ha confermato un tipo di controllo della resistenza poligenico dominante. Il protocollo di lavoro ha dovuto prevedere maglie un po' larghe nelle prime fasi di selezione, mentre in fase finale la lettura dei risultati è stata molto severa, e sono stati eliminati tutti i casi di risposte intermedie.

Altro elemento non del tutto previsto sono stati i tempi lunghi necessari per la valutazione di linee con introduzione delle resistenze a *fusarium*. Questo ha

	portato ad analizzare un numero inferiore di piante per resistenza a fusarium presso il laboratorio VERDELAB che invece di 50 analisi ne ha realizzate solo 15. Le restanti analisi saranno eseguite sempre dal laboratorio Verdelab nella primavera 2020, quando le piante già seminate saranno cresciute. I costi delle analisi mancanti verranno sostenuti da Sativa.
--	--

<b>Azione</b>	<b>3.2 - Implementazione all'interno della piattaforma "Mappatura sementi" di applicazioni per gestire DSS, monitoraggi del territorio e dello sviluppo culturale e archiviazione dati</b>
<b>Unità aziendale responsabile</b>	<b>Agronica Group srl</b>
<b>Descrizione delle attività</b>	<p>Molte aziende agricole e ditte sementiere aderenti al progetto della filiera sementi già condividono le problematiche della mappatura nelle aree di moltiplicazioni al fine degli adempimenti della L.R.2/98 e che quindi hanno già un archivio condiviso dove vengono censite le aziende in cui vengono moltiplicate le sementi per diverse tipologie di colture: barbabietola da zucchero, bietola da orto, cavolo, ravanello, cetriolo, zucchini, cipolla ed altre. Avendo le ditte preventivamente indicato appezzamenti o aree di moltiplicazione per ottemperare ai vincoli di isolamento, sono state associate a tale sub-strato informativo geo-localizzato indicazioni agro-meteo dedicate e puntuali, nonché un collegamento ad algoritmi per la stima di potenziali insorgenze di problematiche fitosanitarie (crittogame e fitofagi) sito-specifiche e puntuali per la coltura presente in campo. Sono stati inseriti, sulla stessa piattaforma integrata del software "Mappatura sementi", diversi innovativi supporti informatizzati rivolti ai tecnici ed alle aziende agricole della filiera per migliorare la conoscenza di fattori e criticità produttive (stress fitosanitari, stress idrici, stato del suolo, altro..). Tali supporti consentiranno poi ai tecnici di comunicare con le aziende anche in forma digitale indicazioni tecniche e prescrizioni su difesa, condizioni meteorologiche significative e eventuali turni irrigui di supporto o di soccorso che consentono un uso ottimizzato di input di acqua e prodotti fitosanitari.</p> <p>Inoltre, sul sistema di geo-localizzazione condiviso, sono state integrate diverse nuove informazioni univoche al fine di migliorare il processo di tracciabilità delle produzioni ed ottimizzarne le fasi di entrata nei magazzini di lavorazione/essiccazione/confezionamento.</p> <p>Nello specifico sono state effettuate implementazioni della piattaforma di mappatura sementi in forma di supporti alle decisioni (DSS) delle nuove funzioni sviluppate ad hoc per le colture di interesse in relazione ad indicazioni fornite dagli studiosi con cui Agronica collabora, in relazione alle conoscenze scientifiche/tecnologiche disponibili. L'attività è stata suddivisa nelle seguenti linee di lavoro:</p> <p>a. <b>Implementazione del sistema attuale di mappatura con l'aggiunta e la gestione di nuovi parametri di archivio</b> necessari alle ditte per una puntuale e ottimizzata gestione della tracciabilità di campo (campo lotto, campo densità semina, campo codice interno della partita, ecc.) con l'obiettivo di gestire meglio la fase di entrata ed accettazione di magazzino post-raccolta.</p>

- b. **Integrazione sulla infrastruttura di "mappatura sementi" dei dati provenienti dalla rete agro-meteo ARPAE** al fine di un loro utilizzo per la corretta applicazione di modelli previsionali e per calcolare le sommatorie delle unità termiche ed altri valori significativi in corso di stagione per eventuali confronti anche con dati raccolti in stagioni diverse;
- c. **Implementazione all'interno del portale mappatura di algoritmi e funzioni di avvertimento** (modello di previsione - DSS) dinamico (push) ed in grado di stimare la possibilità di insorgenza e sviluppo di malattie crittogamiche sulla **barbabietola da zucchero** (cercosporiosi, mal bianco e peronospora della barbabietola da seme/zucchero). In relazione al modello matematico per la cercosporiosi della barbabietola (e degli altri patogeni sopra indicati) è stato inserito quello maggiormente diffuso e pubblico utilizzato anche dalla regione Emilia Romagna e sono stati realizzati output a 3 livelli: tabellare, grafico e su mappa. Il modello simula l'area fogliare colpita comprese le infezioni latenti che compariranno al termine del periodo di incubazione e calcola la percentuale di area fogliare ammalata sulle foglie di barbabietola da zucchero, ossia lo sviluppo nel tempo delle epidemie. Usando i dati meteorologici verrà calcolato un tasso giornaliero che rappresenta il tasso di crescita della gravità di malattia, espresso come infezioni sia visibili (area necrotica) che latenti (il micelio si sviluppa nel tessuto fogliare senza che il tessuto stesso manifesti ancora sintomi di malattia).  
Il modello simula l'andamento della malattia dal giorno di comparsa dei primi sintomi fino al giorno attuale ed è in grado di prevedere l'andamento futuro, per un periodo di giorni pari alla durata del periodo di incubazione della malattia (circa 10 giorni).  
A partire dal giorno di comparsa (rilevato in campo o calcolato con il modello) il modello genera una curva di sviluppo della malattia.  
Il modello è in grado di fornire una previsione dello sviluppo futuro della malattia per un numero di giorni pari all'ultimo periodo di incubazione.
- d. **Elaborazione indici vegetativi (NDVI) e di crescita area fogliare (LAI)** in base alla georeferenziazione (poligono) dell'appezzamento oggetto della moltiplicazione. E' stato realizzato un interfacciamento dinamico con le immagini satellitari nelle varie frequenze utili (infrarosso/NIR) [origine della fornitura copernicus/Sentinel-2/ESA]. Tali immagini consentono di sperimentare un nuovo approccio all'assistenza tecnica (*remote sensing*), infatti le informazioni desumibili da remoto sull'appezzamento attraverso l'elaborazione dinamica delle immagini satellitari possono fornire quel livello minimo di presidio e monitoraggio delle principali criticità colturali (stress idrici, indici di accrescimento fogliare, stato della clorofilla, eventuali zone intra-appezzamento con andamento difforme, ecc.) e quindi prevenire talune visite in campo o quanto meno limitarle magari alle sole fasi fenologiche o epoche di accrescimento stagionali di particolare criticità.
- e. **Implementazione sul portale "mappatura sementi" delle chiamate /interrogazioni dinamiche del sistema** e modello DSS di irrinet/irriframe in base alla georeferenziazione degli appezzamenti mappati (poligoni) per il calcolo delle necessità e prevenzione di eventuali stress idrici delle colture in campo.

#### **Stato dell'arte della piattaforma mappatura ante-implementazioni del progetto "Innova seme"**

Al fine di inquadrare al meglio l'entità e la qualità del lavoro implementativo svolto sulla piattaforma della mappatura sementi grazie allo svolgimento del progetto "InnovaSeme" corre la necessità ed opportunità di illustrare rapidamente la consistenza funzionale e le interfacce di gestione della stessa piattaforma prima dell'avvio dei lavori dell'implementazione nuova. E' semplice ed intuitivo per chiunque comprendere quanto sia cambiata l'impostazione d'interfaccia e quante siano state le modifiche evolutive e nuove funzionalità

introdotte. La prima modifica consta in un cambio delle fondamenta stesse dell'interfaccia: siamo passati da un'interfaccia sviluppata per un uso esclusivo da browser Internet explorer 10 e 11 non adattativa e non responsiva ad una nuova interfaccia di tipo responsivo ed adattiva che permette di operare ed utilizzare la piattaforma di mappatura anche su browser di ultima generazione (chrome, safari, mozilla, edge, ecc.) e soprattutto su tutte le tipologie di device: smartphone e tablet compresi .



Fig: 1 – la figura sopra riporta la pagina di login del sistema mappatura nella versione precedente (non adattiva e non responsiva).



Fig: 2 – la figura sopra riporta la pagina di dashboard del sistema mappatura nella versione precedente (non adattiva e non responsiva) e senza la sezione di avvisi e messaggi tra ditte (gestione comunicazioni automatiche).

utente: Agronica

Carica Le Configurazioni

Designazione	Specie	Validità_Inizio	Validità_Fine	Modifica	Cancella
Bietola 2012/2013	Barbafattoria da zucchero - Monogerm. Barbafattoria da zucchero - Purgeme. Barbafattoria da Fraggio - Monogerm e radice gialla. Barbafattoria da Fraggio - Monogerm e radice rossa. Barbafattoria da Fraggio - Purgeme e radice bianca. Barbafattoria da Fraggio - Purgeme e radice gialla. Barbafattoria da Fraggio - Purgeme e radice rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice patto rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice patto rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice torcia rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice torcia rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice lunga rossa. Bietola da coste - Costa bianca e foglia bionda. Bietola da coste - Costa verde e foglia bionda. Bietola da coste - Costa verde e foglia rossa.	01/09/2012	31/08/2013		
Carcio 2012	Carcio da Fraggio - Carcio da Fraggio. Carcio da Fraggio - Carcio da Fraggio (Hybrid). Carcio incinato (Ineri) - Carcio Lacinati. Carcio incinato (Ineri) - Carcio Lacinati (Hybrid). Cauliflora - Cauliflora. Cauliflora - Cauliflora (Hybrid). Carcio broccolo - Broccolo a Palla. Carcio broccolo - Broccolo a Palla (Hybrid). Carcio broccolo - Broccolo a Germoglio (Hybrid). Carcio di Bruxelles - Carcio di Bruxelles. Carcio di Bruxelles - Carcio di Bruxelles (Hybrid). Carcio cappuccio bianco - Cappuccio a Palla. Carcio cappuccio bianco - Cappuccio a Palla (Hybrid). Carcio raga - Gongioides Raga Bianco. Carcio raga - Gongioides Raga Bianco (Hybrid). Carcio raga - Gongioides Raga Blu. Carcio raga - Gongioides Raga Blu (Hybrid). Carcio verza. Carcio verza - Carcio verza (Hybrid).	01/07/2012	31/01/2013		
Bietola 2011/2012	Barbafattoria da zucchero - Monogerm. Barbafattoria da zucchero - Purgeme. Barbafattoria da Fraggio - Monogerm e radice bianca. Barbafattoria da Fraggio - Monogerm e radice gialla. Barbafattoria da Fraggio - Monogerm e radice rossa. Barbafattoria da Fraggio - Purgeme e radice bianca. Barbafattoria da Fraggio - Purgeme e radice gialla. Barbafattoria da Fraggio - Purgeme e radice rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice patto rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice patto rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice torcia rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice torcia rossa. Bietola rossa (da Orto) - Radice lunga rossa. Bietola da coste - Costa bianca e foglia bionda. Bietola da coste - Costa verde e foglia bionda. Bietola da coste - Costa verde e foglia rossa.	01/09/2011	31/08/2012		
Carcio 2013	Carcio - Carcio. Carcio - Carcio (Hybrid). Carcio - Medio. Carcio - Medio (Hybrid). Carcio - Lungo. Carcio - Lungo (Hybrid).	01/02/2013	31/12/2013		
Zucchini 2013	Zucchini - Lungo scuro (topologia americana). Zucchini - Lungo scuro (topologia americana) (Hybrid). Zucchini - Lungo verde chiaro. Zucchini - Lungo verde chiaro (Hybrid). Zucchini - Lungo Striato. Zucchini - Lungo Striato (Hybrid). Zucchini - Lungo Bianco. Zucchini - Lungo Bianco (Hybrid). Zucchini - Rotondo Verde Scuro. Zucchini - Rotondo Verde Scuro (Hybrid). Zucchini - Rotondo verde chiaro. Zucchini - Rotondo verde chiaro (Hybrid).	13/02/2013	31/12/2013		
Carcio 2014	Carcio da Fraggio - Carcio da Fraggio. Carcio da Fraggio - Carcio da Fraggio (Hybrid). Carcio incinato (Ineri) - Carcio Lacinati. Carcio incinato (Ineri) - Carcio Lacinati (Hybrid). Cauliflora - Cauliflora. Cauliflora - Cauliflora (Hybrid). Carcio broccolo - Broccolo a Palla. Carcio broccolo - Broccolo a Palla (Hybrid). Carcio broccolo - Broccolo a Germoglio (Hybrid). Carcio di Bruxelles - Carcio di Bruxelles. Carcio di Bruxelles - Carcio di Bruxelles (Hybrid). Carcio cappuccio bianco - Cappuccio a Palla. Carcio cappuccio bianco - Cappuccio a Palla (Hybrid). Carcio raga - Gongioides Raga Bianco. Carcio raga - Gongioides Raga Bianco (Hybrid). Carcio raga - Gongioides Raga Blu. Carcio raga - Gongioides Raga Blu (Hybrid). Carcio verza. Carcio verza - Carcio verza (Hybrid).	01/07/2013	29/07/2014		
Carcio 2014	Carcio - Carcio. Carcio - Carcio (Hybrid). Carcio - Medio. Carcio - Medio (Hybrid). Carcio - Lungo. Carcio - Lungo (Hybrid).	01/02/2014	31/12/2014		
Zucchini 2014	Zucchini - Lungo scuro (topologia americana). Zucchini - Lungo scuro (topologia americana) (Hybrid). Zucchini - Lungo verde chiaro. Zucchini - Lungo verde chiaro (Hybrid). Zucchini - Lungo Striato. Zucchini - Lungo Striato (Hybrid). Zucchini - Lungo Bianco. Zucchini - Lungo Bianco (Hybrid). Zucchini - Rotondo Verde Scuro. Zucchini - Rotondo Verde Scuro (Hybrid). Zucchini - Rotondo verde chiaro. Zucchini - Rotondo verde chiaro (Hybrid).	13/02/2014	31/12/2014		
Carcio 2015	Carcio da Fraggio - Carcio da Fraggio. Carcio da Fraggio - Carcio da Fraggio (Hybrid). Carcio incinato (Ineri) - Carcio Lacinati. Carcio incinato (Ineri) - Carcio Lacinati (Hybrid). Cauliflora - Cauliflora. Cauliflora - Cauliflora (Hybrid). Carcio broccolo - Broccolo a Palla. Carcio broccolo - Broccolo a Palla (Hybrid). Carcio broccolo - Broccolo a Germoglio (Hybrid). Carcio di Bruxelles - Carcio di Bruxelles. Carcio di Bruxelles - Carcio di Bruxelles (Hybrid). Carcio cappuccio bianco - Cappuccio a Palla. Carcio cappuccio bianco - Cappuccio a Palla (Hybrid). Carcio raga - Gongioides Raga Bianco. Carcio raga - Gongioides Raga Bianco (Hybrid). Carcio raga - Gongioides Raga Blu. Carcio raga - Gongioides Raga Blu (Hybrid). Carcio verza. Carcio verza - Carcio verza (Hybrid).	01/07/2014	30/06/2015		
Ravanella 2015	Ravanella - Mantova. Ravanella - Mantova (Hybrid). Ravanella - Orefina. Ravanella - Orefina (Hybrid). Ravanella - Major Rotondo Bianco. Ravanella - Major Rotondo Bianco (Hybrid). Ravanella - Major Tondo Nero. Ravanella - Major Tondo Nero (Hybrid). Ravanella - Major Lungo Nero. Ravanella - Major Lungo Nero (Hybrid). Ravanella - Macrocarpa da Radice Lungo Bianco. Ravanella - Macrocarpa da Radice Lungo Bianco (Hybrid). Ravanella - Macrocarpa da Radice Lungo Rosso. Ravanella - Macrocarpa da Radice Lungo Rosso (Hybrid). Ravanella - Macrocarpa da Radice Lungo Rosso S.P.B. Ravanella - Macrocarpa da Radice Lungo Rosso S.P.B. (Hybrid). Ravanella - Radicula Ovale Rosso. Ravanella - Radicula Ovale Rosso (Hybrid). Ravanella - Radicula Ovale Rosso S.P.B. Ravanella - Radicula Ovale Rosso S.P.B. (Hybrid). Ravanella - Radicula Lungo Rosso. Ravanella - Radicula Lungo Rosso (Hybrid). Ravanella - Radicula Lungo Rosso S.P.B. Ravanella - Radicula Lungo Rosso S.P.B. (Hybrid). Ravanella - Radicula Lungo Rosso S.P.B. Ravanella - Radicula Lungo Rosso S.P.B. (Hybrid). Ravanella - Radicula Lungo Rosso S.P.B. Ravanella - Radicula Lungo Rosso S.P.B. (Hybrid).	01/10/2015	30/09/2016		

Nuovo

Fig: 3 – la figura sopra riporta la pagina di configurazione e gestione apertura/chiusura sportelli (non adattiva e non responsiva) .

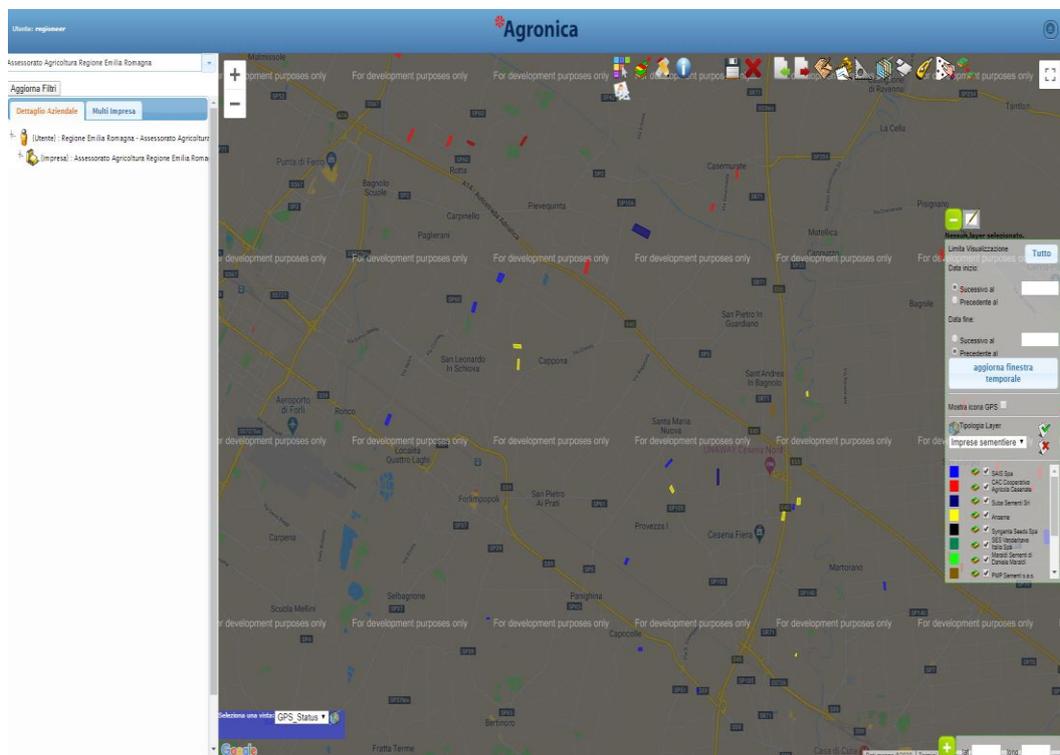


Fig: 4/5 – le figure sopra/sotto riportano la pagina di visualizzazione ed edit cartografica (gis) del sistema mappatura nella versione precedente (non adattiva e non responsiva) e priva di tante utility inserite con le nuove implementazioni (tra queste la visualizzazione multi-layer e multi-sfondo per visualizzazione immagine satellitare sentinel 2.

The screenshot displays the Agronica web application interface, which is used for managing agricultural data. The top section features a Google Maps interface with a data entry pop-up for a specific plot. Below the map are several data entry panels for 'Infezione', 'Preventivi di Semina', and 'Semine Effettive'. At the bottom, a table lists the planting records.

**Map Data Entry Pop-up:**

Codice: 172  
 Sup: 1,0276  
 Sup. (Google): 1,0276  
 Indirizzo: Via Bagnoli - Pievesestina - 47023 -  
 Specie Cavolo cappuccio bianco  
 Varieta: Alta  
 Tipologia: Cappuccio a Palla  
 Validita Inizio: 31/07/2012  
 Validita Fine: 20/11/2012

**Table: Ordinamento per:**

Referente	Indirizzo	Comune	Prov.	Indirizzo Apposta	Specie Vegetale	Tipologia
✓ Anema	Via Pincello	CESENA	FC	Via Pincello - 47023 -	Cavolo cappuccio bianco	Cappuccio a Palla
✓ Anema	Via Trivio Eros	RAVENNA	RA	Via Trivio Eros - 48100 -	Cavolo cappuccio bianco	Cappuccio a Palla
✓ Anema	Via Ca' Palazzo 10	CORSICO	RN	Via Ca' Palazzo 10 - 47940 -	Cavolo cappuccio bianco	Cappuccio a Palla (ibrido)
✓ Anema	Via Ca' Palazzo 10	CORSICO	RN	Via Ca' Palazzo 10 - 47940 -	Cavolo cappuccio bianco	Cappuccio a Palla (ibrido)
✓ Anema	Via Cartha di San martino	CESENA	FC	Via Cartha di San martino - 47023 -	Cavolo cappuccio bianco	Cappuccio a Palla (ibrido)
✓ Anema	Via Caperna	BOCCIONE	RN	Via Caperna - 47030 -	Cavolo cappuccio bianco	Cappuccio a Palla (ibrido)

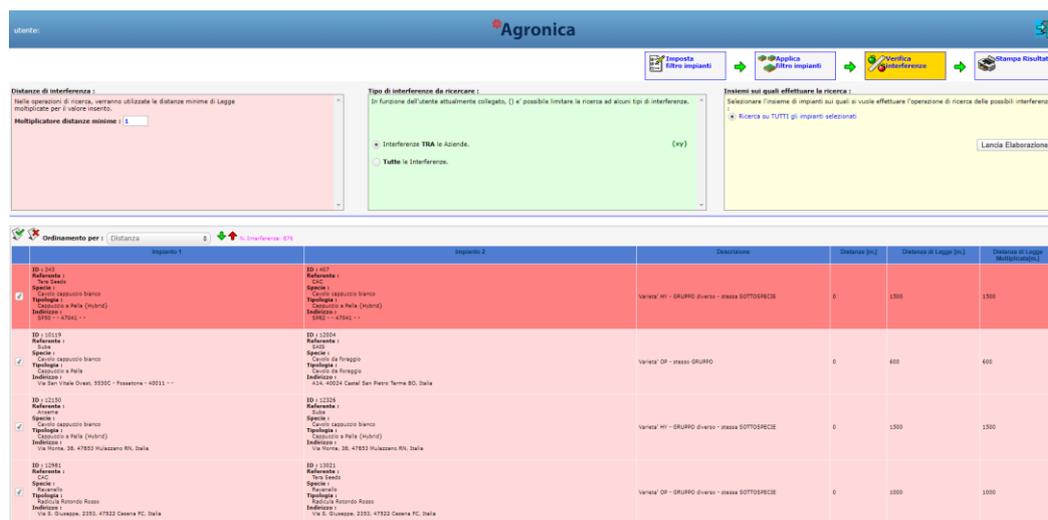


Fig. 6/7 – Le figure sopra prevedono la gestione di ricerca ed analisi delle distanze di isolamento e reportistica come previsto dalla L.R. 2/98.

## Risultati ottenuti

### A) Implementazione del sistema attuale di mappatura con l'aggiunta e la gestione di nuovi parametri di archivio

Il progetto InnovaSeme ha portato alla realizzazione di diverse innovazioni tecnologiche-informatiche di rilievo tra queste:

- Integrazione automatica accesso/consultazione ed elaborazione dati agrometeo Arpa sorgente quadranti std. GIAS;
- Integrazione di alcuni modelli previsionali DSS sulla stima dell'insorgenza principali crittogame della barbabietola da zucchero come cercosporiosi, mal bianco e peronospora della stessa;
- Integrazione di varie innovazioni di gestione dello sportello tra le quali: sistema di avviso ed avvertimento push su diversi canali comunicativi tra tutti i tecnici interessati delle ditte (email, video push), modifiche diffuse su interfacce pagine responsive ed adattive compatibili a tutti i device e multi-browser;
- Integrazione immagini satellitari Sentinel 2;
- Integrazione della stima/calcolo bilancio irriguo Irrinet;



Sistema di Mappatura e Gestione Isolamenti

USERNAME

PASSWORD

**ACCEDI**

Sito ottimizzato per chrome



Fig. 8 – Nuova pagina di login sviluppata in tecnologia adattiva e responsive;



Fig. 9 – Nuova pagina di menu principale/accesso per la navigazione sulla piattaforma nei suoi vari moduli di assistenza tecnica e dashboard completamente implementata in tecnologia adattiva e responsiva;

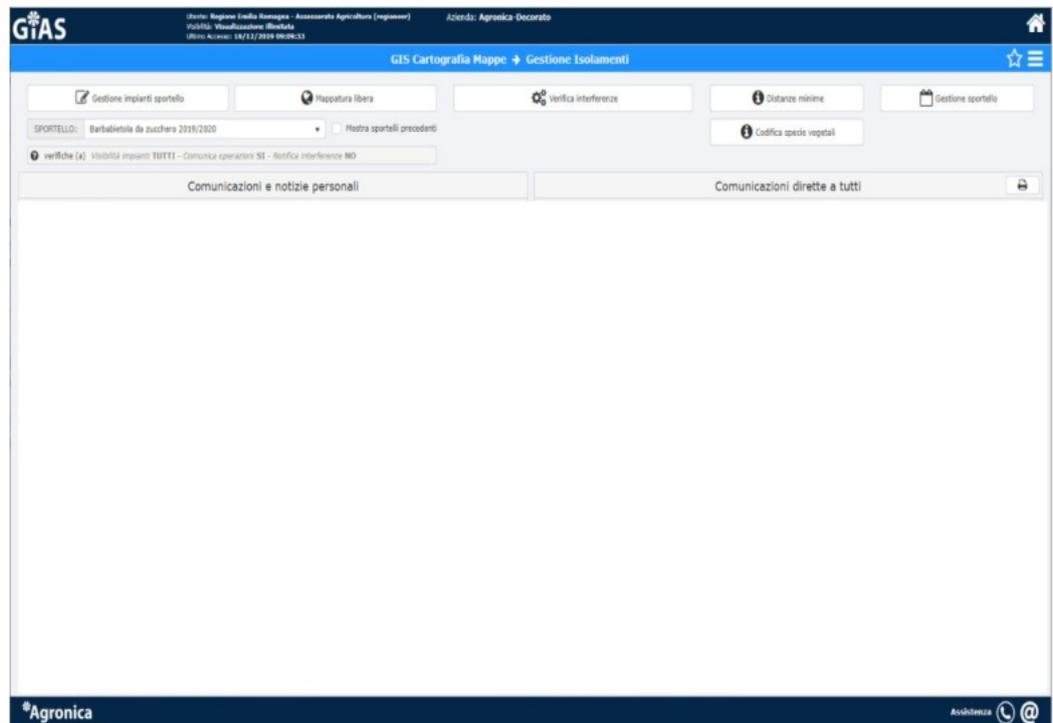


Fig. 10 – Nuova pagina di menu principale/accesso per la navigazione sulla piattaforma nei suoi vari moduli di assistenza tecnica e dashboard completamente implementata in tecnologia adattiva e responsiva;

Utente: Regione Emilia Romagna - Assessorato Agricoltura (regionee)  
 Visualizza: Visualizzazione illimitata  
 Ultimo Accesso: 18/02/2020 17:05:20

GIS Cartografia Mappe → Gestione Isolamenti

Aggiungi nuovo sportello

Operazioni	Sportello	Specie	Validità	
			Dal	Al
	Brassica Juncea primaverile 2020	Senape - Brassica Juncea, Senape - Brassica Juncea (Hybrid)	13/01/2020	30/06/2020
	Brassica rapa primaverile 2020	Rapa primaverile e autunnale - Brassica Rapa, Rapa primaverile e autunnale - Brassica Rapa (Hybrid)	13/01/2020	30/06/2020
	Cicoria primaverile 2020	Cicoria - Foglie Colorate, Cicoria - Foglie Colorate (Hybrid), Cicoria - Foglia Bianca, Cicoria - Foglia Bianca (Hybrid), Cicoria - Foglia Verd...	13/01/2020	30/06/2020
	Ravanello primaverile 2020	Ravanello - Maritimus, Ravanello - Maritimus (Hybrid), Ravanello - Oleifera, Ravanello - Oleifera (Hybrid), Ravanello - Major Rotondo Bia...	13/01/2020	30/06/2020
	Ravanello a semina autunnale 2020	Ravanello - Maritimus, Ravanello - Maritimus (Hybrid), Ravanello - Oleifera, Ravanello - Oleifera (Hybrid), Ravanello - Major Rotondo Bia...	13/09/2019	31/03/2020
	Segale 2020	Segale - Pre-base, Segale - Pre-base (Hybrid), Segale - Base, Segale - Base (Hybrid), Segale - Certificata, Segale - Certificata (Hybrid)	13/09/2019	31/03/2020
	Brassica Juncea aut. 2020	Senape - Brassica Juncea, Senape - Brassica Juncea (Hybrid)	13/09/2019	31/03/2020
	Brassica rapa aut. 2020	Rapa primaverile e autunnale - Brassica Rapa, Rapa primaverile e autunnale - Brassica Rapa (Hybrid)	13/09/2019	31/03/2020
	Barbabetola da zucchero 2019/2020	Barbabetola da zucchero - Monogerme, Barbabetola da zucchero - Plurigerme	04/09/2019	30/06/2020
	Cicoria aut. 2020	Cicoria - Foglie Colorate, Cicoria - Foglie Colorate (Hybrid), Cicoria - Foglia Bianca, Cicoria - Foglia Bianca (Hybrid), Cicoria - Foglia Verd...	19/08/2019	31/03/2020
	Bietola aut. (foraggio, coste, orto) 2020	Barbabetola da Foraggio - Monogerme a radice bianca, Barbabetola da Foraggio - Monogerme a radice gialla, Barbabetola da Foraggio ...	19/08/2019	31/03/2020
	Carota 2020	Carota - Lungo, Carota - Lungo (Hybrid), Carota - Mezza lunga, Carota - Mezza lunga (Hybrid), Carota - Rotonda, Carota - Rotonda (Hy...	19/08/2019	31/03/2020
	Cavolo 2020	Cavolo da foraggio - Cavolo da Foraggio, Cavolo da foraggio - Cavolo da Foraggio (Hybrid), Cavolo laciniato (=nero) - Cavolo Laciniato, ...	01/07/2019	30/06/2020
	Cipolla 2020	Cipolla - Bulbo giallo, Cipolla - Bulbo giallo (Hybrid), Cipolla - Bulbo giallo tondo, Cipolla - Bulbo giallo tondo (Hybrid), Cipolla - Bulbo ros...	01/07/2019	30/06/2020

Agronica Assistenza

Utente: Regione Emilia Romagna - Assessorato Agricoltura (regionee)  
 Visualizza: Visualizzazione illimitata  
 Ultimo Accesso: 18/02/2020 17:05:20

GIS Cartografia Mappe → Gestione Isolamenti

Aggiungi nuovo sportello

**Modifica sportello**

DESCRIZIONE: Barbabetola da zucchero 2019/2020    VALIDITÀ INIZIO: 04/09/2019    VALIDITÀ FINE: 30/06/2020

SPECIE VEGETALI ASSOCIATE: Barbabetola da zucchero X

+ Aggiungi nuovo elemento

Operazioni	Fase	Data inizio	Data fine	Visibilità impianti	Operazioni permesse	Comunica operazioni	Notifiche attive
	Inserimento preliminare (a)	04/09/2019	16/10/2019	Solo Interni	SI	No	No
	verifiche (a)	17/10/2019	29/01/2020	Tutti	SI	SI	No
	Aggiustamenti con verifiche (a)	30/01/2020	30/06/2020	Tutti	SI	SI	SI

OK    Annulla

Operazioni	Sportello	Specie	Validità	
			Dal	Al
	Bietola aut. (foraggio, coste, orto) 2020	Barbabetola da Foraggio - Monogerme a radice bianca, Barbabetola da Foraggio - Monogerme a radice gialla, Barbabetola da Foraggio ...	19/08/2019	31/03/2020
	Carota 2020	Carota - Lungo, Carota - Lungo (Hybrid), Carota - Mezza lunga, Carota - Mezza lunga (Hybrid), Carota - Rotonda, Carota - Rotonda (Hy...	19/08/2019	31/03/2020
	Cavolo 2020	Cavolo da foraggio - Cavolo da Foraggio, Cavolo da foraggio - Cavolo da Foraggio (Hybrid), Cavolo laciniato (=nero) - Cavolo Laciniato, ...	01/07/2019	30/06/2020
	Cipolla 2020	Cipolla - Bulbo giallo, Cipolla - Bulbo giallo (Hybrid), Cipolla - Bulbo giallo tondo, Cipolla - Bulbo giallo tondo (Hybrid), Cipolla - Bulbo ros...	01/07/2019	30/06/2020

Agronica Assistenza

Fig. 11/12 – Nuove pagine di gestione sportelli con gestione di nuove colture e gestione avanzata delle fasi di avanzamento della mappatura e relativi adeguamenti delle visualizzazioni e condivisioni tra ditte tale nuova gestione implementata in tecnologia adattiva e responsiva;

☐	Username	I/P	Ragione Sociale / Cognome Nome	Qualifica	Gruppo	Accesso dal	Accesso al
<input type="checkbox"/>		P		Isolito Berastamb		01/01/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico Assodamenti		10/05/2015	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito		01/01/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito KWS		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito CAI		...	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico CAC		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito		01/01/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico KWS		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito		01/01/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico CAC		...	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico CAC		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito CAI		...	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico CAC		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito		01/01/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito Syngenta		01/01/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		I		Cooperativa		...	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico Strube Dieckmann		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito CAI		...	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico CAC		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico Strube Dieckmann		01/09/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Isolito		01/01/2013	31/01/2021
<input type="checkbox"/>		P		Tecnico Strube Dieckmann		01/09/2013	31/01/2021

Fig. 13 – riorganizzazione completa della gestione utenti e permission/visibilità resi necessari per adeguare il sistema ai nuovi requisiti normativi sulla privacy e conservazione dei dati GDPR inoltre grazie a tale nuova ri-organizzazione con individuazione dei singolo utente/ditta/tecnico ci ha consentito di sviluppare anche tutto il nuovo sistema di avvisi e messaggi personalizzati tra utenti per la condivisione preventiva e in forma push delle situazioni di possibile conflitto (notifica Video/mail/sms/APP) implementata in tecnologia adattiva e responsiva;

The screenshot shows the 'GIS Agronica' dashboard. At the top, there is a header with the GIS logo, user information (User: Tolino Frenzi (id:1000000000)), and a home icon. Below the header is a navigation bar with 'GIS Cartografia Mappe' and 'Gestione Isolamenti'. The main content area features several filters and buttons: 'Isolazioni incidenti spaziali', 'Rassegna libera', 'Verifica interferenze', 'Distanze minime', 'Sportello: Barbadetela da zucchero 2019/2020', 'Mostra sportelli precedenti', 'Aggiornamenti con verifica', and 'Codifica specie vegetali'. At the bottom, there are two sections for 'Comunicazioni e notizie personali' and 'Comunicazioni dirette a tutti'. The footer includes the 'Agronica' logo and a 'Assistenza' button.

