

**AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2019 DEL TIPO DI OPERAZIONE 16.1.01  
"GRUPPI OPERATIVI DEL PEI PER LA PRODUTTIVITÀ E LA SOSTENIBILITÀ DELL'AGRICOLTURA"**

**FOCUS AREA 4B DGR N. 1098 DEL 01 LUGLIO 2019**

**RELAZIONE TECNICA FINALE**

DOMANDA DI SOSTEGNO **5149124** DOMANDA DI PAGAMENTO **5699947**

FOCUS AREA: 4B

Titolo Piano	<b>Nuovi sistemi di diagnosi veloce e tecniche a basso impatto ecotossicologico per contenere fenomeni di resistenza dei patogeni, fitofagi e delle malerbe - RESISTI</b>
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	RI.NOVA Soc. Coop. (ex CRPV)
Elenco partner del Gruppo Operativo	RI.NOVA (ex CRPV) UNIBO CNR IPSP UCSC UNIFE Dinamica Soc. Agr. Rizzati Romano  Az. Agr. Corradini David

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	30
Data inizio attività	01 Maggio 2020
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	27 Ottobre 2023

Relazione relativa al periodo di attività dal	01 Febbraio 2020	al 27 Ottobre 2023
Data rilascio relazione	30/11/2023	

Autore della relazione	Maria Grazia Tommasini
------------------------	------------------------

telefono		email	mgtommasini@crpv.it
----------	--	-------	---------------------

## 1. DESCRIZIONE DELLO STATO DI AVANZAMENTO DEL PIANO

Il Gruppo Operativo ha dato avvio alle attività previste nel piano a partire dal 1 maggio 2020. Tutte le attività sono state realizzate seguendo i protocolli presentati nel piano, e conseguentemente anche le spese previste sono state eseguite. In particolare viene rendicontata l'intera attività svolta nel corso del progetto dal 1 maggio 2020 al 26 ottobre 2023 (a seguito di proroga di 12 mesi approvata) in questo rendiconto tecnico.

In sintesi:

- l'azione 1 è stata realizzata come previsto seguendo i percorsi e utilizzando i diversi strumenti indicati nel piano.
- Non era prevista, e non è stata svolta alcuna attività nell'Azione 2.
- L'intera azione 3 è stata realizzata completamente conformemente con quanto previsto nel Piano (di seguito anche denominato anche Progetto). Ciò detto sono state apportate alcune modifiche minori di carattere tecnico che non hanno modificato né gli obiettivi, né i costi del progetto. In generale tutte le prove svolte nell'azione 3 hanno fornito risultati funzionali a fornire innovazioni nel settore dei problemi legati alla resistenza delle molecole chimiche più comunemente impiegate in agricoltura verso le principali avversità ed in articolare a supportare con nuove tecniche le scelte degli agricoltori.
- L'azione 4 sulla divulgazione è stata attivata sin dalle prime fasi progetto ed ha visto sviluppare dal GO diverse iniziative che hanno incluso sia visite in campo che incontri tecnici, campus cloud e altri strumenti di informazione. RINOVA ha messo a disposizione del Gruppo Operativo il proprio Portale Internet, affinché le attività ed i risultati conseguiti nel presente Piano fossero facilmente fruibili dall'utenza.  
Il personale di RINOVA si è inoltre fatto carico di predisporre in lingua italiana e inglese, le modulistiche richieste per la presentazione del Piano al fine del collegamento alla Rete PEI-Agri.
- L'azione 5 sulla formazione è stata svolta conformemente a quanto previsto.

Il Gruppo Operativo ha dato avvio alle attività complessivamente previste nel piano a partire dal 1 maggio 2020 al fine di poter procedere con le diverse attività e prove sin dalla campagna agraria 2020 e sono state completate entro il l'estate 2023 a cui è seguita una fase conclusiva legata al completamento della fase di Formazione, alla realizzazione della relazione tecnica e rendicontazione completata il 30/11/2023.

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività reale	Mese termine attività previsto	Mese termine attività reale
1	RI.NOVA soc. coop	Cooperazione	1	1	30	44
3	RI.NOVA (ex CRPV) UNIBO CNR IPSP UCSC UNIFE Soc. Agr. Rizzati Romano	Azioni specifiche	1	1	26	44
4	RI.NOVA soc. coop	Divulgazione	3	4	30	36
5	Dinamica	Formazione	10	24	30	40

## **AZIONE 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE**

### **2.1 Attività e risultati**

Azione
--------

#### **1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE**

RI.NOVA (ex CRPV), nel suo ruolo di mandatario, ha mantenuto la funzione di coordinamento generale e coordinamento organizzativo per garantire il funzionamento tecnico e amministrativo del Gruppo Operativo (GO).

RI.NOVA ha quindi avuto il compito di pianificare le attività previste nel Piano mettendo in atto tutte le iniziative necessarie alla realizzazione e al conseguimento dei risultati previsti. Per fare questo 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 a vari livelli, nonché nella gestione di comitati tecnici e gruppi di lavoro riguardanti i principali comparti produttivi. In particolare M.Grazia Tommasini ha svolto il ruolo di Responsabile del Progetto (RP).

#### **Attivazione del Gruppo Operativo**

La fase di attivazione del GO ha riguardato sia gli aspetti formali e amministrativi, sia il consolidamento degli obiettivi con l'intero gruppo di referenti coinvolti a vario titolo nel Piano.

In merito agli aspetti formali, con particolare riferimento alle attività del Piano e ai relativi costi ammessi, RI.NOVA, unitamente al Responsabile Scientifico (RS) e ai Responsabili dei partner del GO, ha verificato la congruenza dei budget approvati rispetto alle attività da svolgere. Con questo

passaggio si è autorizzata l'attivazione del GO, comunicata a tutti i partner tramite e-mail. Inoltre, in questa fase si è proceduto alla costituzione formale del raggruppamento (ATS).

Una volta soddisfatti gli aspetti formali, è stato svolto un incontro del GO (24/04/2020) per l'attivazione formale delle azioni del piano alla presenza di tutte le figure coinvolte per ogni partner rispettivamente nelle azioni 3.1 e 3.2. A questo incontro ne sono seguiti altri 5 (09/03/2022, 28/01/2022, 30/06/2022, 01/12/2022, 20/07/2023) a cui hanno seguito numerosi contatti, confronti e scambi sia via mail che telefono fra i partners.

Tali incontri sono stati altresì funzionali per approfondire la discussione sulle criticità incontrate nello sviluppo delle attività e a individuare le azioni di mitigazione necessarie nel rispetto degli obiettivi del piano e dei costi.

In queste sedi, il Responsabile del Progetto (M.Grazia Tommasini - RI.NOVA) e il Responsabile Scientifico (Marina Collina - UNIBO) hanno tenuto sempre attenta l'attenzione agli obiettivi del Piano, al fine di avere la più ampia condivisione possibile delle informazioni e impostare le modalità di realizzazione delle azioni d'innovazione.

### **Costituzione del Comitato di Piano**

In occasione della riunione di attivazione si è anche proceduto alla costituzione del Comitato di Piano (CP) per la gestione e il funzionamento del GO, che è così composto:

- RO-RP, M.Grazia Tommasini (RI.NOVA)
- RS, Marina Collina (UNIBO)
- Rappresentante di UCSC: Emanuele mazzoni, Tito Caffi
- Rappresentante di CNR ISPS di Padova: Laura Scarabel
- Rappresentante di UNIFE: Steafno Civolani, Giovanni Bernacchia
- Rappresentante dell'Az. Soc. Agr. Rizzati Romano: Rizzati Romano
- Rappresentante dell'Az Agr. Corradini David: Corradini David
- Rappresentante di Dinamica: Cinzia Tornese

### **Gestione del Gruppo Operativo**

Dalla data di attivazione del GO, il Responsabile di Progetto ha svolto una serie di attività funzionali a garantire la corretta applicazione di quanto contenuto nel Piano stesso, e in particolare:

- Il monitoraggio dello stato d'avanzamento dei lavori;
- La valutazione dei risultati in corso d'opera;
- L'analisi degli scostamenti, comparando i risultati intermedi raggiunti con quelli attesi;
- La definizione delle azioni correttive.

Il Responsabile di Progetto (RP), in stretta collaborazione con il Responsabile 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. Allo stesso modo, il RP e il 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 di RI.NOVA (v. Autocontrollo e Qualità).

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

A campione, il RP ha verificato la congruenza tra le caratteristiche dei materiali e prodotti impiegati dai partner, rispetto a quanto riportato nel Piano. A tal fine il RP ha eseguito alcune verifiche ispettive presso i partner, in coerenza con quanto indicato dalle procedure gestionali del Sistema Gestione Qualità di RI.NOVA.

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

In occasione di questa domanda di pagamento (stralcio), il RP e il RS, insieme a tutti i partner coinvolti, hanno effettuato l'analisi dei risultati 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 GO**

Oltre alle attività descritte in precedenza, RI.NOVA ha svolto una serie di attività di supporto al GO, come le attività di interrelazione con la Regione Emilia-Romagna, l'assistenza tecnico-amministrativa agli altri partner, le richieste di chiarimento.

RI.NOVA si è inoltre occupato dell'aggiornamento della Rete PEI-AGRI in riferimento al Piano, come richiesto dalla Regione, al fine di stimolare l'innovazione, tramite l'apposita modulistica presente sul sito.

### **Autocontrollo e Qualità**

Attraverso le Procedure Gestionali e le Istruzioni operative approntate nell'ambito del proprio Sistema Gestione Qualità, RI.NOVA 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;
- Rispettati gli standard di riferimento individuati per il Piano;
- Garantita la soddisfazione del cliente tramite confronti diretti e comunicazioni scritte;
- Rispettate modalità e tempi di verifica in corso d'opera definiti per il Piano;
- Individuati i fornitori ritenuti più consoni per il perseguimento degli obiettivi.

La definizione delle procedure, attraverso le quali il RP ha effettuato il coordinamento e applicato le politiche di controllo di qualità, sono la logica conseguenza della struttura organizzativa di RI.NOVA. In particolare, sono state espletate le attività di seguito riassunte.

#### Attività di coordinamento

Le procedure attraverso le quali si è concretizzato il coordinamento del GO si sono sviluppate attraverso riunioni e colloqui periodici con il Responsabile Scientifico e con quelli delle Unità Operative coinvolte.

#### Attività di controllo

La verifica periodica dell'attuazione progettuale si è realizzata secondo cadenze temporali come erano state individuate nella scheda progetto. 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 sotto descritti:

- Verifiche dell'applicazione dei protocolli operativi in relazione a quanto riportato nella scheda progetto;
- Visite ai campi sperimentali e ai laboratori coinvolti nella conduzione delle specifiche attività.

#### Riscontro di non conformità e/o gestione di modifiche e varianti

Non si sono verificate situazioni difformi a quanto previsto dalla scheda progetto.

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 di RI.NOVA.

Il Sistema Qualità RI.NOVA, 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).

In data 8 luglio 2022 è stata inoltrata una richiesta di **PROROGA di 12 mesi** (a seguito della D.G.R. n. 833 del 23/05/2022) sulla scadenza del progetto in oggetto (posticipando, quindi, la chiusura al 26/10/2023), a causa delle difficoltà nella realizzazione dell'attività di formazione e consulenza, legate in gran parte all'emergenza COVID. La richiesta è stata funzionale anche a completare alcune indagini nell'ambito delle Azioni 3.1 ("azione 3.1.1. "Allestimento di un protocollo diagnostico "LAMP" per la rapida individuazione della resistenza target-site agli erbicidi inibitori dell'ALS in *Amaranthus retroflexus*, *A. hybridus*, *A. tuberculatus* e preparazione di strategie di gestione specifiche", "azione 3.1.3 sui "Metodi molecolari innovativi per una diagnosi in campo della presenza di mutazioni coinvolte nella resistenza ai prodotti fitosanitari e valutazione della loro frequenza in patogeni delle piante", "azione 3.1.2 su "Allestimento di protocolli diagnostici "LAMP" per la rapida individuazione della resistenza target-site agli insetticidi neonicotinoidi e piretroidi in *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* e ad abamectina e bifenazate in *Tetranychus urticae*") gran parte delle quali sono tra l'altro state ritardate nella prima fase ed in particolare sulle attività di laboratorio a causa delle restrizioni causate dal Covid oltre che per il ritardo nella consegna di alcuni materiali chiave per lo svolgimento delle indagini di laboratorio e dell'azione 3.2 ("valutazione di strategie alternative di difesa contro la psilla") per completare al meglio le indagini che ha previsto la validazione dell'impiego di una miscela di feromoni specifici di *Psylla pyri* prodotti da una ditta giapponese (Shin Etzu). La proroga è stata approvata con Determina n. 13487 del 12/07/2022 dalla Regione Emilia Romagna.

Sull'azione 1 sono state sviluppate tutte le attività previste nel piano. Gli obiettivi sono stati raggiunti e non sono state rilevate criticità nella fase di cooperazione del GO.

#### PERSONALE

Cognome e nome		Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo orario	Costo totale
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto coordinamento	154	27	4.158,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto coordinamento	136	27	3.672,00
	RINOVA	Impiegato amministrativo	segreteria	99	27	2.673,00
	RINOVA	Impiegato amministrativo	supporto amministrativo	50	27	1.350,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto coordinamento	46	43	1.978,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto coordinamento	205	43	8.815,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	responsabile qualità	100	43	4.300,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	Responsabile progetto e coordinamento	92	43	3.956,00
	RINOVA	Impiegato amministrativo	Responsabile amministrativo	78	43	3.354,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	Supporto generale	172	43	7.396,00
					<b>Totale:</b>	<b>41.652,00</b>

## **AZIONE 3 – AZIONI SPECIFICHE LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO**

### **SOTTO-AZIONE 3.1 – METODI INNOVATIVI PER UNA DIAGNOSI PRECOCE DELLA RESISTENZA**

**Uar:** CNR, UCSC, UNIBO

**Attività 3.1.1 – Allestimento di un protocollo diagnostico “LAMP” per la rapida individuazione della resistenza *target-site* agli erbicidi inibitori dell’ALS in *Amaranthus retroflexus*, *A. hybridus*, *A. tuberculatus* e preparazione di strategie di gestione specifiche.**

#### **Obiettivi**

Il progetto di ricerca intende sviluppare una tecnica molecolare detta amplificazione isotermica mediata da loop (LAMP) in grado di diagnosticare la presenza di biotipi di amaranto resistenti agli erbicidi inibitori dell’acetolattato sintasi (ALS) direttamente in campo. La diagnosi precoce durante la stagione vegetativa di biotipi resistenti consente di programmare un adeguato controllo che tenga conto dei biotipi resistenti e che preveda l’uso di erbicidi con un diverso meccanismo di azione associato ad interventi non chimici. La diagnosi *on-site* della resistenza può quindi migliorare la gestione delle infestanti e diminuire il costo economico ed ambientale dei trattamenti erbicidi. Nello specifico si vuole rilevare l’allele mutante del gene ALS chiamato Leu 574 che conferisce cross-resistenza agli imidazolinoni ed alle solfoniluree nelle 3 specie di amaranto diffuse nella regione Emilia-Romagna ovvero *A. retroflexus*, *A. hybridus* e *A. tuberculatus*. Lo scopo è anche quello di sviluppare il saggio LAMP in grado di funzionare indifferentemente sulle tre specie di amaranto visto che si possono verificare situazioni di co-infestazione di diverse specie in un medesimo campo.

#### **MATERIALI E METODI**

##### **1. Selezione delle popolazioni di amaranto**

Sono state usate due popolazioni suscettibili agli ALS per ciascuna delle tre specie *A. hybridus*, *A. retroflexus* e *A. tuberculatus* (Tabella 3.1.1.1). Le diverse popolazioni di amaranto sospette resistenti agli inibitori dell’ALS sono state testate per determinare il pattern di resistenza agli ALS e per individuare la specie di amaranto che era presente (Tabella 3.1.1.2). Tra queste popolazioni resistenti ne sono state scelte 2 per ciascuna delle tre specie per mettere a punto la metodica LAMP. Una ulteriore popolazione di *A. hybridus* è stata utilizzata per la validazione del metodo con una procedura da campo e per la quale il test della resistenza è stato effettuato a posteriori. Per ogni popolazione, semi maturi da almeno 25-30 piante sono stati raccolti, puliti e mantenuti a 4°C fino al momento del loro utilizzo.

Tabella 3.1.1.1. Popolazioni suscettibili delle 3 specie di amaranto coinvolte nella sperimentazione

Specie	Codice IPSP	Comune	Provincia	Situazione di campionamento
A.	37	Berra	Ferrara	Sterrato

<i>retroflexus</i>	52	Roma	Roma	Parco pubblico
<i>A. hybridus</i>	53	Roma	Roma	Parco pubblico
	57W	San Stino di Livenza	Venezia	Sperimentale
<i>A. tuberculatus</i>	64	Gombito	Cremona	barena Adda
	65	Portalbera	Pavia	barena Adda

Tabella 3.1.1.2. Popolazioni di amaranto sospette resistenti campionate nell'ambito di un precedente PSR e dall'IPSP.

origine dei campioni	Anno di campionamento	Codice IPSP	Comune	Provincia	Situazione di campionamento
Precedente PSR Emilia-Romagna	2017	74	Argenta	Ferrara	Soia
	2017	75	Alfonsine	Ravenna	Soia
	2017	76	Massa Fiscaglia	Ferrara	Soia
	2017	77	Ostellato	Ferrara	Soia
	2017	78	Comacchio	Ferrara	Soia
	2017	80	Massa Fiscaglia	Ferrara	Soia
	2018	103	Codigoro	Ferrara	Soia
IPSP	2014	35	Berra	Ferrara	Soia
	2017	61	Montegrotto Terme	Padova	Soia
	2022	185	Zibido San Giacomo	Milano	Riso

## 2. Saggio in vivo per determinare il pattern di resistenza agli inibitori dell'ALS

I test biologici per determinare la sensibilità dei biotipi al tifensulfuron-metile (sulfonilurea) e all'imazamox (imidazolinone) sono stati condotti in serra a Legnaro (PD) (45°21'N, 11°58'E). I semi sono stati seminati in scatole di plastica contenente un substrato di agar allo 0,6% e posti in una camera di germinazione a 18/28 °C notte/giorno e fotoperiodo di 12 ore utilizzando tubi al neon con una densità di flusso fotonico adatta alla fotosintesi (15-30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Dopo 5-6 giorni, i semi germinati sono stati trapiantati in vasi di plastica (11 cm x 10,1 cm) riempiti con un substrato standard (60% terreno argilloso, 15% sabbia, 15% perlite e 10% torba) e sono stati coltivati in serra (30/20 °C giorno/notte) con un fotoperiodo di 16 ore luce/8 ore buio.

Quando le piantine hanno raggiunto lo stadio di 4-5 foglie, sono state trattate con tifensulfuron-metile (Harmony 50 SX, DuPont™, 500 g a.i.  $\text{kg}^{-1}$  + 0.1% Trend90) e imazamox (Tuareg®, DuPont™, 40 g a.i.  $\text{L}^{-1}$ ) alle dosi raccomandate di campo corrispondenti a 6 g a.i.  $\text{ha}^{-1}$  e 40 g a.i.  $\text{ha}^{-1}$ , rispettivamente. Gli erbicidi sono stati applicati utilizzando un'irroratrice da banco di precisione con una barra dotata di tre ugelli idraulici a getto piatto (portata estesa) (Teejet®, 11002), che erogavano 300 L  $\text{ha}^{-1}$  ad una pressione di 215 kPa e una velocità di circa 0,75  $\text{m/s}^{-1}$ . Il layout sperimentale era un disegno completamente randomizzato con due repliche biologiche (= vasi, 20 piante per vaso). Quattro settimane dopo l'applicazione dell'erbicida, è stato registrato il numero di piante sopravvissute ed è stata determinata la percentuale di piante resistenti per ciascuna popolazione. L'esperimento è stato condotto due volte e i risultati sono espressi come valore medio ed errore standard.

## 3. Determinazione della specie

Per determinare le specie di *Amaranthus* presenti nelle popolazioni raccolte è stata utilizzata una chiave botanica semplificata, precedentemente descritta dall'IPSP e basata sulle caratteristiche dell'infiorescenza. Per ogni popolazione risultata resistente, 10 piante sopravvissute sono state coltivate fino a maturità in modo da poter osservare le caratteristiche dell'infiorescenza e dei semi utili per il riconoscimento delle specie di amaranto.

## 4. Estrazione dei DNA e genotipizzazione

### 4.1. Estrazione dei DNA

Per le analisi molecolari, circa 1  $\text{cm}^2$  di foglia per pianta è stato campionato e conservato a -20°C finché non è stata effettuata l'estrazione del DNA genomico utilizzando un protocollo CTAB (cetiltrimetilammonio bromuro) adattato per la manipolazione a temperatura ambiente. Brevemente, i campioni scongelati sono stati macinati con tessuto TissueLyser II (Qiagen Hilden, Germania) a temperatura ambiente per 1 minuto a 30 Hz; il tessuto macinato è stato incubato con 600  $\mu\text{l}$  di CTAB al 2% più tampone PVP all'1% (senza mercaptoetanolo) a 60 °C per 30 minuti; Dopo l'incubazione sono stati aggiunti 600  $\mu\text{l}$  di cloroformio:alcol isoamilico 24:1 e miscelati delicatamente per inversione; i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 10.000 $\times$  g; la fase acquosa è stata recuperata e il DNA è stato precipitato con 200  $\mu\text{l}$  di alcol isopropilico freddo (-20°C) e centrifugato per 20 minuti a 10.000 $\times$ g; tutto il liquido è stato rimosso e i pellet sono stati risciacquati con etanolo al 70% e lasciati asciugare a temperatura ambiente; i pellet essiccati sono stati successivamente sciolti in acqua. La concentrazione e la qualità del DNA sono state determinate utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). La concentrazione del DNA è stata regolata a 20 ng/ $\mu\text{L}$ .

## 4.2. Saggio CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Un saggio CAPS è stato utilizzato come metodo di riferimento per genotipizzare le piante. Nella fase di setup ha permesso di conoscere in anticipo il genotipo dei campioni utilizzati, mentre nella fase di validazione è stato usato per verificare la capacità predittiva della LAMP.

Ampliconi di lunghezza 1.394 bp, inclusa la posizione 574, sono stati ottenuti utilizzando i primer Caps\_F1 (5'-GGGAAGAATAAGCAACCTCATGTG-3') e 3UTR\_R1 (5'-TGGCTGATGAAAGGCAACAC-3'). La PCR è stata eseguita utilizzando GoTaq® G2 Hot Start Polymerase (Promega) in una miscela da 15 µL, inclusi 3 µL di tampone GoTaq Flexi 5× Green, miscela dNTP (0,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,9 µM), primer forward e reverse (0,2 µM ciascuno), 0,075 µL di GoTaq DNA Polymerase e 1 µL di DNA. Condizioni di amplificazione: 95 °C per 2 minuti; 35 cicli 95°C per 30 s, 58°C per 30 s, 72°C per 1 min 30 sec e 72°C per 5 min. 5 µL di prodotto PCR non purificato sono stati incubati a 37 °C per 1 ora con 0,1 µL dell'enzima di restrizione MnlI (MfeI) (10 U/µL) (Thermo Scientific, Waltham, USA), 9 µL di acqua e 1 µL di 10X Buffer G. I campioni digeriti sono stati analizzati su un gel di agarosio all'1%: i campioni non tagliati sono stati attribuiti come omozigoti wild type (WT), mentre i campioni completamente digeriti (due bande di circa 514 e 880 bp, rispettivamente) sono stati attribuiti come mutanti omozigoti e parzialmente campioni digeriti (tre bande di 1.394, 880 e 514 pb, rispettivamente) come mutanti eterozigoti Leu/Trp-574.

## 5. Disegno dei primer

Poiché il funzionamento di questo saggio è determinato dalla presenza di primer specifici per alcune varianti alleliche, è detto allele-specific AS-LAMP. I primer allele-specifici utilizzati nei protocolli LAMP sono normalmente di tipo FIP o BIP, e ciascuno di questi può contenere la mutazione che conferisce la specificità al 5' od al 3' della sequenza (vedi esempio in Figura 3.1.1.1). Non conoscendo a priori quale strategia funzionasse meglio nel nostro caso, sono stati disegnati 4 set di primer per ciascuna delle quattro strategie possibili (chiamate FIP3', FIP5', BIP3' e BIP5'). Poiché la posizione della mutazione cambia anche la posizione del primer lungo la sequenza, cambiano anche tutti gli altri primer (F3, B3, LF e LB). Per questo motivo ogni singola strategia è stata testata durante le fasi iniziali del setup e solo quella ritenuta più performante è stata adottata per proseguire lo studio.

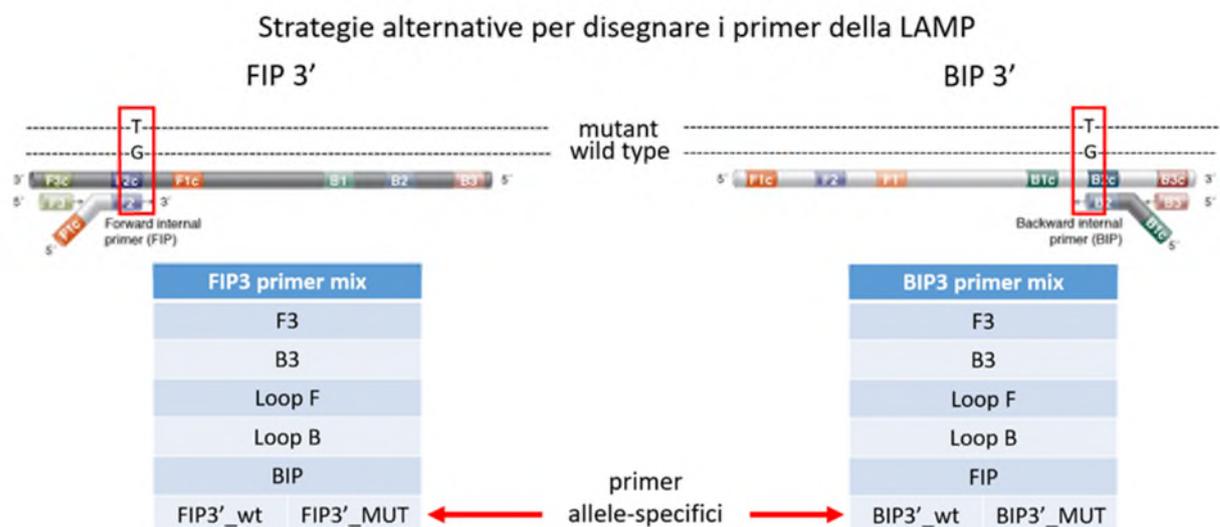


Figura 3.1.1.1. Strategie diverse per la AS-LAMP determinano sequenze diverse dei primer: in questo caso vengono mostrati i primer FIP e BIP. Pur avendo sequenza diversa, entrambi portano il nucleotide discriminante in posizione 3'.

I primer sono stati disegnati con l'aiuto di Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e/>), utilizzando una sequenza di *A. tuberculatus* come guida. Sono stati utilizzati parametri predefiniti, con piccole modifiche introdotte per ottenere un numero maggiore di combinazioni di primer (ovvero "condizione parametro" = normale; Tm F1c/B1c=60-66 °C; Tm F2/B2=59-61°C; Tm F3/B3=59-61°C; velocità GC=60-80%; distanze F2-B2=120-250 bp; distanze loop F1c-F2=40-100 bp). I primer allele-specifici di ciascuna strategia (chiamati FIP3', FIP5', BIP3' e BIP5') differiscono esclusivamente per l'ultimo nucleotide, che conferisce loro la specificità per l'allele wild-type (Trp) o mutante (Leu).

## 6. Setup della LAMP

Per determinare la migliore strategia di amplificazione, sono state condotte delle reazioni con tutte le mix disegnate (FIP3', FIP5', BIP3' e BIP5') in assenza di template, sia a 60°C che 65°C, per verificare in quali condizioni fosse assenti prodotti aspecifici causati da auto-amplificazione dei primer. Le reazioni LAMP sono state condotte su uno strumento Genie II (OptiGene, Horsham, Regno Unito) inizialmente in miscele di reazione da 25 µl, contenenti 15 µl di GspSSD Isothermal Mastermix (ISO-001) (OptiGene), 200 nM di primer F3 e B3, 2 µM di primer FIP e BIP e 1 µM di ciascun primer di loop (FL e BL).

Una volta determinata la strategia di amplificazione più promettente, le piante selvatiche e mutanti genotipizzate con il test CAPS sono state analizzate mediante LAMP. Il DNA è stato estratto come descritto nella sezione 4.1 da 14 piante di una popolazione sensibile e resistente per ciascuna specie di amaranto. Le piante delle popolazioni resistenti sono state scelte tra quelle sopravvissute al trattamento con imazamox mentre le piante delle popolazioni suscettibili sono state campionate dai vasi non trattati degli esperimenti descritti al paragrafo 2. Ciascun campione è stato amplificato sia con il set di primer Trp che con quello specifico per Leu in reazioni separate, con le condizioni ottimizzate precedentemente determinate. Il volume di reazione è stato diminuito a 10 µl, mantenendo inalterati i rapporti fra i primer, e aggiungendo 5 uL di DNA (alla concentrazione di 20 ng/µL). La specificità dei prodotti di amplificazione è stata confermata controllando le curve di fusione ottenute con una fase di ricottura lenta (0,05 °C sec<sup>-1</sup>, da 95 °C a 80 °C) con monitoraggio della fluorescenza.

Poiché la macchina OptiGene LAMP consente la visualizzazione in tempo reale di ciascuna curva di amplificazione, è possibile distinguere le amplificazioni altamente specifiche da quelle meno specifiche (cioè, ritardate). Sfruttando questa caratteristica, è stato utilizzato come misura di specificità il momento in cui la curva di amplificazione raggiungeva il 50% della fluorescenza massima, definito t<sub>50</sub>. Se un campione risultava amplificato da entrambe le miscele di reazione e la differenza tra i due t<sub>50</sub> era inferiore ad una soglia fissa, il campione è stato considerato "non determinato" ed escluso dalle analisi. Se invece la differenza tra i due t<sub>50</sub> era superiore alla soglia, l'amplificazione ritardata veniva ignorata. La soglia è stata definita dopo il setup.

## 7. Validazione

Nella fase di validazione, la presenza della mutazione che conferisce resistenza (Leu) è stata predetta con la metodica LAMP ed i risultati sono stati poi comparati con quelli del saggio CAPS (metodo di

riferimento), in modo da determinare i campioni veri positivi (TP), falsi positivi (FP), veri negativi (TN) o falsi negativi (FN). Sono stati valutati due approcci di analisi dei dati: 1) considerando sia la reazione LAMP specifica per il wild-type che quella specifica per il mutante e 2) considerando solo la reazione LAMP specifica per il mutante. TP, FP, TN e FN sono stati utilizzati per determinare la sensibilità (ovvero tasso di veri positivi,  $TPR=TP/P$ ), specificità (tasso di veri negativi,  $TNR=TN/N$ ) e precisione (ovvero valore predittivo positivo,  $PPV=TP/(TP+FP)$ ). Per entrambi gli approcci, tutti gli indici sono stati stimati per determinare l'approccio più adatto da utilizzare sul campo.

Per questo passaggio è stato utilizzato un diverso set di piante wild-type e resistenti. Il DNA è stato estratto da 14 piante di una popolazione sensibile e resistente per ciascuna specie di *Amaranthus*. Le piante delle popolazioni sia sensibili che resistenti agli ALS sono state campionate dai vasi non trattati degli esperimenti descritti nel paragrafo 2. Come nella configurazione, ciascun campione è stato amplificato con i set di primer specifici per Trp e Leu in reazioni separate. I campioni sono stati classificati come veri positivi (TP) se risultavano portatori della mutazione sia per LAMP che per CAPS, mentre lo stato di falso positivo (FP) è stato assegnato ai campioni risultanti portatori della mutazione per LAMP, ma wild type per CAPS. Oppure, i campioni sono stati classificati come veri negativi (TN) se risultavano wild type con entrambi i metodi, mentre lo stato di falso negativo (FN) è stato assegnato ai campioni risultanti wild type per LAMP, ma portatori della mutazione per CAPS.

## 8. Test in situazione di campo (simulata)

Poiché questo test LAMP è progettato per aiutare agricoltori, tecnici e altre parti interessate a capire se una data popolazione di amaranto è suscettibile agli inibitori degli ALS prima del trattamento con erbicida, il test è stato convalidato anche in condizioni di campo simulate. Piante di una popolazione di campo mai testata, sospettata di essere resistente agli ALS, sono state coltivate come descritte nel paragrafo 2 fino allo stadio di 2-4 foglie. I campioni di DNA genomico grezzo (non purificato) sono stati preparati con il kit di lisi dei materiali vegetali (EXT-001, Optigene), seguendo il protocollo del produttore, ma estendendo la macinazione manuale da 1 minuto a 3 minuti. I campioni di DNA grezzo (30 piante) sono stati poi amplificati con il test LAMP come descritto nel paragrafo 6, ma utilizzando solo il set di primer LAMP specifico per il mutante e adattando la reazione ad un volume finale di 25  $\mu$ L. La percentuale di piante portatrici della mutazione puntiforme è stata utilizzata per dedurre lo stato di resistenza della popolazione, ovvero la percentuale di sopravvivenza in caso di trattamento con inibitori di ALS. Per verificare il risultato del saggio LAMP è stato poi utilizzato un saggio biologico erbicida, effettuato come descritto nel paragrafo 2, per determinare l'effettivo stato di resistenza della popolazione.

## RISULTATI

### 1. Biosaggio ed individuazione specie amaranto

Tutte le popolazioni suscettibili appartenenti alle tre specie (*A. tuberculatus*: 64 e 65; *A. retroflexus*: 52 e 37; *A. hybridus*: 53 e 57W) sono state pienamente controllate da entrambi gli erbicidi già alla dose di campo (1x) (Figura 3.1.1.2). Tutte le popolazioni sospette resistenti sono risultate cross-resistenti ad entrambi gli erbicidi, con sopravvivenza fra 80 e 100%, sia alla dose di campo che a tre volte la dose (Figura 3.1.1.2 e Tabella 3.1.1.3).

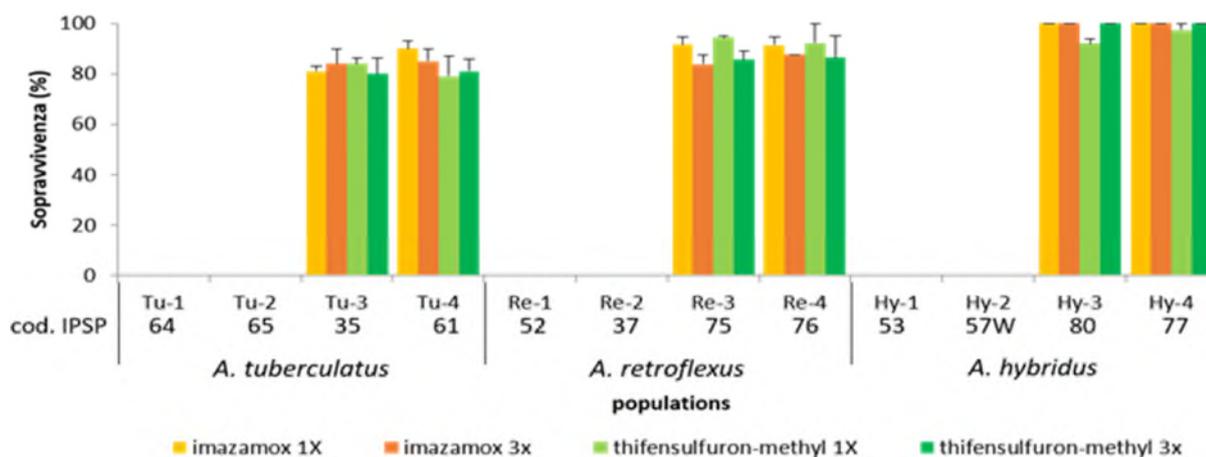


Figura 3.1.1.2. Sopravvivenza delle popolazioni di amaranto alla dose di campo (1X) e tre volte la dose (3X) di imazamox e thifensulfuron-metile. Le barre rappresentano la percentuale media di piante sopravvissute con gli errori standard.

Fra le popolazioni coinvolte, sono state identificate solo le specie *A. hybridus* e *A. retroflexus* (Tabella 3.1.1.3), ma non *A. tuberculatus*. Per questo motivo, sono state aggiunte alla sperimentazione anche le popolazioni 35 e 61, appartenenti a questa specie. Sono state perciò scelte le 2 popolazioni resistenti per specie da usare per la LAMP. I risultati dello screening con gli ALS su queste popolazioni sono riportati in Figura 3.1.1.2.

Tabella 3.1.1.3. Riconoscimento delle specie di amaranto nelle popolazioni dell' Emilia-Romagna e % di sopravvivenza al trattamento con thifensulfuron-metile ed imazamox.

Codice IPSP	Thifensulfuron-metile		Imazamox		Specie
	1x	3x	1x	3x	
74	60	80	60	55	<i>A. retroflexus</i>
75	92	80	90	80	<i>A. retroflexus</i>
76	90	80	90	82	<i>A. retroflexus</i>
77	98	100	100	100	<i>A. hybridus</i>
78	95	100	100	80	<i>A. retroflexus</i>
80	90	100	100	100	<i>A. hybridus</i>
103	100	97	96	94	<i>A. hybridus</i>

## 2. Scelta della strategia migliore e setup

I primer delle strategie FIP5', BIP5' e BIP3' hanno dato amplificazione anche in assenza di template sia alla temperatura di 60 che di 65°C, indicando una forte tendenza alla auto-amplificazione. Per questo motivo non è stato possibile utilizzarli. I primer della strategia FIP3' invece hanno invece dato assenza di auto-amplificazione ad entrambe le temperature e sono stati perciò scelti per continuare la sperimentazione esempio di risultato in Figura 3.1.1.3 I primer della strategia FIP3' sono elencati nella tabella 3.1.1.4.

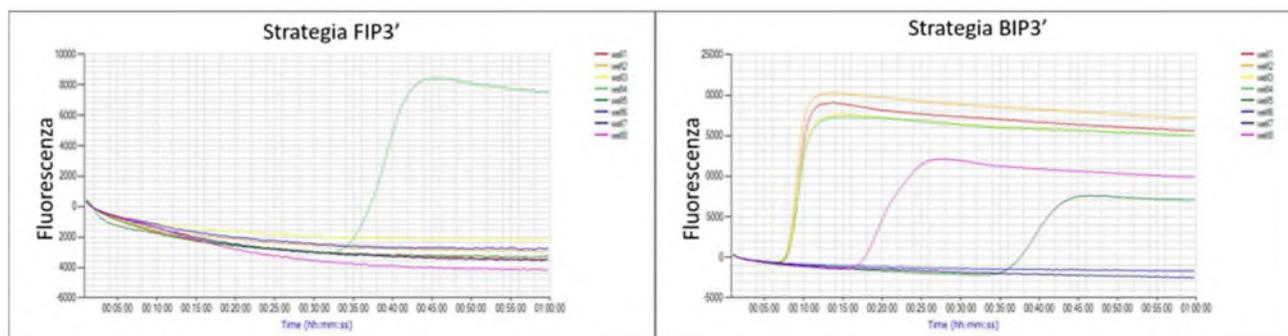


Figura 3.1.1.3. Verifica dell'assenza di reazione di auto-amplificazione dei primer con le strategie FIP3' e BIP3'. I primi 4 pozzetti (well 1-4) contengono le reazioni ottenute con il primer specifico per il wild-type, mentre gli altri 4 (well 5-8) quello specifico per il mutante, tutti senza DNA. Nel pozzetto numero 4 (verde) del grafico a sinistra è presente un'amplificazione che si manifesta dopo i 30 minuti, molto probabilmente un artefatto dovuto all'inquinamento del pozzetto.

Tabella 3.1.1.4. Sequenza dei primer del set FIP3' utilizzati per il setup e la validazione della LAMP.

Primer	Sequence (5'-3')
F3	TGCTCTTGAACAATCAACAT
B3	AATTGCAGCCCTTAAATCG
FIP3_Trp	AAGGATTCCCGAGGTATGTATGTG-TTAGGTATGGTTGTTCAAT <u>G</u>
FIP3_Leu	AAGGATTCCCGAGGTATGTATGTG-TTAGGTATGGTTGTTCAAT <u>I</u>
BIP	TTCAGAAATCTTCCCGGATATGC-CTCACCTTGGTAACACGG
LF	CCGGTTAGCTTTGTAAAATCGATCT
LB	TTTGCTGAAGCATGTGATATACCAG

Il test CAPS ha rivelato che tutte le piante delle popolazioni sensibili agli inibitori di ALS scelte per il setup (Hy-1, Re-1, Tu-1) avevano solo l'allele wild type 574-Trp, cioè gli ampliconi rimangono non tagliati dopo la reazione con l'enzima di restrizione MfeI (ad esempio Figura 3.1.1.4, immagini gel in alto a sinistra per pop Hy-1). Il test CAPS condotto sulle piante delle popolazioni resistenti agli inibitori dell' ALS, invece, ha dato solo piante con l'allele mutante 574-Leu, cioè gli ampliconi vengono tagliati da MfeI (ad esempio figura 3.1.1.4, immagini del gel in alto a destra). Poiché sul gel di agarosio non erano visibili ampliconi non digeriti, tutte le piante resistenti erano resistenti omozigoti. Sette su quattordici di questi campioni sono stati analizzati con la LAMP insieme a un controllo senza DNA (bianco): la maggior parte dei campioni delle popolazioni sensibili sono stati amplificati con successo dalla miscela LAMP specifica per Trp, mentre con la miscela specifica per Leu non si è verificata nessuna amplificazione come era atteso (Figura 3.1.1.4, grafico in basso a sinistra). Al contrario, la maggior parte dei campioni delle popolazioni resistenti agli inibitori di ALS sono stati correttamente amplificati dalla miscela LAMP specifica per Leu, ma non dalla miscela specifica per Trp (figura 3.1.1.4, grafico in basso a destra).

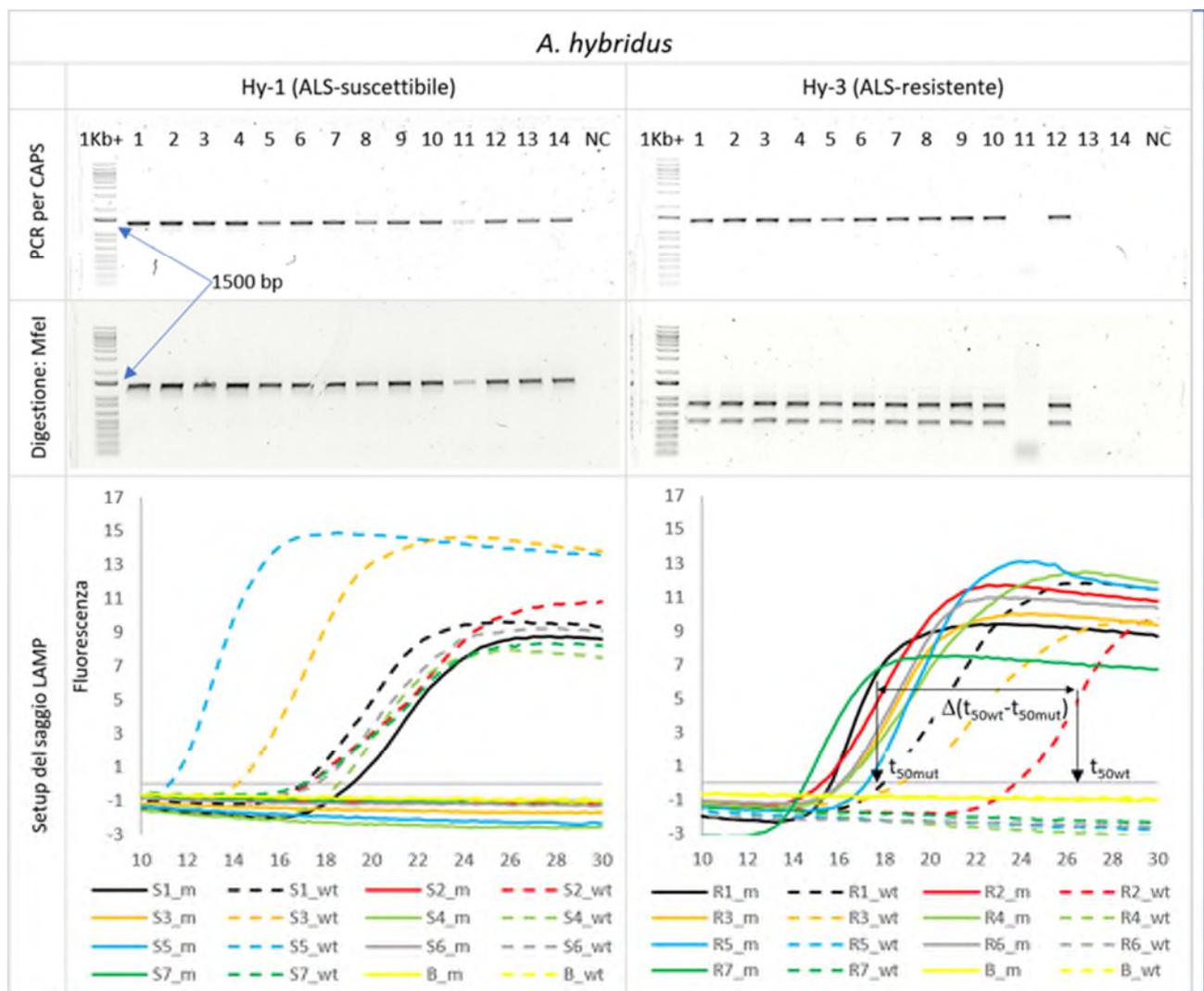


Figura 3.1.1.4. Esempio dei test CAPS (immagini di gel di agarosio in alto) e LAMP (grafici a linee in basso) eseguiti nella fase di messa a punto (*A. hybridus*). Le immagini del gel mostrano l'effetto della digestione enzimatica MfeI sugli ampliconi della PCR ottenuti da 14 campioni di una popolazione

suscettibile all'ALS (Hy-1, in alto a sinistra) e una popolazione resistente all'ALS (Hy-3, in alto a destra). I grafici a linee riportano le curve LAMP di amplificazione ottenute da 7 di questi campioni. I campioni sono stati numerati da 1 a 7, S o R, a seconda dello stato di resistenza della pianta; i campioni con solo acqua (bianchi, B) sono indicati in giallo pallido. Ciascuno è stato amplificato con miscele LAMP specifiche per l'allele mutante 574-Leu (campioni S/R\_m, linee continue) e specifiche per l'allele wild type 574-Trp (campioni S/R\_wt, linee tratteggiate).  $t_{50mut}$  è il momento in cui la reazione specifica per l'allele mutante 574-Leu raggiunge il 50% della fluorescenza massima, mentre  $t_{50wt}$  si riferisce alla reazione specifica per la curva dell'allele wild type 574-Trp. La differenza tra loro è indicata come  $\Delta(t_{wt} - t_{mut})$ .

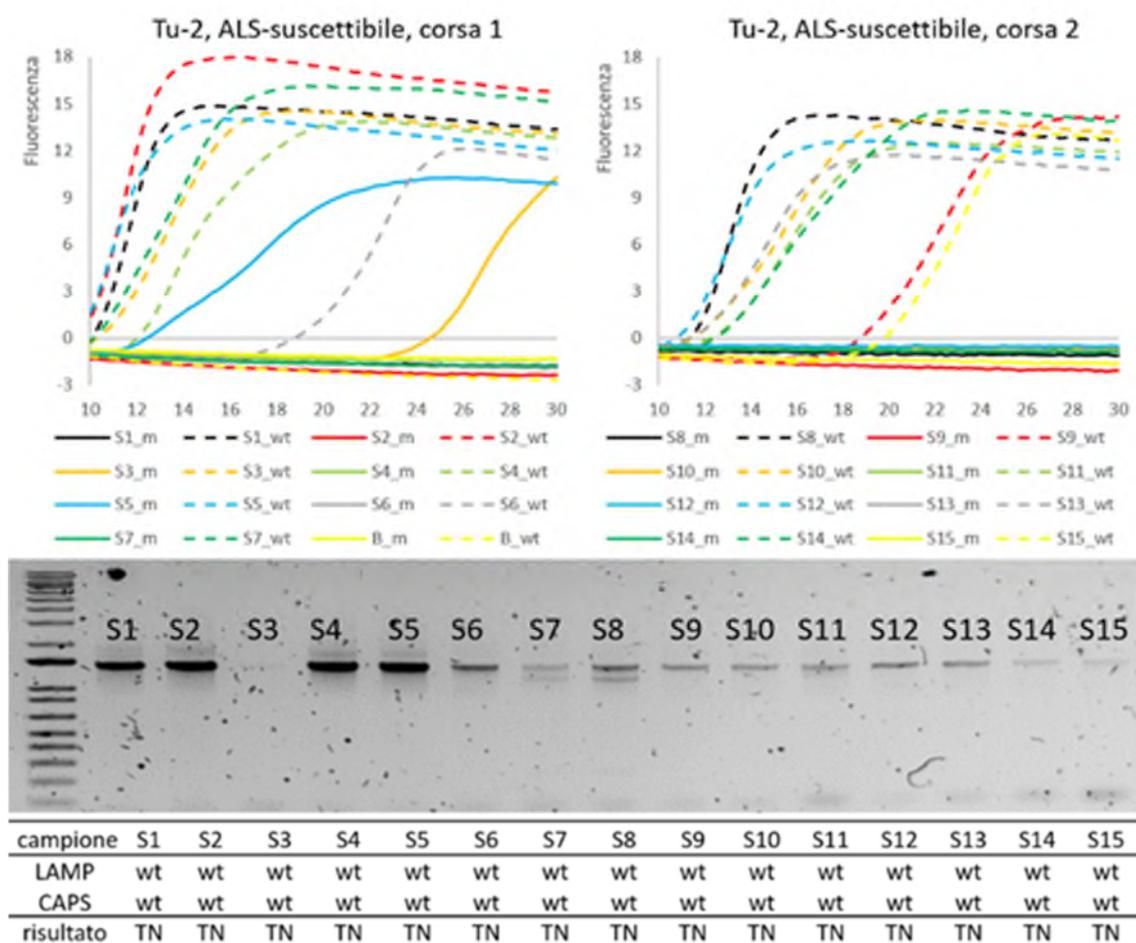
In alcuni casi piante omozigoti di tipo selvatico 574-Trp o di tipo mutante 574-Leu sono state amplificate con entrambe le miscele, ad indicare che si possono verificare delle amplificazioni non specifiche. In questa situazione tuttavia è spesso possibile discriminare la curva di amplificazione specifica da quella non specifica se c'è un ritardo di amplificazione pari o superiore a 5 minuti tra le due. La soglia discriminante di 5 minuti è stata scelta perché rilevabile anche a occhio nudo, ed è stata suggerita da indagini precedenti. Ad esempio, la curva allelica mutante della pianta numero 2 della popolazione Hy-3 ("R2", linee rosse in figura 3.1.1.4, grafico in basso a destra) ha raggiunto il 50% della fluorescenza massima a  $t_{50mut} = 18$  min, mentre la curva allelica wild type ha raggiunto il 50% della fluorescenza massima a  $t_{50wt} = 26$  min. Il ritardo tra  $t_{50wt}$  e  $t_{50mut}$  è stato di 8 minuti e il campione è stato considerato portatore della mutazione. Invece, il campione S1 della popolazione Hy-1 (linee nere in figura 3.1.1.4, grafico in basso a sinistra) è stato considerato non determinato ( $t_{50mut} - t_{50wt} = 2$  min). Per ottimizzare la specificità del test LAMP, sono stati considerati e valutati numerosi parametri (volumi di reazione, concentrazioni di DNA modello, strategie di progettazione dei primer (primer FIP mutati all'estremità 5', più primer BIP mutati 5' e 3')) Le migliori condizioni descritte nel paragrafo 6 sono state adottate per la successiva validazione della LAMP.

### 3. Validazione

Per la validazione ciascun campione è stato amplificato con la miscela specifica per l'allele mutante 574-Leu e con quella specifica per l'allele wild type 574-Trp ed i risultati della LAMP sono stati confrontati con quelli ottenuti con l'altro test molecolare CAPS. È stato così possibile classificare ogni pianta come TP, TN, FP o FN per stimare i corrispondenti indici di prestazione comuni. I risultati ottenuti sono stati analizzati considerando entrambe le amplificazioni e poi anche solo con la LAMP specifica per l'allele mutante, al fine di determinare quale approccio fosse il più adatto da applicare in condizioni di campo. Un esempio di interpretazione dei risultati con i due approcci alternativi è riportato nelle Figure 3.1.1.5, .6 e .7. Se si considerano entrambe le amplificazioni (figure 3.1.1.5 e .6), si possono verificare doppie amplificazioni e, in questo caso, è necessario che le due curve siano valutate con il metodo della soglia dei 5 minuti. In particolare, si vede che i campioni mutanti eterozigoti possono avere doppie amplificazioni con  $t_{50} < 5$  min (es. figura 3.1.1.6, campioni R3, R13 e R15 della popolazione Tu-4), risultando indeterminate. Invece, l'amplificazione con un solo set di primer (figura 3.1.1.7) dà come risultato amplificazioni singole, più facili da interpretare.

Un riassunto della procedura di validazione e degli indici di prestazione stimati è riportato nella Tabella 3.1.1.5. Considerando entrambe le amplificazioni, la sensibilità (la capacità di rilevare i veri

positivi) variava dal 67 al 93%, la specificità (la capacità di rilevare i veri negativi) variava dal 75 all'87% e precisione (la capacità di rilevare i veri positivi evitando i falsi positivi) dal 55 al 100%. Considerando invece solo il set di primer specifico per la mutazione, la sensibilità è stata del 100%, la specificità variava dal 65 al 73% e la precisione dal 59 al 79%. Gli indici sono risultati più alti per *A. retroflexus* e *A. hybridus* rispetto ad *A. tuberculatus*. Nello specifico, la precisione è apparsa piuttosto inferiore per *A. tuberculatus* rispetto alle altre due specie, il che significa che alcune piante che non portano la mutazione (e sono quindi sensibili agli ALS) vengono erroneamente conteggiate come resistenti. Per *A. tuberculatus* questo indice aumentava quando veniva considerato solo il set di primer specifico per la mutazione, mentre per le altre due specie diminuiva. Invece, sia la sensibilità che la specificità sono aumentate per tutte le specie quando si considera solo il set di primer specifico per la mutazione.



Figura

3.1.1.5. Esempio di procedura di validazione del test LAMP per *A. tuberculatus*. In alto, i grafici a linee riportano le curve LAMP ottenute da 15 campioni (corsa 1: S1-7; corsa 2: S8-15) della popolazione suscettibile Tu-2: ciascun campione è stato amplificato con la miscela specifica per il mutante 574-Leu allele (campioni S#\_m, linee continue) e quello specifico per l'allele wild type 574-Trp (campioni S#\_wt, linee tratteggiate). I campioni senza DNA (solo acqua) sono indicati come "B". I risultati LAMP sono stati confrontati con quelli del test CAPS (il gel di agarosio in basso) e ciascun campione è stato classificato come TP, TN, FP o FN per tracciare la matrice di confusione. Tutti i campioni Tu-2 sono di tipo selvaggio; le due bande di S7 e S8 sono aspecifiche e non dovute alla presenza dell'allele trp-574-leu, perché la dimensione delle bande non corrisponde a quella attesa (vedi paragrafo 4.2).

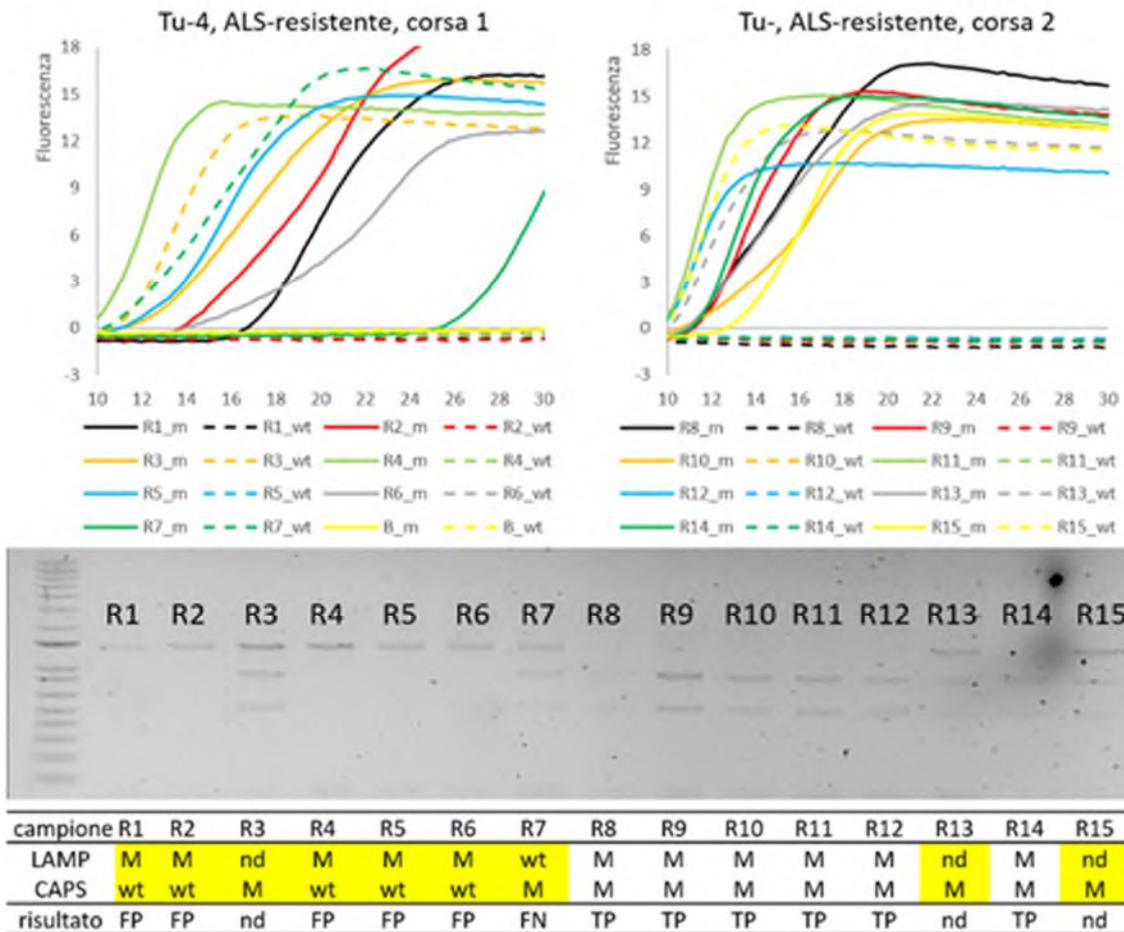


Figura 3.1.1.6. Esempio di procedura di validazione del test LAMP per *A. tuberculosis*. In alto, i grafici a linee riportano le curve LAMP ottenute da 15 campioni (corsa 1: R1-7; corsa 2: R8-15) della popolazione resistente Tu-4: ciascun campione è stato amplificato con la miscela specifica per il mutante 574-Leu allele (campioni R#\_m, linee continue) e quello specifico per l'allele wild type 574-Trp (campioni R#\_wt, linee tratteggiate). I campioni senza DNA (solo acqua) sono indicati come "B". I risultati LAMP sono stati confrontati con quelli del dosaggio CAPS (il gel di agarosio in basso) e ciascun campione è stato classificato come TP, TN, FP o FN per tracciare la matrice di confusione: sono evidenziati i campioni con discrepanza tra i due saggi.

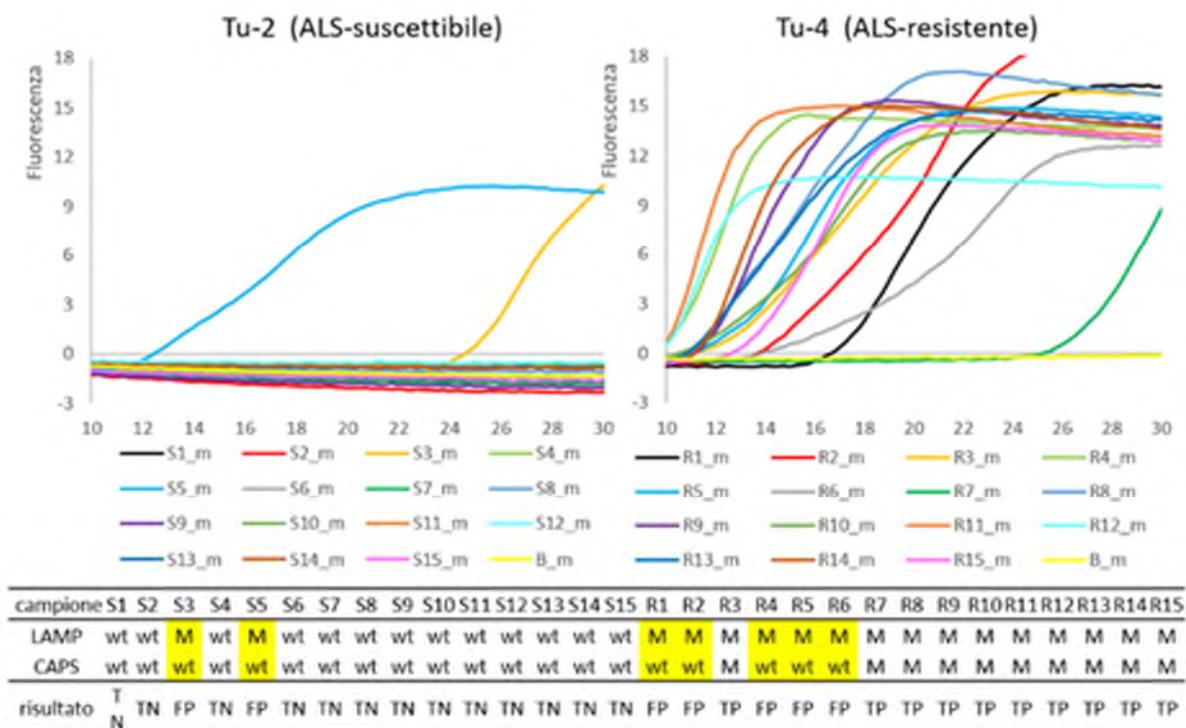


Figura 3.1.1.7. Procedura di validazione del test LAMP di *A. tuberculosis*. I grafici a linee riportano le curve LAMP ottenute da 15 campioni ciascuno della popolazione Tu-2 e Tu-4 (Tu-2: S1-15; Tu-4: R1- 15). Ciascun campione è stato analizzato considerando la miscela specifica solo per l'allele mutante 574-leu. I campioni senza DNA (solo acqua) sono indicati come "B". I risultati LAMP sono stati confrontati con quelli del test CAPS (figure 5 e 6, i gel di agarosio in basso) e ciascun campione è stato classificato come TP, TN, FP o FN per tracciare la matrice di confusione: campioni con una discrepanza tra i due test sono evidenziati.

Tabella 3.1.1.5. Risultati della validazione e stima degli indici di sensibilità, specificità e precisione per le tre specie di *Amaranthus* e i due approcci di analisi e i valori medi tra le specie. TP: vero positivo; FP: falso positivo; TN: vero negativo; FN: falso negativo.

specie	FIP primer considerati	sensibilità (%)	specificità (%)	precisione (%)
		TP/P	TN/N	TP/(TP+FP)
<i>A. tuberculatus</i>	M + wt	60	75	55
	M	100	65	59
<i>A. retroflexus</i>	M + wt	67	87	100
	M	100	73	79
<i>A. hybridus</i>	M + wt	93	87	100
	M	100	67	75
media (se specie non è nota)	M + wt	73	83	85
	M	100	68	71

#### 4. Test con simulazione situazione di campo

Trenta piante della popolazione Hy-5 (ovvero la popolazione n. 185 campionata in riso nel 2022, tabella 3.1.1.2) sono state testate per la presenza della mutazione 574-Leu con il test LAMP eseguito sull'estrazione del DNA genomico grezzo. Tutte le 30 piante, tranne 1, hanno avuto un'amplificazione chiaramente positiva con la miscela LAMP mutante-specifica e la maggior parte dei campioni ha raggiunto l'amplificazione massima tra 12 e 20 minuti (figura 3.1.1.8), analogamente a quanto ottenuto durante la configurazione e la validazione. Apparentemente, l'estrazione rapida del DNA effettuata con il kit commerciale non ha influenzato in modo significativo l'efficienza dell'amplificazione della LAMP. Solo una pianta (T23) ha prodotto un'amplificazione tardiva. Anche considerando questa pianta come suscettibile o non determinata, tutte le altre risultavano portatrici della mutazione 574-Leu (almeno in stato eterozigote) e quindi ci si aspettava un tasso di sopravvivenza agli inibitori di ALS vicino al 100%. Infatti, il test biologico in vivo effettuato su questa popolazione ha confermato la stima (il tasso di sopravvivenza ad entrambe le dosi di campo di tifensulfuron-metile e di imazamox è stato del 100%).

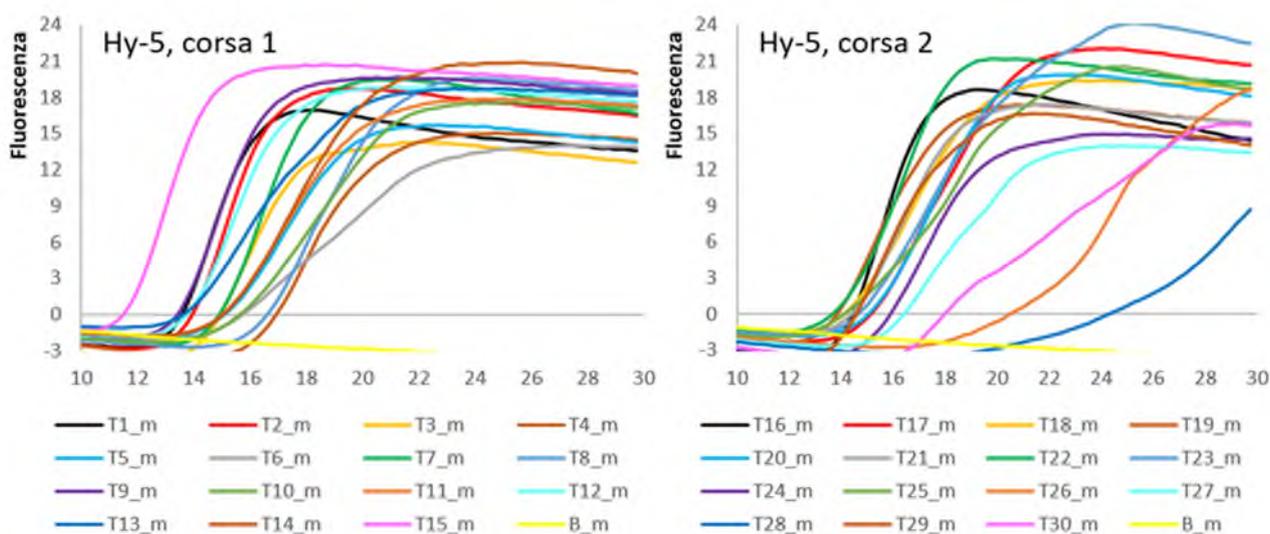


Figura 3.1.1.8. Risultati della previsione della resistenza di una popolazione non testata (Hy-5) in una situazione di campo simulata. I campioni sono stati amplificati solo con primer specifici per l'allele mutante 574-Leu (campioni T#\_m). I campioni senza modello (spazi vuoti, B) sono indicati in giallo.

## CONCLUSIONI COMPLESSIVE

Nel corso del progetto sono state testate popolazioni di amaranto precedentemente raccolte in campi di soia e per le quali è stata confermata la resistenza incrociata al tifensulfuron-metile ed all'imazamox, erbicidi frequentemente impiegati per il controllo degli amaranti in post-emergenza. È stato accertato che le specie di amaranto raccolte nella regione Emilia-Romagna sono riconducibili ad *Amaranthus retroflexus*, *A. hybridus* e *A. tuberculatus*, e talvolta in un medesimo campo possono essere presenti più di una specie. Il meccanismo di resistenza delle popolazioni appartenenti a queste 3 specie è prevalentemente di tipo target-site, cioè dovuto alla presenza di una specifica mutazione nel gene ALS, Trp-574-Leu, nota per essere dominante. Per questo motivo è stato messo a punto il test molecolare LAMP in grado di riconoscere le piante mutate 574-Leu (piante resistenti) dalle piante 574-Trp (piante sensibili) e di funzionare sulle 3 specie.

Nella prima fase dell'attività è stato condotto un test CAPS su tutte le piante delle popolazioni in esame per riconoscere e selezionare le piante resistenti, omozigoti (con 2 alleli resistenti) da quelle resistenti eterozigoti (con 1 allele resistente ed un allele suscettibile) e per poter confrontare, in un secondo momento, i dati ottenuti con il test molecolare innovativo LAMP.

Lo sviluppo del test LAMP è stato impegnativo e ha richiesto l'individuazione del miglior set di primer e l'attenta valutazione dei parametri di amplificazione. Entrambi gli approcci di amplificazione (un singolo set di primer specifico per l'allele mutante, o due set di primer sia per gli alleli mutanti che per quelli wild type) hanno permesso di avere un test LAMP con un buon equilibrio tra sensibilità (la capacità di rilevare i veri positivi), specificità (la capacità di rilevare i veri negativi) e precisione (la capacità di rilevare i veri positivi evitando i falsi positivi). Tuttavia, i risultati indicano che c'è una differenza tra i 2 approcci, quello con i 2 set di primers portano ad una maggiore specificità e precisione ma ad una minore sensibilità, causando la sottostima delle piante resistenti. Viceversa,

quello con 1 set di primer porta ad una sovrastima delle piante resistenti. Questa lieve sovrastima della resistenza non è da considerarsi un problema in quanto consente di essere più cautelativi evitando l'uso di un erbicida ALS a favore di un erbicida con un diverso meccanismo d'azione. Al contrario con la sottovalutazione delle piante resistenti, si rischierebbe di usare l'erbicida ALS che avrebbe meno efficacia per la presenza di piante resistenti non rilevate dalla LAMP. Questo causerebbe un potenziale spreco di erbicidi, un'ulteriore selezione di piante resistenti ed un maggior impatto sull'ambiente. Alla luce di questi risultati l'approccio più idoneo per individuare le piante resistenti delle 3 specie è risultato essere quello basato sul singolo set di primer che riconosce in modo specifico l'allele mutato Leu.

I risultati hanno evidenziato che il test LAMP è efficace anche quando si utilizza un DNA più grezzo ottenuto con una estrazione più rapida. Pertanto, la combinazione del test LAMP sviluppato con questo metodo di estrazione velocizza il test e permette di impiegarlo per rilevare direttamente in loco la presenza di piante resistenti. Con un singolo test LAMP e con il dispositivo (macchinetta portatile) usato in questo progetto è possibile testare 15 piante in 30 minuti.

Finora i test LAMP sono stati applicati con successo solo per rilevare mutazioni che conferiscono resistenza agli inibitori dell'acetil coenzima A. A nostra conoscenza, questo è il primo test LAMP applicato con successo per la rilevazione della resistenza agli ALS. La possibilità di estendere l'utilizzo di questo protocollo ad altre specie congeneri di *Amaranthus* dovrà essere valutata di volta in volta. I risultati mostrano che le specie autogame (*A. retroflexus*, *A. hybridus*), con minore variabilità genetica intrinseca, hanno maggiori possibilità. Il mancato successo nello sviluppo del saggio LAMP per rilevare mutazioni di ALS in *Lolium* spp. è stato attribuito alla variabilità genetica intrinseca della specie di infestanti allogama o alla sequenza ALS bersaglio. Tuttavia, la variabilità genetica è un limite anche per la maggior parte degli strumenti di rilevamento basati su sequenze.

Anche se non è stato ancora testato, questo test LAMP potrebbe funzionare anche in altre specie di amaranto, perché i primer cadono in una parte conservata del gene. Nonostante ciò, poiché il test è progettato per riconoscere specificamente le varianti alleliche Trp-574-Leu, non è possibile rilevare altre varianti alleliche, come anche la resistenza che non è dovuta a questa mutazione puntiforme (ad esempio mutazioni in un altro punto del gene ALS).

### **Attività 3.1.2 – Allestimento di protocolli diagnostici “LAMP” per la rapida individuazione della resistenza *target-site* agli insetticidi neonicotinoidi e piretroidi in *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* e ad abamectina e bifenazate in *Tetranychus urticae***

#### **Obiettivi**

La moderna difesa fitosanitaria necessita di strumenti diagnostici efficaci, rapidi, economicamente sostenibili e validati. Acquisire rapidamente informazioni sui livelli di sensibilità agli insetticidi e su quali meccanismi di resistenza siano diffusi all'interno di una popolazione di un fitofago è una premessa sempre più indispensabile per prevenire e/o limitare l'evoluzione della resistenza e quindi evitare interventi chimici inefficaci e reiterati che determinano aumento dei costi e inquinamento delle acque e del suolo, consentendo inoltre di mantenere più a lungo l'efficacia di prodotti e meccanismi d'azione di cui è sempre più difficile la scoperta di novità.

#### **MATERIALI E METODI**

## 1. Popolazioni standard di riferimento

Per verificare la selettività dei primers scelti è stato impiegato il DNA estratto da ceppi di afidi in allevamento (*Myzus persicae*) e precedentemente impegnati in altre indagini oggetto di varie pubblicazioni<sup>1</sup>[1]. Nel corso di precedenti studi tali ceppi erano stati caratterizzati per quanto riguarda la sensibilità alle varie classi di insetticidi ed era stato caratterizzato l'insieme di mutazioni presenti con tecniche di amplificazione (PCR) allele specifica e con sequenziamento "Sanger" degli ampliconi ottenuti. In tal modo era perfettamente conosciuto il genotipo ed il corredo di mutazioni in grado di determinare la resistenza. Per quanto riguarda invece *Aphis gossypii* e *Tetranychus urticae*, non erano disponibili ceppi in allevamento. Tuttavia si è impiegato DNA la cui condizione (wild-type o mutato) è stata caratterizzata e confermata anch'essa mediante PCR allele specifica seguita da sequenziamento Sanger delle porzioni dei geni coinvolti nella resistenza come è noto da dati di letteratura. In particolare, per quanto riguarda *Tetranychus urticae* gli esemplari utilizzati derivavano da popolazioni con evidenti problemi di resistenza riscontrati in Provincia di Piacenza e che in un precedente progetto erano state confermate come resistenti tramite biosaggi.

L'estrazione del DNA da questi campioni è stata effettuata con un protocollo "salting out" precedentemente utilizzato (Panini et al., 2014). Tale protocollo consente un'estrazione relativamente rapida e soprattutto economica anche se al momento attuale non è facilmente utilizzabile e trasponibile alle condizioni di campo.

La caratterizzazione delle mutazioni presenti è stata effettuata con un saggio QSGG (Qualitative Sybr Green Genotyping)<sup>2</sup>. I risultati ottenibili con tale saggio sono esemplificati nei grafici seguenti dove la linea blu rappresenta l'amplificazione ottenuta in presenza dell'allele sensibile (W = wild type) e

---

<sup>1</sup> Panini, M., Dradi, D., Marani, G., Butturini, A. & Mazzoni, E. (2014) Detecting the presence of target-site resistance to neonicotinoids and pyrethroids in Italian populations of *Myzus persicae*. *Pest Management Science* 70, 931–938. <https://doi.org/10.1002/ps.3630>

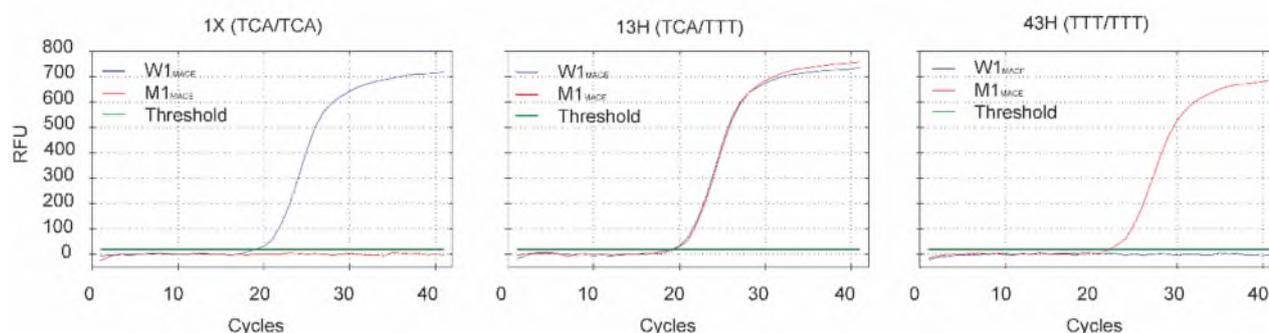
Panini, M., Anaclerio, M., Puggioni, V., Stagnati, L., Nauen, R. & Mazzoni, E. (2015) Presence and impact of allelic variations of two alternative *s-kdr* mutations, M918T and M918L, in the voltage-gated sodium channel of the green peach aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science* 71, 878–884. <https://doi.org/10.1002/ps.3927>

Puggioni, V., Chiesa, O., Panini, M. & Mazzoni, E. (2017) Qualitative Sybr Green real-time detection of single nucleotide polymorphisms responsible for target-site resistance in insect pests: the example of *Myzus persicae* and *Musca domestica*. *Bulletin of Entomological Research* 107, 96–105. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000675>

Panini, M., Chiesa, O., Troczka, B.J., Mallott, M., Manicardi, G.C., Cassanelli, S., Cominelli, F., Hayward, A., Mazzoni, E. & Bass, C. (2021) Transposon-mediated insertional mutagenesis unmasks recessive insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2100559118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100559118>

<sup>2</sup> Puggioni, V., Chiesa, O., Panini, M. & Mazzoni, E. (2017) Qualitative Sybr Green real-time detection of single nucleotide polymorphisms responsible for target-site resistance in insect pests: the example of *Myzus persicae* and *Musca domestica*. *Bulletin of Entomological Research* 107, 96–105. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000675>

quella rossa l'amplificazione ottenuta in presenza dell'allele mutato (M = mutato). Nel caso di individui omozigoti sensibili si ottiene l'amplificazione solo dell'amplicone "wild type" (ceppo 1X); nel caso di individui omozigoti resistenti si ottiene l'amplificazione solo dell'amplicone "mutato" (ceppo 43H) mentre si ottengono entrambe le amplificazioni con individui eterozigoti (ceppo 13H).