Fig. 14/15 – dashboard di gestione isolamenti in real-time con messaggi/notifiche dedicate per il singolo user/tecnico connesso da parte dei tecnici/ditte che hanno eseguito modifiche e mappature con potenziali app.ti in conflitto o distanza inferiore alle distanza previste dalla LR2/98 ed indicazione della distanza calcolata in automatico tra i diversi appezzamenti e la geolocalizzazione degli stessi nonché contestuale richiesta di accettazione/rifiuto/sospensione tra diverse ditte, dashboard completamente

implementata in tecnologia adattiva e responsiva; Nella sezione di destra della dashboard sono altresì elencate tutte le variazioni anche non di diretta competenza/interesse eseguite dai vari tecnici di tutte le ditte in campo. Log real-time. La stessa notifica viene inoltrata istantaneamente anche tramite email formattata come da esempio sotto riportato.

Disancora  Elimina

Oggetto: **Notifica di impianti in interferenza**

**Da:** [notificationinterferenze@agronica.it](mailto:notificationinterferenze@agronica.it) [<mailto:notificationinterferenze@agronica.it>]

**Inviato:** giovedì 17 maggio 2018 11:47

**A:**

**Oggetto:** Notifica di impianti in interferenza

Richiedente:

*Campo in via: via  
in Conflitto con:*

- 1.
- 2.
- 3.

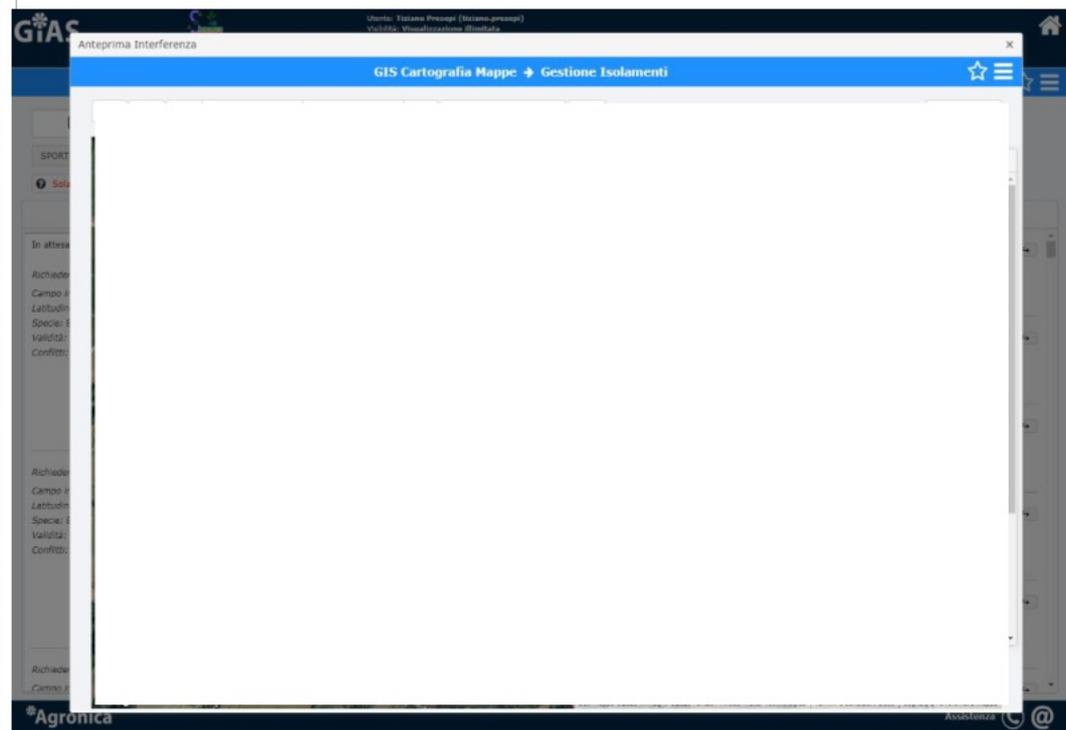


Fig. 16 – Nuova pagina di link dinamico per la consultazione mirata della situazione di potenziale conflitto venutasi a creare post-inserimento del nuovo poligono/app.to da parte della seconda ditta in modo che con un click chi ha ricevuto la notifica push della richiesta di conferma ed accettazione abbia modo di verificare sulla mappa visivamente la nuova situazione potenziale venutasi a creare e decidere così se accettare o sospendere l'accettazione in attesa id un confronto con più dettaglio o verbale con la ditta arrivata in prossimità.

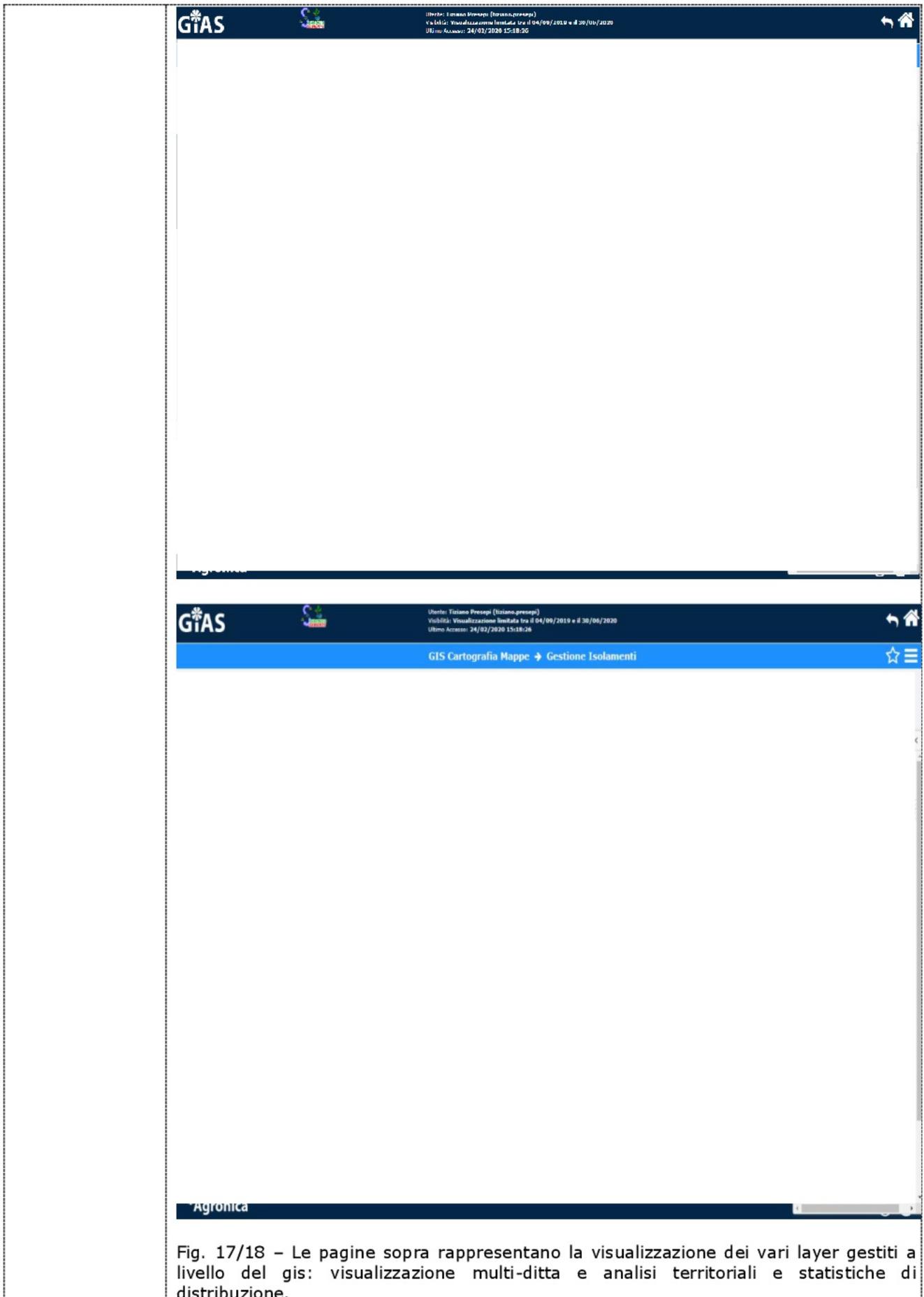


Fig. 17/18 – Le pagine sopra rappresentano la visualizzazione dei vari layer gestiti a livello del gis: visualizzazione multi-ditta e analisi territoriali e statistiche di distribuzione.

Fig. 19 – Nella pagina della piattaforma Gias sopra esposta sono riportati i nuovi attributi/campi gestibili dalle ditte sementiere con finalità aziendale di qualità e tracciabilità delle produzioni tra i quali i più rilevanti sono i principali parametri come date di semina e raccolta, lotto interno, ecc.. Inoltre con le nuove implementazioni è ora previsto un warning immediato di possibili contaminazioni e distanze non rispettate onde avere massima prevenzione.

GIS Cartografia Mappe → Gestione Isolamenti



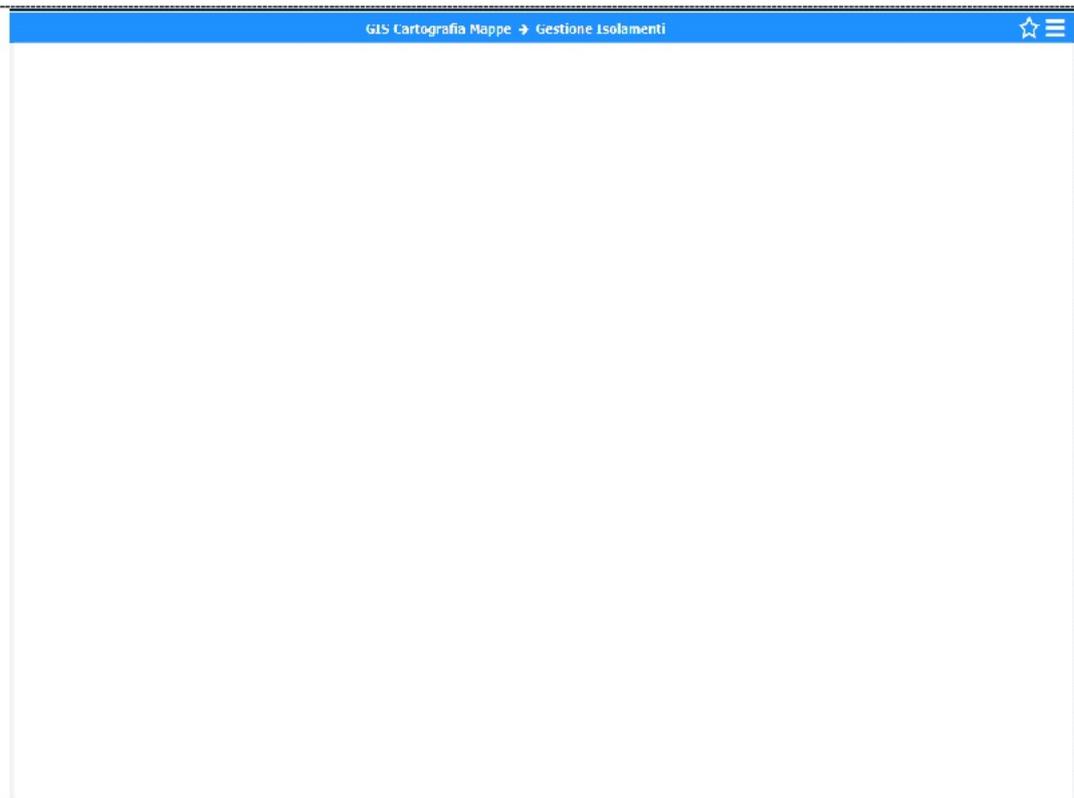


Fig. 20/22 – Le pagine qui sopra sono le nuove maschere di elaborazione finale dei rispetti delle distanze di legge e multipli prudenziali delle stesse con cui le ditte poi gestiscono anche le comunicazioni di accordo e di trasmissione dei consuntivi alla regione per adempimenti di legge LR2/98.

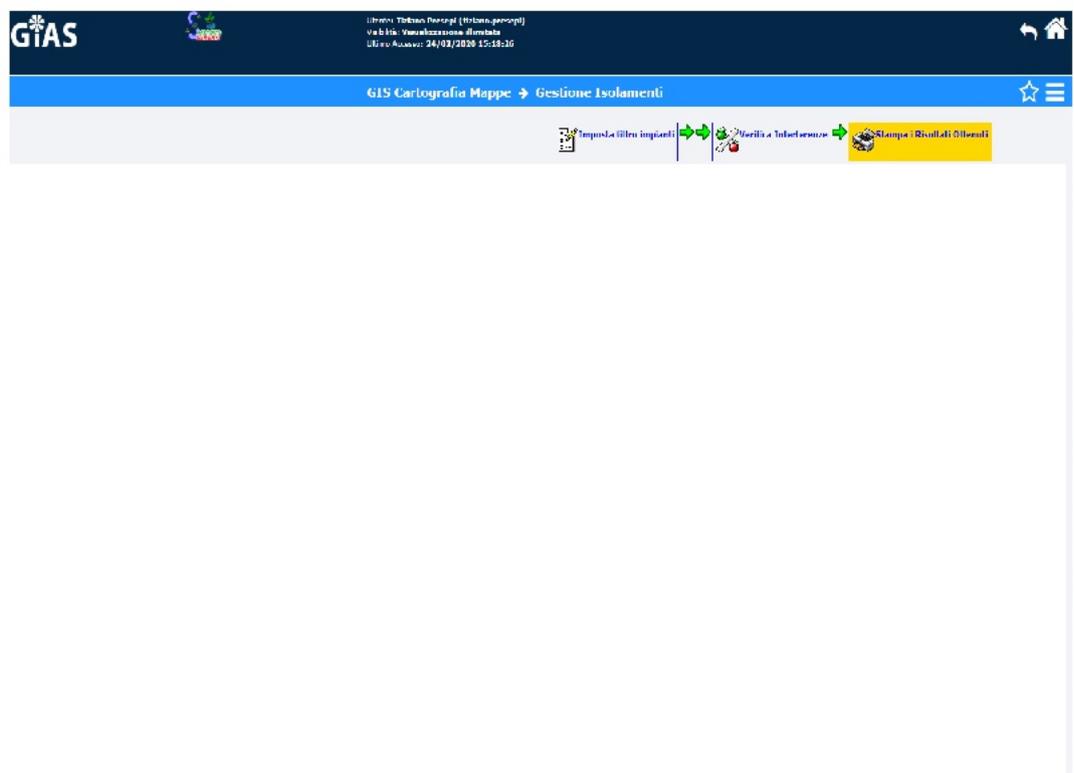


Fig. 23 – Export su excel per firme e trasmissione alla regione ER dei dati isolamenti per tutte le colture.

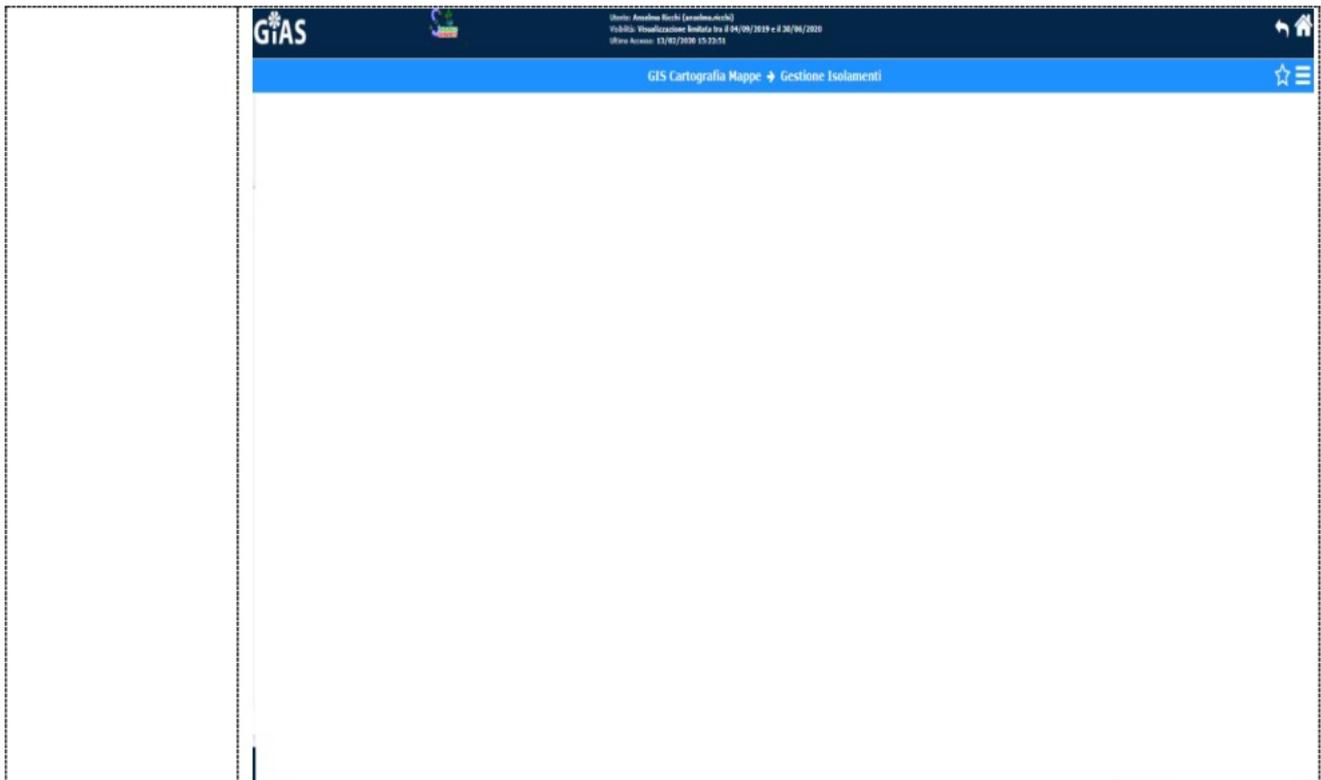


Fig. 24 – Maschera del gis mappatura che permette ai tecnici delle ditte di selezionare l'azienda agricola su cui fare il rilievo e misurazione degli appezzamenti pianificati in moltiplicazione. Info con tutti i dettagli colturali inseriti e consultabili.

### **B) Integrazione dati agro-meteo ARPAER e consultazione su mappatura**

Una delle implementazioni più interessanti e di immediato utilizzo/sfruttamento da parte di tutti i tecnici delle ditte attive sul sistema di mappatura siaper le colture orticole che bieticole (allogame) è la possibilità di poter consultare run-time azienda per azienda senza ulteriori input e selezioni oltre a quelle basi già necessarie e previste per la mappatura i dati agro-meteorologici relativi ai principali parametri climatici aerei prodotti e forniti quotidianamente dall'agenzia regionale per l'ambiente ed il clima (ARPAER). Tali dati già elaborati sui server di Agronica a fini della fornitura degli stessi al Servizio Fitosanitario Regionale ed ad altri utilizzatori istituzionali ed agricoli accreditati consentono ai tecnici delle ditte di avere una fornitura continuativa e completa per tutto il territorio regionale di dati analitici con frequenza giornaliera (valori medi giornalieri) o puntuali orari per le seguenti grandezze/informazioni: Temperatura aria (min/max e media); umidità aria ; bagnatura fogliare; direzione ed intensità del vento; evapotraspirazione; pioggia cumulata. La copertura ed il modello di fornitura prevedono la spazializzazione dei dati con frequenza territoriale di 5x5km (formato gias). La qualità elevata di tali dati e l'assenza di anomalie e buchi consente quindi l'utilizzo degli stessi per eseguire varie tipologie di elaborazioni sensibilmente utili per ogni valutazione agronomica e decisionale e quindi per elaborare algoritmi di previsione di patologie fungine o bilanci irrigui o fertirrigui. Inoltre tali dati Arpaer hanno un'altra importante peculiarità sono dotati di 5 giorni di dati di stima previsionali che consentono anche previsioni e tendenze.

Fig. 25 – Pagina di pre-filtro tempo e sorgente dati gestibile (dati pubblici regionali o dati di stazioni/sensori privati/aziendali).

Data	2020							2019						
	Temperatura aria (°C)	Temperatura min (°C)	Temperatura max (°C)	Somma termica (°C)	Umidità relativa (%)	Pioggia (mm)	Bagnatura fogliare	Temperatura aria (°C)	Temperatura min (°C)	Temperatura max (°C)	Somma termica (°C)	Umidità relativa (%)	Pioggia (mm)	Bagnatura fogliare
01/01	4,71	0,00	9,70	3,71	70,81	0,00	6,00	7,05	0,20	7,80	1,05	97,13	0,00	14,00
02/01	3,86	1,30	8,80	6,08	83,88	0,00	8,00	1,05	-0,10	4,20	1,90	94,04	0,00	21,00
03/01	5,09	1,50	10,30	10,10	79,96	0,00	10,00	1,25	-1,40	6,70	2,11	71,25	0,00	0,00
04/01	6,28	4,50	11,00	16,04	85,24	0,00	15,00	0,50	-3,10	5,80	2,12	58,33	0,00	0,00
05/01	5,62	2,00	10,80	20,66	77,58	0,00	6,00	0,81	-1,80	4,20	2,13	55,83	0,00	0,00
06/01	3,01	0,30	9,20	23,27	77,75	0,00	0,00	1,92	-2,70	9,20	3,07	71,63	0,00	1,00
07/01	1,24	-2,00	5,50	23,61	88,63	0,00	16,00	2,09	-2,40	0,00	4,16	75,54	0,00	7,00
08/01	1,90	-1,60	7,30	24,51	92,58	0,00	19,00	0,46	-2,00	4,40	4,16	87,75	0,00	17,00
09/01	3,47	-1,00	10,40	20,98	78,17	0,00	11,00	-0,23	-2,10	2,20	4,16	94,88	0,00	23,00
10/01	5,85	0,20	14,00	31,03	81,50	0,00	15,00	1,67	-3,00	7,20	4,03	67,75	0,00	5,00
11/01	6,10	4,10	9,70	36,93	86,11	0,00	17,00	2,02	-0,50	6,40	5,63	67,33	0,00	0,00
12/01	5,61	2,00	10,80	41,54	83,88	0,00	15,00	2,21	-1,10	9,40	7,06	53,63	0,00	0,00
13/01	2,33	1,50	8,10	42,68	88,71	0,00	18,00	2,80	1,60	9,10	8,86	61,13	0,00	0,00
14/01	1,74	-1,70	6,30	43,62	92,88	0,00	23,00	6,11	-0,50	13,60	13,97	53,75	0,00	2,00

Fig. 26 – la tabella sopra riporta l'output utente disponibile per consultare le serie giornaliere e oraria dei dati meteo ambiente. E' inoltre prevista una funzione per eseguire confronti tra diversi periodi.

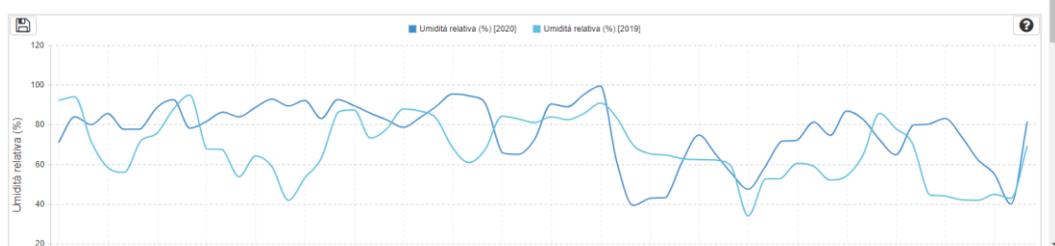
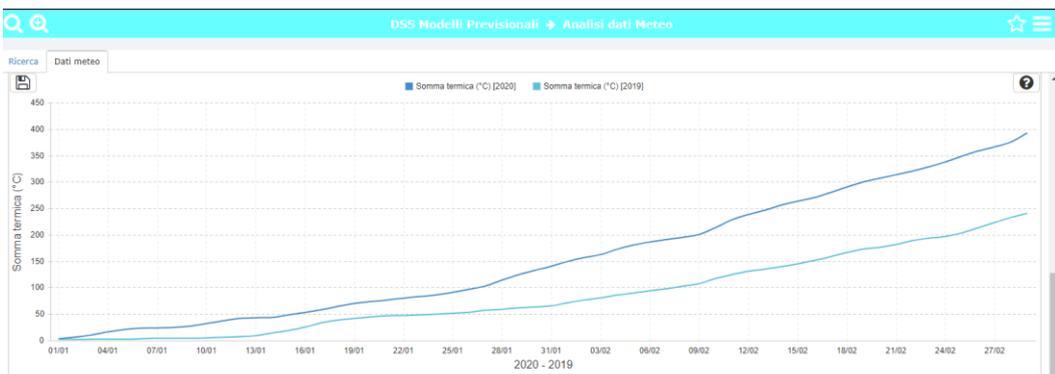
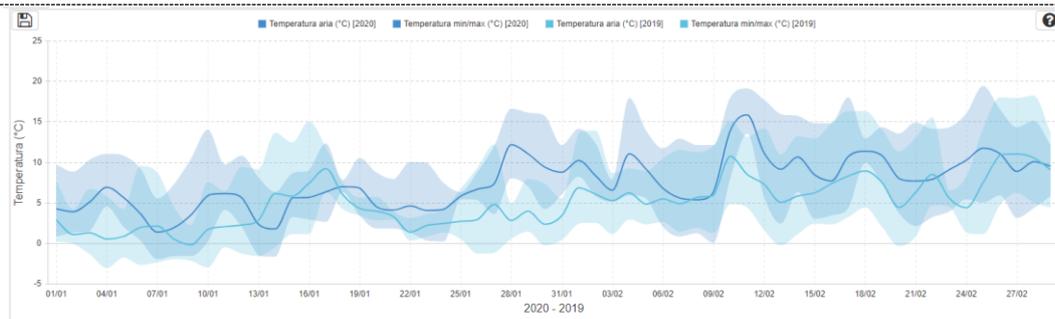




Fig. 27/28/29/30 – varie pagine di consultazione grafica con rappresentati varie serie: istogrammi delle piogge cumulate; sommatorie gradi giorno del periodo; andamenti del periodo per umidità, temperature, ecc. Visualizzazioni equivalenti e disponibili su serie giornaliere, mensili, annuali e per periodi arbitrari a scelta dell'utente con grandezze rilevate con frequenza oraria o sub-oraria.

### C) Implementazione dss modelli previsionali patologie crittogame barbabietola da seme (dss)

L'implementazione all'interno del portale mappatura di algoritmi e funzioni di avvertimento (modello di previsione - DSS) dinamico (push) è in grado di stimare la possibilità di insorgenza e sviluppo di malattie crittogamiche sulla barbabietola da zucchero (cercosporiosi, mal bianco e peronospora della barbabietola da seme/zucchero). In relazione al modello matematico per la cercosporiosi della barbabietola (e degli altri patogeni sopra indicati) è stato inserito quello maggiormente diffuso e pubblico utilizzato anche dalla regione Emilia Romagna e sono stati realizzati output a 3 livelli: tabellare, grafico e su mappa. Il modello simula l'area fogliare colpita comprese le infezioni latenti che compariranno al termine del periodo di incubazione e calcola la percentuale di area fogliare ammalata sulle foglie di barbabietola da zucchero, ossia lo sviluppo nel tempo delle epidemie. Usando i dati meteorologici verrà calcolato un tasso giornaliero che rappresenta il tasso di crescita della gravità di malattia, espresso come infezioni sia visibili (area necrotica) che latenti (il micelio si sviluppa nel tessuto fogliare senza che il tessuto stesso manifesti ancora sintomi di malattia).

Il modello simula l'andamento della malattia dal giorno di comparsa dei primi sintomi fino al giorno attuale ed è in grado di prevedere l'andamento futuro, per un periodo di giorni pari alla durata del periodo di incubazione della malattia (circa 10 giorni).

A partire dal giorno di comparsa (rilevato in campo o calcolato con il modello) il modello genera una curva di sviluppo della malattia.

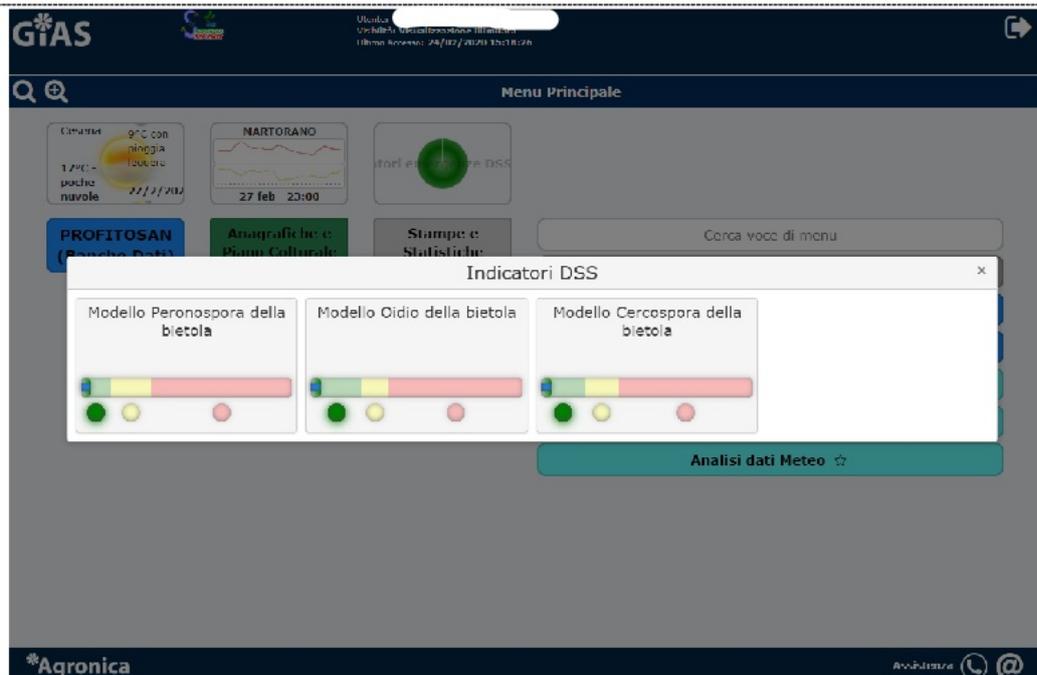


Fig. 31 – Widget visibile già in home page con indicatori soglie patologie stimate dal dss.

Il modello é in grado di fornire una previsione dello sviluppo futuro della malattia per un numero di giorni pari all’ultimo periodo di incubazione.

La piattaforma Gias implementata ad ok per la mappatura consente ora dinamicamente ed automaticamente senza ulteriori input e ricerche al tecnico della ditta di visualizzare costantemente gli indici di potenziale rischio per le patologie principali della coltura con diversi gradi di dettaglio e visualizzazione (alfanumerica, grafica e cartografica).

Inoltre sempre in primo piano il sistema già all’accesso dell’utente con la login nella piattaforma fornisce nell’homepage un widget di immediata consultazione (indicatori dss) che riporta una sorta di termometro con le 3 soglie per le 3 patologie in esame (verde= nessun rischio; giallo= rischio basso ma in aumento; rosso= rischio alto intervenire/rilevare puntualmente in campo la presenza di primi sintomi).

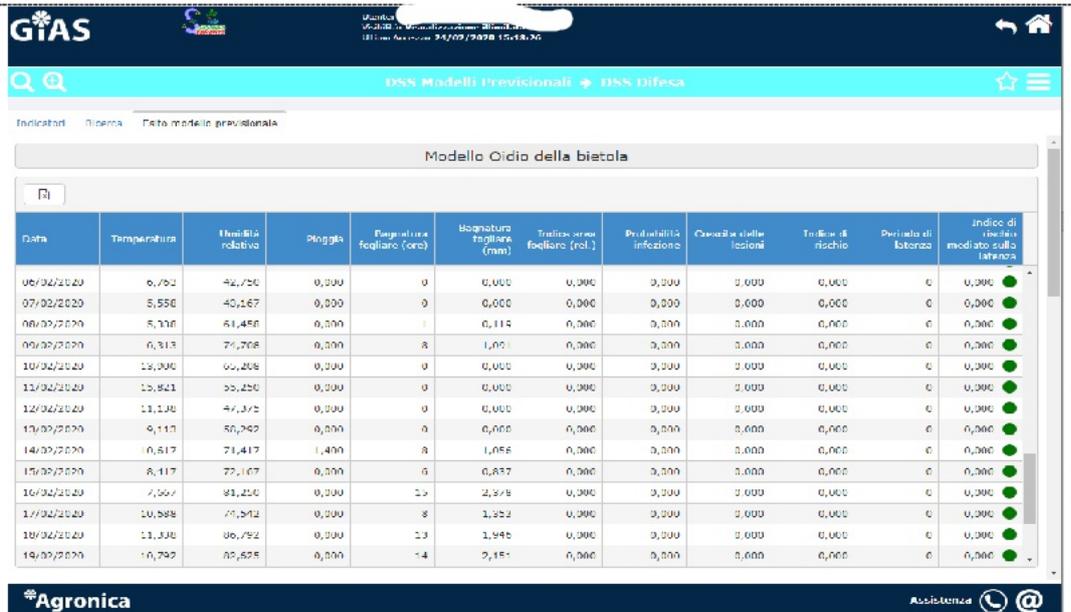


Fig. 32 – output tabellare con i principali valori calcolati dall’algoritmo in questo caso relativo alla patologia sul mal bianco (oidio) della barbabietola.

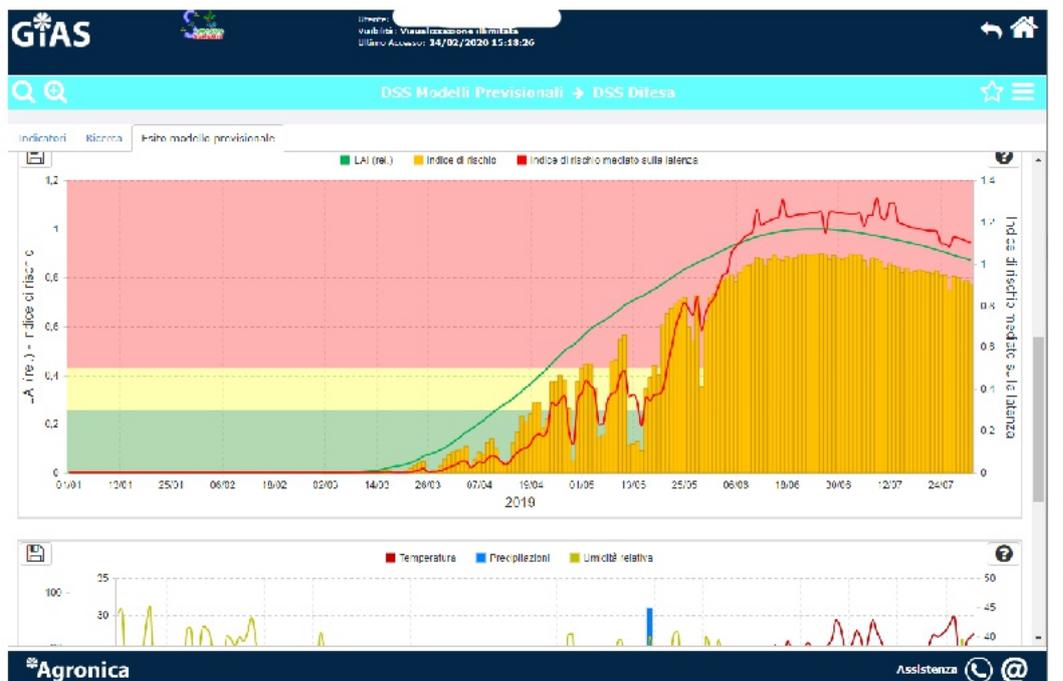


Fig. 33 – Output del modello sulla cercosporiosi della barbabietola: grafico dove è immediatamente visionabile l’andamento dell’indice di rischio in relazione al fattore tempo (giorni/ore).

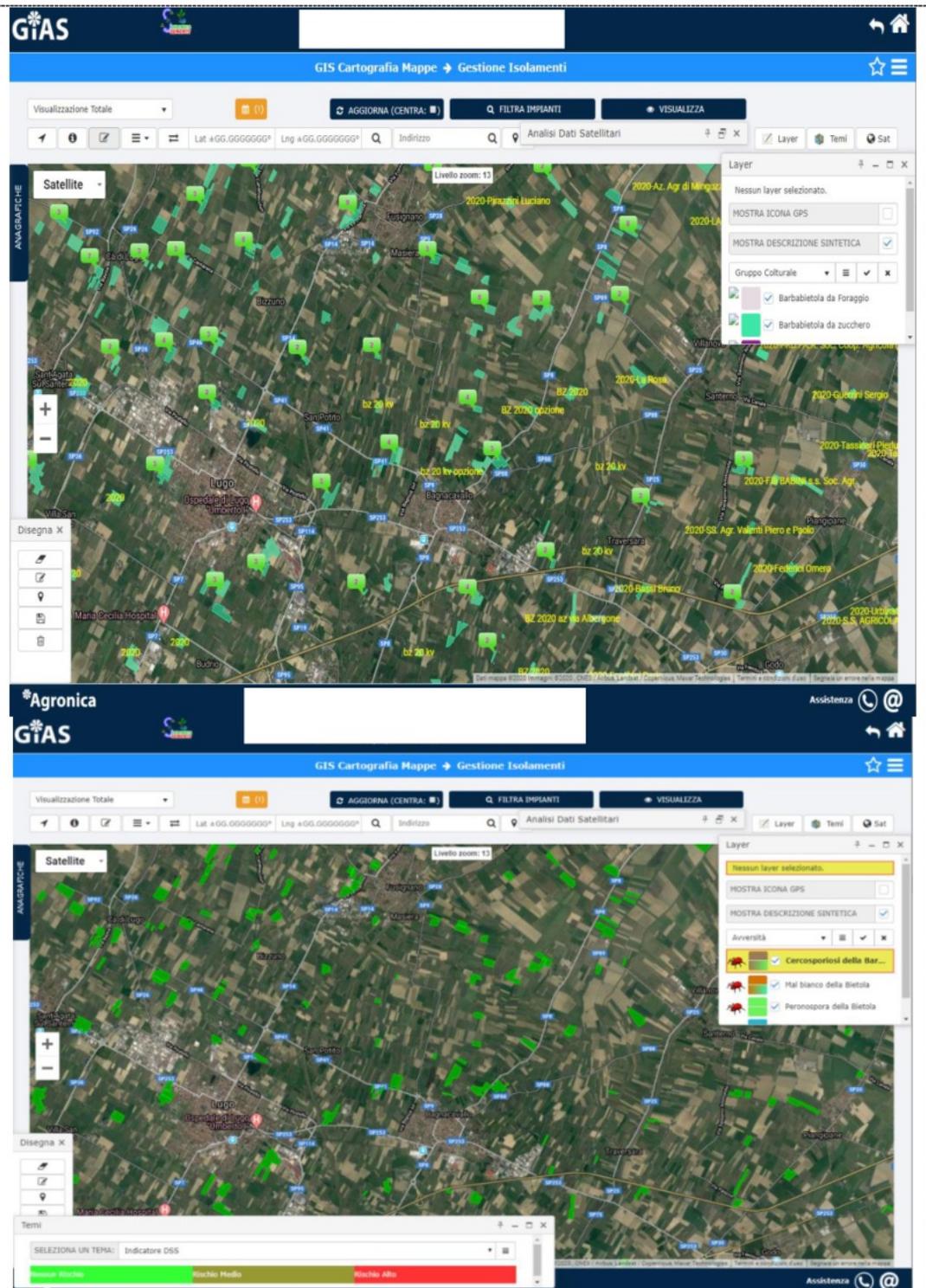


Fig. 34/35 – In questa immagine è riportata una visualizzazione real-time ora possibile grazie all'implementazione del sistema che consente di avere una visione su ampia scala territoriale degli indici di potenziale rischio insorgenze delle 3 patologie crittomiche implementate grazie all'integrazione dei dati Arpae meteo orari di tutta la regione oltre che all'elaborazione notturna automatizzata su tutto il territorio.

**D) Consultazione indici vegetativi (NDVI) generati da immagini satellitari SENTINEL-2/ESA**

La presente attività è da considerarsi decisamente innovativa e generatrice di potenziali successive future nuove ricerche ed implementazioni. In sostanza come previsto si è provveduto alla progettazione e realizzazione di una nuova infrastruttura software poi installata sul server della mappatura sementi per far

sì che quotidianamente un servizio automatico ponga interrogazioni mirate sul server ESA Copernicus. Successivamente viene predisposto un download di immagini satellitari grezze e si provvede alla loro conseguente archiviazione e pre-elaborazione direttamente sul server della mappatura sementi. Da qui poi dinamicamente ed automaticamente le immagini e relativi indici di vegetazione NDVI pubblicate online sono disponibili real-time e liberamente fruibili dai tecnici delle ditte sementiere in forma integrata alla ordinaria operatività GIS. In un prossimo futuro si ritiene che le stesse immagini possano essere fruite anche dagli agricoltori che nel frattempo siano stati formati ad un loro utilizzo. Tali immagini una volta elaborate coerentemente, costituiscono una base dati di "corredi informativi" sul territorio agricolo regionale a disposizione in continuo e con frequenze anche sub-settimanali di interesse per gli utilizzatori del software mappatura per eseguire verifiche/monitoraggi real-time su ampia scala. Attualmente è molto elevata la potenzialità di informazioni contenute all'interno delle immagini satellitari telerilevate attraverso la costellazione Gallileo dei satelliti ESA ed in particolare quella denominato Sentinel-2. Sentinel-2 che è un satellite geostazionario torna sulle medesime zone di rilievo ogni 3-7 giorni e produce immagini multi-spettrali (con frequenze che vanno dall'infrarosso all'ultravioletto compreso anche lo spettro RGB) con una risoluzione/restituzione di pixel ogni 10mt. In particolare si è deciso di concentrarsi sull'elaborazione di uno degli spettri principali, noto per fornire interessanti correlazioni nella frequenza dell'infrarosso (NIR - near infrared rate - infrarosso vicino) in quanto è noto che può fornire con buona determinazione il livello di LAI (Leaf Area Index - indice di superficie fogliare). L'obiettivo primario di questa attività del progetto non era tanto quello di specializzare l'analisi agronomica sul dettaglio di un determinato indice/criterio/assistenza tecnica quanto invece operare e preparare le fondamenta tecnologiche per avviare nell'ambito dei prossimi cicli produttivi delle sperimentazioni in campo per verificare ad esempio la possibilità di introdurre nuove modalità ed approcci di gestione per l'assistenza tecnica (remote sensing). Le informazioni desumibili da remoto sull'appezzamento attraverso l'elaborazione dinamica delle immagini satellitari possono infatti fornire quel livello minimo di presidio e monitoraggio delle principali criticità colturali (stress idrici, indici di accrescimento fogliare, stato della clorofilla, eventuali zone intra-appezzamento con andamento difforme, ecc.) e quindi prevenire talune visite in campo. L'aver modo di fare delle pre-analisi su stress e criticità prima di riscontrarle in dettaglio sul campo consentirebbe di preparare una strategia di risposta e di consiglio per l'agricoltore in maniera organizzata e strutturata. Si potrebbero stimare tempistiche di raccolta evidenziando criticità sulla produttività, ecc... Le possibili applicazioni e specializzazioni agronomiche dell'applicazione di questi approcci di monitoraggio real-time con remote-sono molteplici ma occorre procedere per gradi consentendo alle ditte approcci incrementali e progressivi.

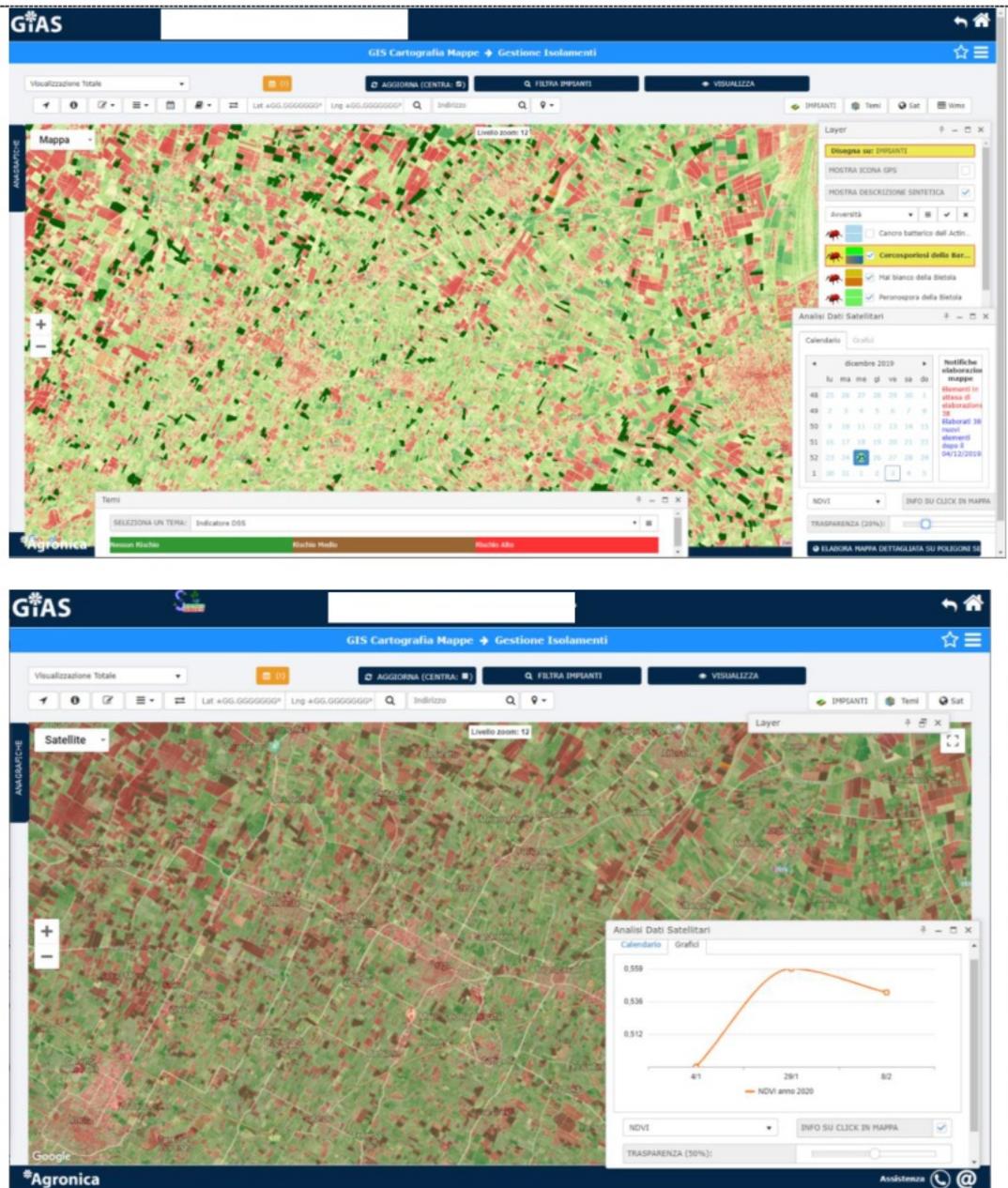


Fig. 36/37 – Nelle due maschere (sopra/sotto) caricata sul GIS immagine regionale ad infrarosso sorgente satellite sentinel 2 a due diversi livelli di scala fig.36 e fig.37. Sopra è evidenziato l’elaborazione di un app.to di Barbabietola della mappatura su cui è stato eseguita elaborazione dell’indice di stato vegetativo - NDVI – elaborato da immagine sentinel 2 – Nel grafico è evidente l’evoluzione di tale indice su 3 diverse acquisizioni sequenza 04/01/2020 – 29/01/2020 e 08/02/2020.

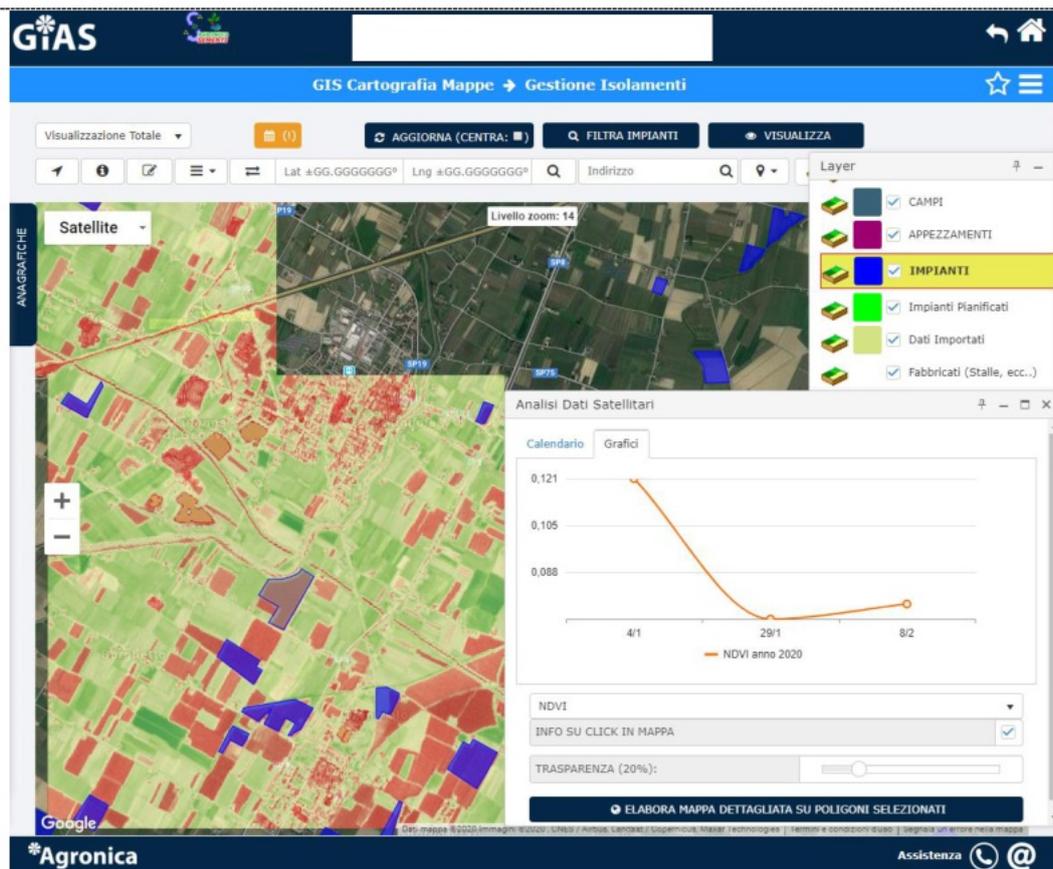


Fig. 38 – Elaborazione indice NDVI ad una scala di dettaglio livello 14 – rispetto al poligono /app.to selezionato.

### E) Integrazione bilancio irriguo irriframe (Anbi) con mappatura sementi Gias

Come da progetto e grazie alla geolocalizzazione pre-esistente degli appezzamenti che le ditte informatizzano per aspetti di isolamento e di qualità aziendale, è stato possibile procedere ad un'integrazione semi-automatica del calcolo dei bilanci irrigui sito specifici sugli appezzamenti di interesse.

Come evidenziato dagli screenshot del sistema mappatura che seguono l'utente tecnico ed eventualmente, in futuro, anche le aziende agricole possono con un click chiedere al sistema di fornire un bilancio sulla necessità di irrigazione per tutti gli appezzamenti mappati e geolocalizzati puntualmente. Il consiglio può essere limitato ad una stima della necessità della coltura in millimetri d'acqua da distribuire o anche ad un consiglio molto più dettagliato in funzione di quante informazioni tecnico-colturali l'utente è disposto ad inserire a sistema sull'appezzamento interessato. I dati verranno trasmessi al motore di calcolo (algoritmo) di Irriframe il quale a quel punto conoscendo la caratterizzazione dell'appezzamento è in grado di affinare il calcolo utilizzando ad esempio tutte le informazioni a sistema: irrigazioni precedenti effettive; tipologia d'impianto irriguo; tipologia di varietà e date esatte di semina/trapianto; altre successive fasi fenologiche rilevate in campo in real-time dal tecnico/agricoltore.



Fig. 39 – Nella pagina sopra della piattaforma gias è ora integrata la chiamata a irriframe geolocalizzata sul poligono dell'app.to mappato per gli isolamenti che fornisce in forma immediata il volume di adacqua necessario da distribuire e la data prevista per l'irrigazione.



Fig. 40 – La pagina sopra si può visualizzare il grafico del periodo elaborato da irriframe relativo all'andamento delle necessità di campo di acqua inerente l'app.to mappato dai tecnici.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro criticità evidenziate,

Tutta l'attività è stata svolta così come previsto nel piano iniziale e le ditte sementiere ora dispongono di una nuova piattaforma che offre una serie di maggiori utilities al software per l'isolamento delle colture portaseme allogame. L'essersi periodicamente confrontati con i tecnici sementieri che da anni stanno utilizzando il software è garanzia di applicazione delle innovazioni che per esperienze precedenti avrà comunque una fase di messa a punto e di formazione durante la campagna 2020 appena iniziata. Non si sono riscontrate particolari criticità avendo abbondantemente discusso in precedenza tutte le funzionalità della nuova piattaforma.

<b>Azione</b>	<b>3.3 - Riconoscimento varietale in erba medica</b>
<b>Unità aziendale responsabile</b>	<b>LaRAS – Laboratorio di Ricerca ed Analisi Sementi (Uni.BO)</b>
<b>Descrizione delle attività</b>	<p>Le cultivar di erba medica attualmente utilizzate nel nostro Paese, che hanno sostituito le popolazioni locali (ecotipi) coltivate fino a pochi anni fa, sono rappresentate da varietà sintetiche generate dall'interincrocio di piante selezionate (componenti) e dalla moltiplicazione delle loro progenie attraverso un numero limitato di generazioni di incroci casuali. Le varietà sintetiche risultano maggiormente definite rispetto agli ecotipi, in quanto ottenute da componenti ben determinati e a cui si fa periodicamente ricorso per il mantenimento della varietà, tuttavia sono pur sempre caratterizzate da un'ampia base genetica. Pertanto la loro identificazione univoca risulta complicata dal fatto che al loro interno la variabilità per i caratteri descrittivi è piuttosto elevata e di entità paragonabile a quella riscontrabile tra cultivar diverse. La necessità di disporre di metodi in grado di identificare i diversi genotipi induce a considerare l'approccio analitico basato su marcatori molecolari (DNA fingerprinting).</p> <p><b>Stato dell'arte sul fingerprinting in erba medica.</b> L'erba medica è una specie caratterizzata da un'elevata variabilità genetica, dovuta alla natura tetraploide del suo genoma, al sistema riproduttivo allogamo e alla forte depressione da inbreeding. L'impiego di marcatori molecolari in grado di descrivere la diversità genetica e le relazioni tra accessioni rappresenta un importante supporto ai programmi di breeding, sia in termini di valorizzazione del germoplasma che di caratterizzazione di ecotipi e varietà commerciali. La complessità genomica dell'erba medica e la scarsità di risorse investite hanno limitato lo sviluppo e l'impiego di marcatori molecolari nel breeding di questa specie. Marcatori RFLP (Brummer et al. 1991; Pupilli et al., 1996 e 2000), RAPD (Mengoni et al., 2000; Nagl et al., 2011), AFLP (Zaccardelli et al., 2003) e SSR (Fahalati et al., 2007; Flajoulot et al., 2005; Sakiroglu et al., 2010) sono stati utilizzati ad oggi in erba medica per la valutazione della diversità genetica presente entro e tra popolazioni, cultivar, ecotipi, e accessioni di germoplasma. Basandosi sulla letteratura disponibile, l'utilizzo di marcatori AFLP non sembra consentire una chiara distinzione tra ecotipi (Zaccardelli et al., 2003), né l'impiego di marcatori RAPD permette una netta separazione tra varietà sintetiche (Negl et al., 2011). Un buon potere discriminante degli SSR è stato invece evidenziato sia nella differenziazione tra ecotipi (Mengoni et al., 2000), sia tra varietà sintetiche ottenute da uno stesso programma di breeding, quindi derivanti da un pool genico comune (Flajoulot et al., 2005). Gli SSR rappresentano infatti i marcatori più utilizzati a fini di fingerprinting e per la valutazione delle distanze genetiche in molte specie vegetali, non solo per l'elevata informatività, ma anche per l'automazione d'analisi a cui si prestano. In particolare la codominanza degli SSR consente di rilevare la ricchezza allelica di una specie tetraploide quale l'erba medica, e stimare quindi in maniera più precisa, rispetto a marcatori dominanti, l'elevato grado di variabilità genetica presente entro e tra popolazioni. A tal proposito si rivela cruciale l'analisi di un certo numero di singoli individui di ciascuna popolazione (varietà o ecotipo), in modo da ottenere un campione rappresentativo dello spettro allelico. La procedura basata su bulk di individui rischierebbe infatti di non rilevare gli alleli meno frequenti ma comunque caratteristici di una determinata popolazione, poiché da studi già effettuati è risultato che gli alleli comuni alla maggioranza degli individui (70% della popolazione) sono solo il 2.6% degli alleli totali riscontrati, mentre la maggior parte degli alleli sono comuni solo al 11-40% degli individui (Mengoni et al., 2000). Di interesse ai fini dell'identificazione varietale sarebbe l'individuazione di alleli "privati",</p>

caratteristici cioè di una determinata varietà, o il rilevamento di alleli comunque indicativi di germoplasma estero.