Al fine di sviluppare protocolli diagnostici dei meccanismi di resistenza agli insetticidi basati sulla tecnica dell'amplificazione isoterma LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) sono state estratte e analizzate le sequenze depositate effettuate ricerche National Center for Biotechnology Information della National Library of Medicine - 8600 Rockville Pike - Bethesda, MD 20894 (USA). Sono state pertanto scaricate le sequenze genomiche codificanti i target dei principali meccanismi d'azione attualmente disponibili contro gli afidi *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* e l'acaro tetranychide *Tetranychus urticae*.

Per le due specie di afidi stati presi in considerazione i geni codificanti il recettore nicotinic dell'acetilcolina (nAChR) (neonicotinoidi), il canale del sodio voltaggio dipendente (VGSC) (piretroidi) e acetilcolinesterasi 2 (ace2) (carbammati). Per *Tetranychus urticae* sono state prelevate le sequenze codificanti i canali cloro glutammato-dipendenti (GluCl1 e GluCl3) e il gene codificante il citocromo b mitocondriale (Cyt b) rispettivamente bersaglio degli adulticidi abamectina e bifenazate. Nel corso del progetto, anche alla luce di evidenze sorte nell'ambito del progetto PSR "IDRA" (progetto 5116538 - PSR 2014-2020 Op. 16.1.01 - GO PEI-Agri - FA 3A), si è ritenuto opportuno porre l'attenzione anche alla mutazione I1017F della chitino sintasi 1 (CHS1) di *T. urticae*, la cui presenza conferisce resistenza ai prodotti ovidici come il clofentezine.

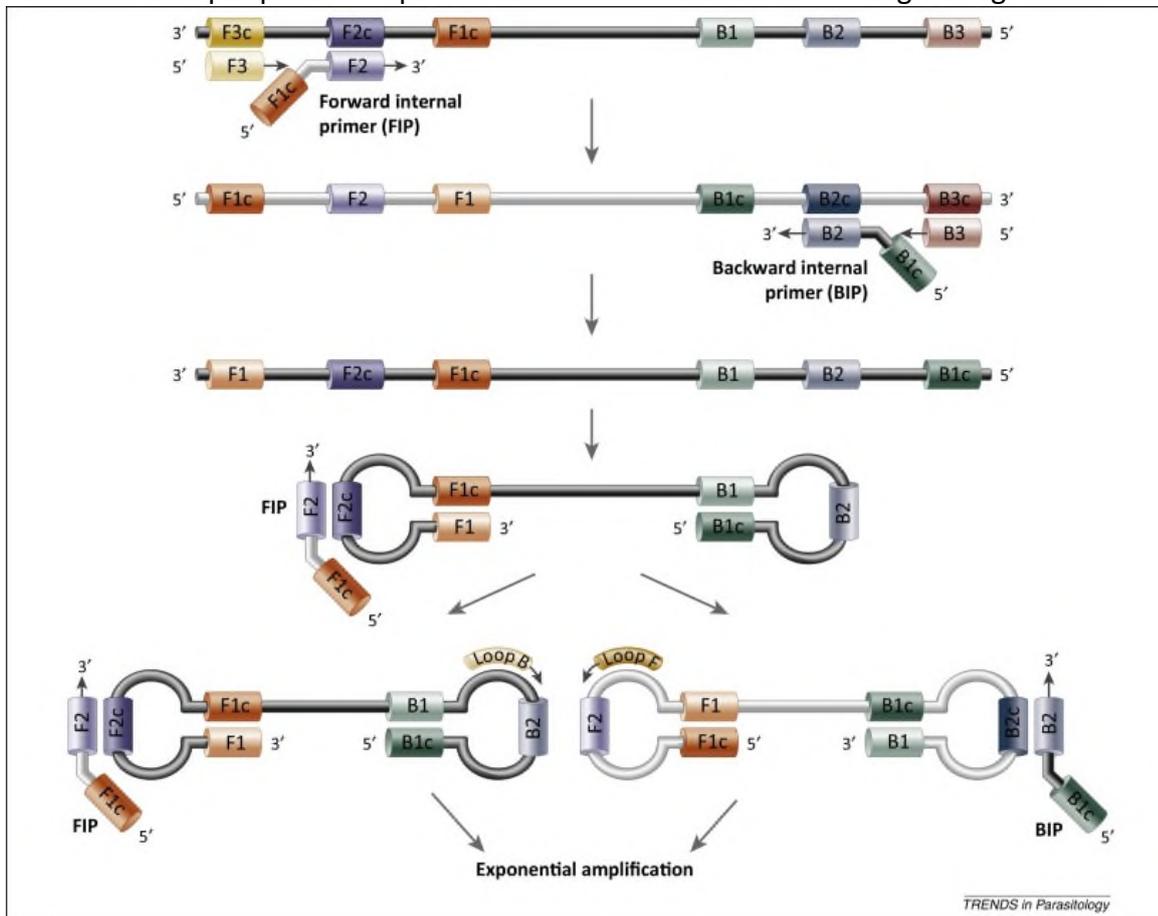
Dalle sequenze scaricate, dopo aver individuato la posizione delle mutazioni (SNP) che nei vari geni causano le sostituzioni amminoacidiche legate della resistenza, sono state estratte sottosequenze di circa 2000 bp con la mutazione in posizione approssimativamente centrale.

Le sequenze così ottenute sono state utilizzate per individuare le sequenze dei primers da impiegare per l'amplificazione isoterma allele specifica (AS-LAMP) in grado di distinguere per ognuno dei target l'allele sensibile (wild type) da quello mutato.

Per individuare i primers specifici è stato impiegato il software di pubblico dominio "primer explorer v. 5" raggiungibile all'indirizzo web: <http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>. La ricerca dei primers per l'amplificazione isoterma si è rivelata particolarmente difficoltosa essendo strettamente dipendente dalla sequenza dei nucleotidi collocati nell'intorno della mutazione di interesse. I vincoli più o meno stringenti ma comunque necessari perché i primers possano amplificare correttamente si sono rivelati in molti casi incompatibili con le sequenze di DNA sulle quali cercarli. Questo ha costituito un grosso vincolo al punto che non sempre si sono potute definire combinazioni di primers compatibili tra di loro e in grado di amplificare in modo specifico la

sequenza di interesse oppure le combinazioni definite erano praticamente uniche e non erano possibili combinazioni alternative di cui valutare selettività ed efficienza.

Una amplificazione AS-LAMP (allele specific Loop-mediated isothermal amplification) richiede la definizione di 6 differenti primers denominati F3, B3, F2, F1c, B2 e B1c. I primers F2 e F1c e B2 e B1c sono combinati per produrre i primers FIP e BIP come indicati nella figura seguente.



Alhassan et al., 2015 Trends in parasitology, 31: 391-400.

Per la messa a punto e dei protocolli e per la verifica della funzionalità e specificità del metodo è stato impiegato in una prima fase il kit commerciale “BeST™ LAMP Kit SYBR®” di A&A Biotechnology. Il kit è basato su un sistema fluorescente (Sybr Green) per individuare l’amplificazione del DNA. La lettura della reazione è stata effettuata con un termociclatore BIO-RAD CFX 96 impostando la temperatura di reazione a 65°C per 1h30’ e effettuando letture a intervallo di 60”.

Successivamente è stato utilizzato un enzima di un produttore differente (New England Biolabs) con un sistema di misura della avvenuta amplificazione non più basato su fluorescenza (che richiede strumenti appositi e di minor facilità di utilizzo in campo) ma su un saggio colorimetrico e quindi utilizzabile senza particolari attrezzature.

Le prove successive sono state perciò effettuate utilizzando la WarmStart™ Colorimetric LAMP 2X Master Mix con UDG della New England BioLabs, per verificare il comportamento dei set di primer disegnati in precedenza con un enzima alternativo. La temperatura di reazione è stata mantenuta a 65°C per 1h e 30’, con inattivazione finale dell’enzima di reazione a 85°C per 5minuti, mentre le verifiche della variazione del colore della mix di reazione, indice di avvenuta amplificazione, venivano effettuate dopo 30 minuti da inizio reazione e, dopo questa prima lettura, ogni 10 minuti fino al termine dell’esperienza. L’avvenuta amplificazione di DNA all’interno della reazione è indicata dal passaggio di colore della soluzione da rosso a giallo.

## RISULTATI

### Ricerca e definizione dei set di primers.

In generale le sequenze dei geni nell'intorno delle mutazioni di interesse si sono dimostrate molto vincolanti e quando si è riusciti a calcolare i set di primers, questi erano "unici". In alcuni abbinamenti specie / target non si è riusciti a individuare alcuna combinazione in grado di consentire l'amplificazione isoterica (vedi sotto). I set di primers ottenuti sono riportati nelle tabelle seguenti, separate per specie e target. In rosso sono indicati i nucleotidi che determinano la selettività del primer rispettivamente per l'allele wild-type (s) o mutato (r).

*Tabella 3.1.2.1. Myzus persicae - Acetilcolinesterasi (ace 2 / S431F) (dimetilcarbammati) [dimer(minimum)dG=-1.85]*

lab el	le n	5'd Tm	3'd G	GCrat e	Sequence	
		55.0	-	-		
F3	21	5	4.73	4.57	0.38	ACGAATATACTCATGGGTAGT
		55.7	-	-		
B3	22	2	4.51	4.24	0.36	CCAATCAGTGTATTCAAACCTCT
FIP- s	45					ACGTTTTCTCCTTTTTGAAAAGC- CTCCGAAGAGGGTACTATCA
FIP- r	45					ACGTTTTCTCCTTTTTGAAAAGC- CTCCGAAGAGGGTACTATTI
BIP	40					TGGTGTCTCGTGAAAATTTGTT-TAGCCGATTTAACC GCC

*Tabella 3.1.2.2. Myzus persicae - Recettore nicotinico dell'acetilcolinesterasi (nAChR / R81T) (neonicotinoidi) [dimer(minimum)dG=-2.01]*

lab el	le n	5'd Tm	3'd G	GCrat e	Sequence	
			-	-		
	2	57.7	6.2	4.1		
F3	5	2	5	6	0.32	CCTGCAGCTATTAATAATCCAATT
			-	-		
	2		5.5	4.4		
B3	1	56.8	9	1	0.43	GCTGAGTAGATTTCTCCATT
FIP- s	4 9					CTCAACCAAACGTTTGATTTTATTAT- ATTGTTTCAGAATGAAAAGAGTC
FIP- r	4 9					GTCACCAAACGTTTGATTTTATTAT- ATTGTTTCAGAATGAAAAGAGTC
	4					CTAACGTATTAGACTTCTGACCGC-
BIP	3					TTAAGCGGCATTAGTCGT

Tabella 3.1.2.3. *Myzus persicae* - Canale del sodio voltaggio dipendente (VGSC / L1014F - locus *kdr*) (piretroidi) [dimer(minimum)dG=-1.17]

lab el	le n	5'd Tm	3'd G	GCra G	te	Sequence
		-	-			
	2	56.	4.8	5.0		
F3	2	52	4	5	0.41	CGAATGGATAGAATCAATGTGG
		-	-			
	2	55.	5.5	4.2		
B3	0	05	7	4	0.35	TGTTGCACCAATAAATTCCT
FIP- s	4 3					GTTACCAATGACAACAGTAGCCAA-ACTGTTTACACGTCGGAG
FIP- r	4 3					AGTTACCAATGACAACAGTAGCCAA-ACTGTTTACACGTCGGAG
	4					
BIP	3					TGTACTACTCGGGGCAAGAATT-AAATTGACACCTGCTAAAGTG

Tabella 3.1.2.4. *Aphis gossypii* - Acetilcolinesterasi (ace 2 / S431F) (dimetilcarbammati) [dimer(minimum)dG=-1.24]

lab el	le n	5'd Tm	3'd G	GCra G	te	Sequence
		-	-			
		55.0	4.5	4.5		
F3	21	3	5	7	0.38	ACCAATATACTCATGGGTAGT
		-	-			
		56.4	6.2	5.5		
B3	18	7	8	7	0.5	CGGGTTAAACCAATCCGT
FIP- s	43					GACACCACCACATTTTCCTCCTT- CCGAAGAGGGTTACTATTCA
FIP- r	43					GACACCACCACATTTTCCTCCTT- CCGAAGAGGGTTACTATTII
BIP	47					AAGCTATTGGACAACCTTAATCCGA- GTATTCAAACCTCTATAGCCGATT

*Aphis gossypii* - Recettore nicotinico dell'acetilcolinesterasi (nAChR / R81T) (neonicotinoidi)  
**Le condizioni della sequenza nell'intorno della mutazione non hanno consentito di definire la combinazione di primers.**

Tabella 3.1.2.5. *Aphis gossypii* - Canale del sodio voltaggio dipendente (VGSC / L1014F - locus *kdir*) (piretroidi) [dimer(minimum)dG=-1.44]

label	n	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
	1	57.09	4.02	-5.7	0.56	CAAAGACCACGAGCTTCC
B3	4	56.16	4.78	4.1	0.33	TCCCTAAGTAATACACATTTATGC
FIP	6					CATTGATTCAATCCATTCACCACAT-CTTCACCGATTTTTTGCCTC
BIP-r	4					CGTCGGAGAACCAACGTGTA-GTCAGTACTTATACATACCACAA <u>A</u>
BIP-s	4					CGTCGGAGAACCAACGTGTA-GTCAGTACTTATACATACCACAAG <u>G</u>

Tabella 3.1.2.6. *Aphis gossypii* - Canale del sodio voltaggio dipendente (VGSC / M918L - locus *s-kdir*) (piretroidi) [dimer(minimum)dG=-1.78]

label	n	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence
F3	18	55.17	-5.88	-4.06	0.44	TCTCCGTATTGCGTTCAT
B3	22	55.3	-3.73	-4.53	0.32	ATTACCTGTGTAGTTTTTTCCA
FIP	44					TGCCAACTTAAATACTCGAAGCTAT-TTTAGTGCCTAACGGTCAC
BIP-s	39					<u>A</u> TGGGTCGAACCATTGGTGC-CATACCCATAACGGCGAAT
BIP-r	39					<u>I</u> TGGGTCGAACCATTGGTGC-CATACCCATAACGGCGAAT

Tabella 3.1.2.8. *Tetranychus urticae* - Chitino sintasi 1 (CHS1 / I1017F) (ovicidi)  
[dimer(minimum)dG=-1.93]

lab el	le n	5'd Tm	3'd G	GCrat e	Sequence	
	2	55.	3.8	4.4		
F3	1	35	7	1	0.33	TTCTTCTTTAGCGTTTGGATT
	2	56.	5.4	4.5		
B3	0	45	2	5	0.4	TCCACAAGAGTTTCACTGTT
	4					CTGGAAGAGGAAAAGAAAGCTGT-
FIP	7					ATTCAAGAACTCAATAAGTTGCC
BIP-	4					
s	0					TGTTCCCAAGTAACAACGTTCAA-CTTTATTTCTTTCGA
BIP-	4					
r	0					TGTTCCCAAGTAACAACGTTCAA-CTTTATTTCTTTCTI

*Tetranychus urticae* - Citocromo b mitocondriale (Cyt b / G126S) (adulticidi)

**Le condizioni della sequenza nell'intorno della mutazione non hanno consentito di definire la combinazione di primers**

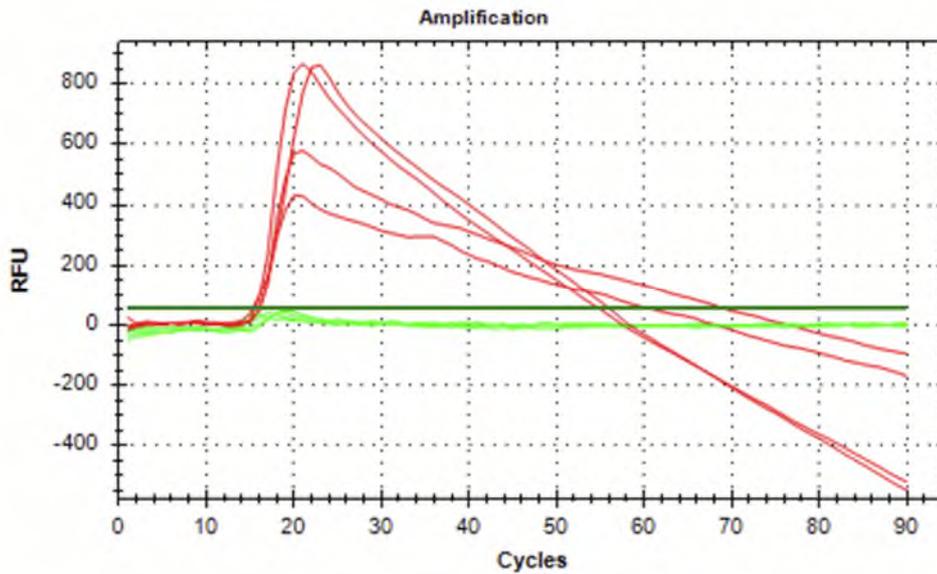
*Tetranychus urticae* - Canali cloro glutammato-dipendente (GluCl1 e GluCl3 / G314D e G326E) (adulticidi)

**Le condizioni della sequenza nell'intorno della mutazione non hanno consentito di definire la combinazione di primers**

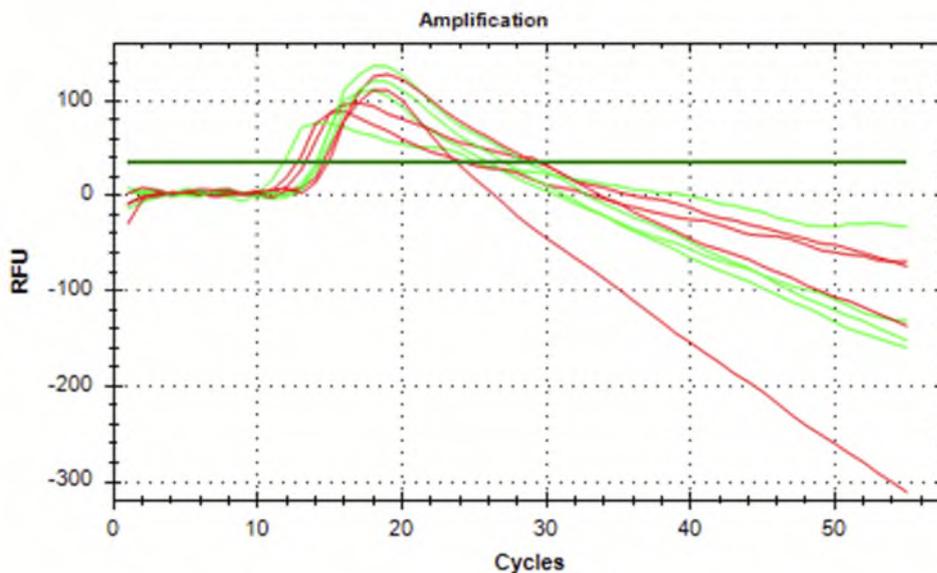
### Test in fluorescenza

I risultati ottenuti sono elencati di seguito.

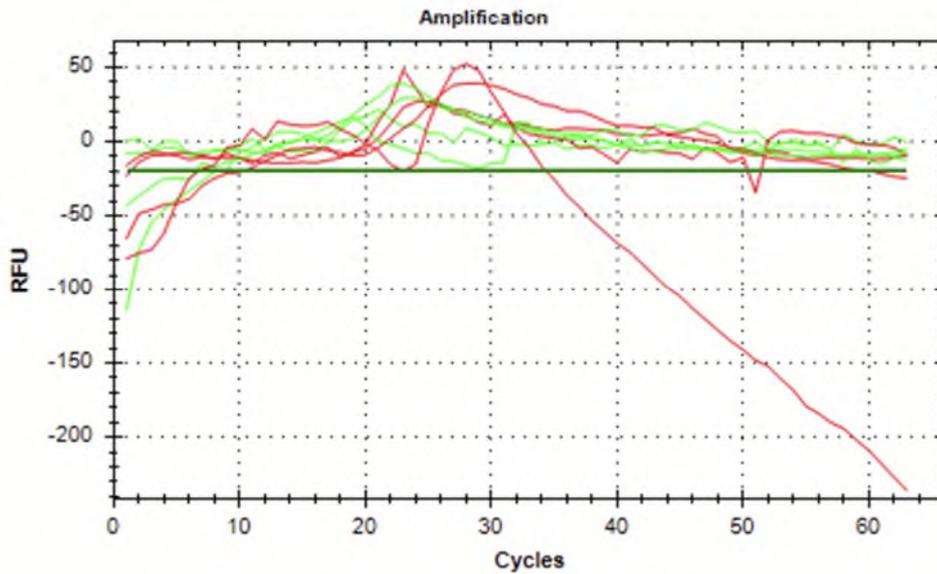
*Myzus persicae*, acetilcolinesterasi, mutazione S431F. Le curve rosse si riferiscono all'amplificazione ottenuta impiegando il primer selettivo per la mutazione mentre quelle verdi indicano il wild-type. Sono stati impiegati 3 differenti ceppi (1X: omozigote wild-type; 13H: eterozigote; 43H omozigote mutato). I primers **non** si sono rivelati selettivi. Come evidenziato dalle curve il primer che dovrebbe caratterizzare il mutato amplifica indipendentemente dalla mutazione presente (e dal DNA) mentre il primer wild-type non amplifica mai



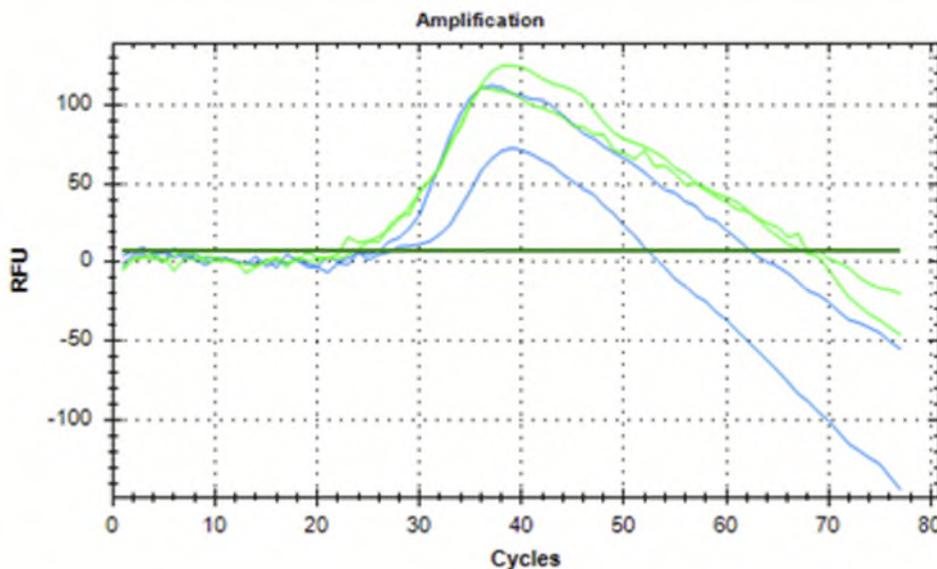
*Myzus persicae*, recettore nicotinico dell'acetilcolina, mutazione R81T. Le curve rosse si riferiscono all'amplificazione ottenuta impiegando il primer selettivo per la mutazione mentre quelle verdi indicano il wild-type. Sono stati impiegati 3 differenti ceppi (1X: omozigote wild-type; 97H: eterozigote; 99H omozigote mutato). Anche in questo caso i primers **non** si sono rivelati selettivi: come evidenziato dalle curve i profili di amplificazione sono molto simili tra di loro indipendentemente dalla presenza di DNA e dal tipo di mutazione.



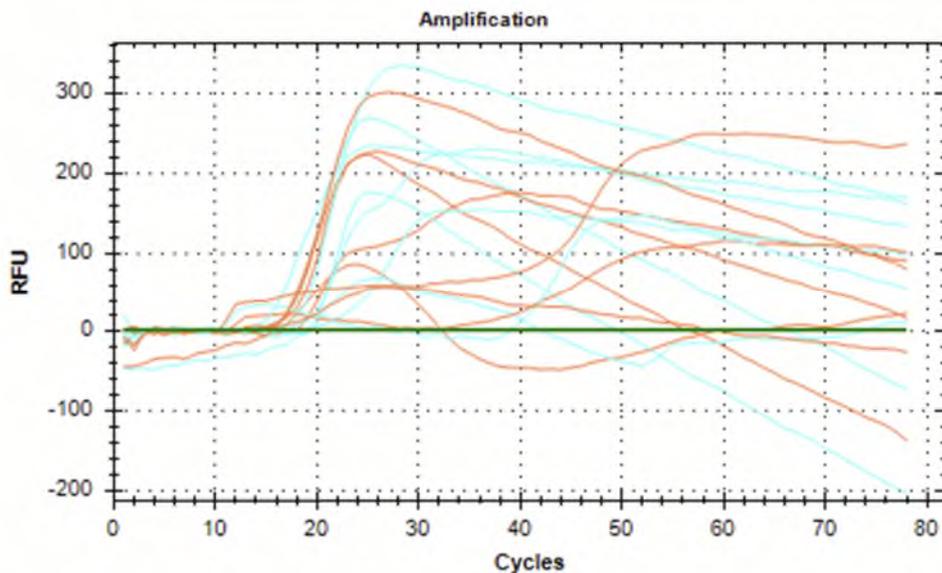
*Aphis gossypii* – canale del sodio voltaggio dipendente, mutazione M918L. Anche in questo caso le curve rosse si riferiscono all'amplificazione ottenuta impiegando il primer selettivo per la mutazione mentre quelle verdi indicano il wild-type. Sono stati impiegati i DNA di 3 differenti ceppi il cui genotipo (omozigote sensibile o resistente oppure eterozigote) era stato caratterizzato mediante sequenziamento. Anche in questo caso i primers **non** si sono rivelati selettivi: come evidenziato dalle curve i profili di amplificazione sono molto ridotti (prossimi a 0) e simili tra di loro indipendentemente dalla presenza di DNA e dal tipo di mutazione.



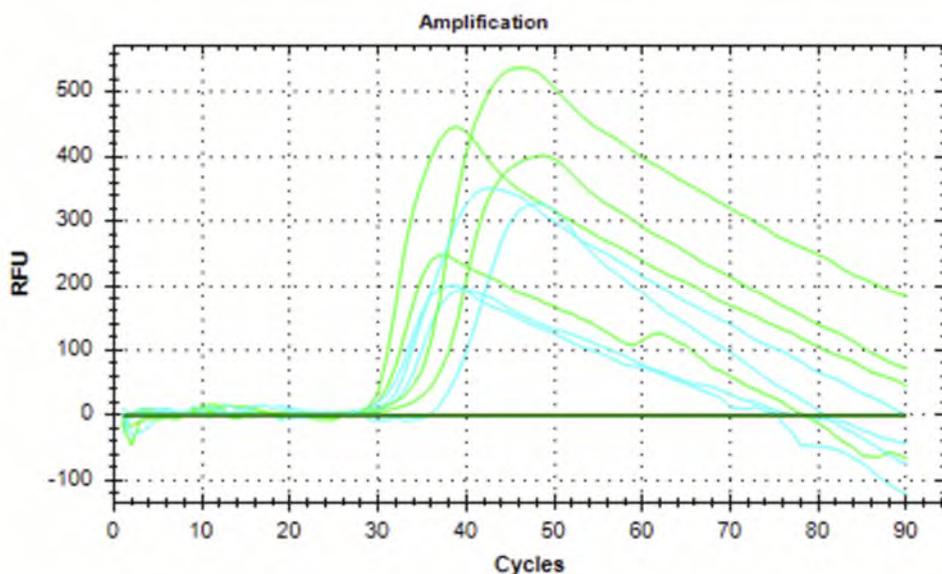
*Tetranychus urticae* – chitino sintasi 1, I1017F. Anche con questo target l'amplificazione non si è dimostrata selettiva con amplificazione aspecifica anche in assenza di DNA (linee azzurre).



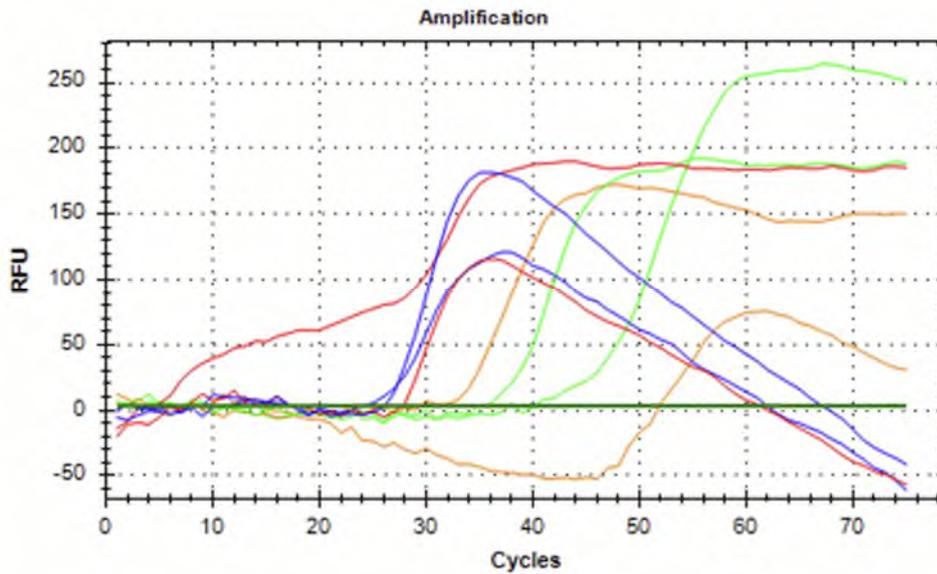
Non essendo stato possibile definire combinazioni differenti di primers sono stati quindi eseguiti esperimenti volti a trovare condizioni di reazione che consentissero di ottenere con i set disponibili di primers risultati conformi ai genotipi da differenziare. Sono stati nell'ordine eseguiti esperimenti di gradient PCR effettuando test contemporanei con intervalli termici tra 64 °C e 74°C. Un esempio di risultati ottenuti è presentato nel grafico seguente dove è evidente che nessuna delle curve risulta diagnostica.



E' stato anche valutato l'effetto sulla selettività di concentrazioni differenti di primers rispetto a quelle raccomandate dalle specifiche dell'enzima usato per l'amplificazione. Anche in questo caso, anche in assenza di template (DNA) si sono ottenute amplificazioni aspecifiche come mostrato nella figura seguente.



Per migliorare la selettività ed eliminare le amplificazioni aspecifiche sono state effettuati test inserendo nella miscela di reazione varie sostanze in grado di ridurre l'incidenza di amplificazioni non corrette. Un esempio è riportato nel grafico seguente effettuato impiegando il set di primers per la mutazione R81T in *Myzus persicae* e aggiungendo al mix di reazione rispettivamente 2  $\mu$ L di L-prolina 5 M (DNA: arancione e H<sub>2</sub>O: verde) o 2  $\mu$ L di betaina (DNA: rosso e H<sub>2</sub>O: blu) 5 M. Apparentemente si ottiene un lieve ritardo dell'amplificazione ma non si eliminano gli aspecifici e non si ottiene selettività.



### Test colorimetrici

L'avvenuta amplificazione di DNA all'interno della reazione è indicata dal passaggio di colore della soluzione da rosso a giallo. Nelle immagini seguenti in cui si riportano esempi dei saggi eseguiti, l'etichetta sotto ogni provetta indica il campione utilizzato (DNA), il target della PCR e la mix di reazione presente nella provetta (WT: mix per l'amplificazione della sequenza wild-type, MT: mix per l'amplificazione della sequenza contenente la mutazione).

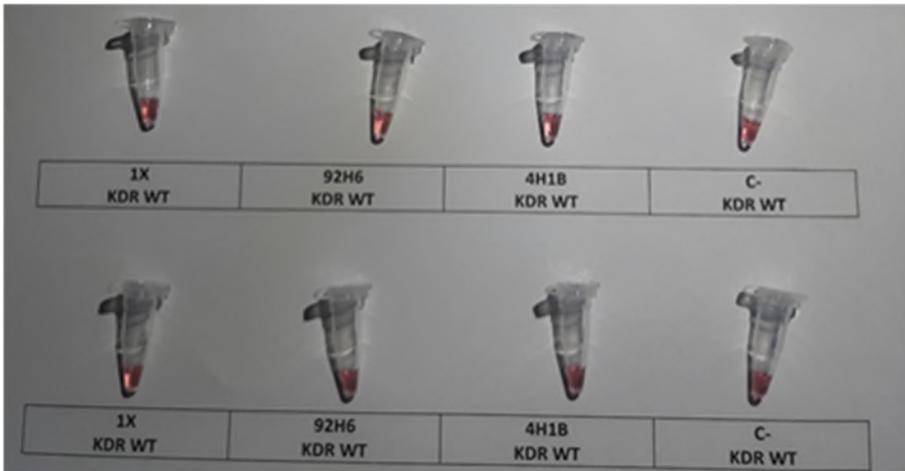
*Myzus persicae*, canale del sodio voltaggio dipendente, mutazione L1014F.

La reazione è avvenuta correttamente, non si è osservata amplificazione aspecifica né nei controlli negativi né amplificazioni non corrette nei campioni analizzati. I DNA erano stati estratti dai seguenti ceppi di riferimento: 1X omozigote wild-type, 92H6 omozigote mutante, 4H1B eterozigote, C- no DNA. Nelle immagini la fila superiore si riferisce al mix "wild type" e quella inferiore al mix "mutato".

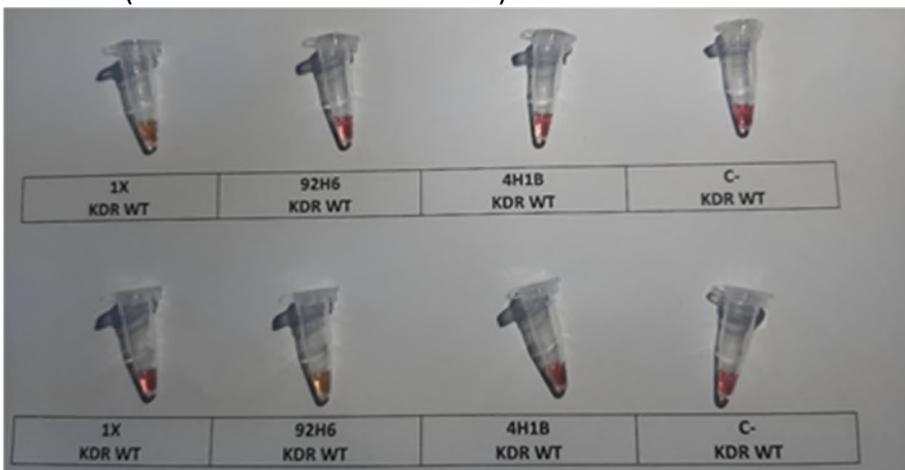
30 minuti: non si osserva amplificazione in nessuno dei campioni.



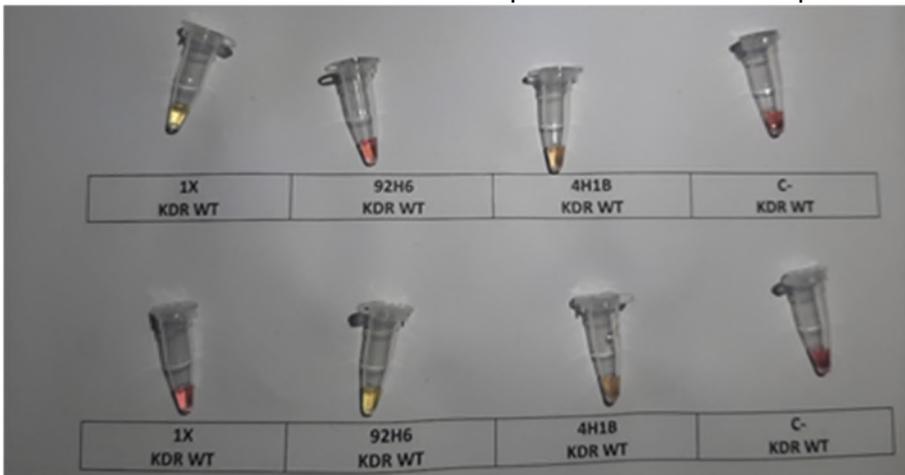
40 minuti: nessuna reazione osservata



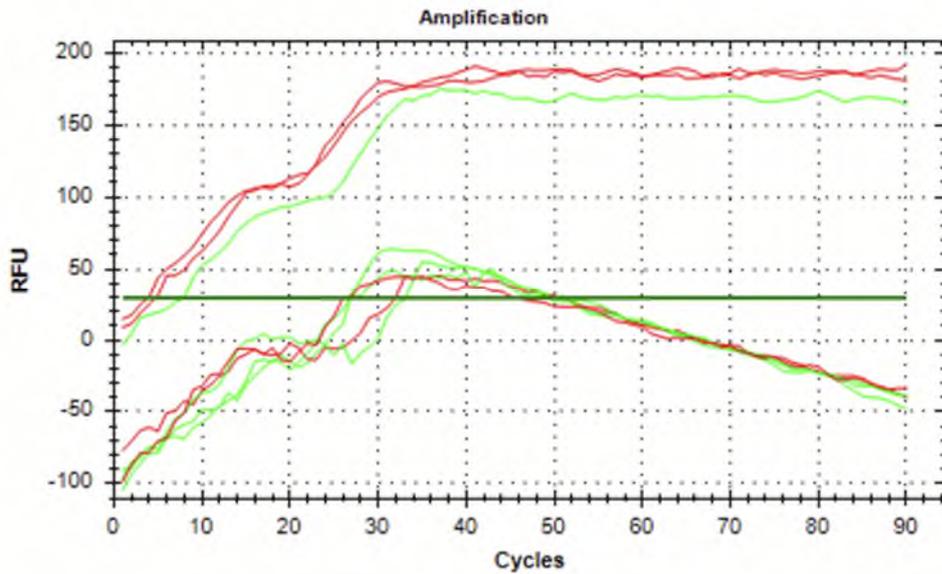
50 minuti: iniziale variazione di colore nei tubi di reazione 1X wild-type (alto a sinistra) e 92H6 mutante (secondo da sinistra in basso).



60 minuti: si è osservata la corretta amplificazione in tutte le provette e la reazione è stata fermata.