### Scopo del lavoro

Lo scopo ultimo di sviluppare un sistema di marcatori SSR altamente informativi per l'accertamento dell'identità e della purezza varietale delle sementi di erba medica in commercio. L'approccio analitico prevede l'assemblaggio di set di marcatori in formato 'multiplex' o 'multiloading' in modo da permettere l'analisi simultanea di diversi loci genomici, rendendo la caratterizzazione genetica rapida ed efficiente, ma al tempo stesso affidabile e riproducibile.

**Il piano di lavoro** prevede l'utilizzo di materiali certi, reperiti attraverso il costituente (es. cloni e seme del nucleo) o i responsabili della conservazione (ecotipi), e provenienti dalle diverse fasi della moltiplicazione, dal seme base al certificato. Per la selezione delle cultivar/ecotipi oggetto di studio è stata fondamentale l'interazione con le ditte sementiere interessate, attraverso l'ASSOSEMENTI ed il coinvolgimento degli agricoltori moltiplicatori riuniti nel COAMS, al fine di individuare i materiali che meglio esemplificano le problematiche di rintracciabilità ed identificazione che il progetto si propone di investigare.

### Materiali

#### INDIVIDUAZIONE DELLE VARIETÀ

Per la fase di messa a punto del set di marcatori SSR (fase cronologicamente precedente a quella di analisi dei campioni sopraccitati) sono stati impiegati materiali commerciali (seme certificato) di 6 varietà disponibili presso il laboratorio LaRAS.

Per la fase centrale del progetto, mirata alla valutazione della variabilità genetica entro e tra varietà, si sono scelte varietà chiaramente distinte (varietà iscritte e materiali di origine certa), ma sviluppate a partire da una base genetica prevalentemente locale emiliano-romagnola. L'idea di partenza era infatti quella di affrontare un "real case scenario", con varietà effettivamente moltiplicate e coltivate nel medesimo areale.

Durante la fase di pianificazione del progetto, due aziende sementiere costitutrici (Azienda A e Azienda B) sono state coinvolte nel ruolo di fornitrici del materiale vegetale. Le aziende, entrambe site in Emilia Romagna, rappresentano due importanti *player* nel mercato nazionale della semente di erba medica.

Il materiale vegetale impiegato nello studio appartiene a 4 varietà di erba medica, di cui MsA1 e MsA2 di proprietà dell'Azienda A, e MsB1 e MsB2 di proprietà dell'Azienda B.

Azienda	Varietà	Origine
A	MsA1	Varietà sintetica registrata alla fine del primo decennio degli anni duemila costituita a partire da 10 genotipi di base. Il campionamento è avvenuto su un medicaio al 6°anno rappresentante la generazione Syn 1.
A	MsA2	Varietà registrata alla fine degli anni '90, frutto di una selezione fenotipica entro una popolazione di ecotipo romagnolo che originariamente aveva isolato una trentina di genotipi. Il materiale esaminato rappresenta il nucleo Syn-2.
B	MsB1	Varietà sintetica iscritta agli inizi degli anni duemila, caratterizzata da una forte eterogeneità per numerosi caratteri morfologici. Da colloqui con il breeder risulta che la varietà sia nata a partire da materiale eterogeneo per il carattere colore del fiore presente in

		MsB2 e da essa eliminato nell'ambito di una ri-selezione della varietà stessa. Si tratta probabilmente di materiale originariamente appartenente alla varietà <i>Medicago sativa</i> ssp. <i>falcata</i> e selezionatosi spontaneamente a causa di alcune annate di freddo intenso). Il colore del fiore varia dal blu all'azzurro al verde e al giallo.
B	MsB2	Varietà sintetica degli anni '70, frutto di materiale proveniente da ecotipi locali, probabilmente con il contributo anche di materiali esotici (da colloqui con il breeder). Entrambe le varietà dell'azienda B sono state campionate su medicei rappresentanti la generazione Syn 2.

In tutti i casi il materiale campionato è stato ottenuto sotto controllo del responsabile della selezione conservatrice ed era rappresentato dalla generazione più precoce tra quelle disponibili. Idealmente, si sarebbe voluto includere nell'analisi anche i genotipi di base (cloni delle sintetiche), ma in nessun caso questo sono risultati accessibili.

Nell'ultima fase (tuttora in corso) sono state inclusi materiali di varietà di origini geografiche diverse (4 francesi e due statunitensi), considerando quindi un maggiore grado di distanza genetica, al fine di permettere una valutazione più completa del potere risolutivo del sistema.

Obiettivo	Materiale
screening iniziale e messa a punto dei marcatori	6 varietà
valutazione della variabilità genetica entro e tra varietà	4 varietà
valutazione del potere risolutivo	6 varietà

### Campionamento

Per la fase di messa a punto del set di marcatori SSR, circa 30 semi di ognuna delle 6 varietà sono stati seminati in vasi collocati in cella climatizzata a circa 23°C per favorire una rapida ed omogenea germinazione e, successivamente, trasferiti in serra fino al campionamento. Per ciascuna varietà si è effettuata l'estrazione del DNA di 5 individui.

Il medesimo trattamento è stato seguito per i materiali stranieri della fase 3, con la differenza che 100 semi sono stati seminati, e l'estrazione del DNA è stata effettuata da 50 di essi

Il materiale vegetale oggetto della fase centrale del lavoro (materiali del nucleo delle varietà MsA1, MsA2, MsB1 e MsB2) è stato campionato mediante sopralluoghi ai campi di mantenimento delle varietà alla presenza dei responsabili della selezione conservatrice.

Per ogni varietà sono state campionate 50 piante mediante il prelievo di circa 1 cm<sup>2</sup> di tessuto fogliare. Al fine di garantire una miglior qualità del DNA estratto si è proceduto con il campionamento da foglie giovani ed esenti da seccumi o segni di infezioni patogene. I frammenti di tessuto fogliare sono stati singolarmente inseriti in tubi da 1,2 ml, conservati in frigorifero portatile durante le operazioni di prelievo e il trasporto

Dopo la raccolta i materiali sono stati liofilizzati, sigillati sotto vuoto e conservati a temperatura ambiente fino al successivo utilizzo.

### Estrazione del DNA genomico

I campioni di tessuto fogliare sono stati macinati ed estratti secondo la medesima procedura. La macinazione dei tessuti fogliari liofilizzati è avvenuta mediante agitazione con mulino scuotitore (*Tissue Lyser II*), dopo l'aggiunta

di una piccola quantità di allumina in ciascun tubo, con frequenza di scuotimento di 30 Hz per 30 minuti al fine di ottenere una macinazione omogenea.

L'estrazione del DNA è stata condotta seguendo il protocollo descritto da Saghai-Marroof et al. (1984) con alcune modifiche. Tutte le operazioni di *liquid handling* sono state facilitate dall'uso di un pipettatore semiautomatico a 96 canali (Liquidator 96, Mettler Toledo). I DNA precipitati sono stati conservati in acqua deionizzata sterile.

Il DNA estratto è stato quantificato direttamente in *micotiter plates* con spettrofotometro (Infinite 200 Pro, Tecan) e diluito con acqua deionizzata sterile alla concentrazione di lavoro di 60 ng/μl. I campioni di DNA pronto per l'amplificazione sono stati riorganizzati in piastre di lavoro allo scopo di rendere più agevole la successiva fase di analisi.

### **Screening iniziale di marcatori SSR**

Nell'ambito del lavoro è stato messo a punto un set di 8 marcatori SSR. Nella prima fase di *screening* sono stati selezionati dalla letteratura scientifica 21 marcatori SSR le cui caratteristiche (locus SSR analizzato, motivo della ripetizione, temperatura di *melting*, dimensione dell'amplicone e riferimento bibliografico) sono riportati nella Tabella 1.

I 21 marcatori molecolari erano stati individuati sulla base della loro informatività (ricchezza allelica e/o indice di polimorfismo *PIC* indicato in bibliografia) e della loro localizzazione genomica (almeno un marcatore per cromosoma). Laddove possibile, sono stati preferiti microsatelliti tri-nucleotidici rispetto ai di-nucleotidici perché meno soggetti al fenomeno *stuttering* (formazione di bande multiple che differiscono in lunghezza dal prodotto di amplificazione principale).

Lo *screening* iniziale è stato condotto su DNA di 12 piante (2 campioni per ognuna delle 6 varietà impiegate nella messa a punto del set di marcatori) amplificato con ciascuna delle 21 coppie di *primer*.

Per rendere più efficiente e meno costosa l'analisi, per tutti i loci SSR selezionati, i primer *forward* sono stati modificati con l'aggiunta di una estensione di 19 pb in 3' (coda M13 3'-CACGACGTTGTAAAACGAC-5'; Otting et al., 1995).

Tabella 1 - Elenco dei marcatori SSR oggetto di screening.

Cromo- soma	Locus	forward/ reverse	Primer (3'-5')	Tm	N° alleli in ref	Motivo	Amplificoni (pb)
I	FMT13	F	GATGAGAAAATGAAAAGAAC	50	18	(GA)2GG(GA)9	162-204
		R	CAAAACTCACTCTAACACAC				
	MSE546	F	GAGAGTGGCTAGATGGTTGAGAA	60	9	TGC(6)	172-202
		R	ACGGGACAACATTATTTCTCTGA				
II	MTIC451	F	GGACAAAATGGGAAGAAAAA	55	17	(TC)11	145-181
		R	AATTACGTTTGTGGATGC				
	MSE145	F	AGCTTCAGTCCAAAGTTTCTCT	60	6	TCA(6)	180-195
		R	CATTTTCTGCTGTTTCTGGAGTT				
III	MTIC189	F	CAAACCTTTTCAATTTCAACC	55/59	21	(TC)9	133-173
		R	ATGTTGGTGATCCTTCTGC				
	MSE470	F	CTTTCTTTGGATTCTTCCCAT	60	10	TGT(6)	175-222
		R	ATTAGCAGCTGGTCAAACAAGAG				
	MTIC332	F	CCCTGGTTTTGATCCAG	60	?	CTT(8)	123
		R	GGTCATACGAGCTCCTCCAT				
IV	MAA660456	F	GGGTTTTGATCCAGATCTTAA	55	11	(TTC)8	133-165
		R	GGTGGTCATACGAGCTCC				
	MSE573	F	AATTTCCACAACCTATGGCTTT	60	4	GGT(5)	178-192
		R	GTGTTGTGCTGTTGTGATGAT				
	AFctt1	F	CCATCATCAACATTTTCA	59	13	CTT)9(CAA)3	90-135
		R	TTGTGGATTGGAACGAGT				
V	B14B03	F	GCTTGTCTTCTTCAAGCTC	55/56	18	(CA)9	163-215
		R	ACCTGACTTGTGTTTTATGC				
	MSE160	F	TAAAGCTTCCAAACTCGTAGCAA	60	7	GAA(5)	189-215
		R	TAGGAACAACATTGCGCTTAAT				
	MTIC153	F	TCACAACATGCAACAAAAGTGG	59	14	?	143-191
		R	TGGGTCGGTGAATTTTCTGT				
VI	MTIC93	F	AGCAGGATTTGGGACAGTTGT	55	3	(TTC)6	131-137
		R	ACCGTAGCTCCCTTTTCCA				
	MSE723	F	TTTTCCATTTCTCTTTTCTTC	60	4	CTT(5)	186-237
		R	AAAAGCAAGAGACCAACATCAAG				
	MTIC273	F	TGTTAGCAACTTTGTGATGG	54	?	CAG(7)	115
		R	TCCATTACAATACCCAGAGG				
VII	MTIC432	F	TGGAATTTGGGATATAGGAAG	55	24	(AG)6	175-243
		R	GCCATAAGAACTTCCACTT				
	MSE231	F	CACAGATCAGAAACAGAGTGACG	60	6	GGT(7)	189-197
		R	AACATGTCTCACTCTGGCTTTA				
	MTIC299	F	AGGCTGTTGTACACCTTTGTC	50	7	(ATG)7	143-158
		R	AAATGCTTAAATGACAAAT				
VIII	MSE479	F	CAGCACTCTCAAATTTCAACA	60	6	ATG(5)	161-179
		R	TGATTTTGGTCTGCTAGGGTTA				
	AFca16	F	GGTCGAACCAAGCATGT	59	6	CA(12)	92-120
		R	TAAAAACATTACATGACCTCAAA				

Circa 180 ng di DNA genomico sono stati amplificati in una miscela di reazione (20 µl totali) contenente tampone PCR 1X, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM di nucleotidi tri-fosfato, 0.15 µM di primer *forward* e *reverse*, 0.7 µM primer universale M13 marcato IRDye® e 0.3 unità di AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Monza-MI).

In questa fase il protocollo di amplificazione è stato impostato sulla base di quanto suggerito in letteratura, e comunque considerando la temperatura di *melting* calcolata per i diversi primer sulla base della loro sequenza.

I prodotti di amplificazione sono stati diluiti (in genere 1:8) in una miscela di caricamento (98% formamide, 0.02 mM EDTA pH 8, 0.08% blu di bromofenolo) e separati in elettroforesi su gel di poliacrilamide al 5% (1X TBE, 6 M urea) utilizzando l'apparato elettroforetico 4300 DNA Analyzer (LICOR Biosciences, Nebraska, USA). Dopo 10 minuti di pre-corsa (1200 V, 40 W, 40mA, 47°C), 0.6 µl di ciascun campione denaturato (8 minuti a 95°C) sono stati caricati usando una siringa ad 8 canali (Hamilton) e sottoposti ad elettroforesi (1300 V, 40W, 40mA, 45°C). Sulla base della qualità dei risultati

elettroforetici sono stati individuati 8 marcatori, uno per cromosoma, tra quelli che avevano prodotto profili migliori e più ricchi di polimorfismo. Inoltre, sulla base della leggibilità dei gel elettroforetici, si sono apportate delle modifiche ai fattori di diluizione dei prodotti di amplificazione. A parità di polimorfismo e di qualità di amplificazione, allo scopo di rendere l'analisi dei campioni più rapida, sono state preferite nella scelta quelle coppie di *primer* che presentavano una temperatura di appaiamento analoga a quella delle altre coppie di *primer* presenti nel set.

### Messa a punto del set di marcatori SSR

Al fine di garantire un miglior risultato dell'analisi elettroforetica si è poi proceduto alla messa a punto del protocollo di amplificazione, modificando, qualora necessario, la composizione della miscela di reazione e le temperature di *annealing*. Traccia degli esperimenti di messa a punto e descrizione delle modifiche sono visibili rispettivamente nella Tabelle 2 e 3.

Tabella 2 - Messa a punto del protocollo di amplificazione e condizioni di separazione elettroforetica.

Locus	Protocollo PCR			Elettroforesi	
	T (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Primers (μM)	700/800	Diluizione
<b>A - Condizioni di prova iniziali</b>					
FMT13	50	2	0.15	700	1:6
MSE546	60	2	0.15	800	1:4
MTIC451	56	2	0.15	700	1:6
MSE145	60	2	0.15	800	1:4
MTIC189	60	2	0.15	800	1:4
MSE470	60	2	0.15	800	1:4
MTIC332	60	2	0.15	800	1:4
MAA660456	50	2	0.15	700	1:6
MSE573	60	2	0.15	800	1:4
AFctt1	56	2	0.15	700	1:6
B14B03	52	2	0.15	700	1:6
MSE160	60	2	0.15	800	1:4
MTIC153	60	2	0.15	800	1:4
MTIC93	52	2	0.15	700	1:6
MSE723	60	2	0.15	800	1:4
MTIC273	56	2	0.15	700	1:6
MTIC432	52	2	0.15	700	1:6
MSE231	60	2	0.15	800	1:4
MTIC299	50	2	0.15	700	1:6
MSE479	60	2	0.15	800	1:4
AFca16	56	2	0.15	700	1:6
<b>B - Condizioni di prova modificate</b>					
FMT13	50	2.5	0.3	800	1:8
MSE546	56	2.5	0.3	700	1:3
MTIC451	56	=	=	800	1:8
MSE145	60	=	=	800	1:4
MTIC189	60	2.5	0.3	700	1:3
MSE470	60	2.5	0.3	700	1:3
MTIC332	56	2.5	0.3	700	1:3
MAA660456					
MSE573	60	=	=	800	1:3,5
AFctt1	56	=	=	800	1:8
B14B03	54	=	=	800	1:5
MSE160	60	=	=	800	1:3,5
MTIC153	56	2.5	0.3	700	1:3
MTIC93					
MSE723	60	2.5	0.3	700	1:3
MTIC273	56	2.5	0.3	700	1:3,5
MTIC432	54	=	=	800	1:5
MSE231	56	2.5	0.3	700	1:3,5
MTIC299	50	2.5	0.3	700	1:4
MSE479	56	2.5	0.3	700	1:3
AFca16	56	=	=	800	1:8

Tabella 3 - Condizioni di amplificazione ed elettroforesi per gli 8 primer selezionati.

Locus	Cromosoma	Ampliconi (pb)	Amplificazione			Elettroforesi	
			T (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Primers (μM)	700/800	Diluizione
FMT13	I	162-204	50	2.5	0.3	700	1:19
MTIC451	II	145-181	56	2	0.15	700	1:8
MSE470	III	175-222	60	2.5	0.3	800	1:3
AFctt1	IV	90-135	56	2	0.15	700	1:8
MSE160	V	189-215	60	2	0.15	800	1:10
MSE723	VI	186-237	60	2.5	0.3	800	01:03
MTIC273	VII	115	56	2.5	0.3	700	1:3,5
AFca16	VIII	92-120	56	2	0.15	700	1:8

Le amplificazioni sono state svolte in simplex, per ogni coppia di primer. I campioni sono stati amplificati in una miscela di reazione di 20 μl contenente 3 μl di DNA (180 ng), tampone PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> (2 - 2.5 mM), 0.2 mM di nucleotidi tri-fosfato, primer forward e reverse (0.15 - 0.30 μM), primer universale M13 marcato con 700\_IRDye® o 800\_IRDye® (0.07 - 0.14 μM in base alla quantità di primer forward e reverse) e 0.3 unità AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Monza-MI).

#### Analisi dei gel e rilievo degli amplificati

L'analisi del gel è stata svolta servendosi del software *Molecular Imaging Standard Edition* (Carestream Health, Inc.).

Dopo un'opportuna preparazione grafica dell'immagine, tutte le bande presenti nel gel sono state automaticamente rilevate dal software. Si è poi proceduto con una eliminazione delle bande ritenute spurie ad un esame visivo e, laddove necessario, la posizione delle bande è stata regolata manualmente (Figura 1).

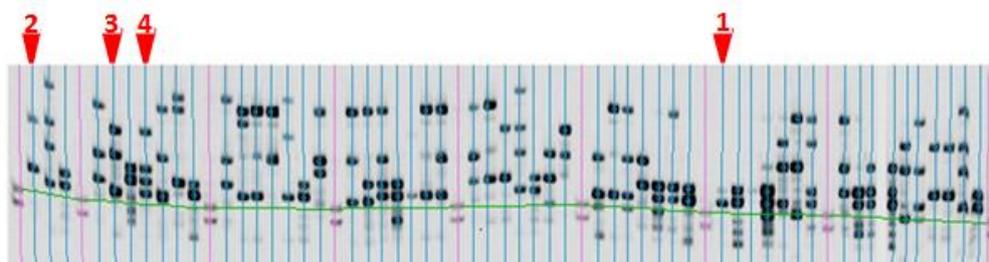


Figura 1 - Profili allelici ottenuti ad un locus marcatore; le frecce evidenziano individui con 1, 2, 3 e 4 alleli al locus. Le corsie con linee blu si riferiscono a campioni, quelle rosa a controlli.

L'attribuzione del peso molecolare degli ampliconi (*band sizing*) è stato effettuato dal software sulla base della separazione parallela di un campione standard di DNA con frammenti di dimensione (paia di basi) nota (*ladder*). Le dimensioni delle bande sono state riportate in un foglio elettronico disponendo i genotipi in colonne e gli alleli al marcatore in righe. Il corretto allineamento delle bande di uguale dimensione e delle bande fra loro alleliche è stato svolto sulla base della similarità della dimensione determinata dal software e dell'esame visivo dei gel. Laddove necessario, sono stati effettuati caricamenti *ad hoc* di alcuni genotipi, allo scopo di confermare (per confronto) la posizione reciproca di bande il cui rapporto (bande omologhe o alleliche) era incerto.

### La codifica dei dati

La presenza nel gel elettroforetico delle bande corrispondenti ai diversi alleli amplificati è stata codificata come una variabile di tipo qualitativo, dove 1 corrisponde alla presenza della banda e 0 alla sua assenza (METODO BINARIO) e i dati sono stati raccolti in una matrice (Botstein *et al.*, 1980; Annicchiarico *et al.*, 2016).

In alternativa, sulla base del fenotipo molecolare (e tenendo conto delle caratteristiche genetiche della specie quali ereditarietà tetrasomica ed allelismo multiplo), si è effettuata una codifica del dato mediante stima del DOSAGGIO ALLELICO (cioè una stima del numero di copie di ogni allele all'interno di ogni singolo genotipo), adottando (con alcune modifiche) la strategia impiegata Flajoulot *et al.* (2005).

Un esempio della sua applicazione è mostrata Figura 2.

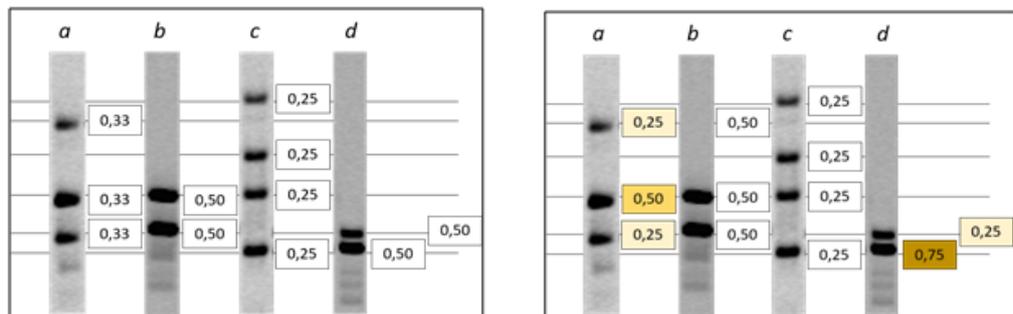


Figura 2 - Rappresentazione esemplificativa del rilievo dei dati, senza (a sinistra) o con stima visiva del dosaggio allelico (sulla base dell'intensità di banda.)

Dopo aver assegnato alle bande di ogni genotipo una frequenza pari a  $1/n_j^i$  (dove  $n$  rappresenta il numero di bande al locus  $j$  presenti nel genotipo  $i$ ; fig. 3a), le frequenze ottenute sono state corrette manualmente, ove possibile, in base all'intensità di banda (fig. 3b). Laddove il risultato elettroforetico non era sufficientemente chiaro, o l'intensità delle bande non suggeriva una possibile indicazione sul dosaggio allelico, sono state considerate valide le frequenze individuate con l'applicazione del rapporto matematico di cui sopra (ad es. nel caso di un genotipo tri-allelico, laddove non si è potuto definire con sufficiente sicurezza quale allele fosse presente in doppia copia, si è mantenuto per tutti e tre gli alleli una frequenza pari a 0.33).

### Calcolo delle frequenze alleliche

Successivamente si è proceduto al calcolo delle frequenze alleliche ai diversi loci sull'intero set di genotipi o separatamente per ciascuna varietà secondo tre approcci.

Nel caso del semplice rilievo per presenza/assenza e nel caso di dati codificati con stima del dosaggio allelico, la frequenza di ogni allele è stata calcolata direttamente secondo la formula (Nei, 1987).

Inoltre, è stato applicato, con alcune modifiche, il modello statistico messo a punto da Liu *et al.* (2007) per la stima delle frequenze alleliche in individui tetraploidi. Il modello, a differenza dei due precedenti, permette di ottenere anche una stima della frequenza degli alleli nulli la cui manifestazione, per la natura tetraploide dei materiali, è prevedibilmente rara.

### Stima della eterozigosità attesa

Per ciascun locus è stata determinata l'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) e il numero effettivo di alleli ( $A_e$ ), cioè il numero teorico di alleli di uguale frequenza tale da fornire l'eterozigosità attesa, secondo le formule di Nei, 1987. Si ricorda che l'eterozigosità attesa è la probabilità che due alleli ad un locus, presi a

caso dalla popolazione, siano diversi. Tali due indici sono comunemente impiegati per rappresentare anche l'informatività del marcatore.

### **Determinazione delle relazioni tra genotipi**

L'analisi statistica dei dati è consistita nella determinazione delle similarità o distanze genetiche (1-similarità) su base molecolare tra tutti i possibili confronti a coppia tra genotipi e nella loro rappresentazione mediante analisi cluster (UPGMA) impiegando il modulo SIMQUAL del pacchetto statistico NTSYS-pc (Rohlf, 1992).

L'analisi è stata ripetuta impiegando le tre matrici di dati prodotte con i criteri di codifica del dato e calcolo delle frequenze alleliche descritti nel capitolo precedente (METODO BINARIO, DOSAGGIO ALLELICO e METODO STATISTICO).

Nel caso di codifica binaria, la matrice di similarità genetica (SG) è stata calcolata per mezzo del coefficiente di Dice (Dice, 1945).

Nel caso di codifica per DOSAGGIO ALLELICO e con il METODO STATISTICO i dati originali sono indicati come frequenze e le matrici di distanza sono state calcolate per mezzo del coefficiente di Prevosti (Prevosti *et al.*, 1975). Per il calcolo della distanza di Prevosti è stato utilizzato il modulo SIMGEND di NTSYS-pc. Prima di procedere alla successiva analisi *cluster* la matrice di distanza (dissimilarità) è stata trasformata in matrice di similarità calcolando per ciascun valore il complemento a 1 ( $S_{ij} = 1 - D_{ij}$ ) mediante il modulo TRANSF.

Fra le matrici di similarità calcolate come sopra descritto, è stata calcolata la correlazione per mezzo del modulo MXCOMP, che ne saggia la significatività mediante il test di Mantel.

Una ulteriore rappresentazione grafica delle relazioni tra genotipi sulla base dei valori di similarità è stata ottenuta sottoponendo ad Analisi delle Coordinate Principali le matrici di similarità sopra ottenute utilizzando il modulo PCoA di GENALEX 6.5

### **Analisi della varianza molecolare**

Il grado di differenziazione genetica dei materiali in analisi è stato valutato mediante Analisi della Varianza Molecolare utilizzando il modulo AMOVA nel pacchetto GENALEX 6.5 (Peakall and Smouse, 2012). Mediante questo approccio è possibile ripartire la variabilità globale, riscontrata a livello molecolare tra individui costituenti un insieme, in componenti riferibili ai diversi livelli gerarchici in cui è possibile strutturare logicamente l'insieme stesso. La significatività delle singole componenti è poi saggiata attraverso procedure permutative.

Sulla base delle matrici di similarità così ottenute è stata successivamente effettuata l'analisi *cluster* e si sono costruiti i corrispondenti dendrogrammi con utilizzando il metodo UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method Arithmetic Average*) impiegando il modulo SAHN. La versione grafica dei dendrogrammi è stata ottenuta con il modulo TREE. La fedeltà della rappresentazione delle similarità tra genotipi offerta dal dendrogramma è stata saggiata calcolando, come sopra indicato, la correlazione tra le matrici di similarità originaria e la matrice cofenetica calcolata per i rispettivi dendrogrammi. Si ricorda che la matrice cofenetica contiene i valori di similarità desunti dal dendrogramma.

### **Risultati ottenuti e discussione**

#### **Genotipizzazione e stima del dosaggio allelico**

Complessivamente la genotipizzazione condotta con gli 8 marcatori molecolari SSR selezionati nella prima fase dello studio ha prodotto profili di amplificazione di buona qualità (Figura 3).

Solo in alcuni casi (esempio locus MSE470 e locus MSE723) i profili di amplificazione sono risultati leggermente deformati e pertanto lo *scoring* degli alleli è stato svolto tramite interpretazione visiva e non per mezzo del

software *Molecular Imaging* sopra citato. In questi casi si è proceduto registrando direttamente la presenza o l'assenza di banda in variabili binarie di tipo 1/0 e allineando i diversi gel per mezzo dei genotipi di controllo comuni e delle *ladder*.

L'analisi degli 8 loci SSR nelle 4 varietà ha rilevato complessivamente 83 alleli (Tabella 4).

Tabella 4 - Analisi dei fenotipi molecolari riscontrati.

Locus (nome)	Crom. n.	Alleli n.	Frequenza fenotipo molecolare Bande (n.)				
			1	2	3	4	0
FMT13	I	16	0,05	0,33	0,53	0,09	0
MTIC451	II	14	0,03	0,2	0,48	0,29	0
MSE470	III	8	0,07	0,53	0,34	0,07	0
AFctt1	IV	12	0,13	0,39	0,37	0,11	0
MSE160	V	10	0,03	0,39	0,51	0,07	0
MSE723	VI	8	0,16	0,68	0,12	0,03	0
MTIC273	VII	5	0,29	0,48	0,22	0	0
AFca16	VIII	10	0,03	0,23	0,53	0,21	0
media		10,4	0,10	0,40	0,39	0,11	0,00

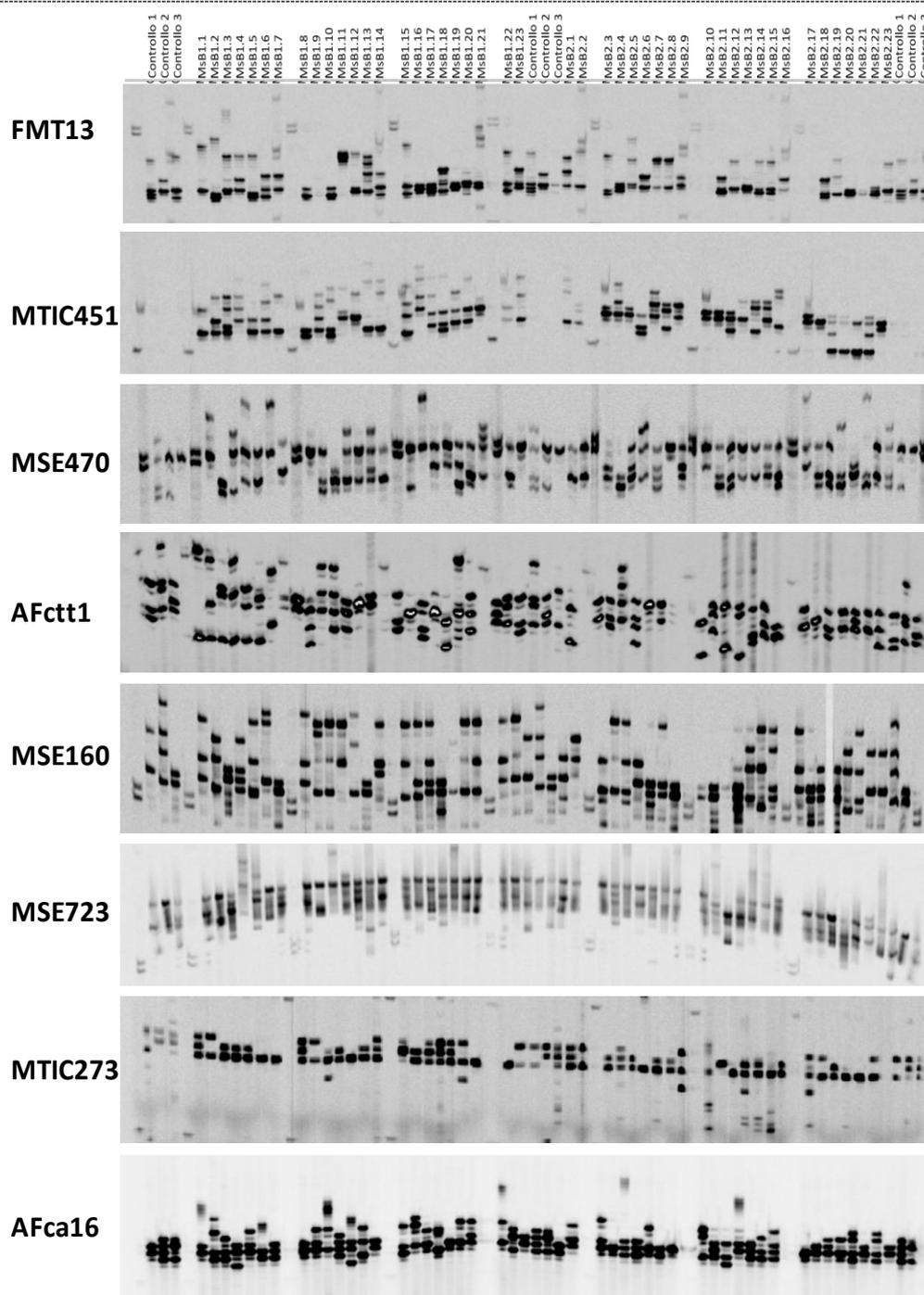


Figura 3 – Esempio di profili ottenuti con gli 8 marcatori selezionati su parti delle popolazioni MsB1 e MsB2.

Il numero medio di alleli per locus ( $n$ ) è stato pari a 10,4. In accordo con la fonte bibliografica di riferimento il locus più polimorfico è risultato FMT13, posizionato sul cromosoma I, con un totale di 16 alleli. Il locus meno polimorfico è risultato essere quello sul cromosoma 7 (MTIC273) con un totale di soli 5 alleli.

La ricchezza allelica rilevata sembra degna di nota, considerato lo scarso numero di varietà e la loro origine. Qiang et al. (2015), genotipizzando una collezione internazionale di ben 336 varietà coltivate di erba medica con 85 SSR, hanno rilevato mediamente 12.4 alleli per locus, un valore solo di poco superiore a quello osservato in questo studio; occorre d'altra parte precisare

che i marcatori da noi utilizzati erano stati selezionati privilegiando quelli con elevato polimorfismo in base a studi precedenti.

Per tutti i loci sono stati rilevati genotipi appartenenti ai quattro fenotipi molecolari con la presenza di 1,2,3 o 4 bande, ad eccezione della classe tetra-allelica non rilevata per il locus MTIC273. È da evidenziare, inoltre, che il genotipo *quadruplex* per l'allele nullo non è stato rilevato ad alcun locus. Eventuali dati mancanti (*missing*) sono stati controllati mediante ri-amplificazione e in nessun caso è stata accertata la presenza di un allele nullo. Senza considerare la possibile presenza di alleli nulli (non visibili) nel caso di fenotipi mono-, bi- e tri-allelici, nella media i fenotipi molecolari più frequenti sono stati quello bi-allelico (0,40) e quello tri-allelico (0,39), mentre meno frequenti sono stati il mono- e il tetra-allelico (rispettivamente 0,11 e 0,10).

### **Informatività dei marcatori**

Nella medesima Tabella 5 per ciascun locus, sono riportati i valori di eterozigotità attesa ( $H_e$ ) e il numero effettivo di alleli ( $A_e$ ) calcolati sulla base delle frequenze alleliche stimate per mezzo dei metodi descritti precedentemente. I due indici hanno un andamento del tutto analogo, in quanto tra loro in stretta relazione matematica.

Tabella 5 - Numero di alleli ed informatività dei marcatori.

Locus (nome)	Crom. n.	Alleli n.	$H_e$			$A_e$		
			Pres/ Ass	Intens. banda	Met.stat ist.	Pres/ Ass	Intens. banda	Met.stat ist.
FMT13	I	16	0,85	0,82	0,90	6,58	5,60	9,84
MTIC451	II	14	0,86	0,83	0,90	7,14	5,98	9,74
MSE470	III	8	0,74	0,69	0,84	3,82	3,25	6,20
AFctt1	IV	12	0,85	0,84	0,91	6,70	6,16	10,62
MSE160	V	10	0,82	0,80	0,88	5,46	5,12	8,57
MSE723	VI	8	0,72	0,68	0,84	3,52	3,08	6,43
MTIC273	VII	5	0,68	0,62	0,82	3,10	2,65	5,69
AFca16	VIII	10	0,79	0,78	0,85	4,87	4,57	6,83
media		10,4	0,79	0,76	0,87	5,15	4,55	7,99

È interessante notare come a fronte di un ampio ambito di variazione in termini di numero di alleli (5-16), il numero effettivo di alleli ( $A_e$ ) è variato molto più limitatamente (3,1-7,14). Ciò è riconducibile ad una distribuzione ineguale della frequenza degli alleli che, anche nel caso di una loro elevata numerosità, limita il livello di eterozigotità.

Si può notare come i valori di  $H_e$  calcolati sulle frequenze alleliche stimate in base all'intensità delle bande risultino sempre più bassi rispetto a quelli calcolati per mezzo della codifica binaria. Ciò non è inatteso in quanto l'attribuzione di un dosaggio allelico determina (e/o accentua) uno squilibrio delle frequenze alleliche rispetto a una loro uguale ripartizione quando calcolate su base binaria.

D'altra parte l' $H_e$  basata sulle frequenze alleliche stimate mediante il metodo statistico è sempre superiore alle altre in quanto contempla la presenza di alleli nulli che contribuiscono alla ricchezza allelica e tendono ad aumentare l'eterozigotità. Tuttavia, dal punto di vista dell'utilità il loro apporto all'informatività del marcatore è praticamente nullo in quanto solo molto raramente sono presenti in omozigosi (allele nullo sui quattro cromosomi). Infatti in questo studio, sulla base dei calcoli svolti applicando la formula di Liu et al. (2007), per gli 8 loci considerati sono state stimate frequenze dell'allele nullo variabili tra 0,15 e 0,28 (dati non riportati). Benché le frequenze rilevate siano considerevoli, come detto non si è comunque rilevato

nessun genotipo quadruplex per l'allele nullo. Poiché la probabilità di un tale evento è pari a  $p^4$  (con  $p$  indicante la frequenza dell'allele nullo), anche nel caso della frequenza maggiore ( $0,28^4 = 0,0062$ ) era poco probabile che un tale genotipo fosse incluso nel campione esaminato.

I valori di  $H_e$  determinati con i tre metodi di stima delle frequenze hanno mostrato ambiti di variazione compresi tra 0,68 e 0,86 con il metodo binario, 0,62 e 0,84 con quello del dosaggio allelico e 0,82 e 0,91 con quello statistico. Complessivamente i valori di  $H_e$  sono risultati piuttosto elevati e leggermente superiori (anche considerando soltanto il metodo binario e quello del dosaggio allelico) a quelli rilevati da Qiang et al. (2015). Tali valori, pur indicando una elevata eterozigosità del materiale vegetale, risultano essere ovviamente condizionati dall'alta ricchezza allelica riscontrata ad ogni locus. Allo stesso tempo infatti, confrontando i valori di  $A_e$  con quelli di  $H_e$ , si può dedurre che quest'ultimi risultano negativamente condizionati da una distribuzione ineguale delle frequenze alleliche.

### Alleli caratteristici

Nessun allele negli 8 loci è stato rilevato uniformemente presente in tutti gli individui analizzati di ciascuna varietà. Come visibile in Tabella 6 alcuni alleli sono risultati distribuiti in maniera eterogenea nelle 4 varietà (sia in termini di presenza/assenza che per quanto riguarda le loro frequenze).

Tab.6. Frequenze alleliche rilevate negli 8 loci di ciascuna varietà

FMT13	A1	A2	B1	B2	MTC451	A1	A2	B1	B2	MSE470	A1	A2	B1	B2
1	3.6	2.3	0.0	1.3	1	0.0	1.1	0.0	0.0	1	0.0	0.0	1.1	3.4
2	0.0	1.1	0.0	1.1	2	0.0	2.2	0.0	0.0	2	0.0	0.0	0.0	1.1
3	1.1	1.1	0.0	1.1	3	0.0	0.0	0.0	1.1	3	9.1	3.6	2.3	4.3
4	0.0	0.0	0.0	1.3	4	0.0	4.3	1.1	6.3	4	0.0	0.0	0.0	2.2
5	6.5	3.1	1.3	7.6	5	1.1	9.1	2.2	5.1	5	31.9	38.8	33.3	43.8
6	11.2	3.8	3.3	4.9	6	9.8	10.9	3.3	8.0	6	6.5	8.0	11.2	9.8
7	0.0	0.0	15.0	0.0	7	10.5	4.0	3.1	5.8	7	49.3	46.4	35.5	26.4
8	0.0	1.1	0.0	1.1	8	16.7	10.9	8.3	6.9	8	3.3	3.3	16.3	6.9
9	3.1	0.0	0.0	0.0	9	10.5	8.3	18.5	2.2					
10	1.1	1.4	3.3	8.0	10	14.5	17.0	33.7	23.4					
11	0.0	3.8	10.4	1.3	11	8.3	0.0	3.4	1.1					
12	0.0	1.1	0.0	0.0	12	28.6	30.1	13.4	31.5					
13	4.0	3.6	8.3	0.0	13	0.0	2.2	1.4	6.3					
14	30.4	29.7	34.2	33.0	14	0.0	0.0	7.6	0.0					
15	18.5	21.7	20.8	19.7										
16	18.5	19.9	3.3	18.9										

AFctt1	A1	A2	B1	B2	MSE160	A1	A2	B1	B2	MSE723	A1	A2	B1	B2
1	3.4	4.9	1.1	4.3	1	0.0	0.0	0.0	4.2	1	0.0	3.3	0.0	2.2
2	3.4	2.3	0.0	3.4	2	23.4	23.0	10.2	22.3	2	0.0	4.3	1.4	3.3
3	0.0	4.3	1.1	2.2	3	3.4	3.6	0.0	1.3	3	48.6	39.5	48.3	34.3
4	3.6	8.3	2.3	0.0	4	13.2	7.2	9.5	4.2	4	13.4	10.9	6.5	6.2
5	32.6	12.1	33.7	12.0	5	8.7	4.3	18.9	16.7	5	20.3	29.7	36.2	23.9
6	3.3	13.3	11.4	18.8	6	0.0	0.0	0.0	3.4	6	17.8	9.8	4.3	3.4
7	23.0	30.7	24.6	26.1	7	26.4	35.5	21.2	20.8	7	0.0	2.3	0.0	2.3
8	18.1	8.3	14.8	6.3	8	16.7	24.3	31.8	23.4	8	0.0	0.0	2.2	2.2
9	6.5	3.4	1.5	9.8	9	2.2	0.0	6.8	0.0					
10	0.0	1.3	3.7	0.0	10	0.0	0.0	1.3	1.3					
11	0.0	6.8	3.8	14.9										
12	0.0	1.3	0.0	0.0										

MTC273	A1	A2	B1	B2	Afctt15	A1	A2	B1	B2
1	23.1	9.8	14.0	18.5	1	0.0	1.3	0.0	0.0
2	20.1	38.6	22.7	21.4	2	0.0	1.1	0.0	2.9
3	33.0	43.3	36.4	37.6	3	0.0	0.0	0.0	1.1
4	3.8	4.9	6.8	2.3	4	2.2	1.1	1.4	4.0
5	0.0	1.1	0.0	0.0	5	3.4	11.7	7.2	13.6
6					6	18.5	4.2	8.7	8.3
7					7	29.7	30.7	19.2	18.1
8					8	30.4	26.1	40.9	34.4
9					9	11.6	23.3	21.0	13.0
10					10	2.2	0.0	1.4	2.3

In numerosi casi (38 su 83 alleli complessivamente rilevati) si è osservata l'assenza di un allele in una o più varietà; tuttavia, solo in 3 casi la frequenza dell'allele nelle altre varietà è risultata maggiore di 0.05 (allele 7 e 9 al locus FMT13 e allele 14 al locus MTIC451).

Il valore soglia dello 0.05 è stato scelto perché ritenuto orientativamente ragionevole nel caso si volessero utilizzare alleli di tale frequenza e caratteristici (cioè esclusivi) di una determinata varietà per accertare l'identità di un campione ignoto. Infatti, assumendo che le frequenze alleliche calcolate sul campione rappresentino effettivamente quelle vere per la varietà, una frequenza allelica di 0.05 richiederebbe l'analisi di un campione di almeno 15 individui per rilevare un tale allele con una confidenza del 95% (errore per falso negativo al 5%) e quindi per poter esprimere un giudizio circa l'identità della varietà. L'allele 7 al marcatore FMT13 è stato rilevato nella varietà MsB1 con una frequenza pari a 0.15. Pertanto in tal caso sarebbe sufficiente esaminare 5 individui per sicuri avere una confidenza statistica del 95% di rilevare l'allele qualora il campione ignoto fosse costituito da MsB1.

Pertanto si ritiene possibile progettare un sistema di verifica varietale basato sull'analisi di un numero contenuto di individui per alcuni loci SSR, preferibilmente su cromosomi diversi o non associati, ai quali la varietà oggetto di verifica mostri la presenza di alleli caratteristici.

#### Similarità tra genotipi e analisi cluster

Sulla base del rilievo degli alleli ottenuto con metodo binario e con il metodo del dosaggio allelico sono state prodotte due matrici di similarità genetica, la prima calcolata con coefficiente di Dice (Figura 4) e la seconda con quello di Prevosti (Figura 5).



Figura 4 - Matrice di similarità (coefficiente di Dice) tra i92 individui delle 4 varietà esaminate.

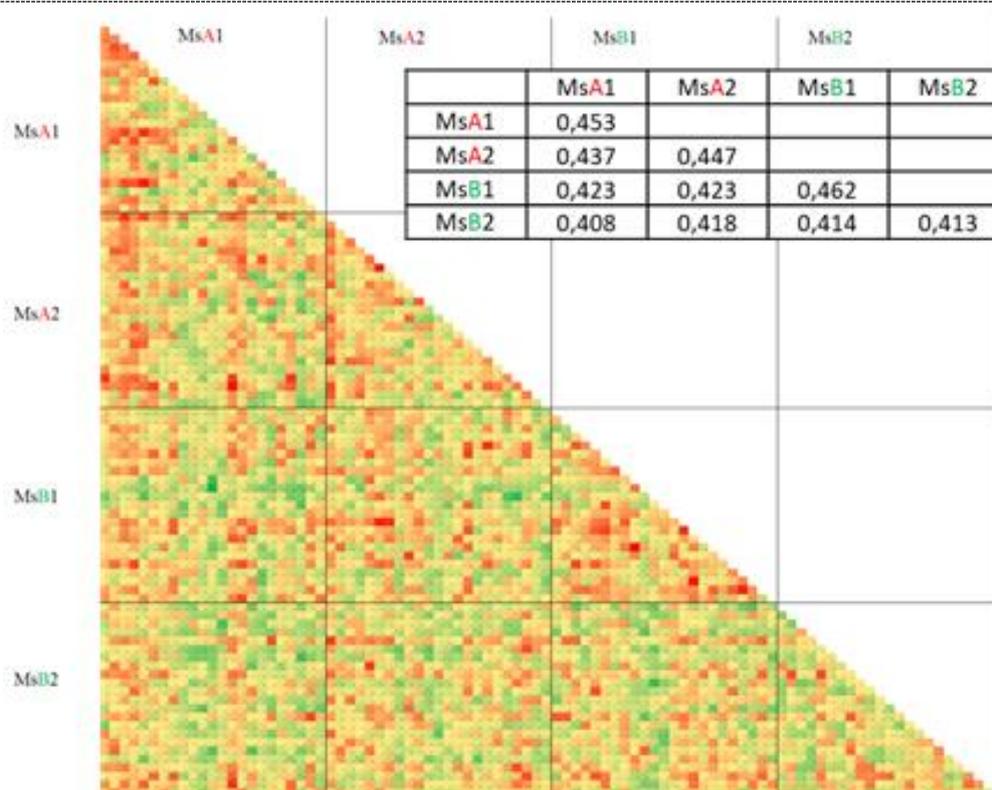


Figura 5 Matrice di similarità' (coefficiente 1-dist. Prevosti) tra 92 individui delle 4 varietà esaminate

Nel primo caso si sono riscontrati valori compresi tra 0,129 e 0,821 (media 0,499), mentre per la seconda valori compresi tra 0,071 e 0,736 (media 0,426), evidenziando quindi in entrambi i casi una elevata variabilità.

I valori di similarità individuati nelle due matrici risultano altamente correlati ( $r = 0,89$ ;  $P < 0,001$ , Mantel test) e pertanto si ritiene che forniscano indicazioni sostanzialmente simili. Di seguito saranno quindi commentati solo i valori relativi alla matrice di similarità di Prevosti.

Ogni cella delle matrici rappresenta la similarità relativa ad un confronto a coppia di genotipi. Le celle sono state colorate assegnando una gradazione tra il verde e il rosso (corrispondenti, rispettivamente ai valori minimo e massimo di similarità). Tale codifica, insieme alla suddivisione della matrice in quadranti corrispondenti ai confronti entro e tra varietà, permette di cogliere a colpo d'occhio una prevalenza, seppur lieve, di confronti ad alta similarità (celle rosse) entro le varietà MsA1, MsA2, MsB1 e nel confronto tra le varietà dell'azienda A. Allo stesso modo una prevalenza di confronti a bassa similarità (celle verdi) è riscontrabile per i confronti entro la varietà MsB2, tra le varietà dell'azienda B e nei confronti tra le due aziende. Questo andamento è confermato dai valori medi calcolati per ciascuna serie di confronti (entro e tra varietà), riportati nelle tabelle in ciascuna figura.

Il valore più elevato di similarità media si è riscontrato entro la varietà MsB1 (0.462) mentre quello più basso in MsB2 che è risultata anche la varietà meno simile rispetto alle altre. Riteniamo che questo possa essere in qualche modo ascrivibile all'ampia base genetica utilizzata per la costituzione di MsB2 (risalente agli anni '70); inoltre è emerso, da colloqui privati con il responsabile del mantenimento, che nello sviluppo della varietà ci possano essere stati contributi genetici, anche non controllati, di materiali di origine esotica.

I valori di frequenza allelica entro varietà stimati per mezzo del "metodo statistico" sono stati impiegati per calcolare le similarità di Prevosti tra le quattro varietà e per rappresentarne le relazioni mediante analisi cluster (Figura 6).

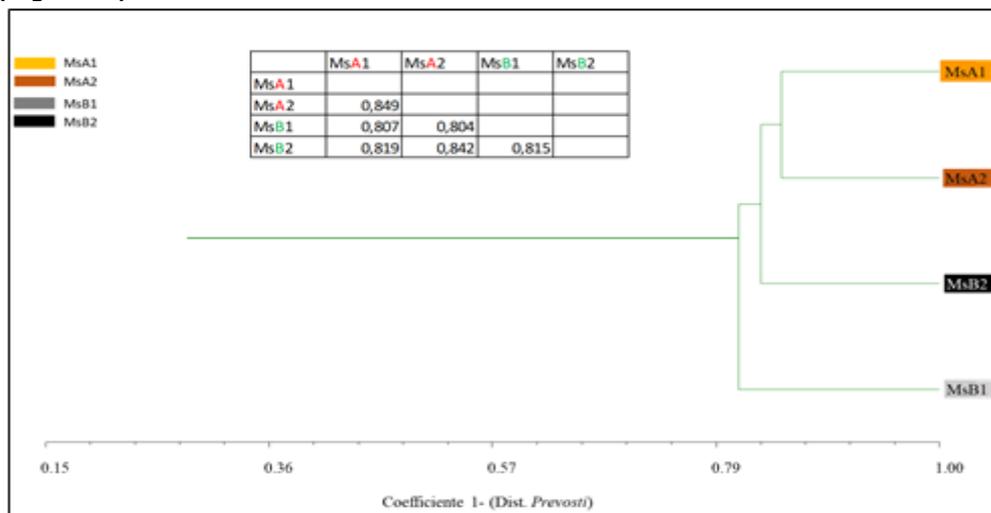


Figura 6 - Matrice di similarità fra varietà (coefficiente 1-dist. Prevosti) e analisi cluster.

Il dendrogramma relativo alle sole varietà qui mostrato è solo in parziale accordo con quanto atteso sulla base delle similarità medie tra individui di varietà diverse (Figura 5); anche in questo caso le varietà più simili sono risultate MsA1 e MSA2, seguite però da MsB2 che, come evidenziato precedentemente appariva, la più distante sulla base dei confronti individuali tra singoli genotipi. Anche in tal caso tale discrepanza è presumibilmente imputabile a pattern diversi di distribuzione allelica. È possibile immaginare, infatti, popolazioni caratterizzate dalle medesime frequenza alleliche (e quindi geneticamente identiche) ma differenti tra loro in termini di coefficiente di similarità media tra i rispettivi genotipi costituenti.

La Figura 7 mostra il dendrogramma relativo alla metà dei genotipi analizzati (quindi considerabile un campione rappresentativo).

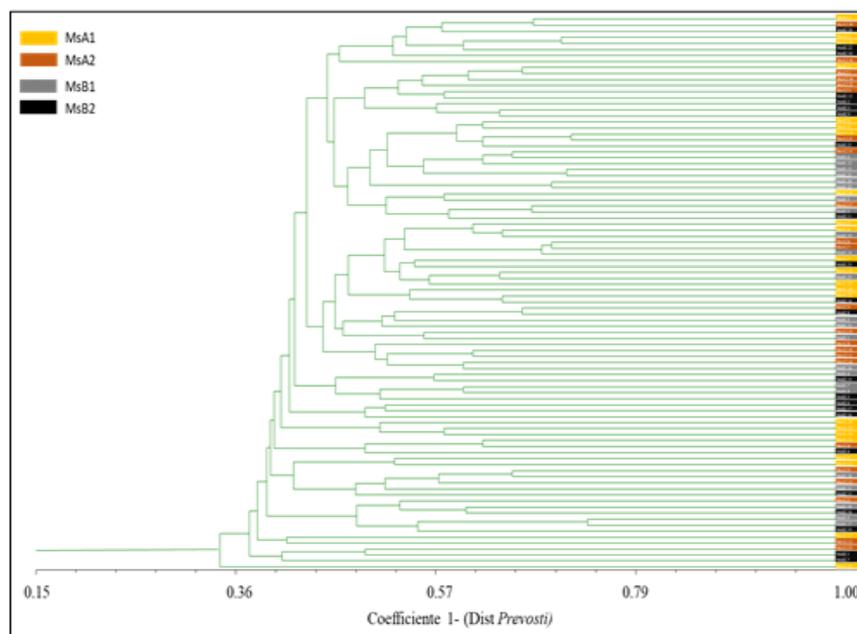


Figura 7 - Analisi cluster su 92 dei genotipi delle quattro varietà.

Da esso non emerge alcun raggruppamento riconducibile alle varietà in esame o alle aziende di provenienza, in quanto i genotipi sono distribuiti in maniera pressoché uniforme nelle diverse branche, riflettendo le minime differenze i termini di similarità genetica sopra discusse. Anche l'analisi della correlazione cofenetica ha confermato la qualità scadente della rappresentazione grafica delle similarità genetiche, ad indicazione che non esiste una struttura interna ai dati.

Risultati simili si sono ottenuti sottoponendo le matrici di similarità ad Analisi delle Coordinate Principali. Nella Figura 8 sono rappresentati i grafici relativi alla scomposizione della PCA sui tre piani individuati dalle coppie di assi. Anche in questo caso non sono presenti pattern evidenti di distribuzione dei genotipi sulla base dell'appartenenza varietale. Infatti la percentuale di variabilità spiegata complessivamente dai tre assi è molto contenuta (valore cumulato 21%). Dalla rappresentazione sembra emergere solamente una debole asimmetria della distribuzione dei genotipi di MsB1, e in minor misura MsA2, lungo l'asse 1 (Figura 8a e 8b).

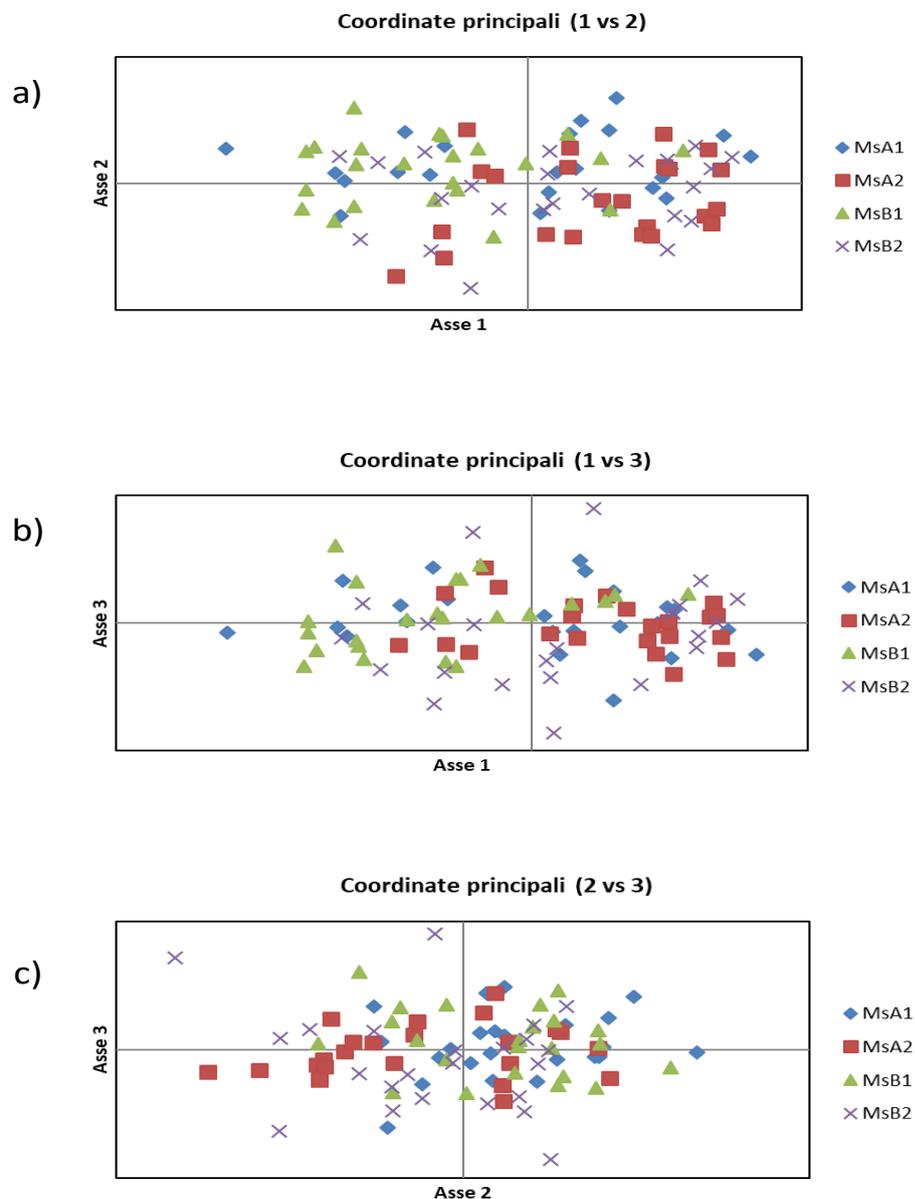
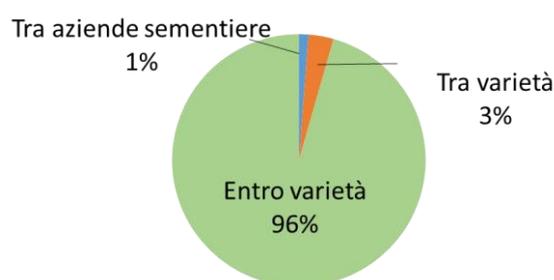


Figura 8 - Analisi delle coordinate principali condotta sulle similarità (dati binari) tra i 92 individui delle quattro varietà esaminate.

La Tabella 7 riporta i risultati dell'AMOVA con la scomposizione della variabilità globale rilevata a livello molecolare tra i genotipi analizzati.

Tabella 7 - Analisi della varianza molecolare (AMOVA) condotta nell'ambito delle 4 varietà di erba medica delle 2 aziende sementiere saggiate con 8 marcatori SSR.

Fonte di variazione	Gradi di libertà	Devianze	Varianze	Componenti della varianza	%	P
Fra aziende	1	0,65	0,65	0,004	1,2%	0,011
Fra varietà	2	0,98	0,49	0,009	3,2%	0,001
Entro varietà	88	24,48	0,28	0,278	95,6%	0,001
Totale	91	26,12		0,291	100,0%	



I valori mostrati sono relativi all'analisi condotta sulla base delle distanze di Prevosti, ma risultati del tutto simili sono stati ottenuti sulla base delle distanze di Dice (1- similarità di Dice). Le quote della varianza totale attribuibili alle componenti "azienda" e "varietà" sono risultate estremamente basse, rispettivamente del 1 e 3%, ma statisticamente significative (rispettivamente  $P 0,011$  e  $P 0,001$ ). La quota rimanente è quindi da attribuire alla varianza entro ciascuna varietà.

I tre approcci statistici sopra descritti hanno chiaramente posto in evidenza l'enorme variabilità genetica, rilevabile con marcatori molecolari, presente all'interno delle varietà commerciali esaminate in questo studio e come questa rappresenti di gran lunga la maggior quota della variabilità complessiva. Risulta evidente pertanto l'impossibilità di attribuire un genotipo ad una determinata varietà sulla base della sola similarità genetica.

### Conclusioni

- Questo studio, a differenza di altri descritti nella letteratura, ha voluto prendere in esame la diversità genetica tra varietà commerciali di erba medica attualmente presenti nel panorama varietale italiano, con l'obiettivo di considerare le reali difficoltà nella loro identificazione. La scelta di analizzare varietà commerciali di erba medica, sviluppate in un areale di costituzione ristretto caratterizzato da specifici obiettivi di breeding (con una probabile almeno parziale condivisione della base genetica originaria), ha rappresentato una sfida per quelli che sono gli obiettivi di questo studio.
- Inoltre è da tenere presente che la produzione sementiera (seme certificato) e l'utilizzazione agronomica delle varietà qui considerate è largamente praticata nello stesso areale geografico, e che tale sovrapposizione comporta necessariamente rischi di cambiamento delle frequenze alleliche originali con fenomeni di *convergenza* e diminuzione della distinguibilità tra le varietà. Pertanto, l'analisi qui condotta rappresenterebbe la prima fase di uno studio mirato a sviluppare

strumenti analitici per monitorare l'andamento della variabilità tra ed entro varietà commerciali nel corso delle successive generazioni di moltiplicazione delle sementi, al fine ultimo di garantire la tracciabilità delle produzioni sementiere.