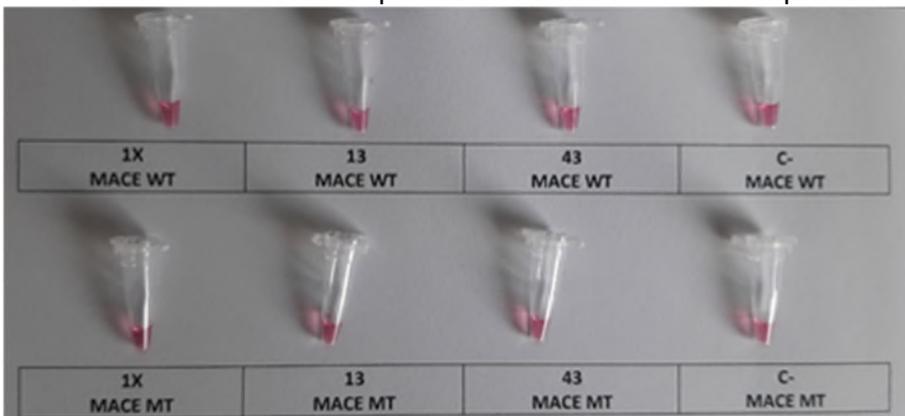


Contemporaneamente è stata eseguita una PCR real-time con le stesse mix di primer ma diversa taq polimerasi (“BeSTTM LAMP Kit SYBR®” di A&A Biotechnology). I profili di amplificazione sono completamente diversi e irregolari e i genotipi non vengono distinti. I DNA utilizzati erano quelli dei ceppi 1X, 92H6 e due controlli negativi (acqua).



*Myzus persicae*, Acetilcolinesterasi (ace 2), mutazione S431F  
 Non si è osservata amplificazione per questo target né nei controlli negativi né negli altri campioni.  
 1X omozigote wild-type, 43 omozigote mutante, 13 eterozigote.

30 minuti: non si osserva amplificazione in nessuno dei campioni.



40 minuti: nessuna amplificazione.



50 minuti: nessuna amplificazione.



60 minuti: nessuna amplificazione.



70 minuti: nessuna amplificazione.



80 minuti: nessuna amplificazione.



90 minuti: nessuna amplificazione e termine dell'esperimento.



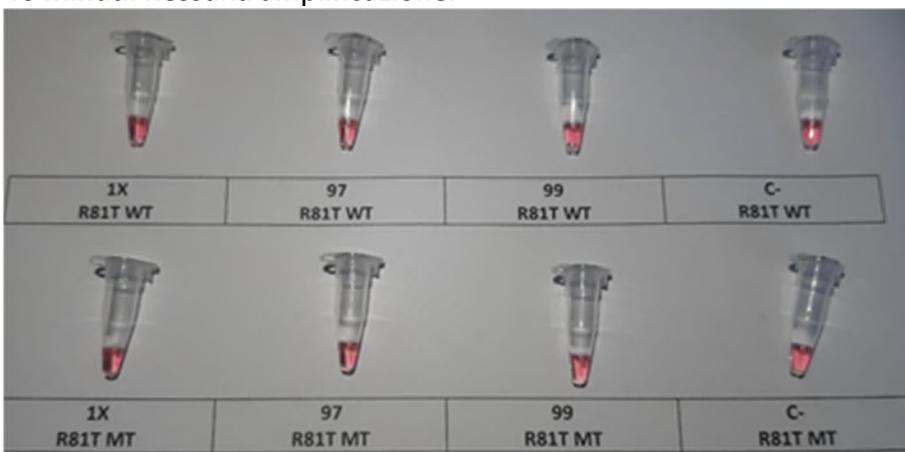
*Myzus persicae*, recettore nicotinico dell'acetilcolina, mutazione R81T

La reazione non amplifica in maniera corretta in quanto non è in grado di riconoscere in maniera selettiva i due alleli. Inoltre si ottiene amplificazione aspecifica nei controlli negativi (C-). 1X: omozigote wild-type, 97 eterozigote, 99 omozigote mutante.

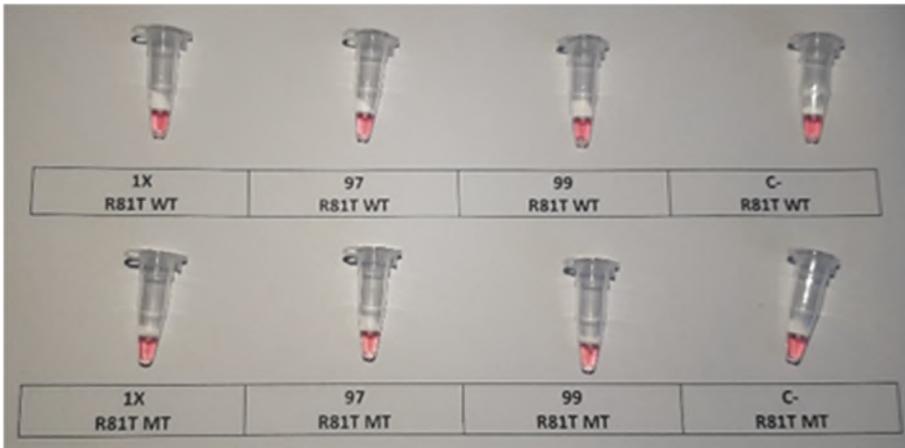
30 minuti: non si osserva amplificazione in nessuno dei campioni.



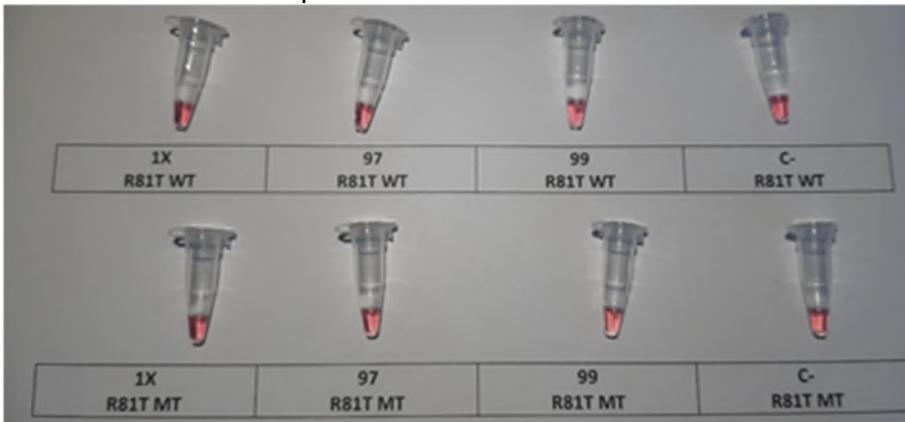
40 minuti: nessuna amplificazione.



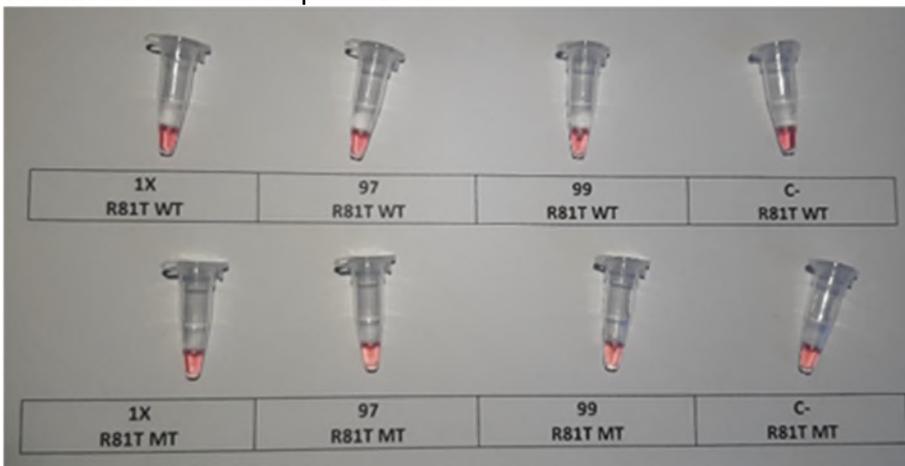
50 minuti: nessuna amplificazione.



60 minuti: nessuna amplificazione.



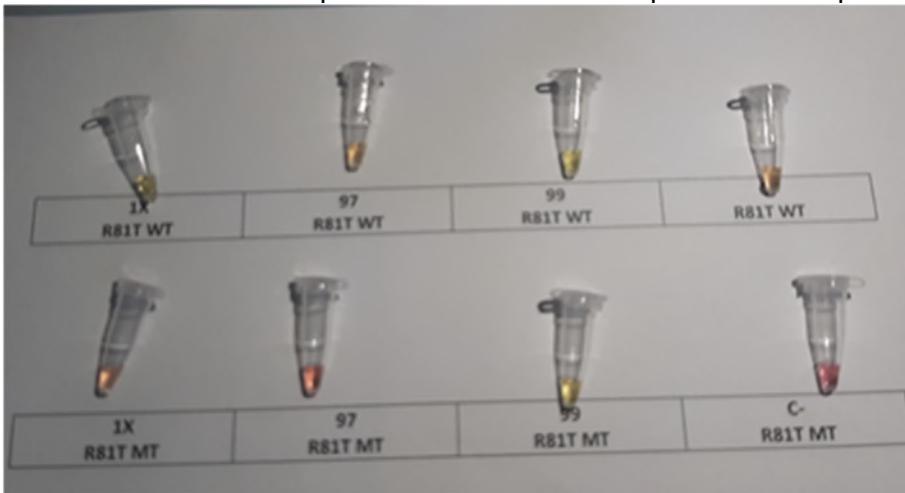
70 minuti: nessuna amplificazione.



80 minuti: nessuna amplificazione.



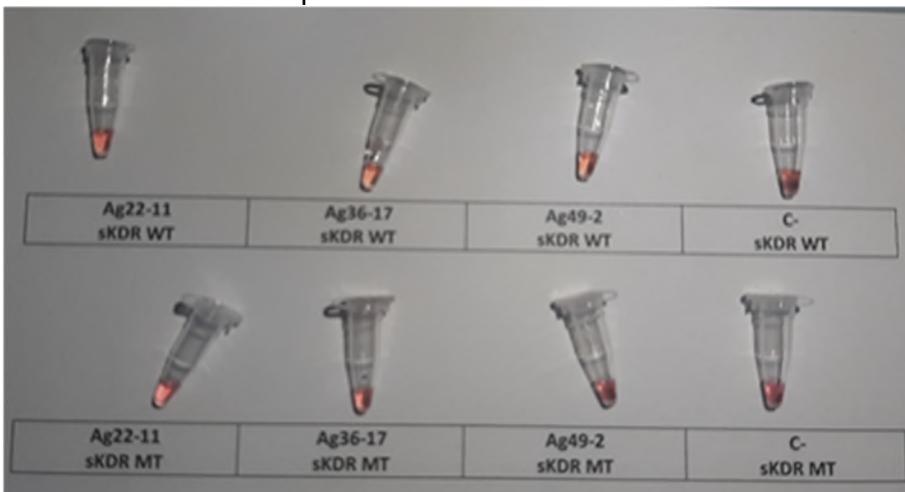
90 minuti: si osserva amplificazione in maniera aspecifica nella quasi totalità dei campioni testati.



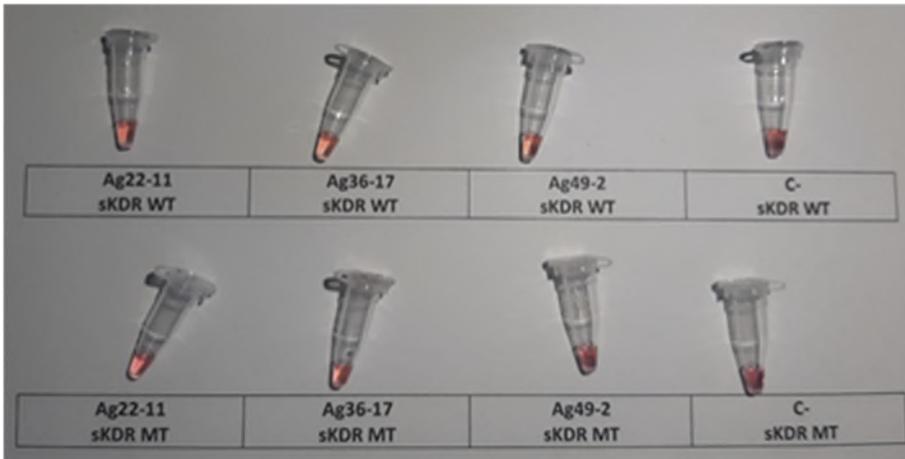
*Aphis gossypii*, canale del sodio voltaggio dipendente, mutazione M918L

Il set di primer disegnato non è in grado di amplificare in maniera corretta i due alleli, in quanto si è osservata un'amplificazione non corretta.

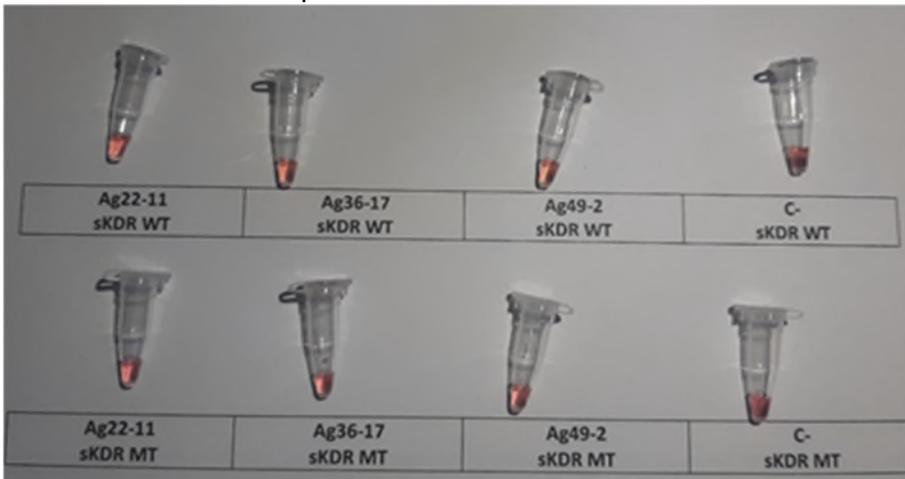
30 minuti: nessuna amplificazione.



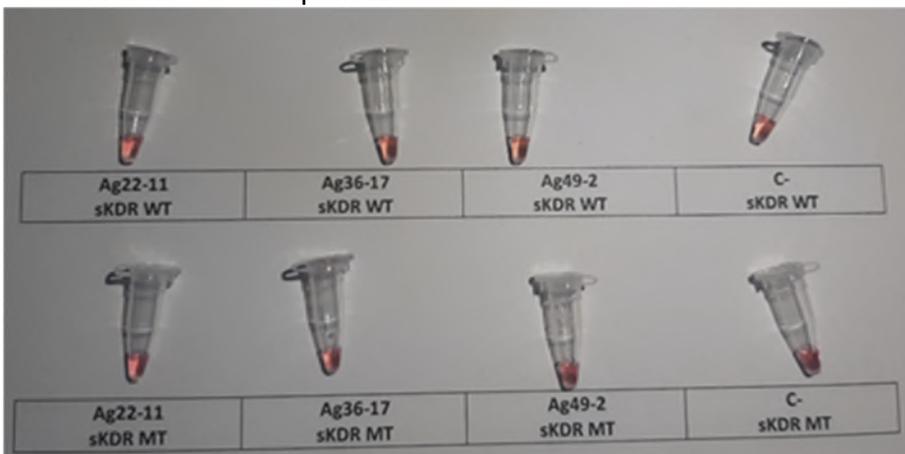
40 minuti: nessuna amplificazione.



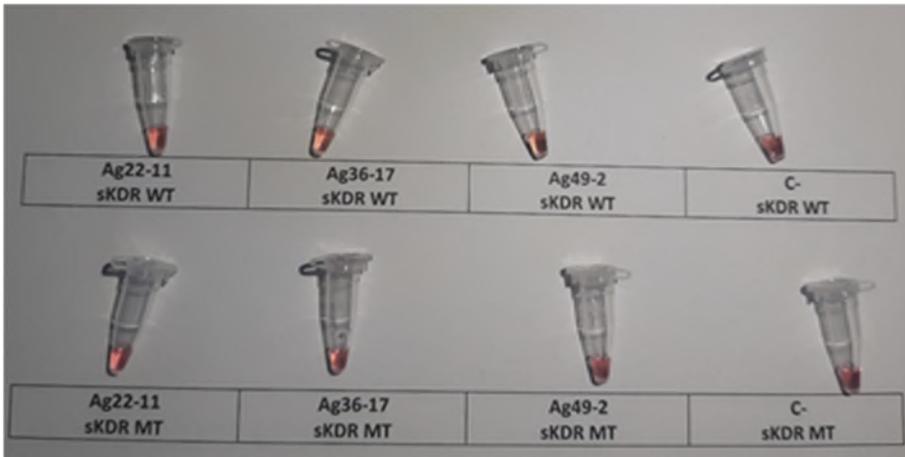
50 minuti: nessuna amplificazione.



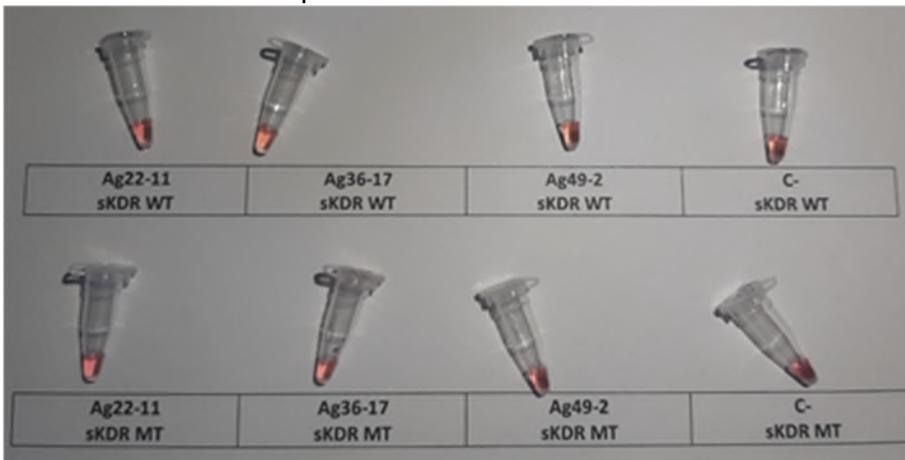
60 minuti: nessuna amplificazione.



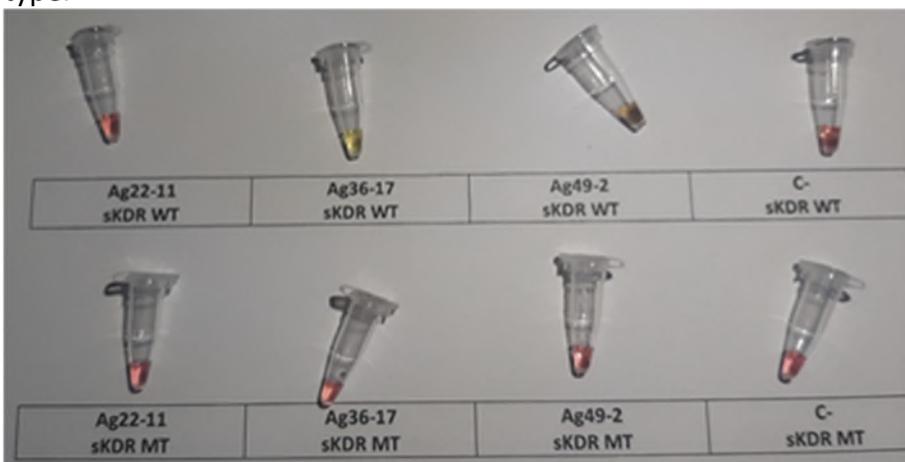
70 minuti: nessuna amplificazione.



80 minuti: nessuna amplificazione.



90 minuti: osservata amplificazione solo nella provetta WT del campione Ag36-17 (eterozigote) e inizio di variazione colorimetrica nella provetta WT del campione Ag49-2 (omozigote mutante). In seguito a questi risultati si può affermare che i primer non sono in grado di amplificare in maniera corretta l'allele mutato e non risultano essere specifici nemmeno per quello wild-type, in quanto si è osservata amplificazione per il campione omozigote mutante ma non per quello omozigote wild-type.

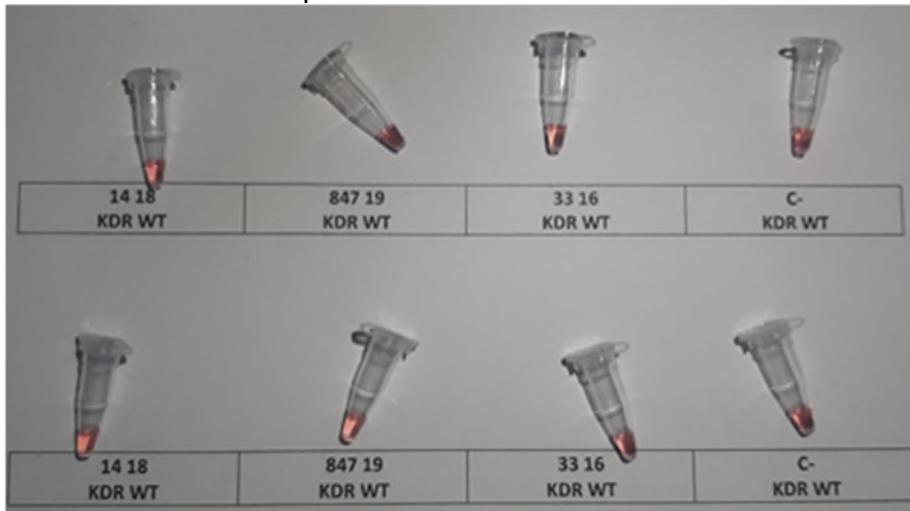


*Aphis gossypii*, canale del sodio voltaggio dipendente, mutazione L1014F

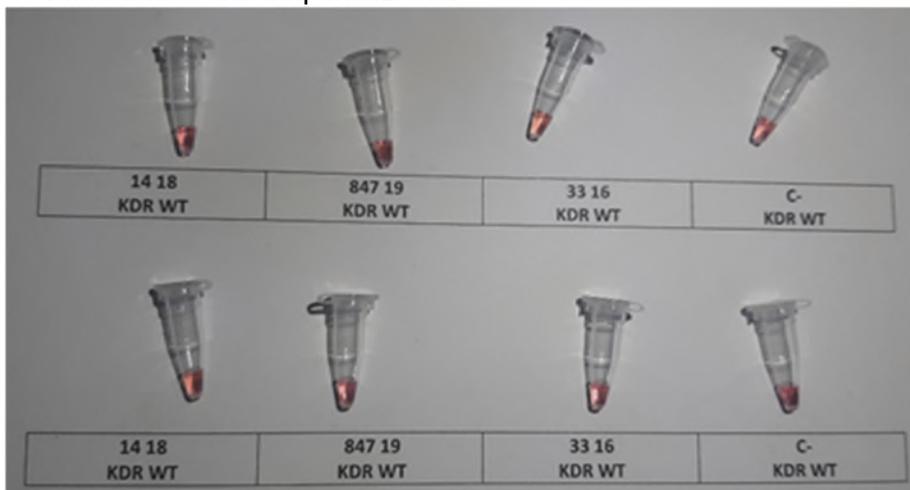
Al momento in Italia non sono stati trovate popolazioni che Non sono stati trovati campioni che presentassero la mutazione ma le prove effettuate si sono dimostrate promettenti in quanto si è

osservata amplificazione solo nelle mix WT dei campioni analizzati. 14-18, 847-19, 33-16: omozigoti wild-type.

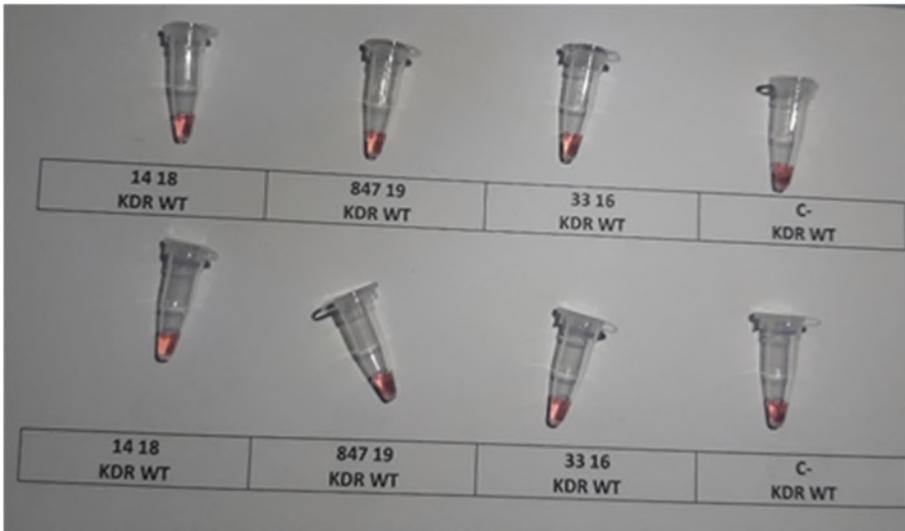
30 minuti: nessuna amplificazione.



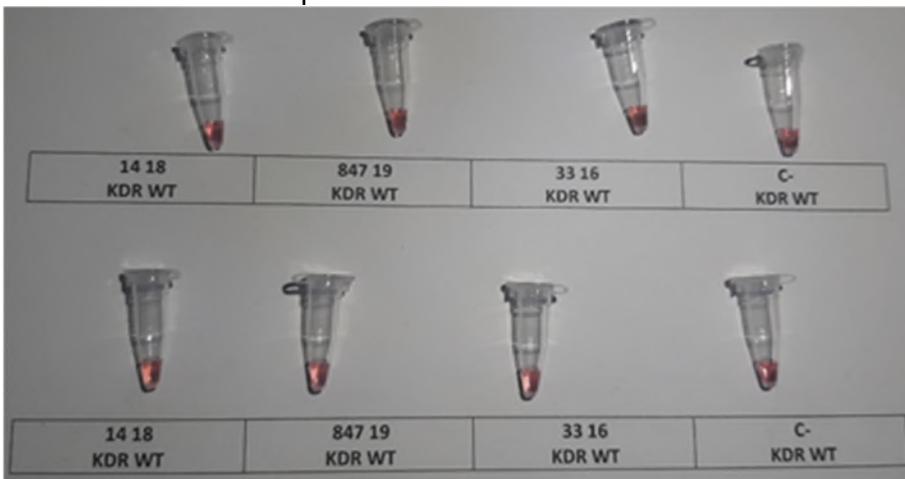
40 minuti: nessuna amplificazione.



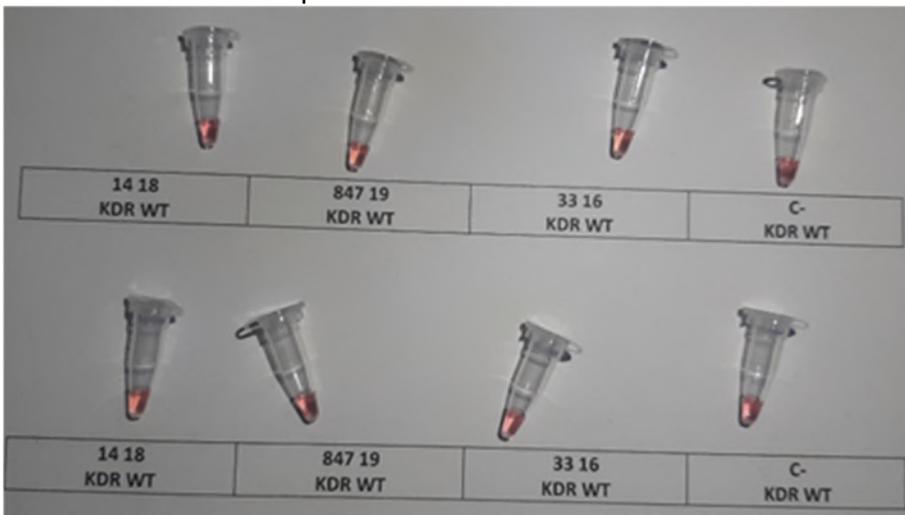
50 minuti: nessuna amplificazione.



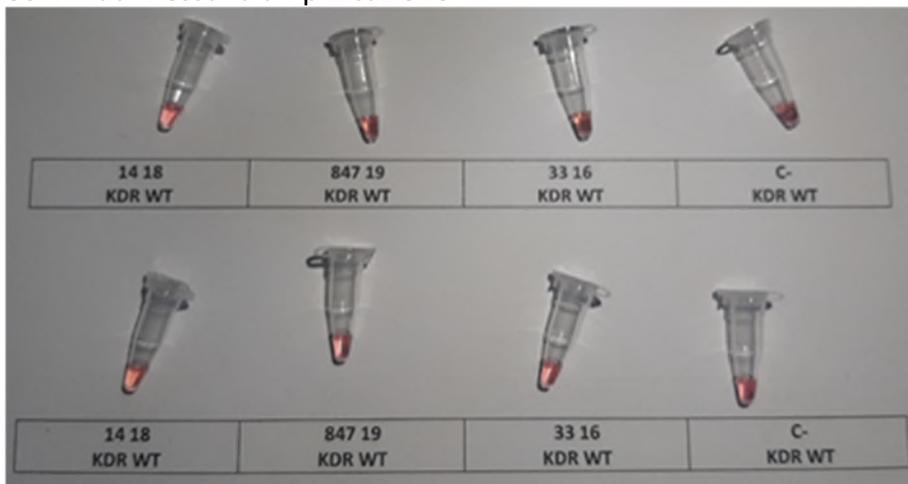
60 minuti: nessuna amplificazione.



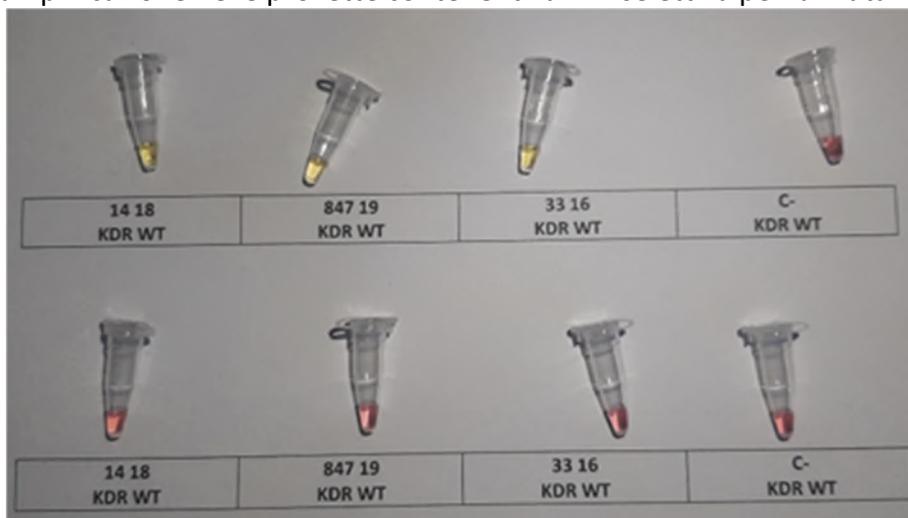
70 minuti: nessuna amplificazione.



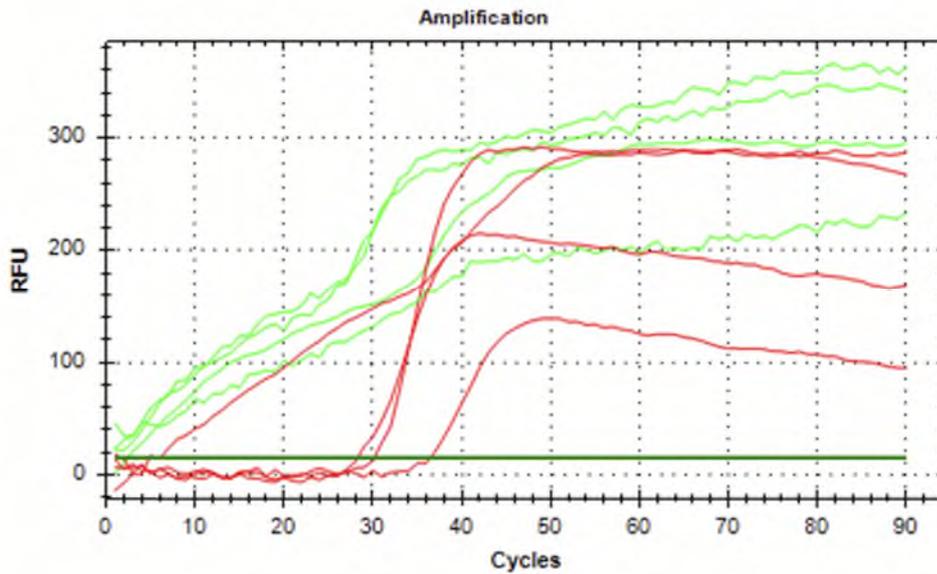
80 minuti: nessuna amplificazione.



90 minuti: si può osservare la corretta amplificazione di tutti i campioni omozigoti sensibili e nessuna amplificazione nelle provette contenenti la mix selettiva per la mutazione.



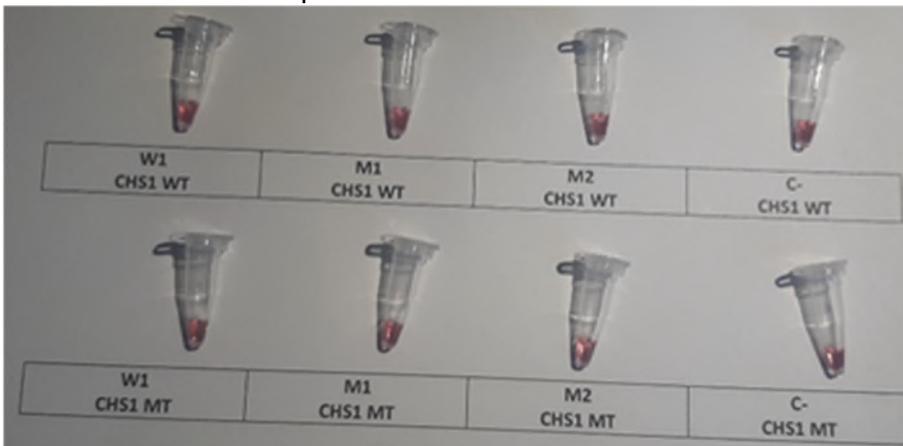
Contemporaneamente è stata fatta una PCR real-time con gli stessi mix di primer utilizzati ma diversa taq polimerasi, come si può osservare l'amplificazione è completamente diversa e irregolare. I campioni utilizzati sono 14-18, 847-19 e due controlli negativi (acqua).



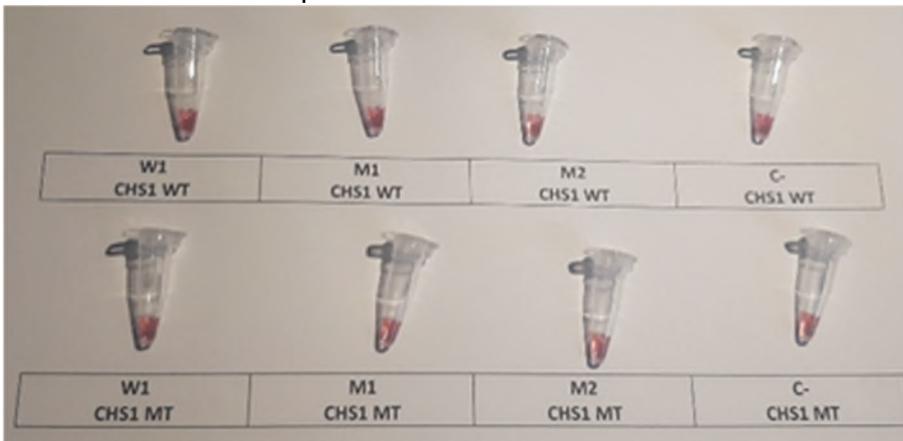
*Tetranychus urticae*, chitino sintasi 1, mutazione I1017F

Le reazioni di amplificazione non avvengono in maniera allele specifica e, anzi, si verifica amplificazione in entrambi i controlli negativi. W1: omozigote wild-type, M1: eterozigote, M2: omozigote mutante.

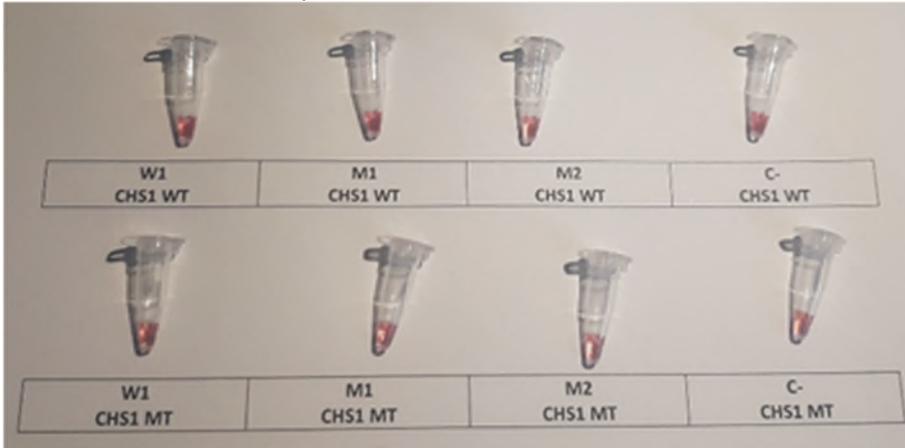
30 minuti: nessuna amplificazione.



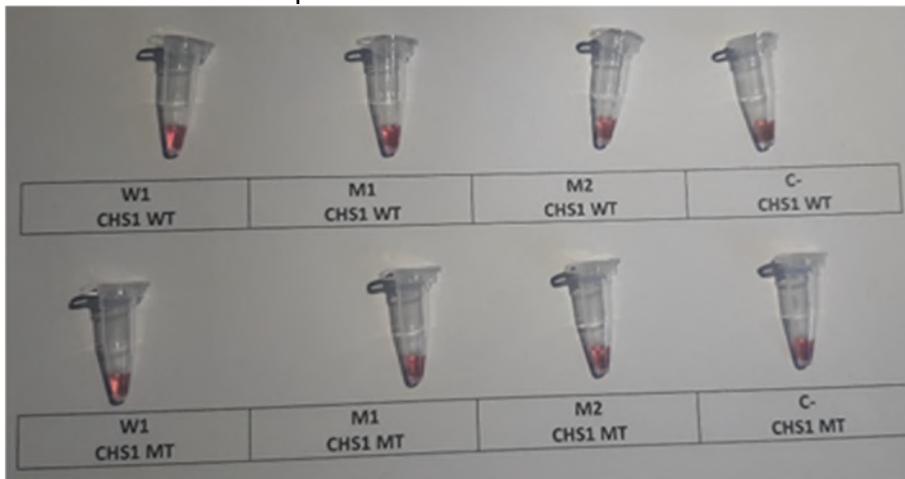
40 minuti: nessuna amplificazione.