- Lo studio ha portato alla individuazione e messa a punto di un set di marcatori SSR affidabili ed informativi per la genotipizzazione di varietà di erba medica. Il protocollo di analisi, applicato a campioni fogliari liofilizzati, ha permesso di ottenere profili elettroforetici degli amplificati chiari e ben leggibili. Ciò ha consentito, in molti casi, la determinazione del dosaggio allelico, mediante valutazione visiva dell'intensità delle bande, indispensabile per una più accurata stima delle frequenze alleliche nel campione rispetto alla semplice valutazione in termini binari (per presenza/assenza). A tale riguardo si ritiene che l'utilizzo di un sistema di elettroforesi capillare, in alternativa a quello *gel-based* qui utilizzato, potrebbe permettere, mediante analisi delle aree dei picchi, una maggiore efficienza ed affidabilità per la determinazione del dosaggio allelico.
- Inoltre è stata applicata una metodologia statistica di stima delle frequenze alleliche basata sulla frequenza dei fenotipi molecolari (Liu et al. 2007) che, a differenza degli altri approcci, permette la stima della frequenza degli alleli nulli. Per la natura dei materiali utilizzati e il ridotto numero di varietà qui considerate, tuttavia, non è stato possibile valutare pienamente l'efficacia del metodo.
- Benché si sia considerato un solo marcatore per cromosoma, il livello di polimorfismo rilevato nei materiali in analisi è stato molto elevato e paragonabile a quello riportato in altri studi dove erano stati considerati materiali coltivati di erba medica. Questo è certamente da ascrivere alla natura fortemente allogama ed alla autotetraploidia della specie. Infatti non è stato rilevato alcun caso di identità tra due genotipi agli 8 loci indagati e il numero medio di alleli per locus in ciascun individuo è risultato elevato. I marcatori hanno evidenziato un elevato numero medio di alleli per locus, benché spesso con frequenze sbilanciate, come indicato dai valori di eterozigosità e numero effettivo di alleli. Lo studio non ha rilevato l'esistenza di alleli fissati e molto pochi sono stati i casi di alleli "privati", cioè presenti solamente in una varietà.
- I marcatori analizzati hanno evidenziato un'ampia variazione per livelli di similarità tra singoli genotipi, mentre i valori di similarità medi entro e tra popolazioni sono risultati piuttosto uniformi. Si ritiene che nel primo caso tale variabilità potrebbe essere ridotta con l'impiego di un numero maggiore di marcatori, mentre presumibilmente non influirebbe sul secondo aspetto.
- La quota della variabilità complessiva di gran lunga preponderante è risultata quella entro varietà, mentre decisamente secondaria è stata quella attribuibile alle varietà o alle aziende costituttrici (AMOVA). L'analisi cluster e quella delle coordinate principali condotte su tutti i genotipi non hanno infatti evidenziato alcun raggruppamento riconducibile alle varietà in esame o alle aziende di provenienza. Questi risultati, seppure relativi ad un campione molto ristretto di varietà, sono basati su un numero sufficientemente elevato di individui per varietà e sono supportati da un elevato polimorfismo a tutti i loci esaminati. Riteniamo pertanto plausibile che a simili conclusioni si possa giungere analizzando anche materiali di altre provenienze.
- Date le difficoltà sopra descritte per l'identificazione varietale sulla base della similarità genetica in erba medica, considerando il *continuum* evidenziato nella variabilità, si ritiene che un approccio basato sull'utilizzo di singoli marcatori diagnostici della varietà possa portare a risultati più

	<p>certi. In particolare si tratterebbe di individuare alleli caratterizzanti ciascuna varietà da identificare in termini di presenza/assenza o di differenze marcate in termini di frequenza. Nello studio qui condotto sono emersi alcuni marcatori potenzialmente utilizzabili a seguito di attenta verifica delle loro caratteristiche su un più ampio campione.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Qualora alleli <i>privati</i>, cioè esclusivi di una varietà, fossero identificati e confermati su campioni significativi in termini di numero di individui e varietà a confronto, sarebbe possibile predisporre un certo numero di test diagnostici, da utilizzare congiuntamente, per l'identificazione varietale. Protocolli di questo genere potrebbero trovare applicazione nell'attività analitica routinaria per la verifica varietale di campioni di semente e costituire un utile strumento per la tracciabilità e la repressione delle frodi.</li> </ul>
<p><b>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</b></p>	<p>L'obiettivo di riconoscere varietà diverse in base ad analisi molecolari non è stato raggiunto prendendo in esame materiale che ha pressochè le stesse basi genetiche (provenienza dallo stesso ecotipo). Questo non dipende dalla metodica che è stata messa a punto quanto appunto dalla poca distanza genetica. L'attività è stata regolarmente svolta e getta le basi per un approfondimento che possa portare a distinguere invece varietà di altri paesi. L'attività svolta potrebbe rappresentare pertanto un metodo per individuare materiale proveniente da altri paesi nel caso questo venga messo in commercio come seme nazionale.</p>

<b>Azione</b>	<b>3.4 - Messa a punto di strategie di controllo delle malerbe per la medica da seme</b>
<b>Unità aziendale responsabile</b>	<b>CRPV Soc. Coop. Agricola (in collaborazione con ASTRA)</b>
<b>Descrizione delle attività</b>	<p><b>Relazione tecnica (attività 2018-2019)</b></p> <p>La corrente attività è stata incentrata sulla messa a punto di strategie di controllo della cuscuta incentrata sull'impiego dei due erbicidi Propizamide e Pendimetalin. E' stata verificata una strategia che si basa sul doppio intervento annuale, il primo invernale ed il secondo dopo il primo sfalcio. Il Pendimetalin è stato applicato da solo oppure alternato alla Propizamide, con applicazione invernale o con applicazione dopo il primo sfalcio.</p> <p>Le tesi a confronto hanno pertanto previsto l'impiego dei due erbicidi sia in forma ripetuta, sia in alternanza l'un l'altro a confronto con un testimone non trattato.</p> <p>La gestione agronomica degli appezzamenti, da parte delle aziende ospitanti, si è basata sulle normali tecniche di Produzione Integrata. Sono state impostate due prove: la prima è stata effettuata nell'area di Fusignano (RA), su un medicaio al terzo anno, mentre la seconda è stata eseguita su un medicaio di due anni nell'area di Mezzano (RA).</p> <p><u>Applicazioni sperimentali:</u></p> <p>Target: Cuscuta (<i>Cuscuta spp.</i>)  Periodi di Esecuzione: Gennaio 2019 – Agosto 2019  Attrezzature impiegate: irroratrice semovente con barra  Volume impiegato: 300 l/ha  <u>Rilievi efficacia:</u></p> <p>N° Rilievi: 3  - Infestazione media di Cuscuta della sub-parcella (% copertura su 1 m<sup>2</sup> );  - Efficacia visiva (% di controllo erbicida , che fornisce il livello di suscettibilità della malerba in oggetto al trattamento).</p> <p><b><u>Prova 1:</u></b>  <u>Sito di prova:</u>  Alfonsine (RA)</p> <p><u>Informazioni agronomiche:</u></p> <p>Coltura: Erba Medica  Varietà:  Data di semina: 5/04/2017  Età del medicaio: 3 anni  <u>Disegno sperimentale:</u></p> <p>Schema sperimentale: Blocchi randomizzati  Numero tesi: 5  Dimensione tesi: 10000 m<sup>2</sup></p> <p><b><u>Prova 2:</u></b>  <u>Sito di prova:</u>  Alfonsine (RA)</p> <p><u>Informazioni agronomiche:</u></p> <p>Coltura: Erba Medica</p>

Varietà: Pomposa  
 Data di semina: 10/04/2018  
 Età del medicaio: 2 anni

Disegno sperimentale:

Schema sperimentale: Blocchi randomizzati

Numero tesi: 5

Dimensione tesi: 8000 m<sup>2</sup>

Ciascuna tesi prevedeva trattamenti effettuati su parcelloni di mq 8000 (Località Mezzano) e di mq 10000 (Località Fusignano), all'interno di ciascuno dei quali sono state ricavate 4 sub-parcelle (100 mq ciascuna) sulle quali sono stati svolti i rilievi. In ogni località sono stati eseguiti tre rilievi, il 22 Gennaio (al momento della prima applicazione, in assenza di cuscuta attiva), il 24 Giugno (12 giorni dopo la seconda applicazione) e il 18 Luglio (36 giorni dopo la seconda applicazione). Ad ogni rilievo è stata stimata l'infestazione media di Cuscuta della sub-parcella, rapportata ad 1 m<sup>2</sup> e l'efficacia visiva espressa in percentuale di controllo erbicida (che fornisce il livello di suscettibilità della malerba in oggetto al trattamento).

Nelle due aziende agricole è stato messo a confronto lo stesso protocollo, riportato in tabella 1.

Tabella 1. Tesi a confronto

Tesi	Prodotto	Form,	Dose formulato	Volume di acqua	Appl, Timing	Data di applicazione	Periodo trattamenti
T1	Pendimeta lin	31,7%, 365 g/L CS	2 L/ha	300 L/ha	A	22 Gennaio 2019	inverno
			2 L/ha	300 L/ha	B	12 Giugno 2019	dopo primo sfalcio
T2	Pendimeta lin	31,7%, 365 g/L CS	3 L/ha	300 L/ha	A	22 Gennaio 2019	inverno
	Propizami de	36,0%, 400 G/L SC	1,5 L/ha	300 L/ha	B	12 Giugno 2019	dopo primo sfalcio
T3	Propizami de	36,0%, 400 G/L SC	1 L/ha	300 L/ha	A	22 Gennaio 2019	inverno
	Pendimeta lin	31,7%, 365 g/L CS	3 L/ha	300 L/ha	B	12 Giugno 2019	dopo primo sfalcio
T4	Propizami de	36,0%, 400 G/L SC	1 L/ha	300 L/ha	A	22 Gennaio 2019	inverno
			1 L/ha	300 L/ha	B	12 Giugno 2019	dopo primo sfalcio
T5	Non trattato	-	-	-	-	-	-



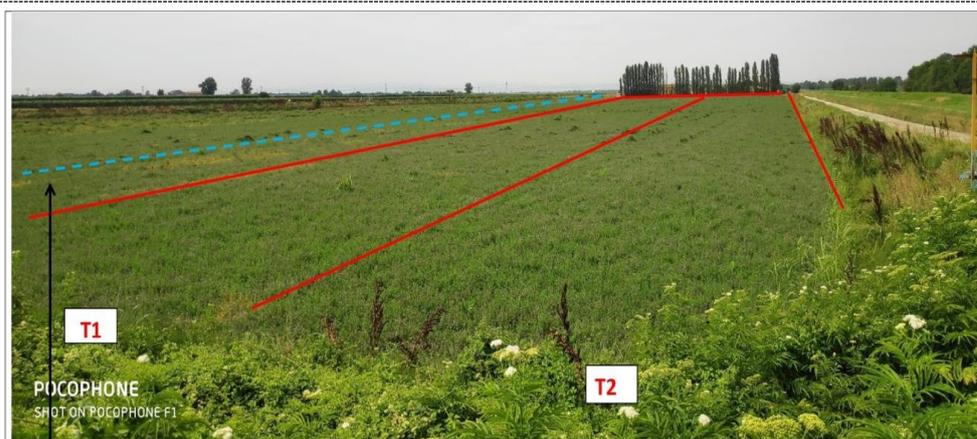
Figura 1. Infestazione di Cuscuta su erba medica



Figura 2. Infestazione di Cuscuta su erba medica



Figura 3. Loc. Fusignano: Infestazione del non trattato



'CORRIDOIO' NON TRATTATO tra la T1 ed il fosso

Figura 4. Loc. Fusignano

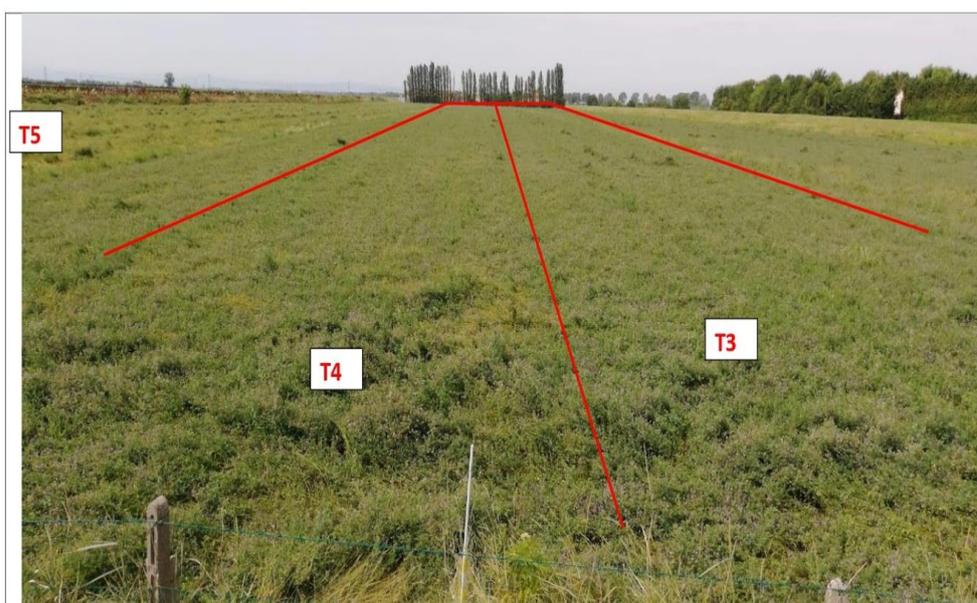


Figura 4. Loc. Fusignano

### Risultati

Le due prove hanno fornito risultati simili circa il controllo della Cuscuta, pur avendo livelli di infestazione diversi. Tutte le strategie hanno fornito un controllo della Cuscuta che si è differenziato statisticamente rispetto alle parcelle non trattate, ma con un diverso grado di efficacia erbicida, riportato nelle tabelle 2 e 3. Nella prima prova in località Fusignano, caratterizzata da un'elevata infestazione di Cuscuta (99,5-100% di copertura), il risultato migliore è stato ottenuto dalle tesi T1 e T3, che hanno fornito risultati significativamente migliori al rilievo di settembre, la tesi T2 si stacca di poco ma significativamente dalle precedenti mentre la tesi T4 si stacca, per un minore controllo, dalle prime tre.

Tabella 2. – Loc. Fusignano: Risultati di efficacia nei confronti della Cuscuta.

Tesi	22/01/2019	24/06/2019			18/07/2019			09/08/2019		
	% Infest.*	% Infest.	% Contr.**	SNK	% Infest.	% Contr.	SNK	% Infest.	% Contr.	SNK
T1	0	10,0	90	b	5,0	95	b	5,0	95	a
T2	0	10,0	90	b	5,0	95	b	10,0	90	b
T3	0	0,0	100	a	0,0	100	a	5,0	95	a
T4	0	15,0	85	c	10,0	90	c	30,0	70	c
T5	0	99,5	-	-	99,5	-	-	100	-	-

**Legenda:**

I valori contrassegnati da lettere uguali non differiscono significativamente con  $P \leq 0,05$  (Test SNK).

\* **Infestazione:** percentuale di copertura del terreno da parte di *Cuscuta campestris*.

\*\***Controllo** (efficacia erbicida): valori medi di riduzione % copertura di Cuscuta rispetto al confronto non trattato.

Nel secondo campo in località Mezzano, caratterizzato da una medio-alta infestazione di Cuscuta (67,5-83.8% di copertura) il risultato delle prime tre tesi non differisce statisticamente mentre anche in questo caso la tesi T4 si stecca significativamente con un risultato nettamente inferiore.

Tabella 3. – Loc. Mezzano: Risultati di efficacia nei confronti della Cuscuta.

Tesi	22/01/2019	24/06/2019			18/07/2019		
	% Infest.*	% Infest.	% Contr.*	SNK	% Infest.	% Contr.	SNK
T1	0	0,0	100	a	0,0	100	a
T2	0	0,0	100	a	0,0	100	a
T3	0	3,5	95	b	3,5	96	b
T4	0	10,3	85	c	11,8	86	c
T5	0	67,5	-	-	83,8	-	-

**Legenda:**

I valori contrassegnati da lettere uguali non differiscono significativamente con  $P \leq 0,05$  (Test SNK).

\* **Infestazione:** percentuale di copertura del terreno da parte di *Cuscuta campestris*.

\*\***Controllo** (efficacia erbicida): valori medi di riduzione % copertura di Cuscuta rispetto al confronto non trattato.

<p><b>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</b></p>	<p>La Cuscuta è risultata suscettibile alle strategie testate con i prodotti a base di Pendimetalin e di Propizamide.</p> <p>L'attività ha quindi fornito importanti dati sperimentali sul valore di Pendimetalin nel controllo della Cuscuta. Tutte le strategie testate pongono l'utilizzo del Pendimetalin come una valida alternativa all'uso della Propizamide, che in entrambe le località ha dato risultati significativamente inferiori nella tesi col doppio intervento.</p> <p>Non si sono registrate particolari criticità e le risultanze ottenute sono state inoltrate anche a 2 ditte che commercializzano erbicidi a base di Pendimetalin al fine di supportare una richiesta di estensione di impiego in etichetta a favore della medica, fortemente richiesta dal mondo produttivo. Nel 2019 infatti come già evidenziato peraltro nelle annate precedenti la cuscuta ha avuto una recrudescenza e negli impianti destinati a produrre seme, si sono registrati forti attacchi che da un lato hanno portato ad una minore resa per effetto della competizione nei confronti della medica ma dall'altro hanno reso necessario un maggior impegno nelle fasi di selezione dove vi sono state percentuali di scarto dovute al seme di cuscuta anche superiori al 40%.</p> <p>Il pendimetalin potrebbe essere un valido affiancamento al diserbo a base di propizamide che in alcuni casi in campagna ha mostrato di non avere più un controllo totale.</p> <p>La prova ha colto pienamente gli obiettivi per la quale era stata impostata.</p>
---	--

<b>Azione</b>	<b>3.5 Definizione di tecniche colturali per la produzione di seme da consumo diretto e per produzione di germogli (sprouting) caratterizzato da basso residuo di fitofarmaci ed elevata qualità sanitaria</b>																																																																																																												
<b>Unità aziendale responsabile</b>	<b>Consorzio Sativa (CRPV in collaborazione con Astra)</b>																																																																																																												
<b>Descrizione delle attività</b>	<p><b>OBBIETTIVI</b></p> <p>La tendenza dei consumatori ad acquistare semi e germogli è sempre più diffusa sotto la spinta di messaggi che ne mostrano le proprietà benefiche e ne fanno un caposaldo della sana alimentazione. I semi per il consumo diretto e soprattutto quelli per produrre germogli, devono offrire garanzie per quanto riguarda le soglie dei residui da fitofarmaci e soprattutto l'assenza di contaminazioni batteriche nocive. Poiché questi aspetti non sono scontati e la maggior parte delle sementi prodotte è stata tradizionalmente destinata alla riproduzione, con un marginale interesse per l'aspetto dei residui, si è reso necessario impostare un'attività sperimentale che portasse alla definizione di strategie di difesa e di conservazione post-raccolta, da applicare nei processi produttivi delle sementi destinate al consumo alimentare.</p> <p>A questo proposito sono state realizzate 2 attività distinte:</p> <p><b>1) Messa a punto di un protocollo di gestione della difesa su colture destinate a produrre seme per germogli e sua verifica applicativa in campo.</b></p> <p><b>2) Controllo del seme lungo le fasi di selezione e conservazione all'interno del magazzino.</b></p> <p>Relativamente alla prima si è deciso di muoversi in tre direzioni:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Valutazione preliminare di tutti i dati reperibili sulla persistenza dei fitofarmaci,</li> <li>• Scelta di aziende campione presso le quali seguire strategie di difesa a basso residuo,</li> <li>• Esecuzione di analisi chimiche per verificare il livello dei residui prima della commercializzazione.</li> </ul> <p><b><u>Attività 1) messa a punto di un protocollo di gestione della difesa su colture destinate a produrre semi per germogli e sua verifica applicativa in campo</u></b></p> <p>Questa attività è stata realizzata in due fasi: una preliminare di verifica dei dati disponibili circa la persistenza dei principi attivi disponibili (A) e una in campo di verifica delle strategie a basso residuo applicate (B).</p> <p><b><u>A. Valutazione preliminare di tutti i dati reperibili sulla persistenza dei fitofarmaci di uso comune su colture di porro, crescione, girasole, ravanella ed erba medica.</u></b></p> <p>Tutti i dati disponibili in merito alle sostanze ammesse sulle diverse colture e soprattutto sulla loro persistenza sono riportate nelle tabelle sottostanti.</p> <p><b>Tabella 1:</b> Sostanze attive ammesse su porro in produzione integrata e intervalli di sicurezza</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Sostanza Attiva (**)= revocata o non</th> <th>Bio</th> <th>Tipologia</th> <th>Gruppo Chimico</th> <th>Codice MoA</th> <th>Coltura</th> <th>Tipo Impieg</th> <th>I.S.</th> <th>LMR</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PENDIMETALIN</td> <td></td> <td>D R</td> <td>Dinitroaniline</td> <td>K1</td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td></td> <td>0,05</td> </tr> <tr> <td>PIRETRINE</td> <td></td> <td>I</td> <td>Prodotti naturali</td> <td>3A</td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td>2</td> <td>1,00</td> </tr> <tr> <td>PIRETRINE</td> <td></td> <td>I</td> <td>Prodotti naturali</td> <td>3A</td> <td>Porro</td> <td>Semente</td> <td></td> <td>1,00</td> </tr> <tr> <td>PIRIDATE</td> <td></td> <td>D</td> <td>Fenilpiridazine</td> <td>C3</td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td>28</td> <td>1,00</td> </tr> <tr> <td>PYRACLOSTROBIN</td> <td></td> <td>F</td> <td>Analoghi delle strobiruline</td> <td>11</td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td>7</td> <td>0,80</td> </tr> <tr> <td>RAME</td> <td></td> <td>F</td> <td>Composti inorganici</td> <td>M 1</td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td>3</td> <td>20,00</td> </tr> <tr> <td>SPINOSAD</td> <td></td> <td>I</td> <td>Spinosine</td> <td>5</td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td>3</td> <td>0,20</td> </tr> <tr> <td>STREPTOMYCES K61</td> <td></td> <td>F</td> <td>Microrganismi</td> <td></td> <td>Porro</td> <td>Semente</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRICHODERMA ASPERELLUM</td> <td></td> <td>F</td> <td>Microrganismi</td> <td></td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>TRICHODERMA HARZIANUM</td> <td></td> <td>F</td> <td>Microrganismi</td> <td></td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>ZOLFO</td> <td></td> <td>A F</td> <td>Composti inorganici</td> <td>M 2</td> <td>Porro</td> <td>Coltura</td> <td>3</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Sostanza Attiva (**)= revocata o non	Bio	Tipologia	Gruppo Chimico	Codice MoA	Coltura	Tipo Impieg	I.S.	LMR	PENDIMETALIN		D R	Dinitroaniline	K1	Porro	Coltura		0,05	PIRETRINE		I	Prodotti naturali	3A	Porro	Coltura	2	1,00	PIRETRINE		I	Prodotti naturali	3A	Porro	Semente		1,00	PIRIDATE		D	Fenilpiridazine	C3	Porro	Coltura	28	1,00	PYRACLOSTROBIN		F	Analoghi delle strobiruline	11	Porro	Coltura	7	0,80	RAME		F	Composti inorganici	M 1	Porro	Coltura	3	20,00	SPINOSAD		I	Spinosine	5	Porro	Coltura	3	0,20	STREPTOMYCES K61		F	Microrganismi		Porro	Semente			TRICHODERMA ASPERELLUM		F	Microrganismi		Porro	Coltura			TRICHODERMA HARZIANUM		F	Microrganismi		Porro	Coltura			ZOLFO		A F	Composti inorganici	M 2	Porro	Coltura	3	
Sostanza Attiva (**)= revocata o non	Bio	Tipologia	Gruppo Chimico	Codice MoA	Coltura	Tipo Impieg	I.S.	LMR																																																																																																					
PENDIMETALIN		D R	Dinitroaniline	K1	Porro	Coltura		0,05																																																																																																					
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	3A	Porro	Coltura	2	1,00																																																																																																					
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	3A	Porro	Semente		1,00																																																																																																					
PIRIDATE		D	Fenilpiridazine	C3	Porro	Coltura	28	1,00																																																																																																					
PYRACLOSTROBIN		F	Analoghi delle strobiruline	11	Porro	Coltura	7	0,80																																																																																																					
RAME		F	Composti inorganici	M 1	Porro	Coltura	3	20,00																																																																																																					
SPINOSAD		I	Spinosine	5	Porro	Coltura	3	0,20																																																																																																					
STREPTOMYCES K61		F	Microrganismi		Porro	Semente																																																																																																							
TRICHODERMA ASPERELLUM		F	Microrganismi		Porro	Coltura																																																																																																							
TRICHODERMA HARZIANUM		F	Microrganismi		Porro	Coltura																																																																																																							
ZOLFO		A F	Composti inorganici	M 2	Porro	Coltura	3																																																																																																						

**Tabella 2:** Sostanze attive ammesse su porro in produzione integrata e intervalli di sicurezza

Sostanza Attiva (**) = revocata o non autorizzata	Bio	Tipologia	Gruppo Chimico	Codice MoA	Coltura	Tipo Impieg	I.S.	LMR
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	3A	Erba medica	Coltura	2	
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	3A	Erba medica	Semente		

**Tabella 3:** Sostanze attive ammesse su crescione in coltivazione biologica e intervalli di sicurezza

Sostanza Attiva (**) = revocata o non autorizzata	Bio	Tipologia	Gruppo Chimico	Coltura	Tipo Impiego	I.S.	LMR
(Z,E)-9,11-TETRADECADIEN-1-IL ACETATO		M	Feromoni	Crescione	Coltura		
(Z,E)-9,12-TETRADECADIEN-1-IL ACETATO		M	Feromoni	Crescione	Coltura		
AZADIRACTINA		I	Prodotti naturali	Crescione	Coltura	3	1
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS SBS. PLANTARUM D		7 F	Microrganismi	Crescione	Coltura		
BACILLUS SUBTILIS		F	Microrganismi	Crescione	Coltura	3	
BACILLUS T. SUB. AIZAWAI		I	Microrganismi	Crescione	Coltura	3	
BACILLUS T. SUB. KURSTAKI		I	Microrganismi	Crescione	Coltura		
CEREVISANE		V		Crescione	Coltura		
CONIOTHYRIUM MINITANS		F	Microrganismi	Crescione	Coltura		
COS-OGA		V		Crescione	Coltura		
ESTRATTO D'AGLIO		I N V		Crescione	Coltura		
FOSFATO FERRICO		L	Composti inorganici	Crescione	Coltura		
HELICOVERPA ARMIGERA NUCLEOPOLIEDROVIRS		I	Microrganismi	Crescione	Coltura	3	
PAECILOMYCES LILACINUS CEPPO 251		N	Microrganismi	Crescione	Coltura		
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Crescione	Coltura	1	1
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Crescione	Semente		1
PYTHIUM OLIGANDRUM		F	Microrganismi	Crescione	Coltura		
RAME		F	Composti inorganici	Crescione	Coltura	3	100
SPINOSAD		I	Prodotti naturali	Crescione	Coltura	3	10
SPODOPTERA LITTORALIS NUCLEOPOLIEDROVIRS		I	Microrganismi	Crescione	Coltura	3	
STREPTOMYCES K61		F	Microrganismi	Crescione	Coltura		
STREPTOMYCES K61		F	Microrganismi	Crescione	Semente		
TRICHODERMA ASPERELLUM		F	Microrganismi	Crescione	Coltura		
TRICHODERMA ATROVIRIDE CEPPO T11		F	Microrganismi	Crescione	Coltura	3	
TRICHODERMA GAMSII		F	Microrganismi	Crescione	Coltura		
ZOLFO		A F	Composti inorganici	Crescione	Coltura	5	

**Tabella 4:** Sostanze attive ammesse su girasole in coltura biologica e intervalli di sicurezza

Sostanza Attiva (**)= revocata o non autorizzata	Bio	Tipologia	Gruppo Chimico	Coltura	Tipo Impiego	I.S.	LMR
BACILLUS T. SUB. AIZAWAI		I	Microrganismi	Girasole	Coltura	3	
BACILLUS T. SUB. KURSTAKI		I	Microrganismi	Girasole	Coltura		
FOSFATO FERRICO		L	Composti inorganici	Girasole	Coltura		
GRASSO DI PECORA		V		Girasole	Coltura		
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Girasole	Coltura	2	3,00
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Girasole	Semente		3,00
RAME		F	Composti inorganici	Girasole	Coltura	20	40,00
ZOLFO		A F	Composti inorganici	Girasole	Coltura	5	

**Tabella 5:** Sostanze attive ammesse su ravanello in coltura biologica e integrata e intervalli di sicurezza

Sostanza Attiva (**)= revocata o non autorizzata	Bio	Tipologia	Gruppo Chimico	Coltura	Tipo Impiego	I.S.	LMR
(Z,E)-9,11-TETRADECADIEN-1-IL ACETATO		M	Feromoni	Ravanell o	Coltura		
(Z,E)-9,12-TETRADECADIEN-1-IL ACETATO		M	Feromoni	Ravanell o	Coltura		
ACIDO PELARGONICO		D	Acidi grassi	Ravanell o	Coltura		
BACILLUS T. SUB. AIZAWAI		I	Microrganismi	Ravanell o	Coltura	3	
BACILLUS T. SUB. KURSTAKI		I	Microrganismi	Ravanell o	Coltura		
CICLOXIDIM		D	Cicloesenoni	Ravanell o	Coltura	35	0,2 0
CIPERMETRINA		I	Piretroidi	Ravanello	Coltura	3	0,05 *
CLORANTRANILIPROLO		I	Antranilammidi	Ravanello	Coltura	21	0,5 0
CONIOTHYRIUM MINITANS		F	Microrganismi	Ravanello	Coltura		
DAZOMET		D F I N	Tiadiazine	Ravanello	Terreno a.	c.	0,0 5
DELTAMETRINA		I	Piretroidi	Ravanello	Coltura	7	0,02 *
DIFENOCONAZOLO		F	Triazoli	Ravanello	Coltura	7	0,4 0
DIQUAT		D	Dipiridilici	Ravanello	Coltura	15	0,01 *
ETOPROFOS		I N	Fosfororganici	Ravanello	Terreno a.	c. 30	0,02 *
FLUAZIFOP-P-BUTILE		D	Arilossifenossi propionati	Ravanello	Coltura	30	0,5 0
FLUXAPYROXAD		F		Ravanello	Coltura	7	0,3 0
FOSFATO FERRICO		L	Composti inorganici	Ravanello	Coltura		
GLIFOSATE		D	Fosfororganici	Ravanello	Coltura		0,10 *
GLIFOSATE		D	Fosfororganici	Ravanello	Terreno a.	c.	0,10 *

LAMBDA-CIALOTRINA		I	Piretroidi	Ravanello	Coltura	3	0,15
MALTODESTRINA		A I		Ravanello	Coltura		
METALDEIDE		L	Ossaciclottani	Ravanello	Coltura	20	0,30
METAM-POTASSIO		D F I N	Ditiocarbammati	Ravanello	Terreno a.	c.	0,02 *
METAM-SODIUM		D F I N	Ditiocarbammati	Ravanello	Terreno a.	c.	0,02 *
OLIO DI ARANCIO		F I	Oli vegetali	Ravanello	Coltura	3	
PAECILOMYCES LILACINUS CEPP0 251		N	Microrganismi	Ravanello	Coltura		
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Ravanello	Coltura	2	1,00
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Ravanello	Sement e		1,00
QUIZALOFOP-P-ETILE		D	Arilossifenossipropionati	Ravanello	Coltura	30	0,40
RAME		F	Composti inorganici	Ravanello	Coltura	3	5,00
STREPTOMYCES K61		F	Microrganismi	Ravanello	Sement e		
TIRAM		F	Ditiocarbammati	Ravanello	Sement e		0,10 *
TRICHODERMA ASPERELLUM		F	Microrganismi	Ravanello	Coltura		
TRICHODERMA GAMSII		F	Microrganismi	Ravanello	Coltura		
ZOLFO		A F	Composti inorganici	Ravanello	Coltura	5	

**Tabella 6:** Sostanze attive ammesse su erba medica in coltura integrata e intervalli di sicurezza.

Sostanza Attiva (**)= revocata o non autorizzata	Bi o	Tipologia	Gruppo Chimico	Coltura	Tipo Impiego	I.S.	LM R
2,4-D		D R	Derivati di acidi fenossicarbossilici	Erba medica	Coltura		
2,4-DB		D	Derivati di acidi fenossicarbossilici	Erba medica	Coltura	30	
ACETAMIPRID		I	Neonicotinoidi	Erba medica	Coltura	14	
BENFLURALIN		D	Dinitroaniline	Erba medica	Coltura		
BENTAZONE		D	Benzotiadiazine	Erba medica	Coltura	40	
BETA-CIFLUTRIN		I	Piretroidi	Erba medica	Coltura	3	
CIPERMETRINA		I	Piretroidi	Erba medica	Coltura	7	
CLETODIM		D	Cicloesenoni	Erba medica	Coltura	40	
DELTAMETRINA		I	Piretroidi	Erba medica	Coltura	14	
DIQUAT		D	Dipiridilici	Erba medica	Coltura	30	

GLIFOSATE		D	Fosfororganici	Erba medica	Coltura	21	
GLIFOSATE		D	Fosfororganici	Erba medica	Terreno a.	c.	
IMAZAMOX		D	Imidazolinoni	Erba medica	Coltura	40	
LAMBDA-CIALOTRINA		I	Piretroidi	Erba medica	Coltura	7	
METRIBUZIN		D	Triazinoni	Erba medica	Coltura	60	
PENDIMETALIN		D R	Dinitroaniline	Erba medica	Coltura		
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Erba medica	Coltura	2	
PIRETRINE		I	Prodotti naturali	Erba medica	Semente		
PIRIDATE		D	Fenilpiridazine	Erba medica	Coltura	28	
PROPAQUIZAFO P		D	Arilossifenossipropionati	Erba medica	Coltura	45	
PROPIZAMIDE		D	Benzammidi	Erba medica	Coltura		
QUIZALOFOP ETILE ISOMERO D		D	Arilossifenossipropionati	Erba medica	Coltura	20	
QUIZALOFOP-P-ETILE		D	Arilossifenossipropionati	Erba medica	Coltura	21	
TAU-FLUVALINATE		A I	Piretroidi	Erba medica	Coltura	7	
TIFENSULFURO N METILE		D	Solfoniluree	Erba medica	Coltura	28	

**LEGENDA:**

- A = Acaricidi
- B = Ausiliari biologici
- C = Coadiuvanti
- D = Diserbanti
- F = Fungicidi
- I = Insetticidi
- L = Limacidi
- M = Feromoni
- N = Nematocidi
- R = Fitoregolatori
- V = Vari
- Z = Fertilizzanti

Sulla base dei dati disponibili, riportati nelle **tabelle 1-2-3-4-5-6**, i tecnici di CRPV e ASTRA, supportati dal personale di SATIVA e di CAC hanno elaborato alcune linee di difesa specifiche per tali colture su cui impostare le prove di campo.