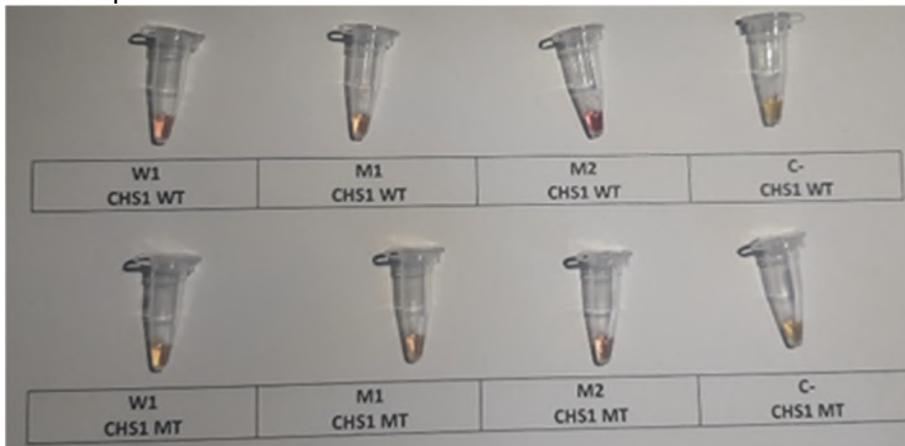
50 minuti: nessuna amplificazione.



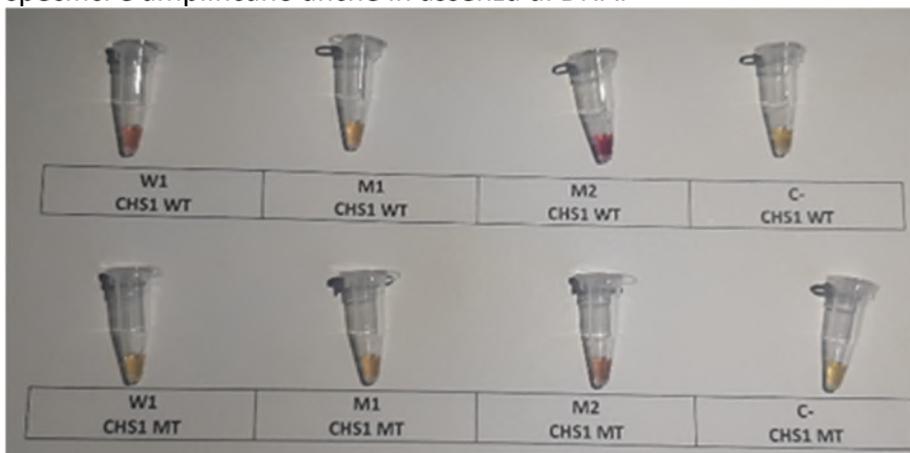
60 minuti: nessuna amplificazione.



70 minuti: osservata amplificazione in entrambi i controlli negativi e, in maniera aspecifica, negli altri campioni.



80 minuti: amplificazione evidente in diverse provette. I primer disegnati non risultano essere allele specifici e amplificano anche in assenza di DNA.



### Validazione

La validazione è stata effettuata sulle specie (*M. persicae* e *A. gossypii*) e target (*kdr*) per le quali la LAMP si è dimostrata essere in grado di predire il genotipo legato alla resistenza ai piretroidi.

Per *M. persicae* si sono analizzate 16 popolazioni (2 provenienti dall'allevamento e 14 raccolte in campo nel corso del progetto). Per *A. gossypii* sono state analizzate 10 popolazioni raccolte in campo. Per entrambe le specie il DNA estratto da un numero variabile di esemplari compreso tra 5 e 10 per ciascuna popolazione è stato analizzato con la tecnica QSGG e con il corrispondente protocollo LAMP.

I risultati sono stati aggregati e messi a confronto per valutare sensibilità, specificità e precisione del metodo impiegato. I risultati sono raccolti nella tabella seguente in cui emerge una sostanziale corrispondenza dei risultati ottenuti con i due metodi.

specie	sensibilità (%)	specificità (%)	precisione (%)
	TP/P	TN/N	TP/(TP+FP)
<i>Myzus persicae</i>	96.6%	90.7%	96.0%
<i>Aphis gossypii</i>	=	96.8%	100.0%

E' stato preparato un **protocollo di utilizzo** riportato di seguito:

## PROTOCOLLO DI LAVORO “LAMP” PER INSETTI

Schiacciare un afide in tampone (100 uL)

Preparare la mix di reazione secondo la seguente tabella:

LAMP PCR MIX	25 ul
LAMP reaction buffer	12.5 ul
primer mix 25X	1 ul
DNA polymerase	1 ul
DNA (estratto grezzo)	3 ul
H <sub>2</sub> O	7.5 ul
tempi di reazione	1h:30'
temperatura di reazione	65°C

Preparare per ogni omogenato 2 tubi: WT (con mix per individuare l'allele sensibile) MT (con mix per individuare l'allele resistente). A ogni tubo aggiungere 3 ul di estratto. Chiudere la provetta e incubare a 65 °C per 90'.

Osservare la variazione di colore ogni 10'. Il passaggio dal rosa al giallo indica una amplificazione positiva.

Interpretazione dei risultati:

Se si osserva amplificazione positiva (colore passa dal rosa al giallo) solo per la provetta “WT” l'uso dei piretroidi è relativamente sicuro anche se sarebbe opportuno conoscere lo status di altre mutazioni.

Se si osserva una amplificazione positiva sia nella provetta WT che MT l'uso dei piretroidi è sconsigliato. Se l'amplificazione si verifica solo nella provetta “MT” i piretroidi hanno efficacia molto ridotta e vanno evitati.

Il protocollo è stato applicato in alcune situazioni reali ma per ragioni organizzative ci si è rivolti a aziende della provincia di Piacenza campionando da 2 campi di melone (*A. gossypii*) e raccogliendo afidi anche da 4 appezzamenti di pomodoro da industria in pieno campo (*M. persicae* e *A. gossypii*). Non è stato tuttavia possibile confermare la differente sensibilità delle popolazioni campionate ai diversi prodotti a causa della mancata efficacia della tecnica LAMP di individuare le mutazioni legate alla resistenza a classi di principi attivi diversi dai piretroidi.

## CONCLUSIONI COMPLESSIVE

La tecnica LAMP pur essendosi rivelata estremamente promettente in varie applicazioni diagnostiche, soprattutto in campo biomedico, non si è invece dimostrata in grado di essere una tecnica universale per l'individuazione delle mutazioni responsabili di resistenze “target-site” nelle specie di insetti dannosi considerati dal progetto (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii* e *Tetranychus urticae*). Di fatto la tecnica ha fornito risultati affidabili solo per quanto riguarda l'individuazione della mutazione L1014F al locus *kdr*, responsabile di una relativamente ridotta resistenza ai piretroidi sia in *Myzus persicae* che *Aphis gossypii*. Inoltre si è rivelata essere molto sensibile al tipo di enzima utilizzato. Infine dal 2020 la tecnica LAMP è stata anche estesamente adottata per la

diagnosi del virus SAR-COV-2 responsabile della malattia COVID-19. Questo ha portato ad un incremento vertiginoso del costo dell'enzima il che rende la tecnica poco interessante almeno per quanto riguarda la ricerca di mutazioni multiple allo stesso locus essendo necessario in teoria moltiplicare le reazioni per coprire tutte le possibili combinazioni. Infine l'applicazione in campo, se pure teoricamente possibile è, nei casi specifici assolutamente limitata dalla mancanza di un altrettanto rapido ed efficiente sistema di estrazione del DNA in campo da singolo esemplare.

### **Attività 3.1.3 – Metodi molecolari innovativi per una diagnosi in campo della presenza di mutazioni coinvolte nella resistenza ai prodotti fitosanitari e valutazione della loro frequenza in patogeni delle piante**

Questa attività si prefiggeva numerosi obiettivi declinati su differenti binomi patogeno/fungicida. Per maggiore chiarezza le attività verranno descritte per ciascun binomio patogeno/fungicida con la tecnica utilizzata riportata come sottocapitolo.

#### **1^ binomio patogeno/classe di fungicidi: *Plasmopara viticola*/CAA**

##### **A) Indagine con tecnica LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*)**

**Obiettivi** : gli obiettivi di questa attività erano la messa a punto di un protocollo molecolare LAMP per l'individuazione di una mutazione SNP (polimorfismo a singolo nucleotide) che conferisce la resistenza ai fungicidi della classe delle ammidi dell'acido carbossilico (CAA) alla quale appartengono svariati principi attivi antiperonosporici (benthiavalicarb, dimethomorph, iprovalicarb, mandipropamid, valifenalate). La creazione del protocollo LAMP aveva la finalità di consentire l'individuazione della mutazione direttamente in campo da parte di tecnici specializzati.

## **MATERIALI E METODI**

La LAMP è un'amplificazione isoterma di acidi nucleici che si basa sull'attività di una polimerasi termostabile, ricavata da *Bacillus stearothermophilus* (*Bst* polimerasi) e su 8 primer disegnati in modo specifico, che riconoscono 8 regioni sul DNA target prescelto (in questo caso costituito dalla mutazione specifica coinvolta nella resistenza alla classe dei fungicidi analizzata). La tecnica è stata scelta perché ha il potenziale vantaggio di non dover gestire la spedizione del campione dal campo al laboratorio in quanto, una volta messa a punto, può essere utilizzata anche direttamente *in situ*, avvalendosi di kit rapidi per estrazione del campione ed identificazione della mutazione. La tecnica LAMP ha la possibilità di fornire dati in tempi brevi, ma la messa a punto della tecnica risulta essere più laboriosa di altre tecniche molecolari, soprattutto lavorando con patogeni come *P. viticola*, un oomicete diploide, che può avere quindi due alleli per lo stesso gene target. Al fine della messa a punto della tecnica, si è dapprima approfondito a livello bibliografico la tecnica e grazie al know how del gruppo di ricerca sul patogeno in oggetto, si è proceduto con lo studio dell'analisi delle sequenze del gene *CesA3* di *P. viticola* (che esprime il complesso enzimatico target dei fungicidi CAA) dove, se

presente una mutazione SNP (G1105S), si ha resistenza alla classe di questi fungicidi. Si sottolinea che, data la natura diploide del patogeno per la maggior parte del suo ciclo, gli alleli resistenti vengono ereditati in modo recessivo. Pertanto, l'intera generazione F1 di incroci tra isolati sensibili e resistenti ai CAA è sensibile e solo nella progenie F2 la resistenza ai CAA compare in alcuni isolati. Quindi per conferire resistenza la mutazione G1105S (come anche la G1105V, anch'essa coinvolta nel fenomeno di resistenza) deve essere presente su entrambi gli alleli.

Si è proceduto quindi al disegno dei primer per l'amplificazione della regione di interesse ed identificazione della mutazione (G1105S). Esistono diversi software che possono essere impiegati per il disegno di questi primers: PrimerExplorer (FUJITSU) LAMP Designer (Premier Biosoft), LAVA (NIBIB Point-of-Care Technologies Research Network Center), LAMP Designer (OptiGene) e altri. Quello da noi prescelto è stato PrimerExplorer. Sono stati disegnati due set di primers (figura 3.1.3.1) per poter identificare la mutazione di interesse. Per controllare se questi primer fossero in grado di identificare i campioni che presentavano la mutazione (G1105S), sono stati necessari dei controlli positivi (campioni con la mutazione) e controlli negativi (campioni senza la mutazione). Ci siamo avvalsi di campioni presenti nella collezione della nostra Unità di ricerca, ma anche di altri campioni provenienti dalla Spagna. I campioni utilizzati come controlli erano stati prima discriminati con la tecnica molecolare AS-PCR, che consente l'identificazione della mutazione in oggetto. La tecnica LAMP ha due possibilità per la visualizzazione dei campioni positivi (con SNP): l'utilizzo degli agenti intercalanti che emettono fluorescenza quando vanno ad inserirsi tra le due eliche di DNA (modalità end-point) oppure in modalità Real Time mediante l'utilizzo di una attrezzatura che rileva la fluorescenza emessa dal campione in tempo reale, dando la possibilità di interpretare automaticamente il risultato finale mediante la formazione di curve sigmoidi sul display dello strumento.

Inizialmente sono state saggiate diverse mix di reazione presenti in letteratura, apportando alcune modifiche (tabella 3.1.3.1), ad una temperatura stabile di reazione di 60°C e poi visualizzate con la metodologia colorimetrica.

Nelle prove successive si è invece proceduto all'utilizzo di un'altra mix di reazione utilizzata per la tecnica in Real Time, visualizzando in tempo reale le curve di amplificazione. Per scegliere la migliore amplificazione dei primers, e quindi la possibilità di evidenziare la mutazione, sono state preparate reazioni in assenza di templatato per entrambi i set di primers, alle temperature di 60 e 63 °C per entrambi i set di primers, per verificare dove fossero assenti prodotti aspecifici causati da auto-amplificazione dei primer. Per il set di primer II è stata provata un'ulteriore temperatura di amplificazione a 65°C. Le reazioni LAMP sono state condotte sullo strumento Genie II (OptiGene, Horsham, Regno Unito), utilizzando 15 µl di Gsp SSD Isothermal Mastermix (ISO-001) (OptiGene), utilizzando 10 nmol/L di F3 e B3 e 100 nmol/L di FIP e BIP (set I) e 10 nmol/L di F3 e B3 e 100 nmol/L FIP e BIP (set II). La strumentazione ci è stata messa a disposizione da uno dei partner del progetto (CNR di Padova) consentendoci di collaborare strettamente con il gruppo della Dott.ssa Scarabel ai fini di una migliore messa a punto della tecnica.

Primer I									
1 ID:33 dimer(minimum)dG=-2.07									
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	29	47	19	59.01	-6.67	-5.84	0.53	ACCCGTGGAATTACGTGTC	
B3	228	245	18	60.24	-5.45	-4.16	0.61	CCTTGGGCCACCAACAAG	
FIP			42					GTCCCAGCCACAGTATTCCGTGTGCCATGTTCTTTGGCTTCT	
BIP			42					GTCTCGTTGCTGTTGTCTACAGCCCTCGTAATAGACTTGCC	
F2	48	67	20	59.83	-5.80	-5.09	0.45	TGCCATGTTCTTTGGCTTCT	
F1c	108	129	22	64.86	-5.86	-6.19	0.59	GTCCCAGCCACAGTATTCCGTG	
B2	206	225	20	59.66	-6.54	-5.85	0.55	GCCCTCGTAATAGACTTGCC	
B1c	160	181	22	64.45	-5.26	-4.41	0.50	GTCTCGTTGCTGTTGTCTACA	

Primer II									
2 ID:1 dimer(minimum)dG=-0.94									
label	5'pos	3'pos	len	Tm	5'dG	3'dG	GCrate	Sequence	
F3	14	31	18	55.82	-4.15	-4.18	0.50	ATGAGAACGCCACTAACC	
B3	183	200	18	55.56	-5.97	-4.21	0.44	TGCACAAAACGACAATG	
FIP			39					ACCATGGGGTAAAACCTGGCTCTGGAATTACGTGTCTGCC	
BIP			43					GATGAGTATCACGGAATACTGTGGCGACAACCAGCAACGAGAC	
F2	34	51	18	56.12	-4.41	-6.10	0.50	TGGAATTACGTGTCTGCC	
F1c	75	95	21	62.19	-5.05	-6.10	0.52	ACCATGGGGTAAAACCTGGCTC	
B2	165	182	18	55.70	-3.99	-5.18	0.50	GACAACCAGCAACGAGAC	
B1c	99	123	25	62.89	-4.25	-6.41	0.48	GATGAGTATCACGGAATACTGTGGC	

Figura.3.1.3.1 - Due set di primer disegnati con il software Primer Explorer, per l'amplificazione specifica della mutazione SNP G1105S coinvolta nella resistenza di *P. viticola* ai CAA

	Curtis (2008)	Duan (2013)	Duan (2014a)	Duan (2014b)	Goto (2009)	Hua (2014)	Hu (2017)	Valor máx	Valor min	Duan (2015)
Volumen (uL)	25	25	25	25	25	25	25			10
10 mM dNTPs (mM)	1.4	1	1	1	1.4	1	1	1.4	1	0.8
Mg <sup>2+</sup> (mM)	10	4	4	3	8	3	5	10	3	2
10 uM FIP/BIP (uM)	1.6	1.2	1.6	1.2	1.6	1.2	1.6	1.6	1.2	1.2
10 uM B3/F3 (uM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
3st DNA polimerase (U)	8	8	3	8	8	8	8	8	3	2.4
5 M betaina (M)	0.4	1.28	0.94	0.64		0.64	0.6	1.28	0.4	0.6
HNB (uM)		150	150	150	120	150	150	150	120	100

Tabella.3.1.3.1 Tabella delle mix di reazione provate per la messa a punto del protocollo con visualizzazione colorimetrica

## RISULTATI

I primi risultati sono stati ottenuti attraverso l'utilizzo di un fluoroforo che in presenza della mutazione di interesse consente un viraggio di colore al campione dal violetto al blu cielo. Come si evince dalla figura 3.1.3.2, i pozzetti dall'1 al 3, dove era presente la mutazione, non hanno evidenziato nessun cambiamento di colore con tutte le combinazioni di mix mostranti il medesimo risultato.

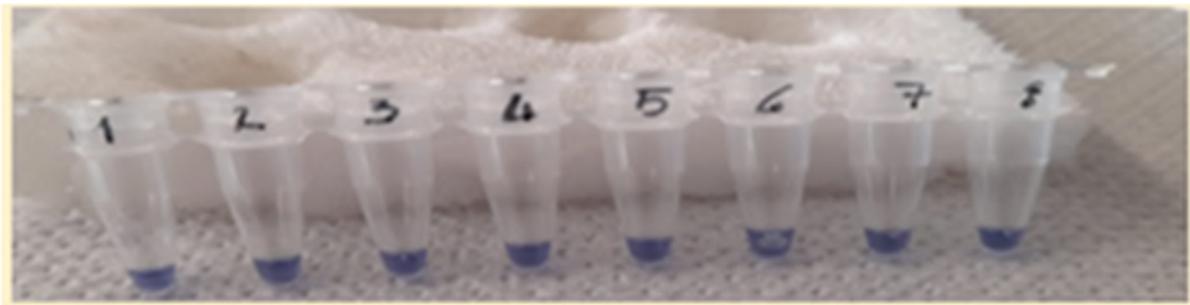


Figura 3.1.3.2 Esempio di risultato ottenuto utilizzando una delle combinazioni di mix riportate in tabella 3.1.3.1 con campioni con mutazione (1-3) e senza mutazione (4-7) e controllo H<sub>2</sub>O (8)

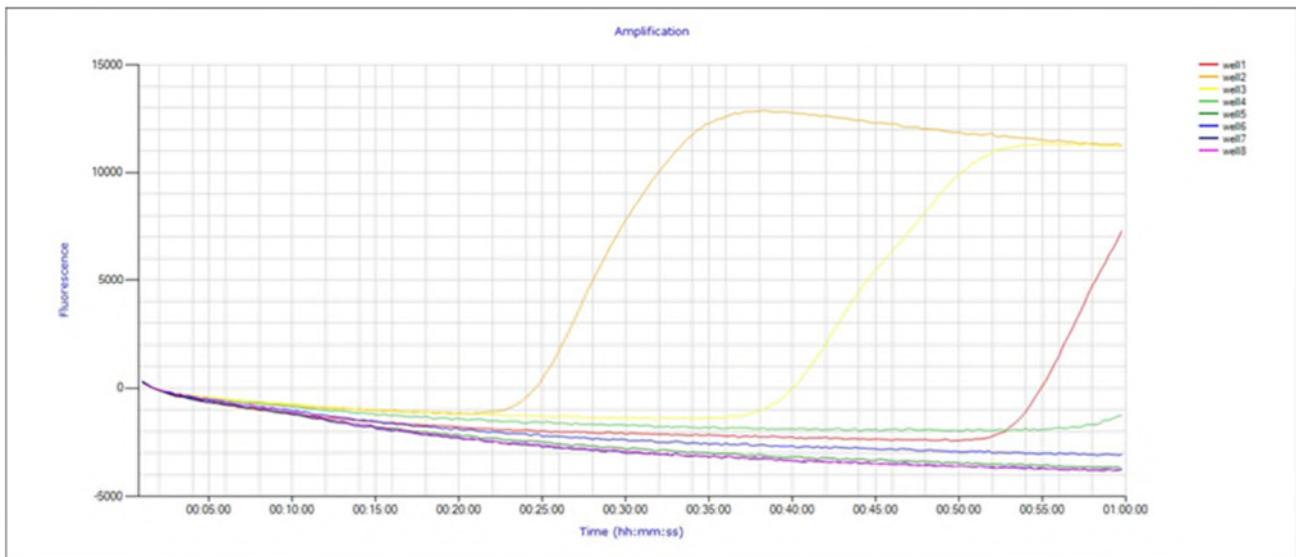


Figura.3.1.3.3 - 4 repliche di H<sub>2</sub>O con set primer I (well 1-4) e 4 repliche di H<sub>2</sub>O con set di primer II (well 5-8) con amplificazione a 60°C

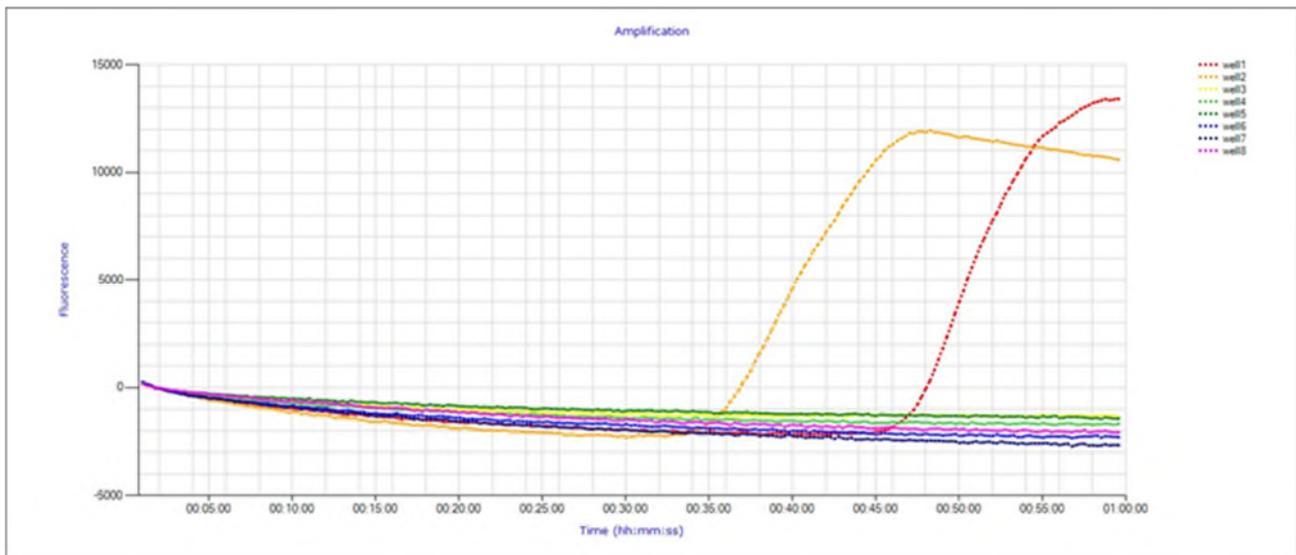


Figura.3.1.3.4 - 4 repliche di H<sub>2</sub>O con set primer I (well 1-4) e 4 repliche di H<sub>2</sub>O con set di primer II (well 5-8) con amplificazione a 63°C

Dalle immagini sopra riportate si può notare che i primer del gruppo I mostrano autoamplificazione (presenza di curve sigmoidi in campioni con H<sub>2</sub>O) ad entrambe le temperature e sono stati quindi abbandonati per le successive prove di messa a punto del metodo, procedendo solo con il set dei primer II.

Dalle immagini sotto riportate si evince come non sia avvenuta nessuna amplificazione (assenza di curve sigmoidi) e i campioni sono tutti uguali al controllo con H<sub>2</sub>O.

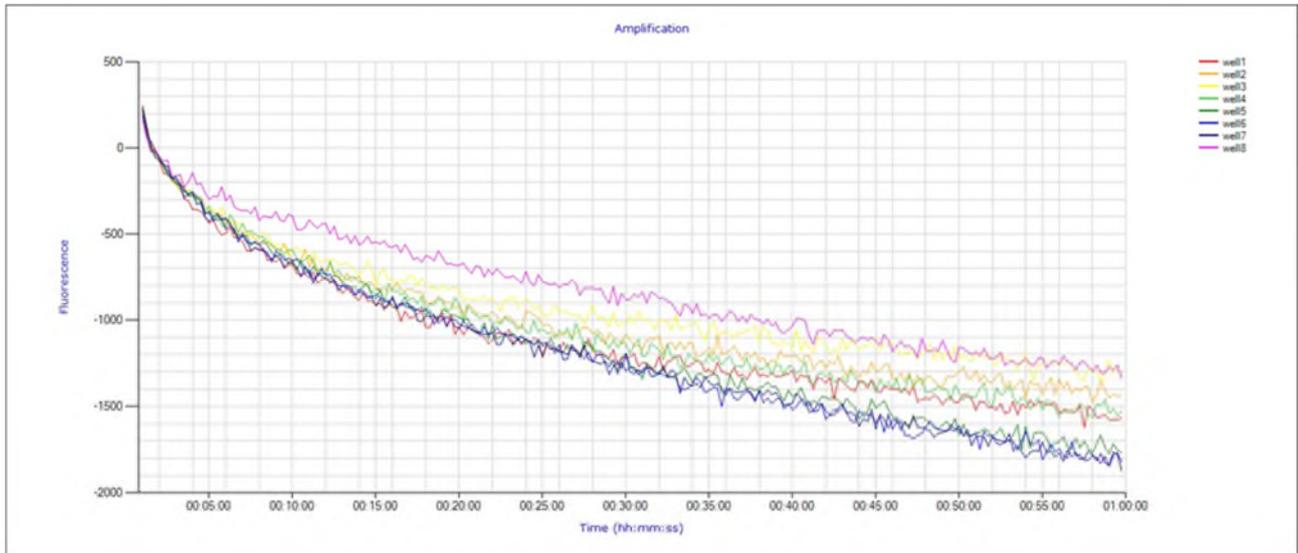


Figura.3.1.3.5 – Tre repliche di campione WT (senza mutazione 1-3 well) e quattro repliche del MUT (con mutazione 4-7 well) e 1 controllo H<sub>2</sub>O (8 well) con set di primer II alla temperatura di amplificazione di 63°C

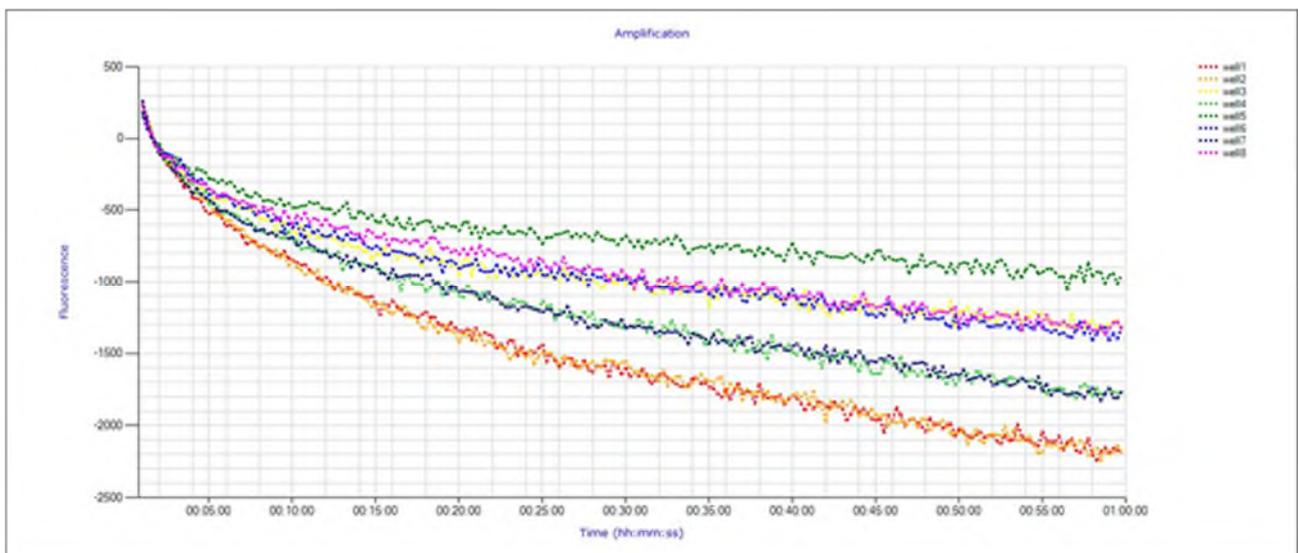


Figura.3.1.3.6 – Tre repliche di campione WT (senza mutazione 1-3 well) e quattro repliche del MUT (con mutazione 4-7 well) e 1 controllo H<sub>2</sub>O (8 well) con set di primer II alla temperatura di amplificazione 65°C

Purtroppo, nonostante molteplici e complessi tentativi sia con l'approccio colorimetrico sia con quello strumentale e nonostante la preziosa collaborazione del gruppo del CNR di Padova, non siamo riusciti ad ottenere i risultati sperati a causa di difficoltà tecniche non previste ma anche delle caratteristiche del patogeno. Pur continuando a ritenere che la tecnica LAMP sia un approccio molto utile per il trasferimento in campo, al momento non siamo stati in grado di trovare i primer adeguati per la mutazione ricercata.

### **B) Indagine con tecnica ddPCR (droplet digital PCR)**

**Obiettivi:** In analogia a quanto proposto con la tecnica LAMP, l'altra strada percorsa per la rilevazione di mutazioni legate alla resistenza dei CAA, è stata quella attraverso la ddPCR, estremamente sensibile e in grado di fornire non solo un dato qualitativo (presenza/assenza della mutazione) come la LAMP ma anche quello quantitativo (% di mutazione presente rispetto ad un campione sensibile) allo scopo di guidare meglio le strategie di difesa in campo. Contrariamente alla LAMP però la tecnica non può essere esportata dal laboratorio ed il vantaggio pratico consta certamente nella velocizzazione delle analisi e quindi nelle risposte da fornire all'assistenza tecnica.

## **MATERIALI E METODI**

### Tecnica ddPCR

La ddPCR è un forma di PCR digitale che suddivide i campioni di DNA in migliaia di gocce separate. Il termine 'droplet' deriva dal metodo utilizzato rappresentato da una emulsione acqua-olio che divide in "goccioline" il DNA estratto da campioni di campo. Per poter identificare le mutazioni che conferiscono la resistenza ai fungicidi è fondamentale conoscere bene la sequenza di riferimento (nel caso specifico del gene *CesA3* del complesso enzimatico cellulosa-sintasi) per poter disegnare i primer e le sonde da adottare. Per la messa a punto del protocollo sono stati necessari campioni di DNA di riferimento non mutati (WT) e con la mutazione G1105S (Mut): essenziali sono stati i campioni già analizzati con biosaggi *in vivo* per determinare le DE<sub>50</sub> e discriminati con un'altra metodica molecolare (AS-PCR) in grado di identificare la presenza/assenza della mutazione. Dopo avere accertato il fenotipo dei campioni da impiegare come controlli, si è proceduto alla messa a punto della tecnica. Insieme a questi campioni di riferimento, sono stati inseriti anche campioni sconosciuti provenienti dai monitoraggi di campo ma non ancora saggiati con altre tecniche dal momento che lo scopo ultimo è quello di adottare la ddPCR come unica e veloce tecnica di diagnosi. In breve le fasi per la messa a punto del protocollo sono state: estrazione e quantificazione del DNA genomico purificato e quantificazione utilizzando un metodo fluorimetrico. Per poter testare la validità dei primer disegnati e della sonda, sono state provate 3 diverse temperature di *annealing* (appaiamento dei primers) a 56, 58 e 60°C, sono state provate diverse concentrazioni di DNA (5/10/20 ng/μl). Per verificare la corretta specificità e sensibilità della sonda nell'identificare la mutazione di interesse, sono state create mix con DNA di *P. viticola* contenenti diverse % di WT e Mut.

## **RISULTATI**

E' stato validato il metodo ddPCR per l'identificazione della mutazione G1105S con una temperatura ottimale dei primer a 56°C e con 10 ng/μl di DNA di campione. La tecnica ddPCR è stata messa a punto e permette di quantificare gli alleli che presentano la mutazione G1105S che conferiscono resistenza ai CAA nelle popolazioni di *P. viticola*. Il metodo è risultato estremamente sensibile in quanto in grado di evidenziare le mutazioni fino allo 0.001%. Il dato che fornisce lo strumento in ddPCR (nel nostro caso il QX200 BIO-RAD) è in termini di Abbondanza Frazionaria (AF%) determinato dalla formula:  $(\text{alleleX}/\text{alleleX} + \text{alleleY}) * 100$  e che rappresenta la frequenza allelica/campione. Quindi siamo in grado di fornire un dato percentuale della presenza di allele mutato rispetto ad un campione sensibile (senza mutazione). Questa tecnica è di fondamentale importanza per un monitoraggio veloce e preciso della frequenza delle mutazioni SNP a carico di questa classe di fungicidi. La ddPCR, come molteplici tecniche molecolari, lavora su DNA estratto da sporangi prelevabili direttamente dalle foglie del campione proveniente da campo senza avere la necessità di un passaggio su ospite per ottenere nuova sporulazione da utilizzare nel biosaggio: solo questo consente di risparmiare i giorni necessari per l'incubazione del patogeno (mediamente 6-7). Inoltre, contrariamente al biosaggio, la tecnica consente di "fotografare" precisamente la composizione del campione prescindendo dalla vitalità degli sporangi visto che il DNA viene estratto dall'intera sporulazione presente anche se devitalizzata da trattamenti fitoiatrici e/o condizioni microclimatiche. Tutto ciò considerato, i risultati della sensibilità dei campioni prelevati dal territorio possono essere comunicati almeno dieci giorni prima di quanto oggi si riesce a fare rispetto alla metodologia *in vivo* oltre che fornire la % di presenza di mutazione in grado di gestire molto meglio la difesa in campo supportandone al meglio le decisioni.

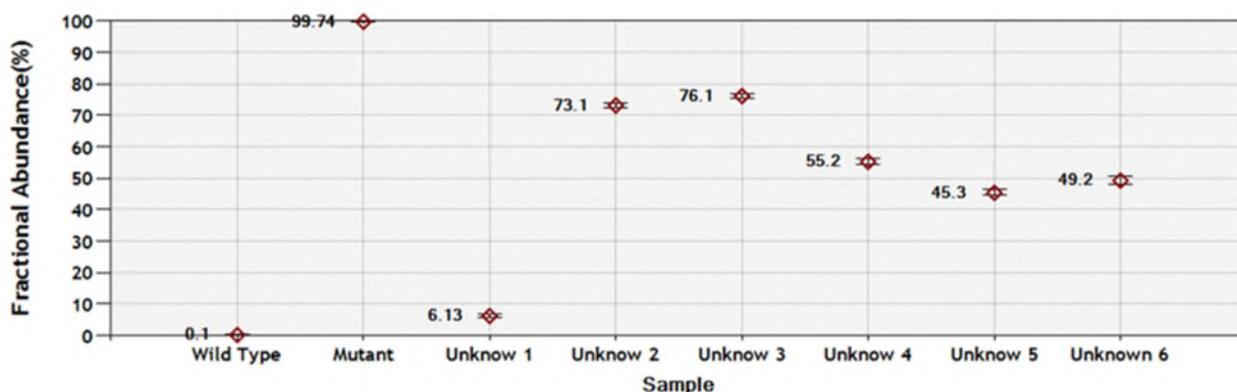


Figura 3.1.3.7 - Esempio di risultato ottenuto mediante tecnica ddPCR utilizzando lo strumento QX200 BIO-RAD

La ddPCR è stata in grado di quantificare l'abbondanza frazionaria (AF) nei campioni provenienti da campo (unknown 1.2.3.4.5.6), come mostrato in Figura 3.1.3.7, come si evince dal grafico i campioni di riferimento Wild Type e Mutant, sono stati correttamente identificati, con 0,1% di AF per il Wtype e 99.74 per il Mutant.

Inoltre sono stati disegnati primer ed una sonda anche per la mutazione G1105V, meno frequente ma presente specialmente in alcuni areali italiani sempre in grado di conferire la resistenza alla

classe dei fungicidi CAA. I dati in nostro possesso ci danno la certezza di riuscire a breve ad individuare con estrema precisione anche la quali/quantità di questa seconda mutazione non inizialmente prevista in fase progettuale ma che abbiamo voluto produrre anche considerata il mancato raggiungimento dell'obiettivo attraverso la tecnica LAMP.

### **2^ binomio patogeno/classe di fungicidi: *Plasmopara viticola*/Qil**

*Indagine con tecnica LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)*

**Obiettivi:** L'obiettivo era rappresentato dall'ottenimento di un protocollo con tecnica LAMP in grado di verificare la presenza delle mutazioni legate alla resistenza di *P. viticola* ai fungicidi Qil (amisulbrom e cyazofamid).

Come in altri casi, la partenza degli studi è stata la ricerca bibliografica riguardante la classe di fungicidi di interesse Qil e le mutazioni SNP che conducono alla resistenza, in particolare la L201S. La sperimentazione è stata avviata ma presto bloccata dalla presenza di difficoltà ulteriori rispetto a quelle attese. Recentissimi studi (Cherrad et. al, 2023) hanno mostrato la presenza di due inserzioni nucleotidiche (E203-DE-V204, E203-VE-V204) sul gene del complesso enzimatico target dei Qil (citocromo Bc1 della catena respiratoria). Questo inserimento determina un cambiamento nella sequenza di amminoacidi con due amminoacidi aggiuntivi. Tale caratteristica è molto difficile da mettere in evidenza con una tecnica LAMP, ma fondamentale per valutare la resistenza al gruppo fungicida perché le inserzioni interferiscono con il legame tra fungicida e bersaglio. Si è deciso quindi di abbandonare questo percorso puntando sulla messa a punto nel prossimo futuro di un protocollo in ddPCR che ci ha fornito affidabili e sensibili protocolli come quelli che verranno descritti.

### **3^ binomio patogeno/classe di fungicidi: *Botrytis cinerea*/SDHI**

*Indagine con tecnica LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)*

**Obiettivi :** L'obiettivo era la messa a punto di un protocollo molecolare LAMP per l'individuazione di una mutazione SNP (H227R) che induce la resistenza a fungicidi della classe SDHI in *Botrytis cinerea*.

#### **MATERIALI E METODI**

Per la messa a punto del protocollo, è stata necessaria un'approfondita ricerca bibliografica per poter definire il disegno dei primer. Il principale lavoro dal quale abbiamo preso spunto è stato quello di Fan *et al*, 2018. Per la messa a punto erano necessari campioni WT (senza mutazione) e Mut (con la mutazione) che abbiamo richiesto a un gruppo di ricerca, con il quale collaboriamo, presso l'Università di Bari. Dopo l'estrazione di DNA i campioni sono stati quantificati e reputati idonei ad essere utilizzati come riferimenti.

Con i primers di Fan *et al*, 2018 sono state eseguite diverse prove per definire le temperature di *annealing* dei primer, la concentrazione di utilizzo dei primers e le concentrazioni di DNA da utilizzare. E' stato ordinato da un servizio esterno un set di primer identico a quello riportato nel

lavoro scientifico (Figura 3.1.3.8) ma sono anche stati disegnati nuovi primer con la presenza di loop e privi di loop (Floop; Bloop) per aumentarne la specificità. Sono state saggiate anche 2 diverse concentrazioni del primer BIP, sia a 10 nmol/L che a 100 nmol/L. Sono state testate diverse temperature di *annealing* dei primers 60-63-65°C con concentrazioni di DNA di WT e Mut a 20ng, diverse concentrazioni di BIP e con la presenza di primer con o senza loop.

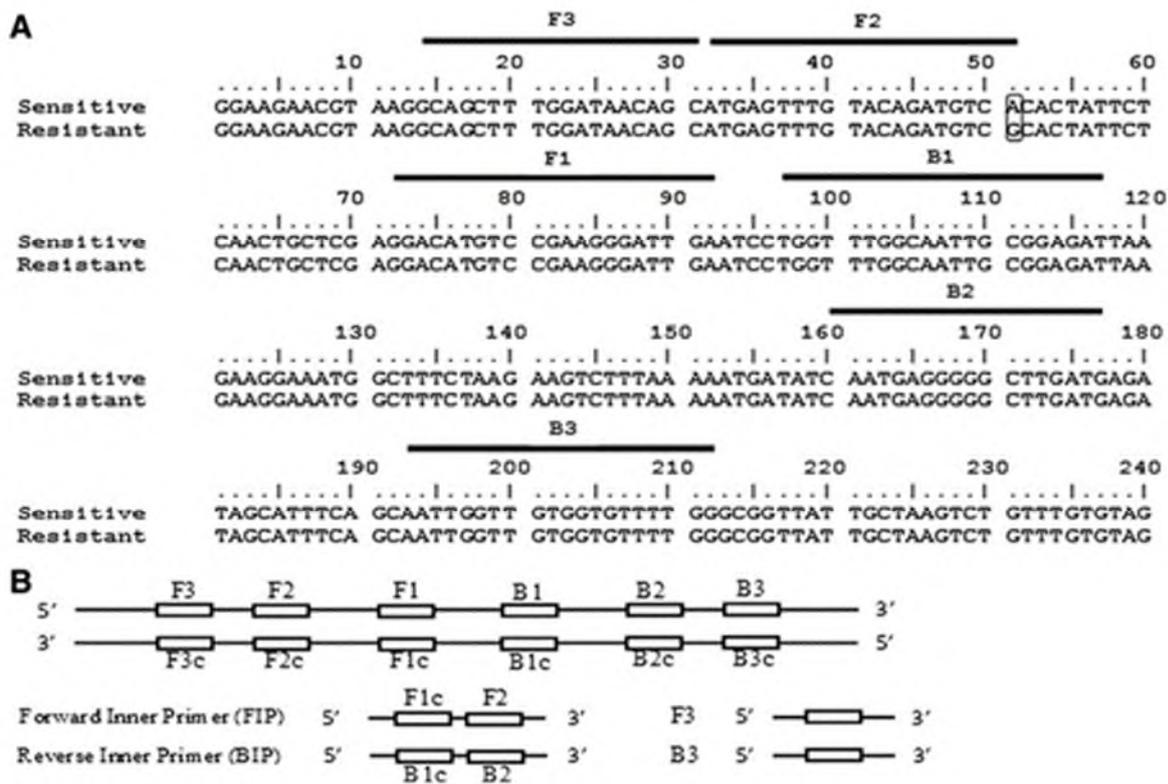


Figura 3.1.3.8 - Primer specifici LAMP H227R da Fan et al, 2018

## RISULTATI

I risultati descritti si riferiscono al set di primer con primer BIP a 100nm/L e la presenza di loop e senza. A 60°C non si è evidenziata amplificazione dei prodotti di riferimento ma amplificazione dell'acqua. A 63°C si è avuta un'amplificazione di diversi campioni in tempi simili, ma con temperature di melting diverse con amplificazione dei campioni WT (1.2.3.9.10.11 senza loop) che non avrebbero dovuto amplificare oltre a quelle Mut (4.5.6.7.12.13.14.15 con loop). A questa temperatura però il controllo con H<sub>2</sub>O (8 senza loop, 16 con loop) è stato correttamente non amplificato (Figura 3.1.3.9). A 65°C si è avuta un'amplificazione non corretta anche dell'acqua come per la temperatura di 60°C.

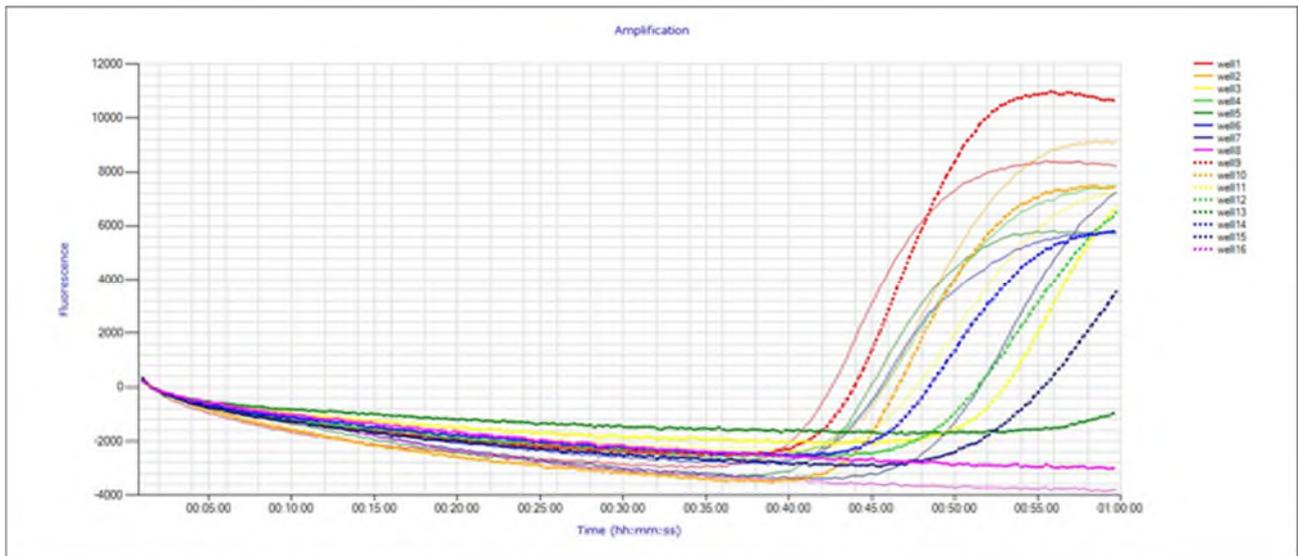


Figura 3.1.3.9 - Curve di amplificazione con setting dei primer a 63°C, BIP a 100 nm/L, Primer FIP e BIP senza e con loop

I risultati sotto descritti fanno invece riferimento al set di primer con il primer BIP a 10nm/L (figura 3.1.3.10)

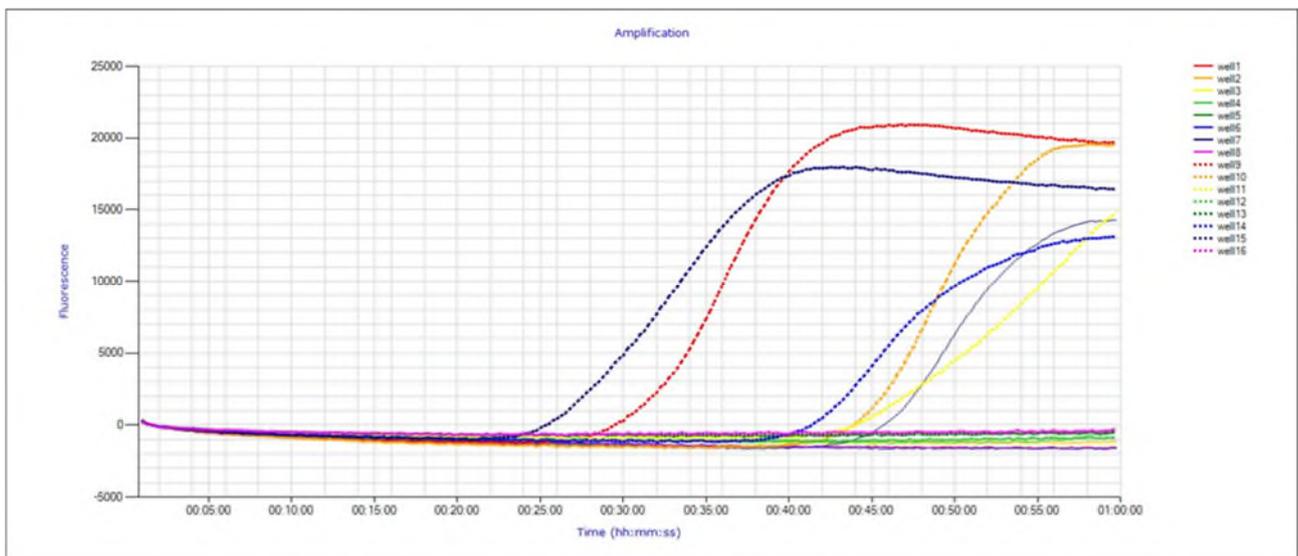


Figura 3.1.3.10 - Curve di amplificazione con setting dei primer a 63°C, BIP a 10 nm/L, Primer FIP e BIP senza e con loop

Per quanto riguarda questi risultati, possiamo dire che si è ottenuta un'amplificazione di diversi prodotti a tempi simili e presenza di curve di melting a temperature simili per entrambi i riferimenti

WT (well 1.2.3.9.10.11 senza loop) e Mut (well 4.5.6.7.12.13.14.15 con loop). In questo esperimento l'H<sub>2</sub>O (8 senza loop, 16 con loop) non è stata amplificata come atteso.

Va notato che la diversa concentrazione del BIP sembra avere maggiore sensibilità in termini di tempo/amplificazione rispetto alle altre prove effettuate e questo ci consentirà di provare ulteriormente a variare la concentrazione di questo primer per poter riuscire a discriminare meglio il WT dal Mut. Quindi, pur non avendo messo a punto il protocollo, l'obiettivo è molto vicino e le sperimentazioni continueranno nei prossimi mesi per giungere alla sua definizione applicabile in campo su molteplici colture interessate dalle infezioni di *B. cinerea*.

#### **4^ binomio patogeno/classe di fungicidi: *Stemphylium vesicarium* /SDHI**

*Indagine con tecnica ddPCR (droplet digital PCR)*

**Obiettivi:** L'obiettivo di questa attività è quello di produrre un protocollo in ddPCR per valutare la presenza e frequenza di mutazioni in *S. vesicarium* coinvolte nella resistenza agli SDHI autorizzati su pero contro la maculatura bruna (boscalid, fluopyram, fluxapyroxad, penthiopyrad, isopyrazam, quest'ultimo recentemente eliminato da normativa europea).

#### **MATERIALI E METODI**

Per mettere a punto il protocollo di analisi sono stati necessari campioni di riferimento di *S. vesicarium*, precedentemente discriminati con indagine *in vitro* (tabella.3.1.3.2).

CEPPO	INGRAFICO	Provenienza (Provincia)	Sensibilità SDHI (% grado d'azione a 30 mg/l)				
			Boscalid	Fluxapyroxad	Penthiopyrad	Fluopyram	Isopyrazam
701'21	B12	FE	76,97	48,49	86,41	96,24	94,18
747'21-e	C01	FE	24,83	23,38	16,95	84,66	96,78
1258	C02	RE	37,92	63,92	40,96	96,05	99,32
1260	C03	RE	94,99	74,48	91,56	95,7	98,7
1343	C04	FE	18,08	12,3	69,1	89,53	85,27

Tabella 3.1.3.2 - Campioni utilizzati per la messa a punto del saggio ddPCR con relativi risultati dei saggi di sensibilità in vitro agli SDHI (% grado d'azione a 30 mg/l)

Le mutazioni ricercate sono state due (la ricerca della seconda mutazione non era stata prevista a livello progettuale): P230L e H134R entrambe rintracciabili nel gene che sovrintende alla produzione del complesso enzimatico della Succinato Deidrogenasi (rispettivamente nella subunità B e C del gene), sito target fungino dei fungicidi SDHI. Le mutazioni sono state scoperte nel biennio 2016-2017 dal gruppo di ricerca in uno studio di laboratorio su campioni provenienti da prove di efficacia di campo dell'azienda sperimentale dell'Università. Per identificare le mutazioni, è fondamentale conoscere le sequenze dei geni che codificano per le due subunità (B-C) del complesso della Succinato deidrogenasi allo scopo di poter disegnare i primer e le sonde da utilizzare per l'individuazione delle mutazioni di interesse. I campioni di DNA di riferimento devono presentare una o l'altra mutazione oppure nessuna (non mutati - WT) e determinare la specificità dei primers e della sonda. In breve le fasi dell'attività sono: estrazione e quantificazione con spettrofotometro del DNA genomico. Sono state provate diverse concentrazioni di DNA per la messa a punto della tecnica: 20-10-1 ng/μl e si è utilizzata una temperatura di *annealing* dei primer di 60°C.

## RISULTATI

La concentrazione di DNA validata per il saggio è stata di 1 ng/μl. Sono state effettuate prove sia per la mutazione P230L che per la mutazione H134R: quelle condotte sulla prima sono da considerarsi preliminari ma hanno comunque evidenziato la validità delle sonde e dell'intero protocollo. Per la

seconda mutazione (H134R), è stato ottenuto un protocollo affidabile e i risultati permettono di supportare quelli ottenuti dai saggi *in vitro* circa il calo della sensibilità e l'insorgenza della mutazione. Il metodo è in grado di identificare le mutazioni con una sensibilità dello 0.004%.

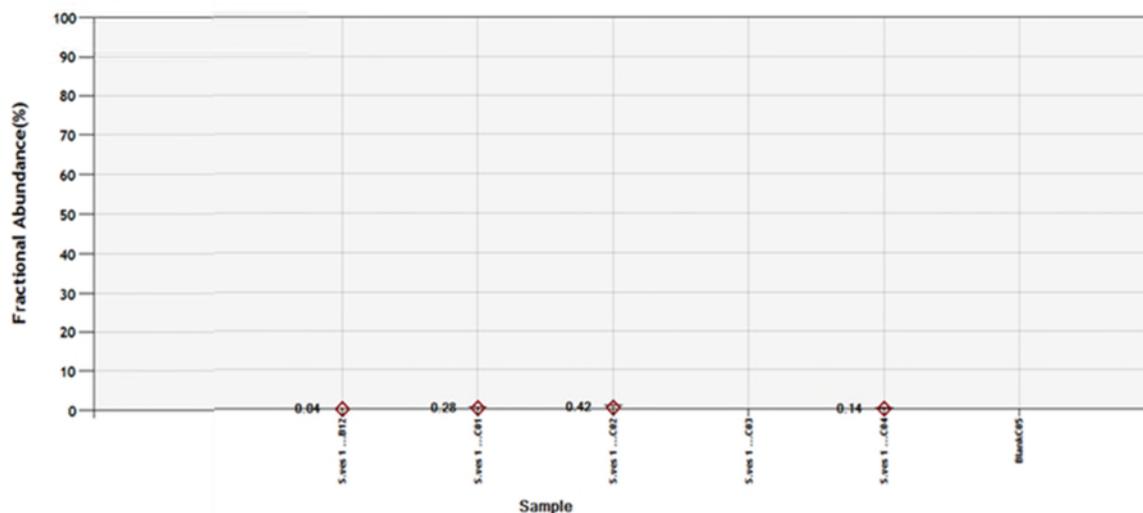


Figura 3.1.3.11 - Esempio di risultato ottenuto mediante tecnica ddPCR utilizzando la sonda disegnata per la mutazione H134R

Dal grafico sopra riportato notiamo l'abbondanza frazionaria (AF) espressa in percentuale nei diversi campioni data dal rapporto tra la presenza di allele mutato rispetto al WT. Si può notare come nei campioni in cui i saggi *in vitro* hanno mostrato abbassamenti del grado di azione degli SDHI (B12, CO1, CO2, CO4) si riscontri la presenza della mutazione, mentre nel campione in cui si ha completa sensibilità per tutti gli SDHI (CO3) la mutazione è assente denotando una diretta correlazione tra i dati derivanti dai saggi *in vitro* con quelli delle analisi molecolari. I riferimenti interni mutato e wild type sono stati testati in un altro esperimento e hanno mostrato il 100% di AF per il mut e 0% di AF per il WT.

#### 5<sup>^</sup> binomio patogeno/classe di fungicidi: *Zymoseptoria tritici*/QoI

Indagine con tecnica ddPCR (droplet digital PCR)

**Obiettivi:** L'obiettivo era rappresentato dall'ottenimento di un protocollo in ddPCR in grado di quantificare la frequenza della mutazione G143A che causa la resistenza di *Z. tritici* (agente della septoriosi del frumento) ai QoI (es. pyraclostrobin).

## MATERIALI E METODI

I diversi esperimenti sono stati allestiti per ottimizzare la temperatura di *annealing* dei primers e la specificità della sonda nell'individuare la mutazione e alla scelta della migliore quantità di DNA da impiegare per poter identificare le frequenze alleliche senza mutazione (WT) e con mutazione (Mut). Sono stati impiegati anche DNA di tipo misto, con diversa % di mutazione per poter saggiare la sensibilità del metodo.

## RISULTATI

Le frequenze alleliche sono state determinate accuratamente su campioni costituiti da DNA misti provenienti da colture monoconidiche di *Z. tritici* e sono state espresse come abbondanza frazionaria (AF). Questo nuovo approccio fornisce uno strumento diagnostico rapido e in grado di rilevare percentuali di sostituzione G143A molto basse, molto utile per il rilevamento della resistenza ai fungicidi nelle fasi iniziali, fornendo così informazioni sulle strategie di gestione in campo per contrastare la malattia. Il protocollo è stato messo a punto e pubblicato su una rivista scientifica accessibile a questo indirizzo: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/2/240>.

*Battistini G, Gazzetti K, Collina M. A New Approach: Determining cyt b G143A Allele Frequency in Zymoseptoria tritici by Digital Droplet PCR. Biology (Basel). 2022 Feb 4;11(2):240. doi: 10.3390/biology11020240. PMID: 35205106; PMCID: PMC8869461.*

## CONCLUSIONI COMPLESSIVE

Per il binomio *P. viticola*/CAA-LAMP il protocollo, nonostante i numerosissimi tentativi, non è stato possibile metterlo a punto. Le caratteristiche dei primer non hanno permesso l'identificazione della mutazione e in questo la natura diploide del patogeno può avere contribuito. Al contrario, è stato raggiunto l'obiettivo con la messa a punto del protocollo con la tecnica digital droplet PCR (ddPCR) per la mutazione principale G1105S e la validazione della sonda per l'identificazione dell'altra mutazione (G1105L) sempre coinvolta nella resistenza ai CAA. Questo lavoro non era stato previsto tra gli obiettivi del progetto. Questa tecnica sarà fondamentale per lo screening veloce delle popolazioni di *P. viticola* provenienti dal campo in grado di fornire in tempi brevi risultati sulla presenza e % di allele mutato.

Per il binomio *P. viticola*/Qil-LAMP non si è riusciti nella messa a punto della tecnica a causa, molto probabilmente, della più complessa caratteristica del tratto genico con la presenza di mutazioni ed inserzioni, confermato dai dati riportati in un lavoro scientifico pubblicato nell'anno in corso da altri autori.

Per il binomio *B. cinerea*/SDHI-LAMP il protocollo non ancora stato messo a punto ma i risultati delle ultime analisi ci consentono di affermare che probabilmente la concentrazione di un primer, se variata ulteriormente, potrà consentire a breve la sua definizione consentendo di discriminare il sensibile WT dal resistente Mut.

Per il binomio *S. vesicarium*/SDHI-ddPCR è stato messo a punto il metodo per l'individuazione della mutazione H134R che conferisce la resistenza ai fungicidi appartenenti alla classe SDHI, oltre ad essere stata disegnata e validata la sonda per la seconda mutazione coinvolta nella resistenza P230L.

Per il binomio *Z. tritici*/Qil-ddPCR è stato messo a punto il metodo per l'individuazione della mutazione G143A che conferisce la resistenza ai fungicidi appartenenti alla classe dei QoI ed è stato pubblicato il protocollo sulla rivista scientifica *Biology* (*Battistini G, Gazzetti K, Collina M. A New Approach: Determining cyt b G143A Allele Frequency in Zymoseptoria tritici by Digital Droplet PCR*)

**Uar:** UNIFE

Questa attività si è concentrata sulla validazione di un sistema di confusione sessuale per psilla del pero basato su “feromoni sessuali” e su “vibrazioni”.

### **Fase 1**

Per quanto riguarda il feromone sessuale i 4 componenti già identificati sono stati prodotti e forniti dalla società Shin-Etsu Chemical Co Ltd e valutati a diverse concentrazioni in laboratorio, semicampo e campo in parcelloni (ripetuti 3-4 repliche) di dimensioni adatte.

In laboratorio sono state svolte indagini comportamentali con olfattometro a due vie (a Y) che mediante indagini elettrofisiologiche con elettroantennogramma (EAG), al fine di osservare oltre all’attrazione verso il maschio alle diverse concentrazioni anche la possibile interruzione (saturazione) ad elevate concentrazioni per un possibile impiego pratico in campo nella tecnica di confusione sessuale. Infatti, l'EAG è una tecnica utilizzata per registrare la risposta elettrica dell'antenna di un insetto quando essa viene sottoposta ad un flusso d'aria contenente una sostanza a potenziale azione feromonica.

In semicampo e campo i feromoni sono stati distribuiti sulla base delle osservazioni emerse nelle fasi di laboratorio valutandone l’efficacia in termini di mancato accoppiamento e conseguente mancata deposizione di uova.

## **MATERIALI E METODI**

### **Saggi biologici con olfattometro**

Per l’indagine olfattometrica è stato utilizzato un olfattometro a Y di piccole dimensioni (figura 3.2.1) (braccio principale 7 cm, bracci laterali 6 cm disposti ad angolo di 70°). Un braccio era collegato ad una beuta contenente 6 microlitri di soluzione di feromone in esano adsorbiti su un rettangolo di carta da filtro di circa 1 cm<sup>2</sup>, l’altro braccio era collegato ad un’altra beuta contenente il rettangolo di carta da filtro con il solo esano (controllo).



*Fig. 3.2.1. Maschio di C. pyri nel braccio destro dell'olfattometro*

Il flusso d'aria (preventivamente purificato tramite passaggio su un filtro di carbone attivo e umidificato attraverso una bottiglia di gorgogliamento contenente acqua distillata) inviato a ciascun braccio laterale era mantenuto costante a 0.5 L/min per mezzo di due flussometri. L'olfattometro è stato posizionato in una camera di cartone costruita ad arte (48 x 48 x 31,5 cm) e illuminata dall'alto da due lampade fluorescenti bianco freddo da 15 W che fornivano un'illuminazione uniforme. Ogni singolo maschio veniva posizionato all'inizio del braccio principale dell'olfattometro, dopodichè, se motivato procedeva fino alla biforcazione dove poteva "scegliere" se dirigersi verso il braccio dove scorre il flusso di aria contenente l'idrocarburo da testare o verso il braccio di controllo. Il comportamento di ogni singolo maschio veniva osservato finché non avveniva la scelta che era considerata valida quando l'insetto rimaneva per almeno 30 secondi oltre i primi 3 cm di uno dei due bracci dell'olfattometro. Se l'insetto entro 15 minuti dal rilascio non era motivato a proseguire e dirigersi verso nessuno dei due bracci, il dato veniva considerato come "non scelta". Ogni 4 individui l'intero olfattometro veniva capovolto per evitare condizionamenti dalla posizione e si procedeva alla sostituzione della carta da filtro caricata con una nuova dose. Al termine di ogni esperimento l'olfattometro e la vetreria venivano lavati e asciugati in muffola a 100° C.

Per ogni singolo idrocarburo sono state valutate tre dosi espresse in femmine equivalenti: 1, 10 e 100 (fem eq), che corrispondono rispettivamente ad una concentrazione di 12,5 mg, 125 mg e 1250 mg per ml di esano. Per ogni dose di ogni composto da saggiare sono stati utilizzati circa 40 maschi sia estivi che invernali. Ogni esperimento all'olfattometro iniziava alle 10.30 e terminava alle 13.30.

## **Saggi elettrofisiologici con elettroantennogramma**

L'indagine elettrofisiologica per valutare le risposte antennali ai quattro feromoni precedentemente identificati e descritti nel saggio all'olfattometro è stata effettuata attraverso una tecnica EAG standard presso il Laboratorio di Elettrofisiologia del Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente dell'Università del Molise.

In questa indagine EAG i quattro componenti disciolti in esano sono stati saggiati alle seguenti dosi: 1, 2, 4, 8, 16 femmine equivalenti in modo da rilevare la sensibilità olfattiva delle antenne dei maschi e calcolare le curve dose-risposta.

Inizialmente, per poter procedere con lo studio, gli insetti sono stati decapitati con l'aiuto di un microscopio ottico, dopodiché a livello del capo è stata inserita una micropipetta di vetro con funzione di elettrodo di riferimento. L'elettrodo di registrazione, a punta a becco di flauto, è stato posizionato a contatto con l'antenna. Entrambi gli elettrodi erano costituiti da capillari di vetro con diametro di 1 mm, che sono stati inseriti all'interno della soluzione Ringer (soluzione isotonica standard Ringer per 1 L di acqua distillata: 6.5g NaCl, 0,42g KCl, 0,25g CaCl<sub>2</sub>, 0,2g NaHCO<sub>3</sub>). Per garantire al massimo la conducibilità elettrica, all'interno degli elettrodi è stato inserito un filo d'argento connesso ad un amplificatore (UN-6) collegato a sua volta ad un computer dotato del software EAG 2.0 deputato alle registrazioni EAG (Synthec, Hilversum, The Netherlands). Il capo dell'insetto una volta posizionato in modo ottimale sull'elettrodo di riferimento e all'altezza dell'elettrodo di registrazione è pronto per l'esecuzione delle misurazioni EAG. Tutto ciò fa sì che l'antenna sia investita continuamente da un flusso d'aria (0,5 L/min) proveniente da un tubo di acciaio inossidabile di diametro di 8 mm con l'estremità a distanza di 1 cm dall'antenna. L'aria, che viene soffiata sull'organo dell'insetto, è stata preventivamente purificata tramite passaggio su un filtro di carbone attivo e umidificata attraverso una bottiglia di gorgogliamento contenente acqua distillata (figura 3.2.2).

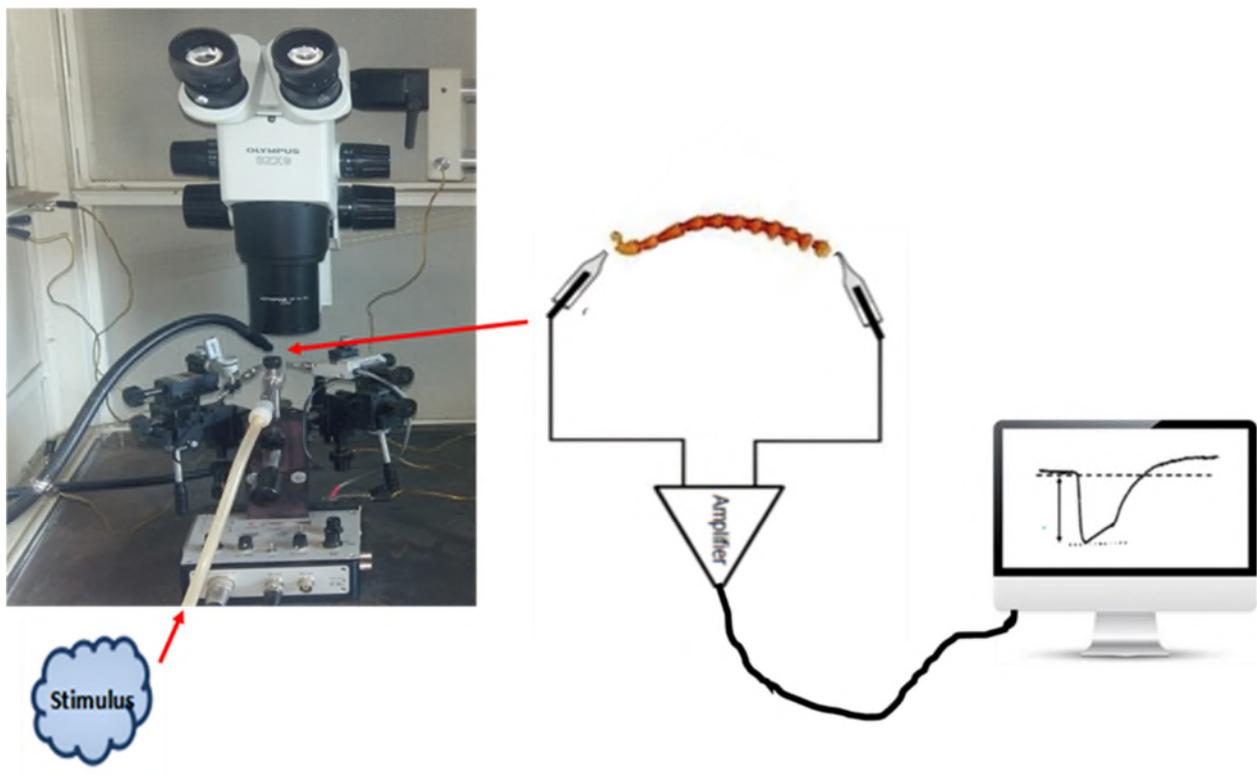


Figura 3.2.2 Schema di funzionamento dell'elettroantennogramma.

Le soluzioni dei diversi composti saggiate a differenti concentrazioni, in quantità di 10  $\mu\text{l}$  e denominate "stimoli", sono state adsorbite su un rettangolo di carta da filtro (1,5  $\text{cm}^2$ ) inserito in una pipetta Pasteur (15 cm di lunghezza) (figura 3.2.3).



Fig. 3.2.3 Pipette Pasteur preparate prima dell'esperimento dove si può notare la presenza, al loro interno, dei diversi "stimoli".

Gli stimoli sono stati aggiunti al flusso d'aria inserendo la punta della pipetta Pasteur in un foro ( $\varnothing$  4 mm) presente a 9 cm dall' uscita del tubo d'acciaio. Qui sono stati iniettati 2,5  $\text{cm}^3$  di aria che passavano automaticamente sulla carta da filtro con velocità per la durata di 1 s. Come stimolo di riferimento è stato utilizzato (Z)-3-esen-1-olo, disciolto in esano in concentrazione 1%, poiché

risultava già elettrofisiologicamente attivo e, inoltre, lo stimolo di controllo (esano) e quello di riferimento sono stati applicati all'inizio e alla fine di ogni registrazione.

È stato necessario sigillare le diverse pipette Pasteur con dei pezzi di parafilm affinché le sostanze su carta da filtro al loro interno non fossero disperse nell'aria. Le diverse soluzioni dei composti saggiati sono state somministrate a gruppi di concentrazioni crescenti a random e lo stimolo di riferimento è stato applicato, inoltre, dopo ogni serie di stimoli aventi la stessa concentrazione, per poter valutare la graduale diminuzione della sensibilità antennale nel tempo.

L'ampiezza della risposta dell'EAG è stata misurata in mV e successivamente è stata corretta per compensare la risposta al solvente e/o artefatti meccanici sensoriali, sottraendo il valore medio dell'esano alle risposte dell'EAG agli stimoli.

L'ampiezza in mV della risposta EAG, a ciascun stimolo saggiato, è stata corretta in base alla riduzione della risposta EAG, al fine di compensare la diminuzione della sensibilità antennale nel corso dell'esperimento. Per ognuno dei quattro composti le risposte EAG sono state ottenute da antenne di maschi estivi e svernanti provenienti dallo stesso pereto utilizzato per le prove all'olfattometro.

### **Analisi dei dati**

Per determinare la significatività delle differenze tra il numero di maschi che hanno scelto il braccio con il composto da saggiare e quello presente nel lato del controllo nell'olfattometro a Y è stato utilizzato il test non parametrico  $\chi^2$  (chi quadro) ( $p < 0,05$ ) (STATISTICA 12, StatSoft). Per valutare le differenze significative delle risposte EAG espresse in mV fra i quattro composti alle varie dosi è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Fisher LSD ( $p < 0,05$ ) per la separazione delle medie (STATISTICA 12, StatSoft).

### **Saggio di confusione sessuale in semicampo (confinato)**

Il saggio di confusione sessuale è stato condotto in condizioni controllate di semicampo (confinato) su una singola foglia di pero. In base ai dati di laboratorio precedentemente ottenuti, si è scelto di concentrare le prove a solo due molecole (15 dimethyleptacosano e 13 methyleptacosano). Il feromone (tabella 3.2.1) veniva rilasciato tramite micropipette da 50  $\mu$ l (Blaubrand© intraMark) inserite all'interno di un tubo (tipo Falcon© da 50 ml). Ogni tubo, quindi, conteneva quattro coppie di adulti di psilla vergini, una singola foglia di pero e una micropipetta monouso contenente il feromone in grado di saturare facilmente l'ambiente circoscritto (figura 3.2.4). Sono state eseguite 8 repliche per il controllo, 13 repliche per il composto 11-15 dimethyleptacosano, 15 repliche per il composto 13 methyleptacosano.

N° repliche	Trattamento	Dose per micropipetta
8	Controllo	/
13	13 methylec	12,5 mg
15	11-15 di-methylec	12,5 µl

Tabella 3.2.1 Progettazione trattamenti saggio di confusione sessuale di laboratorio

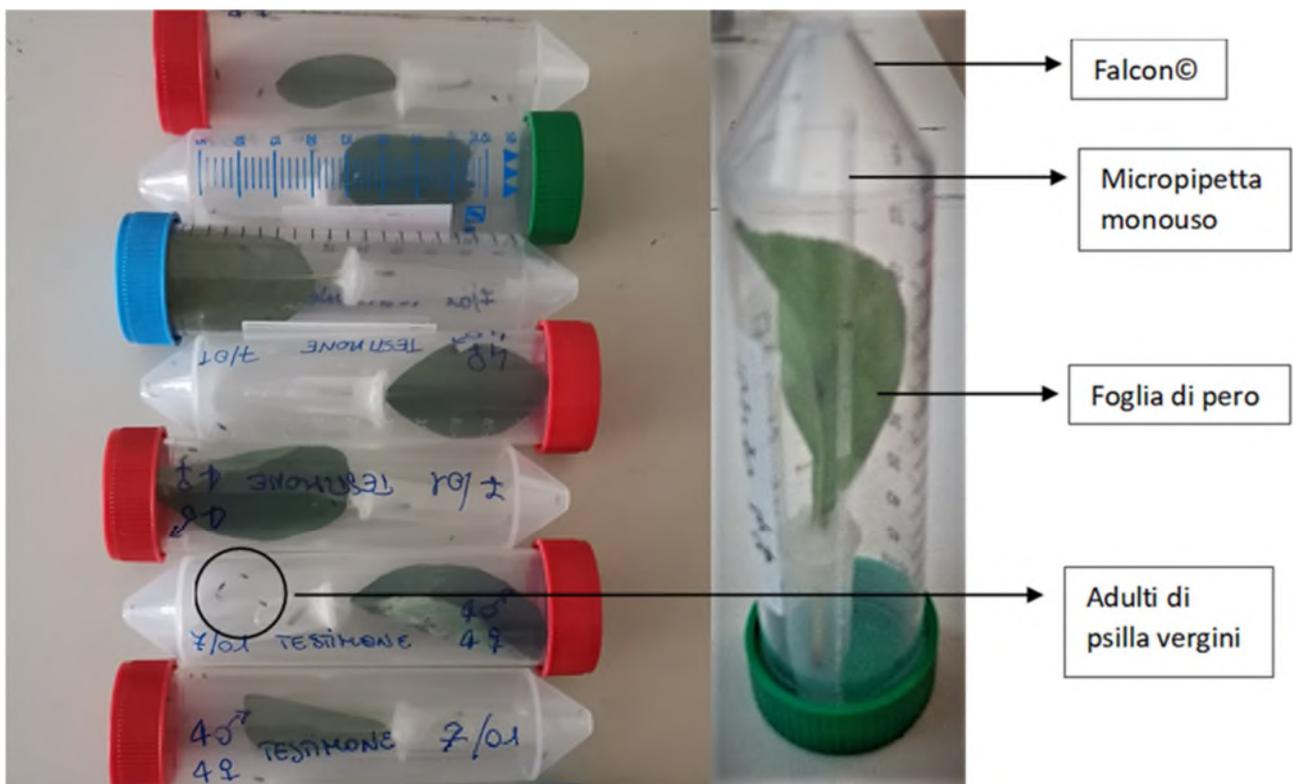


Figura 3.2.4 Tubi tipo Falcon© contenente micropipetta da 50 µl in cui è stato applicata una dose stabilita di feromone, una foglia di pero e quattro coppie di adulti di psilla vergini.

### Saggio di confusione sessuale in semi-campo su piantine micropropagate

Nella seconda fase della sperimentazione i due feromoni sono stati testati in condizioni più simili alla situazione presente in campo aperto lavorando su piantine di pero di circa 30 cm di altezza. I feromoni (tabella 3.2.2) sono stati somministrati attraverso l'utilizzo della Torre di Potter: all'interno di un becher è stata preparata la soluzione composta dalla dose di feromone e dalla relativa quantità di acqua per ottenere la concentrazione desiderata; questa veniva poi mescolata per qualche

minuto prima di essere applicata. Con l'ausilio di una micropipetta da 1000 µl (tipo Gilson) venivano prelevati 2 ml di soluzione (quantità standard di prodotto utilizzata con la Torre di Potter) e nebulizzati direttamente sulle singole piantine di pera micro-propagate (cv William) posizionate alla base della torre. Le singole piantine venivano poi poste all'interno di gabbie BugDorm-4F3074 Insect Rearing Cage (W32.5 x D32.5 x H77.0 cm). All'interno della gabbia venivano subito rilasciate 4 coppie di adulti vergini per ciascuna piantina, per un tempo di 7-10 giorni, al termine del quale veniva effettuato il rilievo del numero di uova deposte dagli adulti per evidenziare se erano stati impediti gli accoppiamenti. Le gabbie sono state inoltre collocate in stanze differenti per evitare ogni tipo di interferenza tra i due feromoni o fra questi ed il controllo (nonostante questi composti idrocarburici siano poco volatili). Questi saggi sono stati condotti in condizioni di temperatura variabile dai 24 ai 28°C e fotoperiodo naturale. In questo test di semicampo state effettuate un numero variabile di repliche (tabella 3.2.2).