**B) Scelta di aziende campione presso le quali applicare le strategie a basso residuo**

La selezione delle aziende presso le quali effettuare la coltivazione di seme destinato alla produzione di germogli è stato effettuato dai tecnici di CAC in base all'ubicazione, alle infrastrutture presenti e alle competenze professionali dell'agricoltore.

La produzione avviene solo su contratto con cliente e CAC provvede a comunicare all' ASL l'elenco dei clienti per i quali è incaricato di produrre seme per uso alimentare.

Nel 2018, non essendo stati programmati impianti per questa tipologia di prodotto sul territorio emiliano-romagnolo, si è deciso di osservare due aziende marchigiane che rispettassero i requisiti necessari e che applicassero strategie di difesa basate sulla riduzione dei trattamenti. D'altra parte è necessario ricordare che CAC agisce su diverse regioni,

dall'Emilia-Romagna alle Marche, all'Umbria, al Molise e alla Puglia con soci distribuiti nelle diverse regioni che coltivano in funzione dei contratti e delle maggiori garanzie offerte. Dopo un'analisi delle diverse opzioni disponibili, tra le aziende agricole che rientravano nei parametri richiesti, si è scelto di tenere in considerazione le seguenti due imprese agricole:

- ✓ L'azienda **R** di Pianaccio Mondavio (PU), coltivata secondo tecniche di agricoltura integrata che ha prodotto seme di porro per germogli;
- ✓ L'azienda **F** in provincia di Macerata, che ha adottato tecniche di agricoltura biologica e ha prodotto seme di erba medica per germogli.

I tecnici di CAC hanno come obiettivo di effettuare il minor numero possibile di trattamenti, per ridurre il rischio chimico, compatibilmente però con l'esigenza di portare a casa un prodotto sano ma allo stesso tempo di qualità. Questo impone un monitoraggio continuo degli appezzamenti, un rapporto il più diretto possibile con l'agricoltore che deve tempestivamente comunicare ogni situazione di rischio e una definizione di regole di gestione del seme che se non rispondente deve essere scartato per l'uso alimentare ed eventualmente destinato alla normale riproduzione. Da tener in conto tuttavia che essendo le colture moltiplicate sotto contratto questo comporta il rischio che il seme non idoneo per l'alimentazione non abbia poi uno sbocco commerciale. Tutte queste problematiche sono tenute in considerazione dai tecnici che gestiscono i rapporti con le aziende.

Nelle due aziende considerate, i tecnici di CAC, hanno effettuato costanti monitoraggi e hanno deciso di non far eseguire alcun tipo di trattamento sulle colture; ai fini del piano è risultato quindi interessante indagare se queste erano in grado di garantire comunque standard produttivi e qualitativi adeguati, soprattutto sotto il profilo della germinabilità e delle contaminazioni microbiologiche. La valutazione delle analisi è riportata più avanti e i certificati sono **nell'allegato 1** dell'Az.3.5.

Nel 2019, sulla base dei risultati osservati l'anno precedente, su territorio regionale, sono state individuate 3 aziende disposte ad applicare linee di difesa basate su prodotti a ridotta residualità:

- ✓ L'Azienda **Mil** che opera nel settore **biologico** e si è occupato, per CAC, della produzione di semi di **crescione, ravenello e girasole** da sprouting;
- ✓ L'Azienda agricola **Min** (Ravenna) è un'azienda a conduzione integrata che ha prodotto semi di **ravenello** per sprouting;
- ✓ L'azienda **Me** di che ha prodotto seme di **erba medica** per sprouting;

Le strategie di difesa adottate nelle suddette aziende sono riportate in **Tabella 7**:

**Tab 7:** Quaderni di campagna delle aziende in sperimentazione

AZIENDA	CONDUZIONE	DATA	COLTURA	SUPERFICIE (Ha)	OPERAZIONE	PRODOTTO	AVVERSAITA'	PRINCIPIO ATTIVO	CARENZA	IMPIEGATA Kg/L
	Integrato	29-mar-16	ERBA MEDICA	35,00	Semina					
	Integrato	13 dic 17	ERBA MEDICA	35,00	Concimazione	UREA				3500
	Integrato	16-ago-18	ERBA MEDICA	35,00	Sfalcio					
	Integrato	28-ago-18	ERBA MEDICA	35,00	Trebbiatura					
	Integrato	19-dic-18	ERBA MEDICA	35,00	Concimazione	UREA				3500
	Integrato	08-ago-19	ERBA MEDICA	35,00	Sfalcio					
	Integrato	14-ago-19	ERBA MEDICA	35,00	Trebbiatura					
	Biologico	13-feb-19	RAVANELLO	4,84	Concimazione	ORGANDIECI				1000
	Biologico	18-feb-19	RAVANELLO	4,84	Semina					
	Biologico	05-mar-19	CRESCIONE	4,51	Concimazione	STALLATICO EXTRA				1000
	Biologico	07 mar 19	CRESCIONE	4,51	Semina					
	Biologico	08-mag-19	GIRASOLE	1	Semina					
	Biologico	05-giu-19	CRESCIONE	4,51	Trattamento	COSTARWG	Cavolaia	Dacillus T. kurstaki	-	3,75
	Biologico	01-lug-19	RAVANELLO	4,84	Sfalcio					
	Biologico	05-lug-19	CRESCIONE	4,51	Trebbiatura					5584
	Biologico	09-lug-19	RAVANELLO	4,84	Trebbiatura					7290
	Integrato	26-feb-19	RAVANELLO	3,32	Diserbo	ROUNDUP POWER	Dicotiledoni	Glifosate		6500
	Integrato	28-feb-19	RAVANELLO	3,32	Semina					
	Integrato	28 mar 19	RAVANELLO	3,32	Trattamento	KARATE-ZEON	Afidi	Lambda cialotrina	3	0,49
	Integrato	02-apr-19	RAVANELLO	3,32	Concimazione	EURO 46				600
	Integrato	17-apr-19	RAVANELLO	3,32	Concimazione	EURO 46				590
	Integrato	07-giu-19	RAVANELLO	3,32	Trattamento	KOCIDE 200	Alternaria	Rame metallo	3	2,5
	Integrato	13-giu-19	RAVANELLO	3,32	Trattamento	KOCIDE 200	Alternaria	Rame metallo	3	2,5

Per quel che riguarda il **ravanello** e il **girasole biologici (foto 1)**, a seguito di una attenta osservazione dello stato di sviluppo della coltura, degli aspetti fitosanitari e dell'esperienza pregressa dell'agricoltore (come era già avvenuto per le due aziende marchigiane), si è deciso di concerto fra i tecnici di CAC e l'agricoltore di ritardare il più possibile ogni intervento di difesa. In questo modo si è arrivati a fine ciclo senza utilizzare alcun prodotto di difesa avendo così la possibilità di verificare comunque oltre alla produttività anche la rispondenza agli standard qualitativi.

Foto 1: **Girasole** biologico prossimo alla raccolta



Nel **crescione biologico** si è deciso di intervenire con un unico trattamento insetticida a base di *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ceppo SA 12, prodotto dalla bassa tossicità e innocuo per mammiferi ed altri animali, predatori naturali, api ed impollinatori in genere. Riguardo le colture a gestione integrata anche su **erba medica** si è deciso di provare a non effettuare alcun trattamento per vedere se la coltura era in grado assicurare comunque performance quali-quantitative soddisfacenti.

Su **ravanello (foto 2)**, invece, si è deciso di ridurre al minimo i trattamenti limitandosi ad un solo trattamento insetticida con un piretroide Lamda-cialotrina (intervallo di sicurezza 3 giorni) e due fungicidi con rame (intervallo di sicurezza 3 giorni).

Foto 2: **Ravanello** DPI prossimo alla raccolta



Gli appezzamenti in oggetto sono stati monitorati dai tecnici di CRPV e ASTRA durante tutto il periodo vegetativo al fine di controllare l'eventuale comparsa di sintomi di patologie. Tutte le colture hanno mostrato un buono stato fitosanitario durante tutto il ciclo produttivo a dimostrazione dell'efficacia delle strategie di difesa adottate.

Per quel che riguarda la gestione agronomica tutte le aziende che intendono produrre seme per germoglio devono firmare un contratto con CAC che li vincola all'utilizzo di imballaggi conformi, al divieto di utilizzo di concimi organici successivamente alla preparazione del letto di semina (in biologico sono stati utilizzati), all'utilizzo di fitofarmaci concordati con i tecnici con modalità conformi alle disposizioni vigenti e alle indicazioni in etichetta. Gli agricoltori sono inoltre tenuti al controllo della qualità dell'acqua irrigua. Un esempio di tale auto-dichiarazione è riportata in **Figura 1**.

La raccolta e trebbiatura del seme sono state realizzate sia nel 2018 che nel 2019 con trebbie di proprietà di CAC, adeguatamente modificate per consentire l'eliminazione del seme di precedenti trebbiature da tutti gli organi della macchina. La raccolta in ogni caso è sempre effettuata in presenza di un tecnico di CAC appositamente formato per la gestione del seme alimentare.

**Fig. 1:** Dichiarazione relativa alla produzione di semi alimentari

**Dichiarazione relativa a produzione di semi alimentari 2019**

Il sottoscritto \_\_\_\_\_ titolare dell'Azienda \_\_\_\_\_  
 con sede in \_\_\_\_\_ P.IVA \_\_\_\_\_, produttore delle seguenti colture:  
 -  
 -  
 -

dichiara:

- che il prodotto ottenuto, è confezionato al momento della trebbiatura in campo su imballi conformi forniti dalla Coop.C.A.C.;
- che non sono stati apportati fertilizzanti organici sulla coltura successivi alla data di semina;
- che i fitofarmaci utilizzati sono conformi alle disposizioni vigenti in materia e a quanto riportato in etichetta;
- che le colture in oggetto sono state irrigate  SI  NO ;
- per le colture irrigate l'acqua utilizzata è stata prelevata da:

Pozzo artesiano       Canale Emiliano Romagnolo       Altro ( \_\_\_\_\_ )

Cesena, \_\_\_\_\_ In Fede

La raccolta e trebbiatura del seme sono state realizzate sempre in presenza di un tecnico di CAC formato per la gestione del seme alimentare.

***C) Esecuzione di analisi chimiche per verificare il livello dei residui***

E' stata messa a punto una procedura per garantire che il seme sia esente da residui di trattamenti e da batteri o altri inquinanti. Le analisi sui residui possono essere effettuate su campioni prelevati in campo se sono stati effettuati trattamenti prossimi alla raccolta o nella fase di lavorazione all'interno dello stabilimento, quelle batteriologiche vengono effettuate su campioni prelevati all'interno dello stabilimento Per i campioni prelevati in campo che siano risultati negativi non è necessario ripetere le analisi durante il processo di selezione in quanto all'interno del magazzino di CAC che viene utilizzato da SATIVA per le operazioni di selezione non vi sono rischi di contaminazione essendo disponibili linee di lavorazione dedicate ai semi destinati all'alimentazione.

**ATTIVITÀ 2: CONTROLLO DEL SEME LUNGO LE FASI DI SELEZIONE E CONSERVAZIONE ALL'INTERNO DEL MAGAZZINO**

Mentre l'attività di campo è stata indirizzata prevalentemente ad evitare la presenza di residui di fitofarmaci, quella all'interno del magazzino ha avuto il compito di escludere possibili contaminazioni batteriche o fungine o danni provocati da insetti. Allo stesso tempo, al fine di garantire la qualità del prodotto, sono stati effettuati controlli di **germinabilità** sia in fase iniziale di conservazione che al momento della spedizione del seme al cliente.

## **PROCEDURA DI GESTIONE DEL SEME IN MAGAZZINO**

Di seguito una breve descrizione della procedura di gestione del seme destinato all'alimentazione umana all'interno dei magazzini di CAC. Sia nel 2018 che nel 2019 i lotti oggetto della sperimentazione hanno seguito tale procedura

### 1) **REPARTO ACCETTAZIONE**

Il seme arriva dal luogo di produzione al reparto accettazione dei magazzini di CAC dentro **BIG BAGS** conformi alle legislazioni vigenti in merito alle conformità dei materiali destinati al contatto con i prodotti alimentari (**Fig. 2 e Foto 3**).

Il seme rivolto all'alimentazione è identificato da una lettera (**Q**) che ne identifica immediatamente la destinazione.

**Figura 2:** Dichiarazione di conformità dei sacchi al contatto con alimenti

Dichiarazione di conformità			
Cilente:	504670 COOPERATIVA AGRICOLA CESENATE Soc Coop Agricola		
Lotto no.	180018D / 513779	Ns.fattura no.	110 / 2019
Note sul lotto:	55X100		
Rapporto di prova	PP	1401\FPM\FDC\12_2-1394\FPM\FDC\16-1394\FPM\FDC\16_2	
Rapporto di prova	PE	0673\FPM\FDC\12	

Prodotto certificato  
CSI FOOD CONTACT  
Licenza CSI no. FLM029

Con la presente si dichiara che il prodotto fornitoVi è idoneo al contatto prolungato (oltre i 6 mesi) fino a temperatura ambiente o inferiore con gli alimenti secchi e/o in polvere e/o oleosi o grassi

Il prodotto è conforme alla seguente legislazione comunitaria:

- Reg. (CE) no. 1935/2004
- Reg. (CE) no. 1895/2005
- Reg. (CE) no. 2023/2006
- Dir. 94/62/CE e successivi aggiornamenti
- Reg. (EU) no. 10/2011 e successivi aggiornamenti

- ISO 18601 e correlate  
- EN 21898 (big bags - FIBC's)

ed alla seguente legislazione italiana:

- DM 21/03/1973 e successivi aggiornamenti e modifiche
- DPR 777/82 e successivi aggiornamenti e modifiche

**Test di idoneità alimentare:**  
(rapporto superficie/volume 6 dm<sup>2</sup>/1 kg di alimento)

- 1) Rischio tossicologico e set-off di MOCA: contaminazione della superficie a contatto con l'alimento - met.TENAX - Medio pesanti
- 2) Test sensoriale olfattivo nel rispetto del Reg. (CE) no. 1935/2004 secondo UNI 10192
- 3) Rischio tossicologico e set-off di MOCA: contaminazione della superficie a contatto con l'alimento - met.TENAX - Volatili
- 4) Metalli in PKG secondo Dir. 94/62/CE
- 5) Migrazione specifica in TENAX: allestimento del contatto con TENAX, il simulante E, come Reg. (EU) no. 10/2011 - 10 giorni a 60°C
- 6) Migrazione specifica di Metalli nei simulanti alimentari: Bario, Cobalto, Manganese, Zinco, Rame, Ferro, Litio - 10 giorni a 60°C
- 7) Ammine aromatiche primarie: migrazione specifica secondo metodo L.00.00-6 (LMBG § 35) - 10 giorni a 60°C
- 8) Migrazione globale in simulanti oleosi per immersione totale-OLIO DI OLIVA RETTIFICATO(pkg) Metodica:UNI EN 1186-2 - 10 giorni a 60°C
- 9) Migrazione di coloranti in simulante olio di girasole - 10 giorni a 60°C
- 10) Ricerca di oli minerali MOSH,MOAH,POSH,PAO (reg.1935/2004)
- 11) Ricerca presenza di Bisfenolo A

Nel prodotto NON sono presenti sostanze e/o additivi con restrizione  
Il prodotto contiene un additivo regolamentato dai Regolamenti (CE) no. 1334/2008 e successivi agg.(additivo "dual use");  
Carbonato di Calcio (CaCo3) e/o biossido di titanio (TiO2)

Si dichiara che il materiale da noi fornito non presenta nessuna delle sostanze denominate "sostanze estremamente problematiche" incluse nella List of Substances of very high concern (SHVC) definite nell'Art.57 del Regolamento (CE) no. 1907/2006 (The REACH regulation) e successivi aggiornamenti.

Si dichiara che il prodotto non contiene e non è stato a contatto con prodotti contenenti biocida dimetilfumarato (DMF) in accordo con la Decisione della Commissione Europea 2009/251/CE.

Si dichiara che non sono stati utilizzati o intenzionalmente aggiunti allergeni alimentari riportati dalla Dir.2007/68/CE e succ. aggiornamenti

Data 31 / 1 / 19

## Dichiarazione di conformità

Cliente:	504670 COOPERATIVA AGRICOLA CESENTATE Soc Coop Agricola		
Lotto no.	180036	/	515120
Nota sul lotto:	45x90		
Ns.fattura no.	110	/	2019

Con la presente si dichiara che il prodotto fornitoVi è conforme alla seguente normativa

Il prodotto è conforme alla seguente legislazione comunitaria:

- Reg. (CE) no. 1935/2004
- Reg.(CE) no. 1895/2005
- Reg. (CE) no. 2023/2006
- Dir. 94/62/CE e successivi aggiornamenti
- Reg. (EU) no. 10/2011 e successivi aggiornamenti
  
- ISO 18601 e correlate

Nel prodotto NON sono presenti sostanze e/o additivi con restrizione

Il prodotto contiene un additivo regolamentato dai Regolamenti (CE) no. 1334/2008 e successivi agg.(additivo "dual use");  
Carbonato di Calcio (CaCO<sub>3</sub>) e/o biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>)

Si dichiara che il materiale da noi fornito non presenta nessuna delle sostanze denominate "Sostanze estremamente problematiche" incluse nella List of Substances of very high concern (SVHC) definite nell'Art.57 del Regolamento (CE) no. 3907/2006 (The REACH regulation) e successivi aggiornamenti.

Si dichiara che il prodotto non contiene e non è stato a contatto con prodotti contenenti biocida dimetilfumarato (DMF) in accordo con la Decisione della Commissione Europea 2009/751/CE.

Si dichiara che non sono stati utilizzati o intenzionalmente aggiunti allergeni alimentari riportati dalla Dir,2007/68/CE e succ. aggiornamenti

Il personale specializzato verifica la rispondenza della **VARIETA'** e del **CODICE DEL COLTIVATORE** con la bolla di trebbiatura e il DDT.  
Successivamente procede all'accertamento del **PESO** e dell'**UMIDITA'** della partita di seme (**Foto 3**).

**Foto 3: Reparto accettazione seme**



**Foto 4: Big bags**



Se il livello di umidità rientra nei parametri idonei alla conservazione e lavorazione il seme è atto al passaggio alla fase successiva, altrimenti viene posto in stufa dentro appositi bins (idonei al contatto con alimenti).

Se il livello di umidità rientra nei range prestabiliti vengono prelevati 2 **CAMPIONI** con delle **SONDE** dedicate al fine di verificare la **GERMINABILITA'** del lotto in questione. Il primo viene destinato al laboratorio interno il secondo viene consegnato al socio.

Questo passaggio risulta cruciale in quanto solo le partite di seme che hanno una GERMINABILITÀ **superiore al 90%** vengono ritenute **IDONEE** alla germogliazione, mentre quelle che non raggiungono tali valori vengono destinate ad un uso non alimentare.

Se la partita non viene indirizzata direttamente alla linea di lavorazione viene momentaneamente conservata all'interno di Big-Bags (**Foto 4**) che dispongono di **apposita documentazione di idoneità (Fig.3)** in una **ZONA DI STOCCAGGIO DEDICATA** su pedane certificate (**Foto 5**) e in scaffalature di ferro zincato.

**Foto 5:** Zona di stoccaggio del seme destinato allo sprouting



**Figura 3:** Dichiarazione di conformità dei materiali e degli oggetti destinati al contatto con i prodotti alimentari.

**DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' DEI MATERIALI E DEGLI OGGETTI DESTINATI A VENIRE A CONTATTO CON I PRODOTTI ALIMENTARI**

Con la presente si dichiara che :

*l'articolo SACCHI PPL BIANCO REF. 175/ML – 206/ML - 212/M – 252/ML a voi forniti sono adatti al confezionamento dell'alimento: prodotti secchi che necessitano di trasformazione*

**è conforme**

a tutte le disposizioni legislative pertinenti, con particolare riferimento alla seguente legislazione comunitaria europea:

- Regolamento (CE) 1935/04
- Regolamento (CE) 1895/05
- Regolamento (CE) 2023/06
- Regolamento (CE) 597/08
- Regolamento (CE) 10/2011 e s.m.
- Direttive Europee: 82/711/CE-85/572/CEE-93/8/CEE-97/48/CEE

ed alla seguente legislazione italiana:

- Decreto Ministeriale 21/3/73 e successivi aggiornamenti e modifiche
- Decreto 338/98
- DPR 777/82 e successivi aggiornamenti e modifiche
- DM 34/73 e s.m.
- D.Lgs. 108/92

Il materiale plastico non contiene materiali di riciclo e rientra nei limiti di legge come da analisi in nostro possesso

Si dichiara, quindi, che:

il materiale non contiene sostanze sottoposte a restrizioni nelle legislazioni citate e rispetta i limiti di migrazione globale

il materiale contiene sostanze sottoposte a restrizioni nelle legislazioni citate e rispetta i limiti di migrazione globale e le restrizioni specifiche

nelle seguenti condizioni di prova:

Simulante	Tempo* e Temperatura** di prova
Per migrazione globale - Olio d'oliva rettificato	.10 gg 40° C – Total immersion
Per migrazione specifica - Olio d'oliva rettificato	10 gg 60° C – Total immersion
Per migrazione specifica con metodo TENAX – Ossido di Polifenilene (MPPO)	10 gg 60° C – Total immersion

Il limite di migrazione globale, unitamente alle altre restrizioni specifiche alle quali possono essere sottoposti i monomeri e/o gli additivi presenti nel materiale, sono rispettati nelle condizioni d'uso sopra menzionate. L'affermazione è supportata da prove analitiche condotte in accordo con il DM 21/3/73 oppure in base a calcoli effettuati considerando il contenuto delle sostanze sottoposte a limiti di migrazione. I calcoli sono stati effettuati assumendo che 1kg di alimento venga a contatto con 6dm<sup>2</sup> di materiale di confezionamento.

Una volta terminate tutte queste procedure **se la germibabilità è idonea** il seme può essere trasferito al **Reparto Lavorazione Seme Alimentare (Foto 6)**

### **1) REPARTO LAVORAZIONE SEME ALIMENTARE**

I pavimenti sono realizzati in particolari Resine Lavabili e le pareti verniciate con Vernici Lavabili.

L'intero reparto è sottoposto ad un piano di pulizia ben definito ad opera di personale specializzato e gestito come fosse una cucina. Il personale ha a disposizione degli spogliatoi dedicati, una spazzatrice dedicata e all'interno del reparto vengono disposte delle apposite trappole per roditori e insetti come previsto dal piano HACCP.



**Foto 6:** Ingresso Reparto lavorazione seme alimentare biologico

La macchina con la quale avviene la **Selezione** dei semi (Foto 7) è strutturata secondo lo schema di seguito descritto.



**Foto 7:** Macchina per la lavorazione del seme destinato ad alimentazione umana.

Il seme viene caricato in una **Tramoggia** dalla quale passa ad un **Tarara** che serve per la pulizia dalle polveri e impurità leggere tramite ventilazione.

Il prodotto che esce viene poi passato in uno **Spietratore** che separa i corpi pesanti (sassi, terra ecc.) tramite un setaccio e una forza vibrante con una combinazione di un flusso d'aria.

Il passaggio successivo avviene in **Cilindri Alveolati** che sono in grado di separare i semi in base alla forma (eliminando quindi quelli di specie diverse).

Successivamente il seme parzialmente pulito passa attraverso una **Tavola Densimetrica** che viene utilizzata per la separazione e classificazione del prodotto in base alla densità (peso).

Infine, il passaggio finale avviene nella **Selezionatrice Ottica Di Colore** in grado di suddividere i grani in base al colore (es seme di convolvolo in seme di ravanello che hanno stesso peso e forma ma colori diversi). A fine lavorazione, a fronte di una germinabilità conforme, quando il prodotto è pronto per la commercializzazione, vengono effettuate le **Analisi Microbiologiche e Multiresiduali**. Un esempio di report di tale analisi è riportato nella **figura 4** mentre altre analisi sono inserite **nell' allegato 1 all'Az.3.5**

A fine lavorazione, a fronte di una germinabilità conforme, quando il prodotto è pronto per la spedizione, vengono effettuate le **ANALISI MICROBIOLOGICHE e MULTIRESIDUALI** se non erano state fatte in precedenza. Un esempio di report di tale analisi è riportato nella **figura 4**.

**Fig. 4:** Report di analisi microbiologiche e multiresiduali.

Dati relativi al campione			
Descrizione del campione: <b>SEMI DI CRESCIONE COMUNE BIO DA GERMOGLIO - CS00001SGQ01-JISTC2777S00</b>			
Quantità : <b>500 g</b>			
Motivo di Analisi: <b>CAMPIONATURA</b>			
Data inizio analisi: <b>05/09/2019</b> Data fine analisi: <b>23/09/2019</b>			
Risultati analitici			
Parametro	U.M.	Risultato	L.Q.
<i>Metodo</i>			
§ E.Coli O 157 <i>UNI EN ISO 16654:2017</i>	R-NR/25 g	NR	
§ Escherichia Coli produttori di tossina Shiga (STEC) <i>UNI CEN ISO 13136:2013</i>	R-NR/25 g	NR	
Risultati analitici microbiologici			
Parametro	U.M.	Risultato	L.Q.
<i>Metodo</i>			
Conteggio delle colonie a 30°C <i>ISO 4833-1:2013</i>	ufc/g	360000	10
Conta Coliformi totali <i>AFNOR BIO 1220-12/06</i>	ufc/g	< 10	10
Conta Escherichia coli beta glucuronidasi positivi <i>AFNOR BIO 1219-12/06</i>	ufc/g	< 10	10
Conta Stafilococchi coagulasi positivi (Staphylococcus aureus e altre specie) <i>ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003</i>	ufc/g	< 10	10
Conta Muffe <i>ISO 21527-1:2008</i>	ufc/g	2100	10
Conta Lieviti <i>ISO 21527-1:2008</i>	ufc/g	1200	10
Ricerca Salmonella spp <i>AFNOR BRD 0711-12/05</i>	/25 g	Assente	
Ricerca Listeria monocytogenes <i>AFNOR BRD 07104-09/98</i>	/25 g	Assente	
Analisi Multiresiduale			
<b>NESSUN PRINCIPIO ATTIVO RILEVATO</b>			
Segue elenco completo dei parametri ricercati in multiresiduale espressi in mg/kg con relativo LQ Non Rilevati <i>UNI EN 15662:2018</i>			
2,4,5-T (sum of 2,4,5-T, its salts and esters, expressed as 2,4,5-T)	0.010	2,4-D (sum of 2,4-D, its salts, its esters and its conjugates, expressed as 2,4-D)	0.010
2,4-DB (sum of 2,4-DB, its salts, its esters and its conjugates, expressed as 2,4-DB)	0.010	2-phenylphenol	0.010
4-chloro-3-methylphenol	0.010	Abamectin (sum of avermectin B1a, avermectin B1b and delta-5,9 isomer of avermectin)	0.010
• Avermectin B1a	0.010	• Avermectin B1b	0.010
• delta-5,9 isomer of avermectin B1a	0.010	• Acephate	0.010
• Acequinocyl	0.010	• Acefampirid	0.010
• Acetochlor	0.010	Acetozoxar-5- methyl (sum of acetozoxar-5- methyl and acetozoxar acid (free and	0.010

Al termine del processo di selezione il seme è idoneo per essere utilizzato dalle imprese specializzate nella produzione di sprouting; viene confezionato in appositi sacchi certificati per uso alimentare e stoccato nello stesso ambiente in cui avviene la lavorazione fino alla spedizione al cliente.