	<b>Dose</b>	<b>N. repliche</b>
Testimone	/	18
13 methylec	<b>0,013 µl/ml H<sub>2</sub>O</b>	7
	<b>0,13 µl/ml H<sub>2</sub>O</b>	12
	<b>1,3 µl/ml H<sub>2</sub>O</b>	12
11,15-dimethylec	<b>0,013 µl/ml H<sub>2</sub>O</b>	13
	<b>0,13 µl/ml H<sub>2</sub>O</b>	13
	<b>1,3 µl/ml H<sub>2</sub>O</b>	13

*Tabella 3.2.2 Progettazione trattamenti saggio di confusione sessuale di semicampo.*

### **Saggio di confusione sessuale in campo**

I prodotti feromonici sono stati testati poi in condizioni di campo. Il campo sperimentale è stato allestito in un giovane frutteto (terza foglia) di pera cultivar Santa Maria situato in un'azienda agricola in provincia di Ferrara (figura 3.2.5). La sperimentazione in campo è stata effettuata in corrispondenza delle generazioni estive di psilla sia nell'anno 2022 che nel 2023.

Anno 2022: la prima condizione necessaria allo svolgimento del saggio di confusione sessuale in campo è stata la verifica della presenza dell'emittero nell'area individuata per la sperimentazione. A seguito di diversi rilievi effettuati nel mese di luglio in cui è stata appurata la presenza di psilla attraverso l'identificazione di tracce di melata sulle foglie e di alcuni giovani individui, è stato allestito il campo sperimentale per l'applicazione dei trattamenti; il campo sperimentale comprendeva 4 filari interi (lunghezza filari circa 90 metri, numero piante per filare circa 100). Lo schema sperimentale utilizzato era a blocchi (4 filari) randomizzati con quattro repliche utilizzando parcelle di tre piante (3 m).

A partire dal giorno 2 agosto 2022 ogni 7 giorni è stato effettuato l'applicazione del composto feromonico in soluzione acquosa con l'utilizzo di un semplice spruzzatore a mano. La somministrazione dei trattamenti sulle piante ha proseguito fino alla metà del mese di settembre, per un totale di 7 trattamenti totali. Tuttavia, non è stato possibile effettuare un rilievo dati in quanto, a causa delle condizioni ambientali non favorevoli (piogge abbondanti e temperature sotto la media), al termine della sperimentazione non vi erano tracce del fitofago in tutto il campo sperimentale e nei frutteti limitrofi.

Anno 2023: come per l'anno precedente, in prossimità dell'insorgere della generazione estiva del fitofago, è stato effettuato un rilievo in campo per verificarne la presenza. Appurata questa condizione, è stato allestito il campo sperimentale impostando in modo diverso le parcelle: sono stati interessati sempre 4 filari interi del frutteto, suddividendo questa volta in 4 parcelloni alternati, ottenendo così 2 repliche per ogni trattamento. Il testimone invece era costituito dal restante frutteto adiacente ai parcelloni con feromone. Le applicazioni sono state effettuate con l'utilizzo di un atomizzatore a spalla Stihl 430 SR e con maggior frequenza rispetto all'anno precedente (uno ogni 4 giorni a partire dal 28 aprile fino a metà giugno), con l'intenzione di mantenere l'ambiente in condizione di saturazione.



*Figura 3.2.5 campo sperimentale in un'azienda agricola in provincia di Ferrara.*

### **Analisi dei dati**

Per la valutazione delle differenze significative nei tre diversi saggi di confusione sessuale per i diversi trattamenti (controllo, 13 methyleptacosano, 11,15-dimethylepatcosano), è stata effettuata l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Fisher LSD ( $p < 0,05$ ) per la separazione delle medie (STATISTICA 12, StatSoft).

## **RISULTATI**

### **Saggi biologici con olfattometro**

Nei grafici sottostanti vengono riportati i risultati dei saggi comportamentali dell'olfattometro a Y sia per i maschi svernanti che estivi a tre dosi dei quattro composti: 11,15-dimetileptacosano, 13-metileptacosano, 3-metileptacosano, 2-metileptacosano.

### **Maschi svernanti**

I risultati delle scelte all'olfattometro a Y dei maschi svernanti di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 11,15-dimetileptacosano sono presenti in figura 3.2.6. Per la dose pari a una femmina equivalente ( $N = 37$ ), l'83,8% dei maschi era motivato alla scelta mentre il 16,2% non sceglieva. Tra

gli insetti che hanno effettuato la scelta, il 77,4% sceglieva significativamente il braccio con il feromone rispetto al controllo. Per la dose di 10 femmine equivalenti (N = 55), non vi è invece differenza significativa nella scelta fra feromone e controllo. Per quanto riguarda la dose più elevata pari a 100 femmine equivalenti (N = 55) tutti i maschi hanno effettuato una scelta (100%) e di questi il 63,6% ha scelto in maniera significativa il feromone.

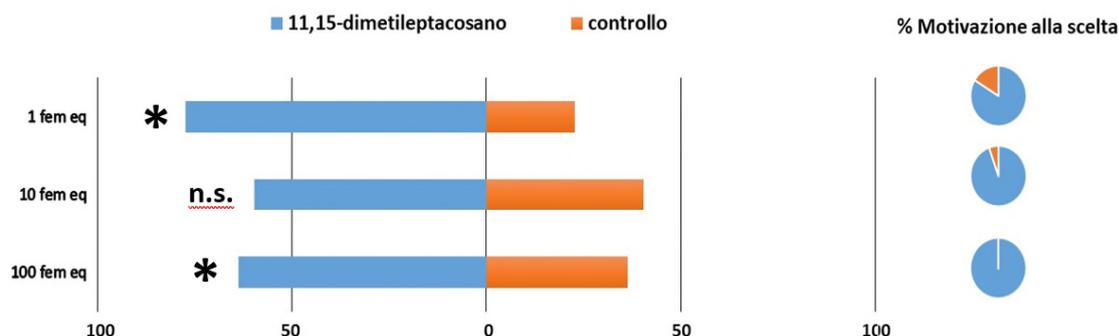


Figura 3.2.6 Risposta olfattiva di maschi della forma svernante di *C. pyri* a dosi crescenti di 11,15-dimetileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

I risultati delle scelte all'olfattometro a Y dei maschi svernanti di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 13-metileptacosano sono presenti in figura 3.2.7. Per la dose pari a una femmina equivalente, tutti gli individui (N = 53) erano motivati ad effettuare la scelta (100%), tuttavia non vi è differenza significativa fra la scelta del braccio con il feromone e il controllo. Simile risultato è stato ottenuto con la dose più elevata pari a 100 femmine equivalenti (N = 59). Risultati statisticamente significativi sono stati ottenuti alla dose equivalente a 10 femmine (N = 48), dove vi è stata una scelta verso il braccio con il feromone dell'80%.

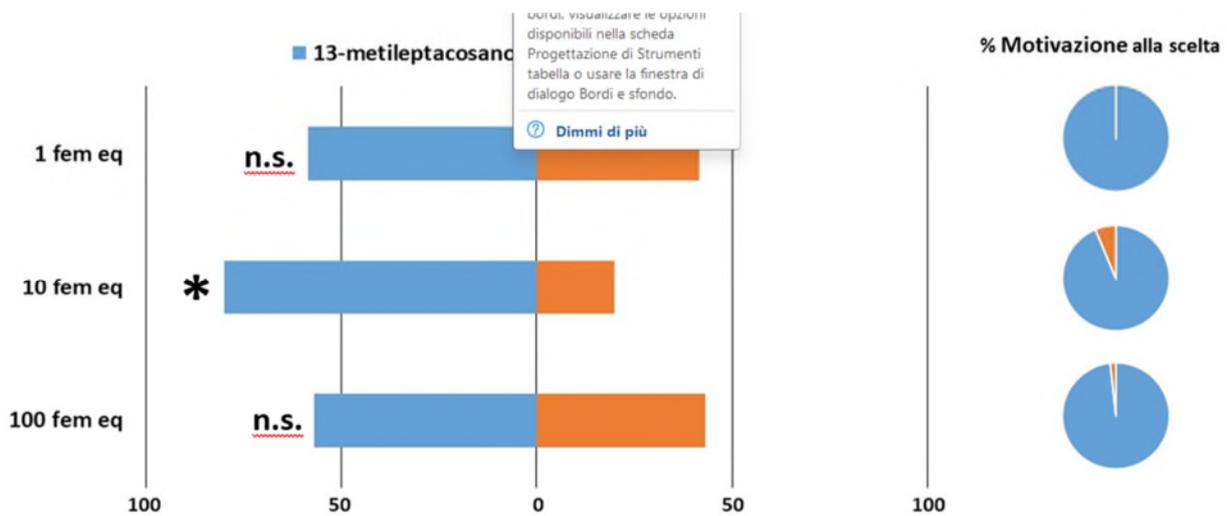


Figura 3.2.7 Risposta olfattiva di maschi della forma svernante di *C. pyri* a dosi crescenti di 13-metileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

I risultati delle scelte all'olfattometro a Y dei maschi svernanti di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 3-metileptacosano sono presenti in figura 3.2.8. Per la dose corrispondente a una femmina equivalente di questo feromone (N = 48), si è avuto il 91,6% di maschi che ha fatto una scelta e l'8,3% che non ha scelto; di quelli che hanno scelto, il 75% ha scelto significativamente il braccio con il feromone. Della dose equivalente a 10 femmine (N = 51), non vi è differenza significativa nella scelta fra i due bracci dell'olfattometro. Infine, per la dose pari a 100 femmine equivalenti (N = 60), si è verificata una scelta del 88,3% e una non scelta del 11,7%. Di quelli che hanno scelto, il 64,2% è andato significativamente verso il braccio con il feromone.

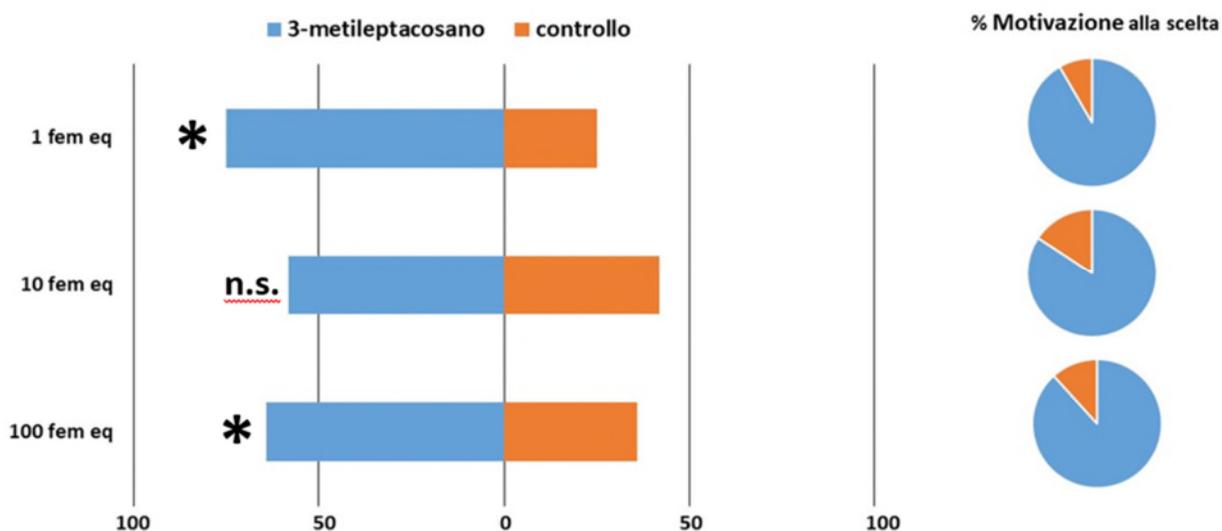


Figura 3.2.8 Risposta olfattiva di maschi della forma svernante di *C. pyri* a dosi crescenti di 3-metileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

I risultati delle scelte all'olfattometro a Y dei maschi svernanti di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 2-metileptacosano sono presenti in figura 3.2.9. Relativamente alla dose di una femmina equivalente (N = 57) si è osservato che l'84,2% di maschi ha effettuato la scelta, tuttavia non vi è stata una preferenza significativa fra i due bracci dell'olfattometro. Della dose equivalente a 10 femmine (N = 48), la scelta è stata pari al 93,7%; dei maschi che hanno scelto, il 75,6% è andato significativamente verso il feromone. Infine, per la dose pari a 100 femmine equivalenti (N = 44), si è osservata una scelta del 97,7%, tuttavia non vi è stata una preferenza significativa fra i due bracci dell'olfattometro.

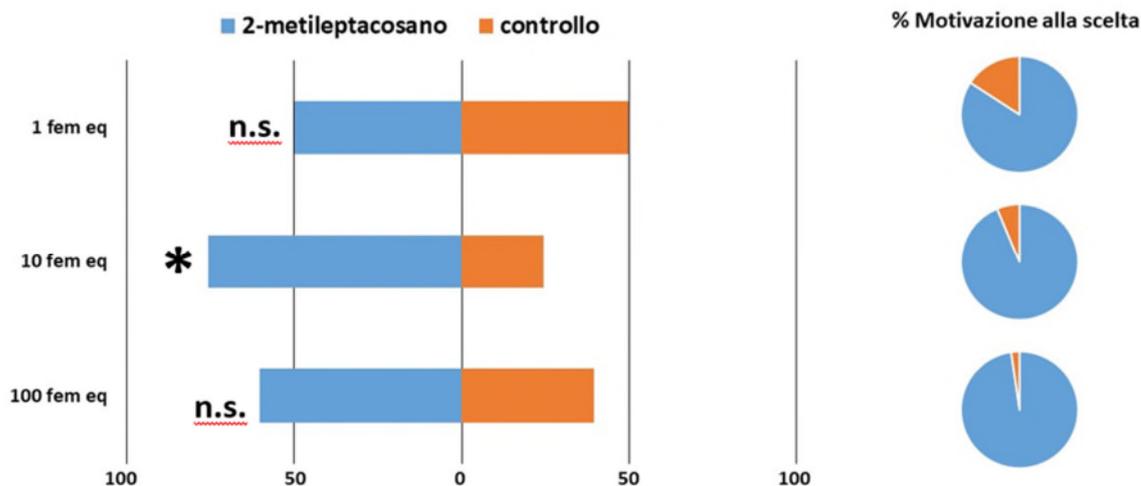


Figura 3.2.9 Risposta olfattiva di maschi della forma svernante di *C. pyri* a dosi crescenti di 2-metileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

### Maschi estivi

I risultati delle scelte dell'olfattometro a Y dei maschi estivi di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 11,15-dimetileptacosano sono presenti in figura 3.2.10. Per la dose pari a una femmina equivalente (N = 50), tutti gli individui erano motivati ad effettuare la scelta (100%), tuttavia non vi è differenza significativa fra la scelta del braccio con il feromone e il controllo. Simile risultato è stato ottenuto per la dose pari a 10 femmine equivalenti (N = 48). Risultati statisticamente significativi sono stati ottenuti alla dose equivalente a 100 femmine (N = 51) dove vi è stata una scelta del 84,3% e una non scelta del 15,7%; degli individui che hanno effettuato una scelta, il 65,1% ha avuto preferenza per il braccio contenente il feromone.

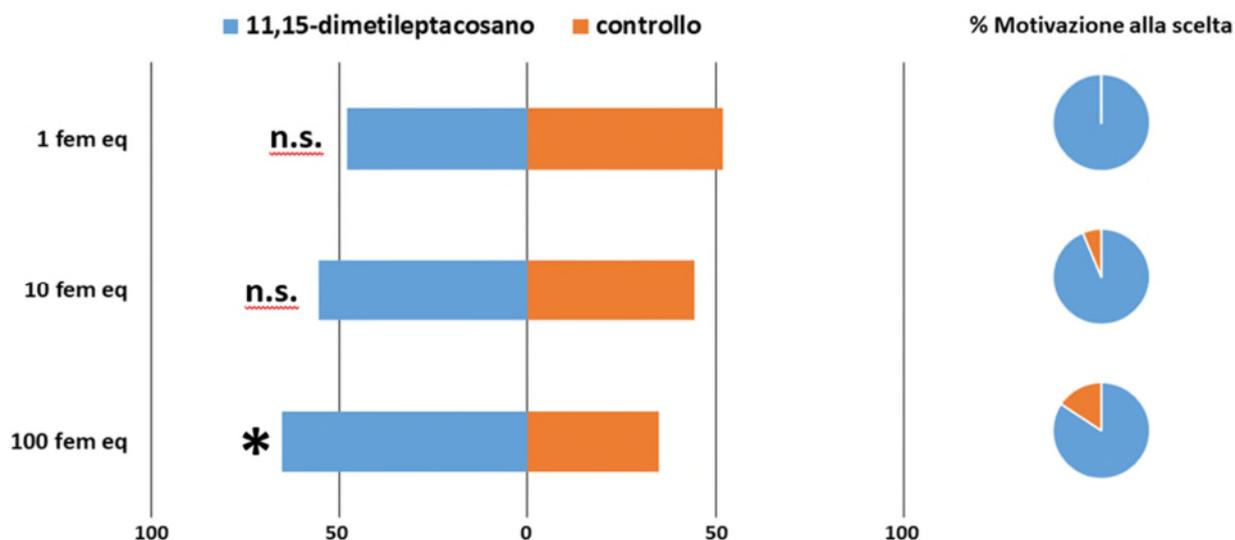


Figura 3.2.10 Risposta olfattiva di maschi della forma estiva di *C. pyri* a dosi crescenti di 11,15-dimetileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

I risultati delle scelte all'olfattometro a Y dei maschi estivi di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 13-metileptacosano sono presenti in figura 3.2.11. Per la dose di una femmina equivalente (N = 48), il 93,8% dei maschi ha effettuato una scelta, tuttavia, non vi è stata una preferenza significativa fra i due bracci dell'olfattometro. Risultati simili sono stati ottenuti sia per la dose pari a 10 femmine equivalenti (N = 49) che per la dose pari a 100 femmine equivalenti (N = 51).

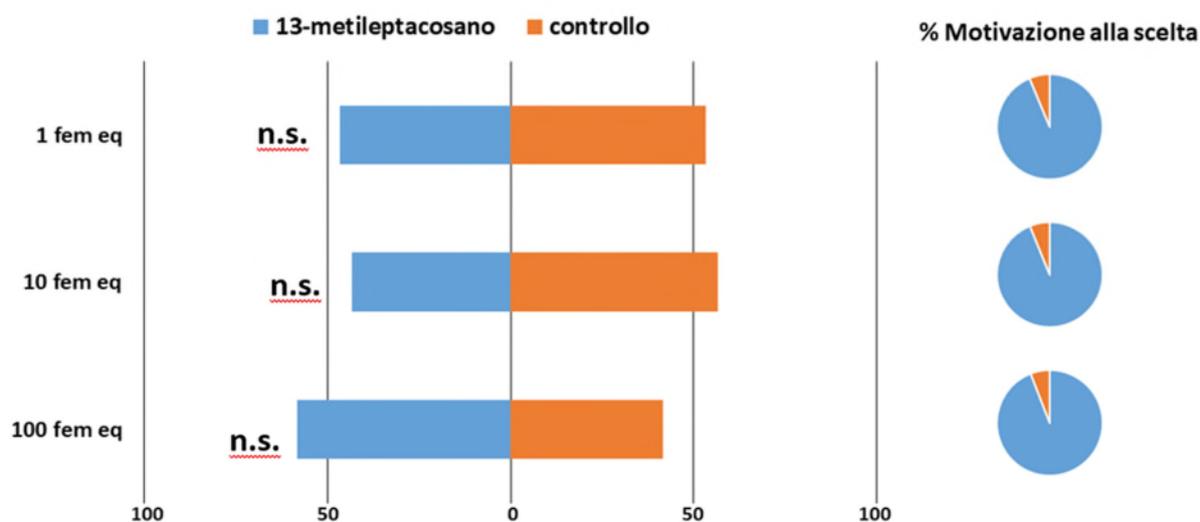


Figura 3.2.11 Risposta olfattiva di maschi della forma estiva di *C. pyri* a dosi crescenti di 13-metileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

I risultati delle scelte all'olfattometro a Y dei maschi estivi di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 3-metileptacosano sono presenti in figura 3.2.12. Relativamente alla dose di una femmina equivalente (N = 47), si è osservato che il 93,6% di individui ha effettuato la scelta, tuttavia non vi è preferenza significativa fra i due bracci dell'olfattometro. Simile risultato è stato ottenuto per la dose pari a 10 femmine equivalenti (N = 52). Risultati statisticamente significativi sono stati ottenuti alla dose equivalente a 100 femmine (N = 51), dove vi è stata una scelta del 92,2%; degli individui che hanno effettuato la scelta, il 70,2% ha avuto preferenza per il braccio contenente il feromone.

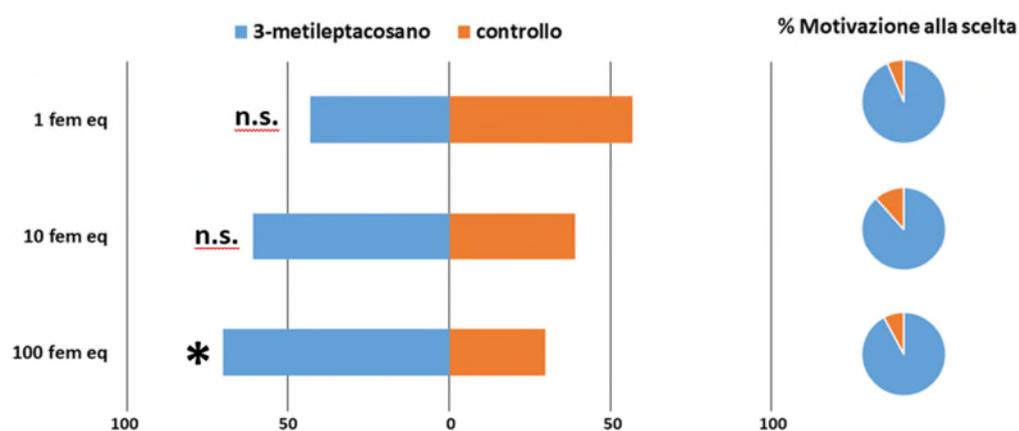


Figura 3.2.12 Risposta olfattiva di maschi della forma estiva di *C. pyri* a dosi crescenti di 3-metileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

I risultati delle scelte all'olfattometro a Y dei maschi estivi di *C. pyri* sottoposti alle tre dosi di feromone 2-metileptacosano sono presenti in figura 3.2.13. Per la dose di una femmina equivalente (N = 48), il 91,7% dei maschi ha effettuato la scelta, tuttavia non vi è differenza significativa fra la scelta del braccio con il feromone e il controllo. Risultato simile è stato ottenuto per la dose pari a 100 femmine equivalenti (N = 50). Risultati statisticamente significativi sono stati ottenuti alla dose equivalente a 10 femmine (N = 50), dove vi è stata una scelta pari all'82% e il 66% degli individui che hanno effettuato la scelta è andato verso il braccio del feromone.

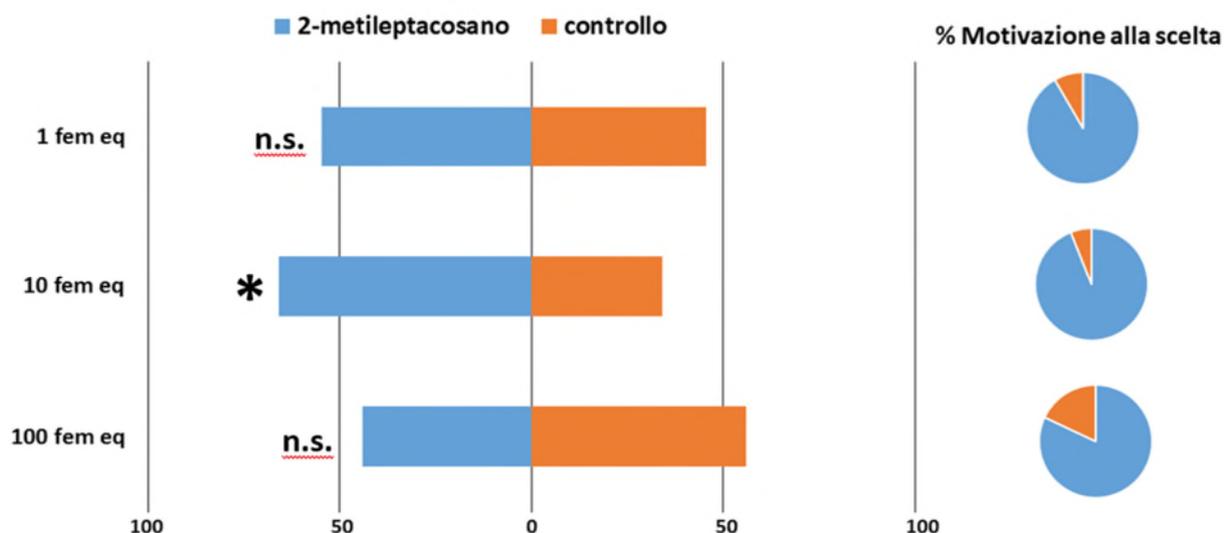


Figura 3.2.13 Risposta olfattiva di maschi della forma estiva di *C. pyri* a dosi crescenti di 2-metileptacosano con olfattometro a Y. Controllo: esano. (\* = differenza significativa;  $p < 0,05$ ; test  $\chi^2$ ).

### Saggi elettrofisiologici con elettroantennogramma

Cinque dosi crescenti (1-16 femmine equivalenti) di ciascun composto sono state utilizzate per calcolare le curve dose-risposta sia dei maschi svernanti (N = 11) che estivi (N = 13) di *C. pyri*. In generale le risposte medie di ogni singolo composto osservate in termini di mV sono abbastanza deboli rispetto al volatile preso come stimolo di riferimento, il (Z)-3-esen-1-olo (circa un ordine di grandezza; dato non mostrato), in particolar modo per i maschi estivi di *C. pyri*.

### Maschi svernanti

Tutti e quattro i composti saggiati sulle antenne di maschio svernante di *C. pyri* hanno “elicitato” risposte EAG, ma solo per alcuni di essi la percezione olfattiva risulta significativamente più elevata: 3-metileptacosano alla dose di 2 femmine equivalenti e il 13-metileptacosano alla dose di 8 femmine equivalenti. Come si può osservare dalle curve dose-risposta EAG, per tutti i composti saggiati l'intensità della risposta aumenta all'aumentare della dose fino a raggiungere un picco per poi decrescere alla dose pari a 16 femmine equivalenti (figura 3.2.14).

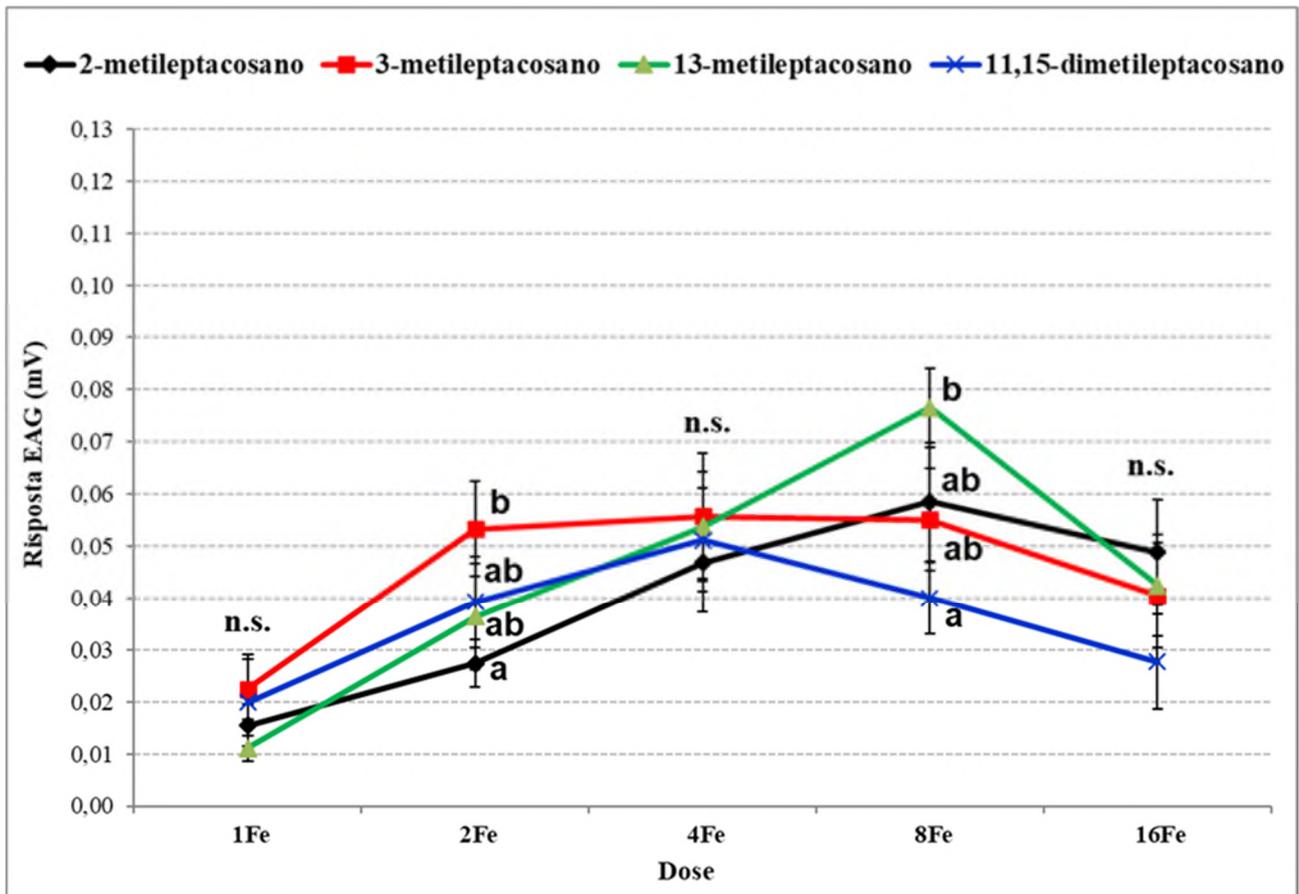


Figura 3.2.14 Risposta EAG espressa in mV per i quattro componenti in maschi svernanti di *C. pyri*. (lettere differenti corrispondono a differenze significative,  $p < 0,05$ ; ANOVA, LSD test).

### Maschi estivi

Tutti e quattro i composti saggiati sulle antenne di maschio estivo di *C. pyri* hanno “elicitato” risposte EAG, ma solo alla dose corrispondente a una femmina equivalente di 13-metileptacosano la percezione olfattiva risulta significativamente più elevata, mentre per tutte le altre dosi non vi è differenza significativa. Come si può osservare dalle curve dose-risposta EAG, per tutti i composti saggiati l'intensità della risposta aumenta all'aumentare della dose fino a raggiungere un picco per poi decrescere alla dose pari a 16 femmine equivalenti (figura 3.2.15).

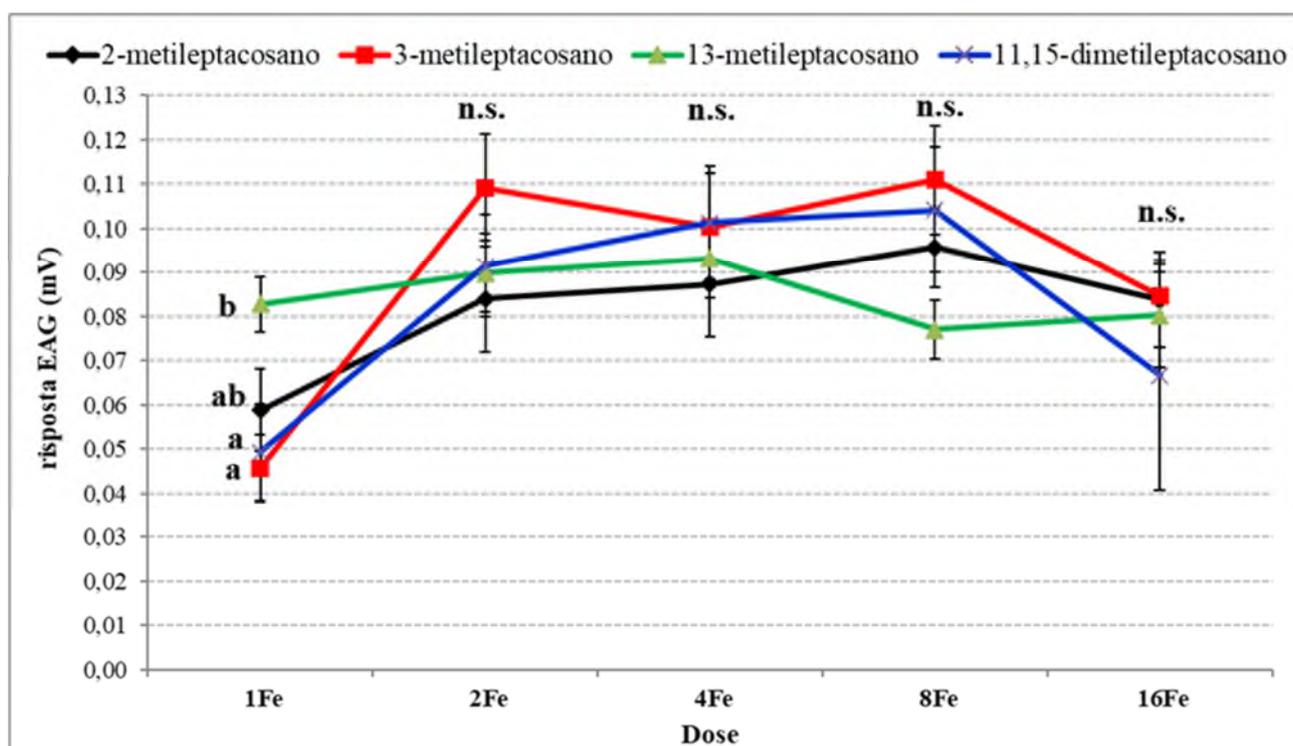


Figura 3.2.15 Risposta EAG espressa in mV per i quattro componenti in maschi estivi di *C. pyri*. (lettere differenti corrispondono a differenze significative,  $p < 0,05$ ; ANOVA, LSD test).

### Risultati del saggio di confusione sessuale in semicampo (confinato)

I risultati del saggio di confusione sessuale in semicampo confinato corrispondono al numero conteggiato di uova sulla foglia di pera posta all'interno del tubo tipo Falcon® dopo un tempo di circa 7-10 giorni. Per ciascun trattamento (controllo, 13 methyleptacosano e 11,15-dimethyleptacosano) è stato effettuato il calcolo delle medie e relative deviazione standard, sulla base del quale è stato calcolata l'incertezza dei dati. È stato svolto il test LSD Fischer post-hoc per separazione medie (test ANOVA a una via) per l'interpretazione statistica dei dati biologici e per testare le differenze tra le medie campionarie: come si può notare anche dal grafico a barre, il test statistico con  $p$ value  $< 0,001$  ha mostrato un differenza altamente significativa tra il controllo e i trattamenti con i due composti idrocarburici. Diversamente invece, il test statistico non ha mostrato differenze significative nell'attività di confusione sessuale tra il composto ad attività feromonica 13 methyleptacosano e 11,15 dimethyleptacosano.

TRATTAMENTO	N.repliche	Medie	P<0,05
Controllo	8	27,88±8,9	<b>a</b>
13 methylEC	15	5,00±3,02	<b>b</b>
11,15-dimethylEC	13	1,08±0.80	<b>b</b>

Tabella 3.2.3 Risultati trattamenti saggio di confusione sessuale in semicampo confinato.

### Risultati del saggio di confusione sessuale di semi-campo su piantine

Nella tabella 3.2.4 sono rappresentati i risultati del saggio di confusione sessuale di semi-campo, in cui i valori indicati corrispondono al rapporto tra il numero di individui di psilla femmina, sul numero di uova sommate al numero di individui giovani rilevati sulle piantine micro-propagate poste all'interno delle gabbie BugDorm dopo circa una settimana. Il numero di repliche molto variabile è dovuto, oltre alla difficoltà sopra descritta nel reperire un numero sufficiente di individui adulti vergini, anche al fatto che le repliche in cui venivano rilevate uova ma non erano presenti adulti di psilla sia femmine che maschi, non sono state considerate valide a fini della sperimentazione.

	Contr ollo	13 methylEC 0,013 µl/ml	13 methylEC 0,13 µl/ml	13 methylEC 1,3 µl/ml	11,15- dimethylEC 0,013 µl/ml	11,15- dimethylEC 0,13 µl/ml	11,15- dimethylEC 1,3 µl/ml
MEDI A	32,18	17,76	43,45	31,38	32,99	26,93	24,70
ES	9,28	7,82	12,36	7,78	6,59	4,99	3,92
n	18	7	12	12	13	13	13

Tabella 3.2.4 Risultati saggio di confusione sessuale di semi-campo: numero di uova per femmina per ciascuna piantina all'interno della gabbia dopo 7 giorni. ns= non significativo.

Come si può notare dalla tabella 3.2.4, sulle piantine sottoposte ai vari trattamenti (feromoni a diverse concentrazioni) sono state riscontrate un numero considerevole di uova. Infatti, lo svolgimento del test statistico per l'analisi delle differenze tra le medie ha evidenziato come non vi siano differenze significative sia tra il controllo e i prodotti idrocarburici, che tra le diverse dosi del feromone.

### Risultati del saggio di confusione sessuale di campo

Come già anticipato, la sperimentazione per il saggio di confusione sessuale svolta nell'anno 2022 non ha permesso la raccolta e la successiva analisi dei dati in quanto, al momento del rilievo, il fitofago non era presente nel frutteto. Diversamente invece, la sperimentazione ripetuta nell'anno 2023, ha permesso la raccolta dei dati: come si può notare dalla tabella 3.2.5 è stato effettuato il rilievo del numero di uova presenti su una quantità variabile di germogli per ogni parcella. Per ciascuna replica è stato calcolato il numero medio di uova di fitofago ed è stata effettuata l'analisi dei dati medi e relativi errori standard.

	N°repliche	MEDIA
Testimone	1	1,52
13 methylec	2	3,48±0,85
11,15-dimethylec	2	4,32±2,3

*Tabella 3.2.5 Risultati della prova di campo 2023: numero di uova per germoglio.*

Il saggio di confusione sessuale di campo realizzato nel 2023 non ha restituito un riscontro positivo per lo scopo della sperimentazione: come si può infatti notare dalla tabella 3.2.5 è stata rilevata una maggiore concentrazione di uova di psilla sui germogli delle piante di pero destinate alle parcelle trattate con i due prodotti a base idrocarbura.

## Fase 2

Nella seconda fase è stata valutata l'efficacia di microvibrazioni prodotte artificialmente da sole o in combinazione con diverse dosi di feromoni sia in semicampo che in campo. Queste vibrazioni dovrebbero camuffare quelle emesse dalla femmina impedendo l'accoppiamento tra i sessi.