Il personale addetto a tutte le lavorazioni precedentemente descritte è altamente specializzato e formato per rispettare le procedure del manuale HCCP sulle tipologie di controlli nel reparto di accettazione, l'uso degli imballaggi, l'abbigliamento in dotazione e la pianificazione delle pulizie di reparto.

### **RISULTATI RAGGIUNTI**

I lotti oggetto della sperimentazione, sia nel 2018 che nel 2019, hanno seguito la procedura sopra descritta. All'arrivo al reparto di accettazione i semi sono stati sottoposti per anzitutto all'analisi della **GERMINABILITÀ (passaggio indispensabile per stabilire l'idoneità al consumo alimentare)** e successivamente, i lotti che mostravano una germinabilità adeguata, dopo il processo di selezione, sono stati sottoposti alle analisi **MULTIRESIDUALI e MICROBIOLOGICHE**.

I risultati delle analisi effettuate sono riportati nella tabella sottostante:

**Tab. 8:** Esiti delle analisi microbiologiche e multiresiduali sul seme e germinabilità

SPECIE	CONDUZIONE	VARIETA'	GERMINABILITA'	RESIDUI	CONTAMINAZ. MICROBIO	VALUTAZIONE
ERBA MEDICA 2018	BIO	EB 10020SGQ01-NIMTC2730S00	94%	NESSUNO	NESSUNA	IDONEO
PORRO 2018	DPI	PR04001SEQ01-NISTC2241S00	93%	NESSUNO	NESSUNA	IDONEO
RAVANELLO TESTA ROSSA 2019	BIO	RA00140SGQ01-JISTC2740S00	99%	NESSUNO	NESSUNA	IDONEO
RAVANELLO 2019	DPI	RA00135SQ01-JISTC2739S00	95%	NESSUNO	NESSUNA	IDONEO
GIRASOLE 2019	BIO	GI1001SGQ01-3382	58%	-	-	NON IDONEO
CRESCIONE COMUNE 2019	BIO	CS00001SGQ01-2777	98%	NESSUNO	NESSUNA	IDONEO
ERBA MEDICA 2019	DPI	EB10020	71%	-	-	NON IDONEO

Come evidenziato in tabella 8 il **girasole bio 2019** e l'**erba medica IPM 2019** non hanno raggiunto livelli di germinabilità atti alla destinazione ad uso alimentare perciò non sono stati introdotti nel processo lavorativo del seme per sprouting (**NON IDONEI**).

**Erba medica bio 2018, Porro IPM 2018, Ravanella bio 2019, Ravanella IPM 2019 e Crescione bio 2019**, avendo una germinabilità adeguata, sono stati sottoposti al processo di selezione e alle analisi (**Allegato 1- Az. 3.5**). Tutti i campioni analizzati sono risultati **IDONEI** al consumo alimentare sia sotto il profilo dei residui che sotto quello microbiologico.

### **CONSIDERAZIONI FINALI**

Questa sperimentazione ha permesso quindi di ottenere dati rassicuranti circa l'efficacia delle strategie "a basso residuo" studiate per il controllo di patogeni e parassiti durante le fasi di moltiplicazione delle sementi. Tali strategie, infatti, sia nell'annata 2018 che in quella 2019, non solo sono state in grado di garantire la produzione di semi privi di residui (o in quantità minime compatibili con l'utilizzo a fini alimentari), ma hanno anche, nella maggior parte dei casi, garantito anche performance produttive e qualitative adeguate. Al contempo sono state messe a punto procedure di gestione del seme raccolto in grado di garantire l'assenza di contaminazioni durante tutte le fasi di lavorazione dello stesso, i controlli microbiologici, infatti, sono serviti a validare le procedure di selezione e conservazione interne al magazzino. L'unica criticità emersa nel progetto è risultata quella legata alla germinabilità del seme di alcuni campioni raccolti nel 2019, che purtroppo, in due casi, non ha raggiunto i livelli di conformità per la trasformazione alimentare. Questo calo di germinabilità potrebbe essere legata a numerosi fattori, sicuramente l'andamento meteorologico del 2019, caratterizzato da abbondanti piogge e temperature al di sotto delle medie nei periodi di maggio e luglio potrebbe avere influito negativamente, ma potrebbe anche essere stata influenzata dalle strategie di difesa adottate, nonché dalla gestione agronomica (lavorazioni del terreno, irrigazioni ecc.) dei singoli agricoltori. Ulteriori indagini potrebbero essere utili ad approfondire eventuali correlazioni tra la scelta delle strategie di difesa e la germinabilità del seme.

**Grado di raggiungimento o degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate**

La presente sperimentazione ha permesso, nei due anni di attività, di perseguire il risultato di riduzione del numero di trattamenti eseguiti in campo privilegiando molecole a bassa persistenza, addirittura su più della metà delle colture (4 su 7) il costante monitoraggio delle colture ha permesso di non eseguire alcun trattamento. Al contempo, l'attività di controllo durante tutte le fasi di selezione e conservazione del seme all'interno del magazzino ha permesso di validare tutte le procedure adottate sotto il profilo delle possibili contaminazioni batteriche e fungine. L'unica criticità emersa è legata alla germinabilità di due campioni 2019 che è risultata non idonea per la produzione di germogli in quanto troppo bassa.

## 2.3.2 Personale Azione 3 – Specifiche azioni legate alla realizzazione del piano.

### Azione 3.1 Costo del personale

Cognome e nome	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	Responsabile Piano	Responsabile della ricerca genetica collabora alla verifica del comportamento dei materiali in prova se coltivati con tecniche a basso residuo.	687	€28.800,12
	Responsabile Tecnico	Collabora alla realizzazione delle prove verificando le varietà da utilizzare e la scelta delle aziende	72	€1.291,68
	Responsabile Tecnico	Collabora alla realizzazione delle prove verificando le varietà da utilizzare e la scelta delle aziende	298	€5.018,32
	Responsabile tecnico	Responsabile tecnico delle fasi di riproduzioni del seme delle piante selezionate.	321	€10.318,25
	Responsabile tecnico	Responsabile tecnico controllo qualità, segue il percorso del seme dalla sua riproduzione in campo alla selezione in magazzino	304	€13.301,46
			794	€16.460,15
			<b>Totale:</b>	<b>€ 75.189,98</b>

### Azione 3.5 Costo del personale

Cognome e nome	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	Responsabile Piano	Responsabile della ricerca genetica collabora alla verifica del comportamento dei materiali in prova se coltivati con tecniche a basso residuo.	80	€3.350,70
	Responsabile Tecnico	Collabora alla realizzazione delle prove verificando le varietà da utilizzare e la scelta delle aziende	30	€505,20
	Responsabile tecnico	Responsabile tecnico controllo qualità, segue il percorso del seme dalla sua riproduzione in campo alla selezione in magazzino	48	€2.096,26
	Responsabile Tecnico	Collabora alla realizzazione delle prove verificando le varietà da utilizzare e la scelta delle aziende	18	€ 322,92
			<b>Totale:</b>	<b>€6.275,08</b>

## 2.3.3 Consulenze - Azione 3 Specifiche azioni legate alla realizzazione del piano.

### Consulenza azione 3.1

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
SICURAL - Laboratorio		€9.600,00	Esecuzione analisi di laboratorio per la valutazione del materiale genetico per composti aromatici	€ 9.600,00
VerdeLab - Laboratorio		€ 4.55,00	Attività di laboratorio per saggi della suscettibilità a <i>Fusarium o.</i> (FOB)	€ 455,00
Agrinnova – Laboratorio		€ 21.450,00	Attività di laboratorio per saggi della suscettibilità a <i>Peronospora b.</i> (PB)	€ 21.450,00
			<b>Totale:</b>	<b>€ 31.505,00</b>

**Consulenza azione 3.2**

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
Agronica Group srl		€ 70. 010,00	Implementazione attività di sviluppo software	€ 70. 010,00
Totale:				€ 70. 010,00

**Consulenza azione Azione 3.3**

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
LaRAS- Lab. Di Ricerca ed analisi- Uni. BO		€ 24.320,00	Studio sulla tracciabilità varietale in erba medica- Analisi molecolari.	€ 24.320,00
Totale:				€ 24.320,00

**Consulenza Azione 3.4**

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
Crpv (in collaborazione con ASTRA)	Personale CRPV in collaborazione con personale tecnico ASTRA	€ € 16.850,00	Attività agronomica di campo -. Valutazione ed elaborazione dati	€ 16.850,00
Totale:				€ € 16.850,00

**Consulenza Azione 3..5**

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
Crpv (in collaborazione con ASTRA)	Personale CRPV in collaborazione con personale tecnico ASTRA	€ 22.280,00	Attività agronomica di campo. Valutazione ed elaborazione dati	€ 22.280,00
Totale:				€ 22.280,00

## 2.4 Divulgazione

### 2.4.1 Attività e risultati

<b>Azione 4</b>	<b>DIVULGAZIONE</b>
<b>Unità aziendale responsabile</b>	<b>CRPV Soc. Coop. Agricola</b>
<b>Descrizione delle attività</b>	<p>L'azione di diffusione risultati è stata rivolta alle aziende agricole coinvolte nel progetto di filiera ed altre aziende socie del Consorzio Sativa. Questa attività è stata svolta prevalentemente nel secondo anno di svolgimento delle attività al raggiungimento dei primi risultati.</p> <p><u>Piano di comunicazione</u></p> <p>Le diverse azioni divulgative organizzate da CRPV sono state indirizzate per garantire il trasferimento delle informazioni. Il CRPV ha organizzato un piano di divulgazione attraverso i classici canali ad esempio articoli ed incontri tecnici, sia attraverso le piattaforme web che consente la condivisione e visualizzazione in rete di contenuti multimediali (es. YouTube, portale pagina web) che rappresenta un obiettivo intrinseco del PSR.</p> <p>In accordo con il Consorzio Sativa e con le diverse U.O., il personale CRPV ha quindi organizzato e gestito le seguenti iniziative e azioni di diffusione previste dal progetto. Come preventivato nel Piano, il Piano di Comunicazione è stato sviluppato dall'intenso operato del personale CRPV.</p> <p>Il personale CRPV ha quindi organizzato e gestito diverse iniziative e azioni di diffusione che sono descritte nelle tabelle dalla 1 alla 4. Per rendere più concreta la visione dell'attività svolta, nelle varie tabelle sono indicate tutte le azioni di divulgazione svolte nel corso dell'intera durata del Piano. Tutte le iniziative svolte hanno rappresentato anche momenti di discussione e confronto sul tema oggetto dell'evento, permettendo così un utile scambio di esperienze e risposte a vantaggio di tutti i partecipanti e del GO stesso</p> <p>In totale, dall'attivazione del progetto alla sua conclusione sono state realizzate in totale <b>n.13</b> iniziative di divulgazione:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- n.4 visite guidate in campo;</li><li>- n.4 incontri tecnici;</li><li>- n.4 articoli;</li><li>- n.1 audiovideo.</li></ul> <p>Inoltre il CRPV ha messo a disposizione del GO il proprio <b>Portale Internet</b>, affinché le attività svolte nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza All'interno del portale CRPV è stata realizzata una pagina dedicata al Piano (<a href="https://progetti.crpv.it/Home/ProjectDetail/45">https://progetti.crpv.it/Home/ProjectDetail/45</a>), composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto e le attività condotte. Questo strumento comunicativo e divulgativo consente altresì di poter visionare collegamenti e sinergie che il presente Piano d'innovazione può avere anche con altri progetti e/o iniziative. Questo lavoro permette, unitamente alla pubblicazione dei risultati, la consultazione dell'elenco dei Piani coordinati da CRPV, dal quale, selezionando un singolo Piano/progetto si accede a una nuova pagina simile a quella del Portale CRPV, con cui si possono vedere i dettagli delle attività. Questo strumento comunicativo e divulgativo consente altresì di poter visionare collegamenti e sinergie che il presente piano può avere anche con altri progetti e/o iniziative.</p> <p><i>Incontri tecnici, visite guidate</i></p> <p>Tutte le iniziative svolte (vedi tabb.1-2)., hanno rappresentato momenti di discussione e confronto sul tema oggetto dell'evento, permettendo così un utile scambio di esperienze e risposte a vantaggio di tutti i partecipanti. In</p>

occasione degli incontri tecnici sono state presentate le relazioni dai vari referenti responsabili della prova che sono riportate negli **allegati** come parte integrante della relazione tecnica. Di seguito l'elenco delle relazioni presentate nell'ambito degli incontri tecnici del 16-12-2019 e del 20-01-2020:

- Allegato 2 Az. 4-Relazione Consorzio Sativa
- Allegato 3 Az. 4-Relazione Laboratorio Sicural
- Allegato 4 Az. 4 Relazione Laboratorio Agrinnova
- Allegato 5 Az. 4. Relazione CRPV soc. Coop.
- Allegato 6 Az. 4. Relazione Lab. LaRAS Uni.BO
- Allegato 7 Az. 4 Relazione Astra Centro di saggio
- Allegato 8 Az. 4 Relazione Astra Innovazione e sviluppo

#### *Articoli tecnici*

Sono stati realizzati n. 4 articoli tecnici (vedi tab.3), pubblicati su riviste specializzate a diffusione tradizionale o on-line. Alcuni di questi articoli sono stati pubblicati sia on line che su riviste specializzate.

#### *Audiovisivo*

In occasione delle visite guidate e incontri tecnici è stato realizzato n. 1 audiovisivo (vedi yab.4) della durata di circa 5 minuti. Di seguito il link per visionare il video (<https://www.youtube.com/watch?v=3y6A-pCjP1w&feature=youtu.be>)

#### *Portale CRPV*

Il CRPV ha messo a disposizione del Beneficiario il proprio **Portale Internet**, affinché le attività ed i risultati conseguiti nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza.

**Tabella 1** - Descrizione delle visite guidate realizzate.

VISITA GUIDATA		
DATA	TITOLO	LUOGO
05/07/2019	Visita campo sperimentale Basilico per lo sviluppo di linee maggiormente resistenti alle fitopatie con maggiori caratteristiche aromatiche.	Società agricola A.L.A.C. – Gattolino (FC)
08/08/2019	Messa a punto di strategie di controllo delle malerbe per la medica da seme.	Azienda agricola F.LLI Mariani – Fusignano (RA)
11/09/2019	Visita campo di girasole per produzione di seme da consumo diretto e per produzione di germogli (sprouting) caratterizzato da basso residuo di fitofarmaci ed elevata qualità sanitaria.	Azienda agricola Romano Milandri (FC)
11/11/2019	Controllo del seme destinato alla produzione di germogli lungo le fasi di selezione e conservazione all'interno del magazzino.	C.A.C. Soc. Coop. Agr. – Martorano Cesena (FC)

Di seguito si riportano nelle foto scattate durante la visita guidata di luglio nei campi sperimentali basilico e settembre visita campi sperimentali girasole.

**Foto 1-** Visita guidata basilico presso la Società agricola A.L.A.C. (FC) di venerdì 5 luglio 2019.



**Foto 2-** Visita guidata campi sperimentali girasole presso l'azienda agricola Milandri (FC) in data 11 settembre 2019.



**Tabella 2 -** Descrizione degli incontri tecnici realizzati

INCONTRO TECNICO		
DATA	TITOLO	LUOGO
22/02/2019	Innovazione genetica, adeguamento culturale, analisi qualitative e supporti informatici per lo sviluppo delle colture portaseme.	Sala riunione c/o KWS - Villa Selva (FC)
16/12/2019	Resoconto finale sui risultati di basilico maggiormente resistenti alle fitopatie e con maggiori caratteristiche aromatiche.	C.A.C. Soc. Coop. Agr. - Martorano Cesena (FC)
16/12/2019	Resoconto finale sui risultati del controllo malerbe su medica da seme e adeguamento informatici relativi al software "mappatura sementi"	C.A.C. Soc. Coop. Agr. - Martorano Cesena (FC)

20/01/2020	Presentazione risultati finali delle attività realizzate	C.A.C. Soc. Coop. Agr. - Martorano Cesena (FC)
------------	--	--

I dettagli del programma degli incontri sono riportati nelle locandine presenti nell'**Allegato 1 Az. 4 Visite Incontri Presenze.pdf**

Negli incontri del 22 gennaio 2009 e 16 dicembre 2019, il referente Ing. Paglierani mediante il collegamento internet, ha spiegato ed illustrato il funzionamento del software "mappatura sementi" indicando le modalità d'inserimento dei dati, al server che gestisce le informazioni, alla rete di trasmissione e alla funzionalità del palmare utilizzato in campagna per la mappatura. Questo confronto diretto è servito ai partecipanti che hanno potuto interagire tra le varie parti.

**Tabella 3** - Descrizione degli articoli tecnici svolte nella durata di vita del progetto.

ARTICOLI TECNICI		
DATA	TITOLO	LUOGO
20/01/2020	Seme da consumo diretto e per produzione di germogli (sprouting) : messa a punto di tecniche colturali finalizzate alla riduzione dei residui di fitofarmaci ed all'elevata qualità sanitaria.	Publicato nella rivista on line : <a href="http://www.fidaf.it">www.fidaf.it</a>
Gennaio/Febbraio 2020	Seme da consumo diretto e per produzione di germogli (sprouting) : messa a punto di tecniche colturali finalizzate alla riduzione dei residui di fitofarmaci ed all'elevata qualità sanitaria.	n. 1 Gennaio/Febbraio 2020 "Rivista Sementi News 2020" mensile della C.A.C. (Coop.agric.Cesenate)
07/02/2020	Erba medica, il problema della tracciabilità varietale	Publicato sulla rivista n. 5 "Terra e vita"
04/03/2020	Mappatura-sementi implementazioni di applicazioni-per-gestire-dss-monitoraggi-del-territorio-e-dello-sviluppo-colturale-e-archiviazione-dati.	Publicato nella rivista on line AgriCulture FIDAF : <a href="http://www.fidaf.it">www.fidaf.it</a>
21/05/2020	Una valida alternativa per il controllo della cuscuta su medica	Rivista specializzata "Informatore agrario" n.19 del 2020

**Tabella 4** - Descrizione dell'audio visivo realizzato

AUDIOVISIVO	
TITOLO	Sito web
Sviluppo delle colture portaseme	<a href="https://www.youtube.com/watch?v=3y6A-pCjP1w&amp;feature=youtu.be">https://www.youtube.com/watch?v=3y6A-pCjP1w&amp;feature=youtu.be</a>

Inoltre, tra i prodotti dell'azione di divulgazione sono state redatte delle "**Schede tecniche**" che riportano le indicazioni sulla gestione agronomica delle diverse colture da seme tra cui: Crescione da seme -Porro da seme -

	<p>Ravanello-Erba medica per produzione germogli-Girasole da seme. Le schede tecniche sono riportate in <b>Allegato 9</b> Az.4 – Schede tecniche.</p> <p>Tutta la documentazione relativa alle locandine delle diverse iniziative, nonché copia degli articoli sono disponibili presso il CRPV.</p> <p>Sono comunque allegati alla presente relazione nell'<b>Allegato 1 Az. 4 Divulgazione .pdf)</b></p>
<p><b>Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate</b></p>	<p>Gli obiettivi previsti nell'ambito di questa azione sono stati completamente raggiunti.</p> <p>Nessuna altra criticità tecnico-scientifica è stata evidenziata durante l'intera attività svolta.</p>

## 2.4.2 Personale Azione 4 - DIVULGAZIONE

Elencare il personale impegnato, il cui costo è portato a rendiconto, descrivendo sinteticamente l'attività svolta. Non includere le consulenze specialistiche, che devono essere descritte a parte.

Cognome e nome	Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo
	Responsabile di progetto	Collabora alla definizione dei momenti di verifica delle attività in campo	75	€ 3.152,25
			Totale:	€ 3.152,25

## 2.4.3 Consulenze CONSULENZE - SOCIETÀ

Ragione sociale della società di consulenza	Referente	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
CRPV	Personale CRPV	€ 8.280,00	Gestione Piano di divulgazione, organizzato incontri tecnici e visite di campo, cura la redazione di articoli di divulgazione.	€ 8.280,00
			Totale:	€ 8.280,00

## 3 - Criticità incontrate durante la realizzazione dell'attività

Lunghezza max 1 pagina

<b>Criticità tecnico-scientifiche</b>	Nessuna criticità tecnico-scientifica è stata incontrata durante la realizzazione dell'attività. <b>Eventuali leggeri scostamento sono indicati in fondo ad ogni singola azione.</b>
<b>Criticità gestionali</b> (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Nessuna criticità gestionale è stata incontrata durante la realizzazione dell'attività
<b>Criticità finanziarie</b>	Nessuna criticità finanziaria è stata incontrata durante la realizzazione dell'attività

## 4 - Altre informazioni

//////////

## 5 - Considerazioni finali

//////////

## 6 - Relazione tecnica

Le attività complessivamente svolte sono state sinteticamente riportate a pagina 2 e 3 della presente relazione pertanto si rimanda a quella sezione per valutare ciò che è stato realizzato all'interno del piano relativamente alle seguenti azioni:

Azione 1 - **Esercizio della cooperazione**

Azione 3.1 **Sviluppo di linee di basilico maggiormente resistenti alle fitopatie con maggiori caratteristiche aromatiche.**

Azione 3.2 **Implementazione all'interno della piattaforma "Mappatura sementi" di applicazioni per gestire DSS, monitoraggi del territorio e dello sviluppo colturale e archiviazione dati**

Azione 3.3 **Riconoscimento varietale in erba medica**

Azione 3.4 **Messa a punto di strategie di controllo delle malerbe per la medica da seme**

Azione 3.5 **Definizione di tecniche colturali per la produzione di seme da consumo diretto e per produzione di germogli (sprouting) caratterizzato da basso residuo di fitofarmaci ed elevata qualità sanitarie**

Azione 4 **Divulgazione**

Riteniamo importante soffermarci sui risultati raggiunti, sui prodotti e sulle ricadute, convinti che il piano abbia colto tutti gli obiettivi per il quale era stato proposto.

### **Risultati innovativi e prodotti che caratterizzano il Piano**

Aldilà dei risultati delle singole azioni, ci preme sottolineare come il piano abbia raggiunto interamente gli obiettivi che si era prefisso, mettendo a disposizione del mondo produttivo e delle ditte sementiere elementi innovativi che possono creare nuove opportunità di mercato.

Le innovazioni interessano un po' tutto il settore sementiero andando dalle colture orticole alla barbabietola portaseme alle colture della medica portaseme alla fornitura di seme per la produzione di germogli.

Le innovazioni sono pertanto:

- di carattere genetico (nuove linee da utilizzare tal quale o per futuri incroci). Attraverso anche l'utilizzo di fitotroni si è visto come sia possibile accelerare i processi di miglioramento genetico attraverso la realizzazione di più generazioni l'anno e come sia molto importante la collaborazione fra genetisti e laboratori di ricerca. L'approccio collaborativo indica una strada percorribile anche dalle piccole ditte sementiere che spesso rinunciano a fare ricerca per mancanza di fondi.
- di supporto alla gestione delle colture. L'adeguamento della piattaforma "Mappatura sementi" fornisce strumenti moderni alle ditte sementiere non solo per l'isolamento genetico delle colture come accadeva oggi ma attraverso l'impiego delle più moderne tecnologie e della georeferenziazione è in grado di associare dati ai singoli appezzamenti mappati per gestire consigli a distanza sull'irrigazione o per far girare modelli previsionali non più a scala territoriale ma basati sulle reali condizioni meteorologiche dei vari appezzamenti. Sulla base di uno stretto collegamento fra immagini satellitari e georeferenziazione si sono create le basi affinché in futuro sia possibile trarre una serie di informazioni anche sullo sviluppo delle colture e sul loro stato generale.
- di messa a punto di metodiche analitiche. Sul seme medica si è visto che l'attività svolta non consente di discriminare le varietà che hanno una storia genetica simile perché provenienti da ecotipi geneticamente poco differenziati. La metodologia di analisi utilizzata potrebbe però essere utile per discriminare seme prodotto in Emilia-Romagna rispetto al seme d'importazione.
- di verifica dell'efficacia di molecole erbicide. L'attività su medica ha dimostrato come il pendimetalin possa essere un valido sostituto della Propizamide e la conseguente richiesta di uso eccezionale al Ministero in attesa della estensione di etichetta va nella direzione di poter dare agli agricoltori uno strumento per difendersi da problematiche quali la cuscuta che crea sia riduzioni produttive ma anche scarti qualitativi.
- di processo. La necessità di ottenere seme microbiologicamente sano, senza residui e con un buon livello di germinabilità ha indotto ad adottare procedure di gestione degli appezzamenti, ma anche di assistenza tecnica alle aziende che hanno portato ad una riduzione dei trattamenti che non hanno compromesso la produttività delle colture ma hanno invece fornito seme idoneo per la produzione di germogli ad uso alimentare, testando e rendendo possibile attivare una nuova linea di prodotti.

### **Prodotti del piano.**

Sinteticamente i prodotti del piano sono costituiti da:

- seme di nuove linee di basilico e da tabelle che ne dimostrano le caratteristiche di resistenza alla peronospora, forniscono prime indicazioni sulla resistenza al fusarium e mostarno il valore di alcuni composti aromatici;
- un ampliamento delle funzioni di una piattaforma informatica a servizio dei produttori e delle ditte sementiere;
- la messa a punto di una metodica di analisi su seme medica che ha dimostrato come varietà create sulla base di materiale genetico locale è difficilmente distinguibile mentre lo potrebbero essere il seme locale da quello riprodotto in altri paesi;
- dati che dimostrano l'efficacia del pendimetalin nel controllo della cuscuta;
- validazione delle procedure di gestione delle operazioni in campo e in magazzino per ottenere seme da destinare ad un uso alimentare quale quello dei germogli.

## **Potenziali ricadute in ambito produttivo**

Le potenziali ricadute delle innovazioni sono certamente legate al loro valore intrinseco ma anche alla capacità delle strutture operanti all'interno della filiera di valorizzarle.

Nel caso di INOVASEME riteniamo vi siano buone prospettive di applicazione dei risultati ottenuti con conseguenti positive ricadute economiche e di prospettive di mercato.

- 1.** Le linee di basilico quando verranno riprodotte e poste in commercio consentiranno a SATIVA di affidare la moltiplicazione ai propri associati che così avranno la certezza di contratti che non avrebbero moltiplicando solo varietà costituite all'estero. Questo determina un vantaggio per le aziende di moltiplicazione ma anche per l'attività di commercializzazione di Sativa che si troverà a vendere sul mercato varietà resistenti a peronospora che solo poche ditte estere stanno iniziando a proporre. La ricerca effettuata sulla qualità aromatica dei nuovi genotipi consentirà inoltre un più stretto legame con le industrie emiliano-romagnole ma più in generale italiane, in grado di valorizzare il basilico nelle loro produzioni. Da non dimenticare infine che l'affinamento delle attività di ricerca genetica potrebbe avere applicazione su altre specie di interesse più locale che non vengono migliorate dalle ditte multinazionali, aprendo di fatto mercato per le ditte piccole come Sativa o altre presenti a livello regionale e nazionale.
- 2.** Le implementazioni della piattaforma "Mappatura sementi" avranno due ricadute già verificate nel recente passato: miglioreranno l'operatività dei tecnici delle ditte sementiere impegnate nella moltiplicazione e forniranno maggiori garanzie alle committenti estere. Questo vale sia per il settore della bietola portaseme che si è fatto per primo interprete delle esigenze di miglioramento della piattaforma ma poi si trasferirà anche al settore delle orticole da seme. Nel solo settore della barbabietola portaseme dove operano fondamentalmente 5 ditte che moltiplicano in Emilia-Romagna oltre il 50% dell'intera produzione europea, a detta degli stessi operatori una componente essenziale in questi anni è stata quella di dimostrare in modo semplice "on line" gli isolamenti genetici e con le nuove modifiche apportate si viene incontro all'esigenza di un maggior controllo dello stato vegetativo e produttivo delle colture mettendo la nostra regione in primo piano per la moltiplicazione della barbabietola portaseme che da sola rappresenta un valore per le aziende agricole di circa 35.000.000 di € che perlomeno raddoppia se consideriamo l'indotto legato alle fasi di selezione e di lavorazione all'interno dei magazzini condotte tutte in provincia di Forlì-Cesena.
- 3.** La ricaduta delle prove effettuate sull'impiego del pendimetalin per il controllo della cuscuta sono diverse: in primo luogo sono stati raccolti dati che potranno servire alle ditte che commercializzano questa molecola per richiedere una estensione di etichetta che si prevede possa completarsi come iter nel 2021 ma che già nel 2020 ha portato alla richiesta congiunta da parte di COAMS (Consorzio delle organizzazioni degli agricoltori moltiplicatori di sementi), CRPV e Assosementi di uso eccezionale, che è stato concesso dal Ministero della Salute. Una seconda ricaduta la si avrà in campagna dove gli agricoltori potranno utilizzare questa molecola meno costosa della Propizamide per controllare la cuscuta (problema recrudescente in questi anni) ottenendo un doppio beneficio economico dato dal risparmio iniziale sui trattamenti e da una maggiore quantità e qualità del seme. Considerando che la medica da seme interessa circa 20.000 ha in Emilia-Romagna pari a oltre il 50% dell'intera produzione nazionale è facile comprendere come anche solo 50 €/ha di maggiori guadagni per l'azienda applicati solo al 10% della superficie determinerebbe un beneficio di 100.000€/anno. Altro aspetto positivo è la riduzione dei rischi di resistenza della cuscuta nei confronti della Propizamide. Avere anche il Pendimetalin consente di non dover utilizzare ripetutamente l'unica molecola oggi autorizzata ed efficace riducendo pertanto i rischi di selezionare delle resistenze.
- 4.** Le ricadute dell'attività svolta dal LARAS potrebbero essere importanti nel momento in cui la metodica studiata potesse essere applicata per discriminare le provenienze dall'estero. Poiché queste non sono sempre tracciate si porrebbe fine ad un commercio nascosto che oggi ma

soprattutto in un recente passato ha penalizzato le nostre produzioni a favore di quelle a minor costo.

5. La validazione infine di procedure di gestione del seme per germogli apre nuove prospettive sia per le ditte sementiere che per le aziende agricole perché in un momento di forte richiesta di germogli da parte del consumatore si creano prospettive di crescita perché si attiva un nuovo mercato che non porta via spazio a quello tradizionale della moltiplicazione ma lo affianca con nuove opportunità per chi sa offrire oltre alla qualità intrinseca anche un modello organizzativo trasparente e garantista del prodotto offerto.

La mis. 16.2.1 INNOVASEME inserita all'interno del più ampio progetto di Filiera presentato da SATIVA ha colto l'obiettivo di fornire innovazioni che non saranno solo a vantaggio della proponente ma di tutta la filiera che si è coordinata ed ha saputo unire le esigenze del settore sementiero nei suoi diversi comparti. Aldilà di tutto deve essere rimarcato come sia la misura 16 sia il progetto di filiera rappresentino un esempio di collaborazione fra ditte e agricoltori che hanno interessi diversi a seconda delle colture ma che hanno saputo trovare dei punti d'incontro anche grazie alla presenza di due importanti tavoli interprofessionali nel settore della bietola portaseme e della medica portaseme.

Data .....

IL LEGALE RAPPRESENTANTE

.....