Queste microvibrazioni sono ripetute in "loop" da un microvibratore che riproduce in play-back gli specifici segnali emessi dalla femmina, preregistrati.

## MATERIALI E METODI

### Saggio di confusione sessuale in semi-campo su piantine micropropagate

I saggi di confusione sessuale con microvibrazioni da sole o con i feromoni sessuali sono stati svolti in semicampo con l'utilizzo di "mini shaker" Tipo TREMOS (Biogard srl). Questi minishaker sono stati collegati al fusticino delle piantine di pero analoghe a quelle descritte nelle prove della fase 1 (Saggio di confusione sessuale in semi-campo su piantine micropropagate). Parallelamente i minishaker sono stati anche combinati a piantine trattate con i feromoni descritti sempre nella fase 1 (Saggio di confusione sessuale in semi-campo su piantine micropropagate) usati alla massima concentrazione distribuita.

	Dose	N. repliche
Mini-shaker	/	4
Mini-shaker + 13 methylEC	1,3 µl/ml H <sub>2</sub> O	3
Mini-shaker + 11,15-dimethylEC	1,3 µl/ml H <sub>2</sub> O	3

Tabella 3.2.6 Saggio di confusione sessuale mediante vibrazioni con e senza feromoni in semicampo

### Saggio di confusione sessuale in campo

I saggi di confusione sessuale con microvibrazioni sono stati svolti in campo sia da soli che affiancati a quelli con feromoni studiati nella fase 1 (Saggio di confusione sessuale in campo).

Prova del 2021: nel campo di prova dell’Az Rizzati nel Comune di Copparo è stato svolto solo un test vibrazionale preliminare, posizionando i mini-shaker sui fili di sostegno delle piante in due blocchi (due filari ognuno). Un blocco nelle vicinanze è stato preso come controllo senza vibrazione.

Prova del 2022: nel campo di prova dell’Az Rizzati nel Comune di Copparo (FE), oltre alle parcelle trattate con i diversi feromoni (Fase 1) su due blocchi (filari) sono stati posizionati i mini-shaker sui fili di sostegno delle piante. Ciascun blocco era diviso in 5 parcelle trattate con e senza i feromoni (come nella fase 1).

Prova del 2023: nel campo di prova dell’Az. Tamisari, Località Gualdo (FE), oltre ai 4 parcelloni trattati solo con i due feromoni (Fase 1) altri due parcelloni identici erano dotati di mini-shaker per le vibrazioni.

## RISULTATI

### Risultati del saggio di confusione sessuale di semi-campo

Come si può notare dalla tabella 3.2.7 non si osserva una diminuzione significativa nel numero di uova deposte aggiungendo le vibrazioni con o senza i due feromoni.

	Mini-shaker	Mini-shaker + 13 methyleC 1,3 µl/ml	Mini-shaker + 11,15 dimethyleC 1,3 µl/ml
MEDIA	35,08 ns	24,94 ns	57,33 ns
ES	10,71	2,23	21,20
n. repliche	4	3	3

*Tabella 3.2.7 Risultati saggio di confusione sessuale di semi-campo con vibrazioni con o senza feromoni: numero di uova per femmina per ciascuna piantina all’interno della gabbia dopo 7 giorni. ns= non significativo.*

### Risultati del saggio di confusione sessuale di campo

La sperimentazione per il saggio preliminare di confusione sessuale svolta nell’anno 2021 solo con microvibratori non ha permesso la raccolta e la successiva analisi dei dati a causa del declino naturale stagionale della popolazione di psilla, anche a causa delle condizioni climatiche non

favorevoli allo sviluppo del fitofago. La capannina meteorologica posizionata in azienda ha infatti raccolto i dati mostrati in Figura 3.2.16.

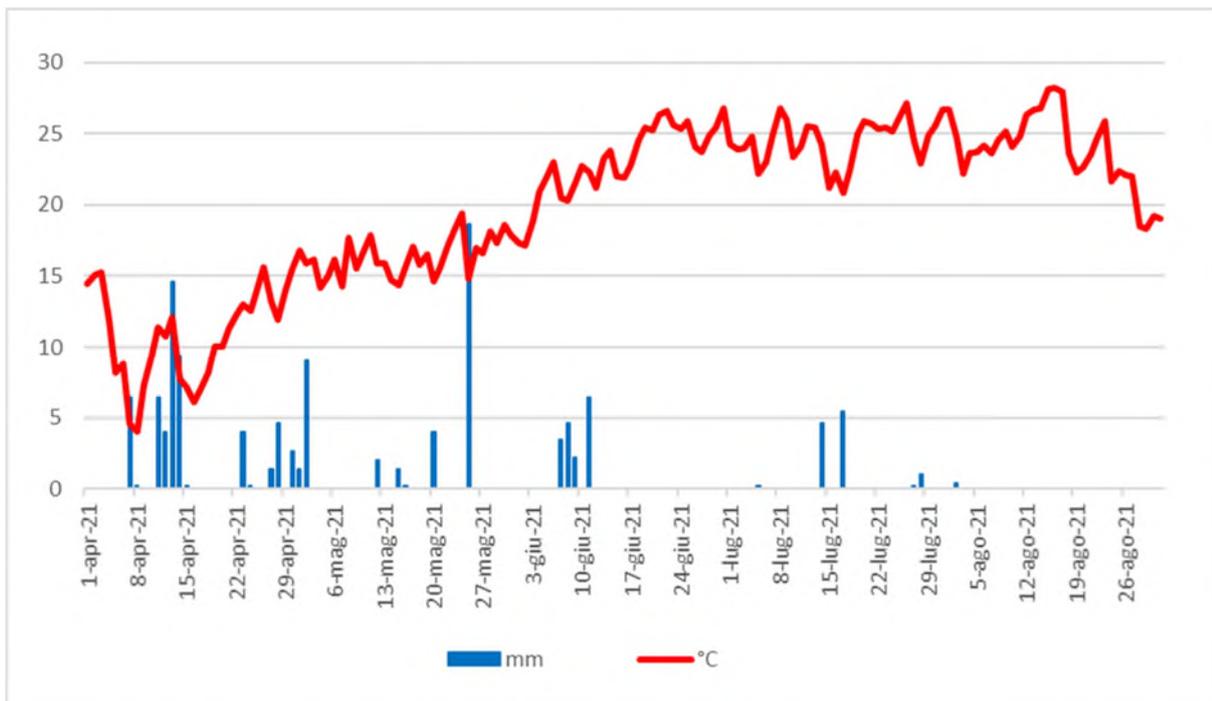


Figura 3.2.16 - Dati meteo capannina Azienda Rizzati 2021

Analogamente la sperimentazione svolta nell'anno 2022 mediante l'utilizzo sia di microvibrazioni da sole che accoppiate ai feromoni sessuali studiati nella Fase 1 non ha consentito di raccogliere dati significativi come evidenziato dalla analisi dei dati, a causa delle condizioni metereologiche con elevate temperature, che non hanno favorito il fitofago determinando un rapido declino della popolazione di psilla a poche unità nel stagione estiva. La capannina meteorologica posizionata in azienda ha infatti raccolto i dati che sono mostrati in Figura 3.2.17.

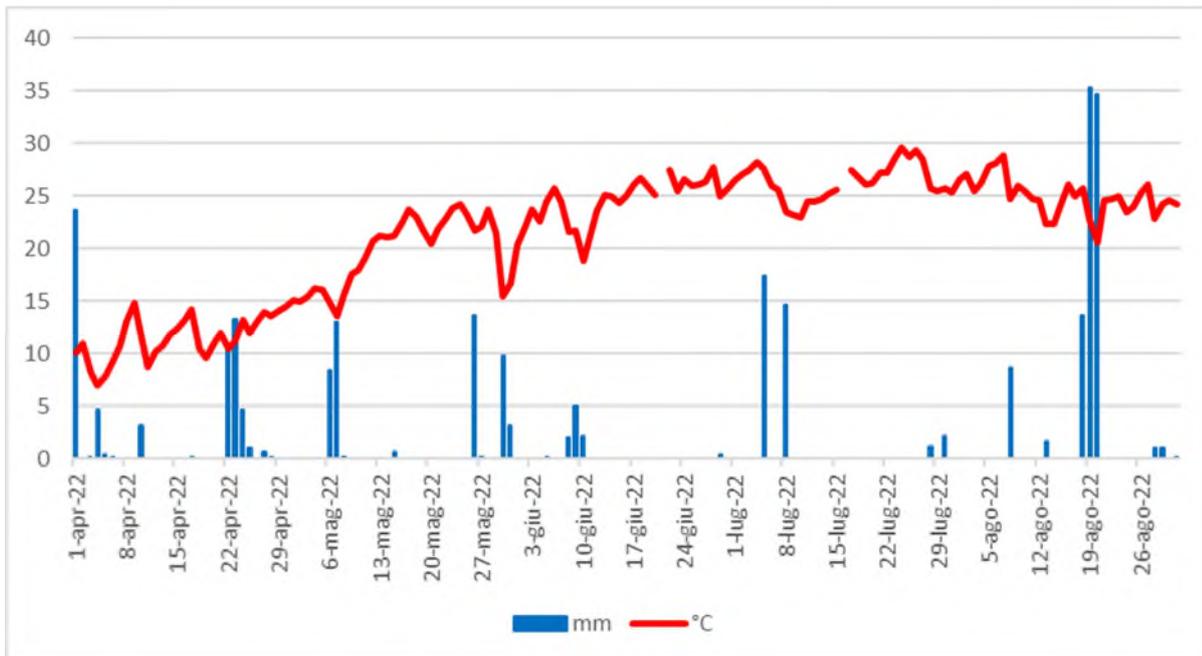


Figura 3.2.17 - Dati meteo capannina Azienda Rizzati 2022

La sperimentazione ripetuta nell'anno 2023 è stata svolta in un'altra azienda (Az Tamisari) perché l'Azienda Rizzati ha espianato l'intero frutteto. Questa nuova prova in presenza di un'elevata popolazione del fitofago (tabella 3.2.8) non ha evidenziato una riduzione nel numero di uova presenti sui germogli per ogni parcellone sia utilizzando le sole vibrazioni (confrontate con il testimone puro della Fase 1) che aggiungendo a queste i due feromoni (tabella 3.2.8).

	N° repliche	MEDIA
Mini-shaker	1	2,11
Mini-shaker + 13 methyleC	1	2,98
Mini-shaker + 11,15-dimethyleC	1	3,12

Tabella 3.2.8 Risultati saggio di confusione sessuale di semi-campo con vibrazioni con o senza feromoni.

## CONCLUSIONI COMPLESSIVE

Nella prima fase condotta in laboratorio emerge che le quattro sostanze volatili identificate in precedenti lavori nella cuticola di *Cacopsylla pyri* (Ganassi et al., 2018) rivestono un ruolo utile nell'attrazione dei maschi di questa specie, nonostante i valori evocati all'EAG e le scelte osservate all'olfattometro a Y non siano particolarmente elevate. Emerge come questi composti siano leggermente più attivi verso gli adulti svernanti di *C. pyri* rispetto a quelli estivi. Questa osservazione è stata riscontrata sia all'olfattometro (maggior motivazione e maggior scelta in generale per i quattro componenti) che all'elettroantennogramma. Dalle indagini elettrofisiologiche, si osserva che alla dose di 16 femmine equivalenti i sensilli antennali sono saturati e questo può dare qualche indicazione sulla tecnica di confusione sessuale. Le analisi olfattometriche non hanno permesso di capire se, aumentando le dosi dei feromoni, i maschi venivano confusi.

La sperimentazione è proseguita poi con prove di confusione sessuale svolte in semi-campo e campo. In particolare, è stata quindi esaminata la dose di prodotto in grado di saturare i diversi ambienti di lavoro in cui si operava: in ambiente confinato, più facilmente saturabile, su piantine in vaso e in pieno campo.

I risultati del saggio di confusione sessuale in semi-campo confinato hanno indicato che due molecole delle quattro testate (13 methyleC e 11,15-dimethyleC) sono in grado di indurre

confusione sessuale sul fitofago. Tuttavia, il proseguimento della sperimentazione attraverso i saggi di confusione sessuale su piantine intere in semi-campo e in pieno campo non ha confermato questo risultato preliminare. La modalità e la dose di rilascio per queste due tipologie di saggio sono state valutate sulla base di una possibile applicazione in campo, per cui le sostanze sono state poste in soluzione acquosa per permetterne la distribuzione tramite le normali attrezzature agricole e le quantità di feromone testate sono state stabilite in modo da essere economicamente applicabili per unità di superficie.

Le prove svolte nella seconda fase, in semi-campo e campo, hanno comportato l'applicazione dei due feromoni, alla massima concentrazione testata, combinata con delle vibrazioni specifiche della femmina. I risultati della sperimentazione di semi-campo e di campo non sono risultati efficaci per l'impedimento dell'accoppiamento del fitofago, per cui sembrerebbe che tra i diversi segnali di comunicazione coesistenti individuati da precedenti lavori bibliografici per la localizzazione del partner, quelli chimici e acustici non siano esclusivi rispetto agli stimoli visivi. Il ruolo degli stimoli visivi, che al momento risulta essere uno degli aspetti meno conosciuti tra gli eventi che permettono l'incontro tra i due sessi, non è stato preso in considerazione in questa sperimentazione per cui sarà necessario approfondire la funzione visiva nella strategia multimodale di accoppiamento delle psille: se le indagini successive evidenzieranno che anche la vista è sostanzialmente coinvolta nelle fasi pre-accoppiamento, l'utilizzo di feromoni e microvibratori per effettuare una strategia di confusione sessuale per *Cacopsylla pyri* non sarà possibile.

Attualmente una tecnica che utilizzi una formulazione di feromone sessuale (probabilmente spray) con dosi e intervalli di applicazione validate utilizzabili nella gestione della difesa fitoiatrica dall'agricoltore in sostituzione degli insetticidi specifici a breve non più utilizzabili non è ancora pienamente sviluppata. Nuove prove potranno essere svolte utilizzando concentrazioni di feromoni anche 10 volte maggiori. L'utilizzo delle vibrazioni probabilmente non è tecnicamente praticabile visto lo scarso effetto osservato in diverse prove.

### SOTTO-AZIONE 3.3 – LA BIODIVERSITÀ DEL SISTEMA VITICOLO COME STRUMENTO DI PREVENZIONE DELLE RESISTENZE

Uar: UCSC

L'attività è stata finalizzata a valutare l'effetto di specifici inerbimenti per il contenimento delle infezioni di peronospora della vite

#### MATERIALI E METODI

Le prove di campo sono state realizzate nelle aziende situate nei comuni di Piacenza (Vigneto Gasparini, Campus UCSC), Castell'Arquato (PC), Ziano Piacentino (PC), Vigolzone (PC), Lugo (RA), Conselice (RA) e Bagnacavallo (RA) nelle annate 2021, 2022, 2023 (Mappa 1).



**Mappa 1.** Ubicazione delle aziende che hanno partecipato alla sperimentazione nelle stagioni 2021, 2022 e 2023.

Le prove sono state realizzate secondo la modalità *on farm*, ovvero seminando grandi parcelloni che sono stati poi gestiti secondo le modalità aziendali per potature, concimazioni, e irrigazioni. La difesa è stata sempre gestita dall'azienda secondo un protocollo biologico (ovvero trattamenti con rame e zolfo): ove possibile, la calendarizzazione dei trattamenti è stata fatta sulla base dei modelli previsionali, altrimenti la gestione aziendale ha previsto un trattamento in meno, nella fase iniziale della stagione (ovvero quando la presenza dell'inerbimento può svolgere un ruolo importante), nel parcellone inerbito rispetto al confronto aziendale. Le prove sono state visitate durante la stagione e sono stati condotti monitoraggi visivi per la presenza di malattia (incidenza e gravità) e il generale andamento dell'apezzamento. Le semine sono state realizzate con l'impiego di miscugli di loietto, orzo, lupinella e trifoglio in autunno oppure con un secondo miscuglio di veccia e senape in primavera (Fig. 1).



*Figura 1. Semine autunnali realizzate con miscuglio di loietto, lupinella e trifoglio (sulla sinistra). Sulla destra alcune immagini dell'uscita dall'inverno degli inerbimenti e semine primaverili nel campus di UCSC (sulla destra).*

Nelle prove *on farm* gli inerbimenti sono spesso stati gestiti dall'azienda a file alterne, specialmente nelle zone di viticoltura collinare della provincia di Piacenza, così da non compromettere la transitabilità all'interno del vigneto per l'esecuzione delle necessarie attività di gestione dello stesso (Fig. 2). La terminazione degli inerbimenti è stata lasciata a libera discrezione dei viticoltori che, nella totalità dei casi, hanno optato per un sovescio, ovvero sfalcio e interrimento per apportare sostanza organica al terreno (Fig. 3).



*Figura 2. Un bell'esempio di inerbimento controllato, con semina primaverile di veccia e senape, gestito a filari alterni (sulla sinistra) presso l'azienda Res Uvae di Castell'Arquato (PC). Sulla sinistra è possibile vedere la terminazione del sovescio a metà giugno con sfalcio e interrimento mediante fresatura della massa vegetale (sulla destra).*

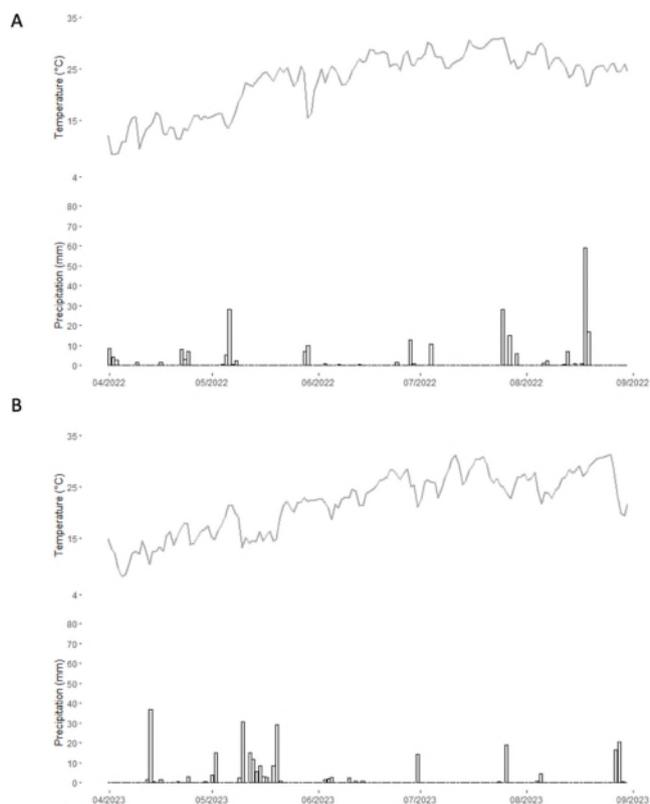


*Figura 3. Sovescio autunnale con miscuglio di graminacee e leguminose il 19 maggio 2022 presso l'azienda Res Uvae di Castell'Arquato (PC). Il momento della fioritura degli inerbimenti rappresenta, di norma, il momento ideale per la trinciatura e interrimento dei residui (in caso di sovescio).*

### **Andamento meteorologico e della pressione di malattia**

#### Vigneto sperimentale del Campus di Piacenza (2022-2023)

A Piacenza nell'annata 2022 la temperatura media stagionale è stata di 22,7 °C e le precipitazioni totali sono state pari a 257,2 mm. Le precipitazioni maggiori si sono registrate nel mese di Maggio (53,8 mm) e nei mesi estivi di Luglio (60 mm) e Agosto (89,4 mm), in particolare nel mese di Agosto si è verificata una forte precipitazione in un'unica giornata di circa 59,2 mm (Fig. 4A). Nell'annata 2023, la temperatura media è stata di 21,8 °C, con precipitazioni totali di 270,5 mm, superiori rispetto all'annata precedente. Le precipitazioni maggiori si sono verificate nel mese di Maggio raggiungendo un totale di 137,6 mm (Fig. 4B).



*Figura 4. Condizioni meteo rilevate presso la località di Piacenza (Gasparini, vigneto sperimentale dell'Università Cattolica del Sacro Cuore). I valori riportati indicano la temperatura media giornaliera (°C) (linea continua) e le precipitazioni giornaliere (mm) (barre) dal 1 aprile al 31 agosto 2022 (A) e 2023 (B).*

Nel vigneto di Piacenza nel 2022 il germogliamento è iniziato circa il 20 aprile, le prime piogge che hanno portato all'inizio dell'epidemia stagionale si sono verificate dall'inizio di maggio, in prossimità della fioritura (Fig. 5). A Piacenza la fioritura è iniziata a metà maggio e si è conclusa con l'allegagione a fine maggio, in concomitanza di eventi piovosi che han favorito l'aumento della pressione di malattia. Nel mese di giugno le piogge sono state modeste, con un principale temporale a fine mese, queste han portato a leggeri aumenti della pressione di malattia, dall'altra parte il mese di luglio è stato piuttosto piovoso, con le maggiori precipitazioni a fine mese, contribuendo all'aumento della pressione di malattia, che ha raggiunto il massimo a fine luglio con un valore di 22 (Fig. 5).

Nel 2023, il germogliamento è iniziato a metà aprile, le prime piogge potenzialmente infettanti si sono invece verificate più avanti nella stagione, intorno alla prima decade di maggio. Il mese di maggio è stato particolarmente piovoso, portando a un lineare aumento della pressione della malattia, durante l'intero mese. La fioritura è iniziata circa il 20 maggio e terminata con l'allegagione nei primi giorni di giugno. I mesi di giugno e luglio complessivamente non sono stati particolarmente piovosi; tuttavia, le modeste precipitazioni sparse durante i mesi hanno aumentato ulteriormente la pressione di malattia fino a un valore massimo di 45,4, raggiunto fra la fine di luglio e inizio di agosto (Fig. 5).

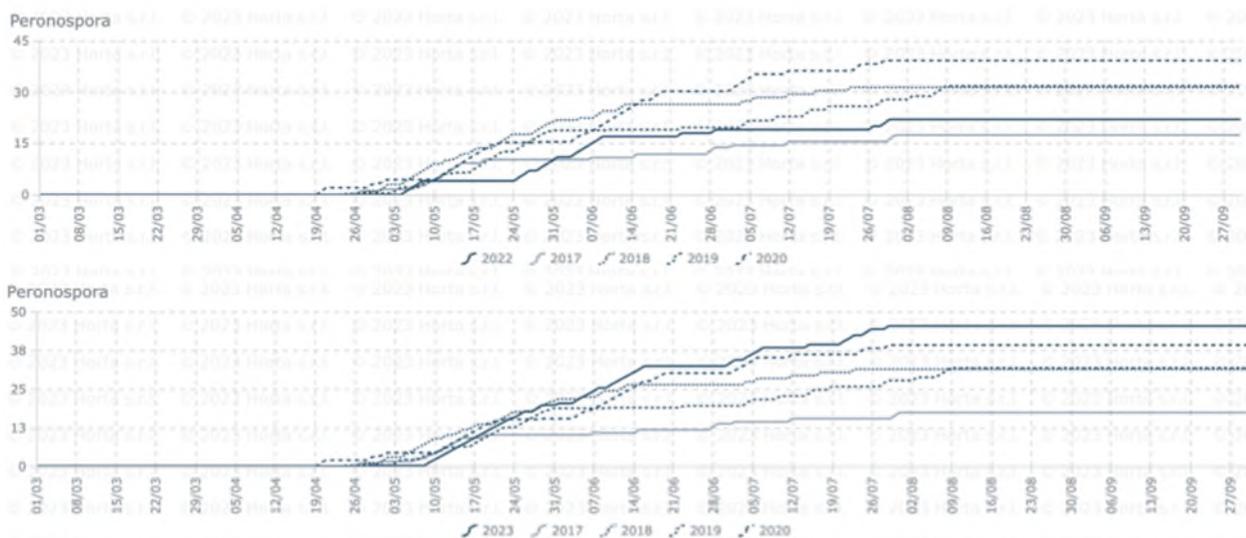
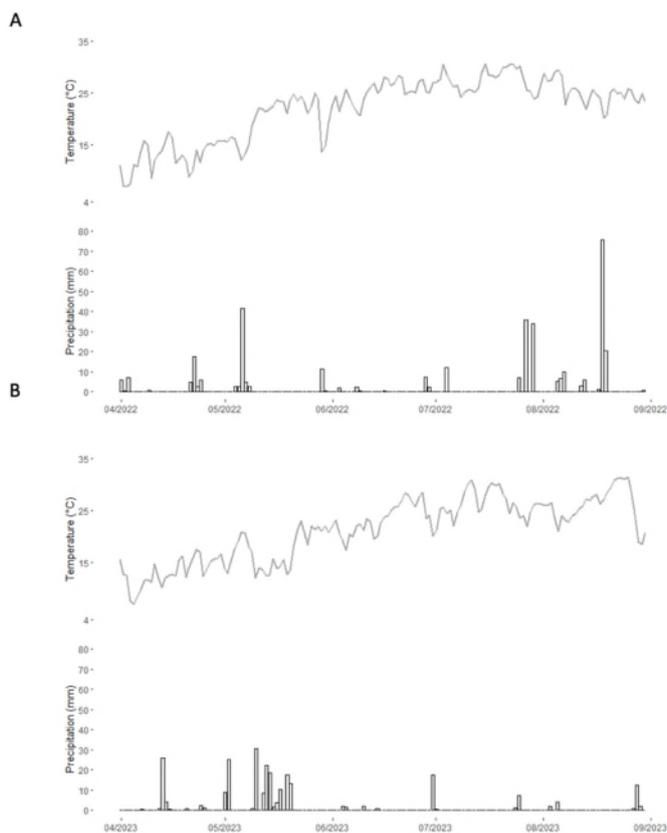


Figura 5. Andamento stagionale della pressione infettiva nel 2022 (sopra) e nel 2023 (sotto) calcolata sui dati della stazione meteorologica del campus di Piacenza. L'indice di pressione infettiva rappresenta un'integrazione delle infezioni primarie e secondarie simulate dai modelli previsionali di vite.net®.

#### Azienda Res Uvae di Castell'Arquato (PC) (2022-2023)

A Castell'Arquato (PC) nell'annata 2022 la temperatura media è stata di 22,1 °C, e le precipitazioni sono state molto abbondanti per un totale di 344,8 mm, in particolare le precipitazioni maggiori si sono verificate in Maggio (66,6 mm), Luglio (89 mm) e Agosto (129 mm) con temporali intensi fra Luglio e Agosto dove in singole giornate si sono registrate precipitazioni dai 33 mm fino a 75 mm (Fig. 6A). Nel 2023, la temperatura media è stata di 21,2°C con un totale di precipitazioni di 252,3 mm, con particolare frequenza di piogge concentrate nel mese di Maggio (162 mm) (Fig. 6B).



*Figura 6. Condizioni meteo rilevate presso la località di Castell'Arquato (Azienda Res Uvae). I valori riportati indicano la temperatura media giornaliera (°C) (linea continua) e le precipitazioni giornaliere (mm) (barre) dal 1 aprile al 31 agosto 2022 (A) e 2022 (B).*

Nel vigneto di Castell'Arquato nel 2022 il germogliamento è stato osservato nella metà del mese di aprile in concomitanza dei principali eventi piovosi, che hanno dato il via all'epidemia stagionale (Fig.7). La fioritura è iniziata nell'ultima decade di maggio e terminata con la allegagione nella prima settimana di giugno, i mesi di maggio e giugno sono stati piuttosto caldi e secchi, con un principale evento piovoso alla fine del mese di maggio. L'andamento secco e caldo non ha favorito lo sviluppo dell'epidemia; infatti, la pressione di malattia ha raggiunto un valore massimo di 6 all'inizio di agosto.

Nel 2023, il germogliamento è iniziato a fine marzo, e poiché il mese di aprile è stato caratterizzato da piogge modeste e temperature medie inferiori all'anno precedente, l'epidemia non è iniziata fino alla prima decade di maggio. Il mese di maggio è stato caratterizzato da frequenti piogge, concentrate nella seconda decade di maggio, che hanno dato il via all'epidemia stagionale prima della fase di fioritura (Fig. 7), che è iniziata nella terza decade di maggio e terminata con l'allegagione nella prima decade di giugno. I mesi di giugno e luglio sono stati piuttosto secchi, con un unico principale temporale alla fine di giugno, con temperature mediamente inferiori rispetto all'anno precedente. Anche nell'anno 2023 l'andamento climatico non è stato il più favorevole per lo sviluppo della malattia, ma le piogge più frequenti nei mesi primaverili e le temperature meno calde rispetto all'anno precedente, han fatto sì che la pressione di malattia raggiungesse il valore massimo di 20 alla fine di luglio.

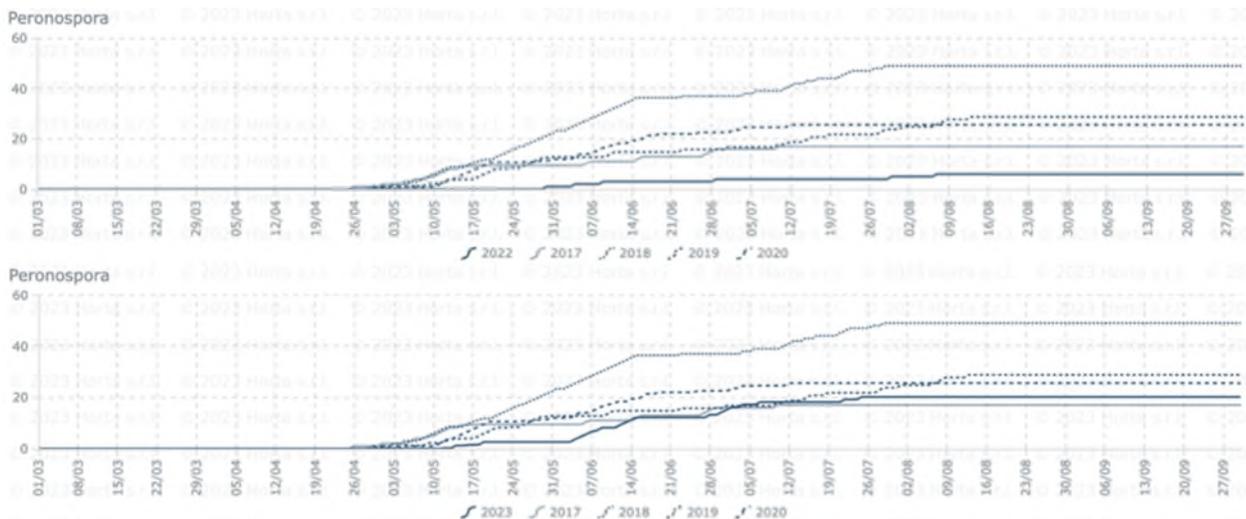


Figura 7. Andamento stagionale della pressione infettiva nel 2022 (sopra) e nel 2023 (sotto) calcolata sui dati della stazione meteorologica del campus di Castell'Arquato (PC). L'indice di pressione infettiva rappresenta un'integrazione delle infezioni primarie e secondarie simulate dai modelli previsionali di vite.net®.

#### Cantina di Ziano Piacentino (PC) (2023)

A Ziano Piacentino (PC), nell'annata 2023 la temperatura media è stata di 21 °C, le precipitazioni sono state estremamente abbondanti per un totale di 554,2 mm, particolarmente concentrate nei mesi estivi, Maggio (161,4 mm), Giugno (88,3 mm), Luglio (99,9 mm) e Agosto (154,7 mm) (Fig. 8).

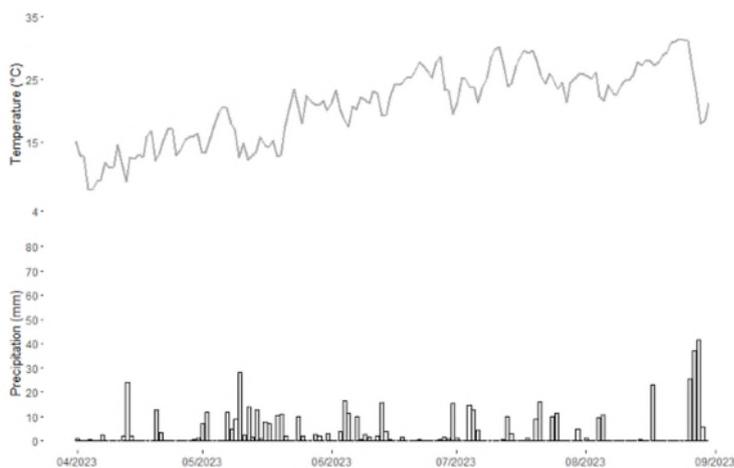


Figura 8. Condizioni meteo rilevate presso la località di Ziano Piacentino. I valori riportati indicano la temperatura media giornaliera (°C) (linea continua) e le precipitazioni giornaliere (mm) (barre) dal 1 aprile al 31 agosto 2023.

Nel vigneto di Ziano Piacentino la stagione 2023 è stata caratterizzata da piogge estremamente frequenti distribuite nell'arco dell'intera stagione, il germogliamento si è osservato nella terza decade di aprile, e la fioritura è iniziata nei primi giorni di giugno, per concludersi con l'allegagione dopo la metà di giugno. Date le abbondanti piogge durante la stagione, l'epidemia è iniziata abbastanza presto, con le prime piogge infettanti a inizio maggio (Fig. 9). Il mese di maggio è stato

caratterizzato da notevoli piogge che hanno portato a un aumento continuativo della pressione di malattia, e anche durante la fioritura, nel mese di giugno, si sono verificati numerosi eventi piovosi con temperature non eccessivamente alte, che hanno contribuito a aumentare ulteriormente la pressione di malattia. In aggiunta, anche il mese di luglio ha registrato numerose piogge, principalmente concentrate nella prima e nell'ultima decade di luglio, facendo così raggiungere un valore massimo di pressione di malattia di 40 a inizio agosto.

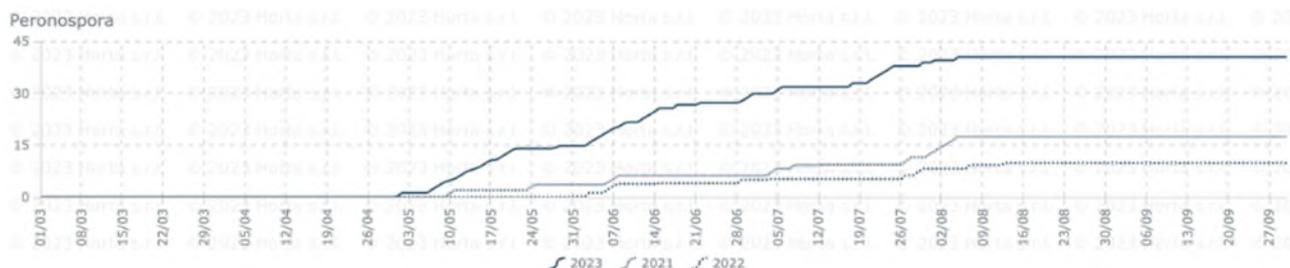


Figura 9. Andamento stagionale della pressione infettiva nel 2023 calcolata sui dati della stazione meteorologica di Ziano Piacentino (PC). L'indice di pressione infettiva rappresenta un'integrazione delle infezioni primarie e secondarie simulate dai modelli previsionali di vite.net®.

Azienda Cremon (Conselice) e Az. Tamburini (Lugo e Bagnacavallo) (2021)

A Lugo, Conselice e Bagnacavallo (RA) nell'anno 2021 la temperatura media è stata di 20,4 °C, con precipitazioni scarse (146,6 mm) durante la stagione. Le precipitazioni maggiori si sono registrate nel mese di Aprile (61,7 mm) (Fig. 10).

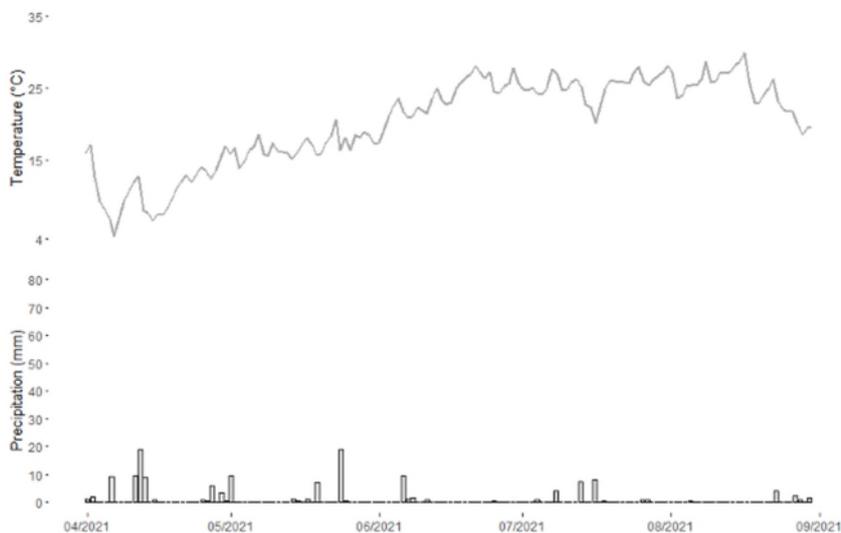


Figura 10. Condizioni meteo rilevate presso la località di Lugo, Conselice e Bagnacavallo (RA). I valori riportati indicano la temperatura media giornaliera (°C) (linea continua) e le precipitazioni giornaliere (mm) (barre) dal 1 aprile al 31 agosto 2021.

Nei vigneti di Lugo, Conselice e Bagnacavallo nel 2021 il germogliamento è stato osservato nell'ultima decade di aprile e le piogge che in sequenza sono cadute alla fine del mese (Fig. 10) hanno generato una serie di potenziali eventi infettivi che hanno avviato l'epidemia stagionale (Fig.

11). La fase di fioritura è iniziata circa un mese più tardi ed è terminata il 10 giugno, con la completa allegagione, quando gli inerbimenti sono stati terminati. L'alternarsi piuttosto regolare durante la stagione ha permesso una crescita piuttosto lineare della pressione infettiva, e quindi del rischio legato all'andamento meteorologico, fino alla fine di luglio quando ha raggiunto il valore massimo, poco sopra 55 (Fig. 11).

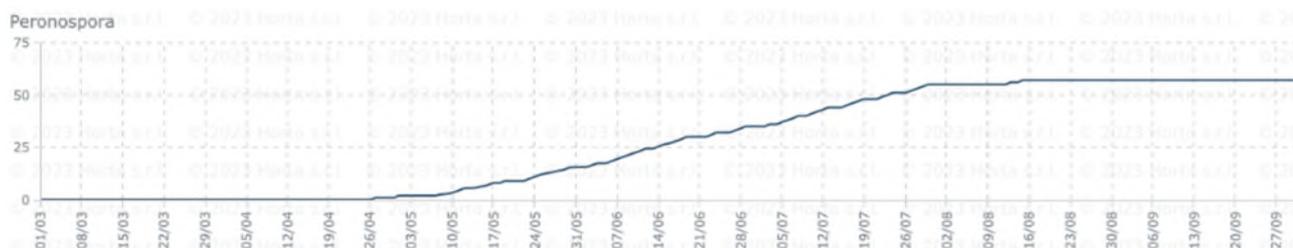
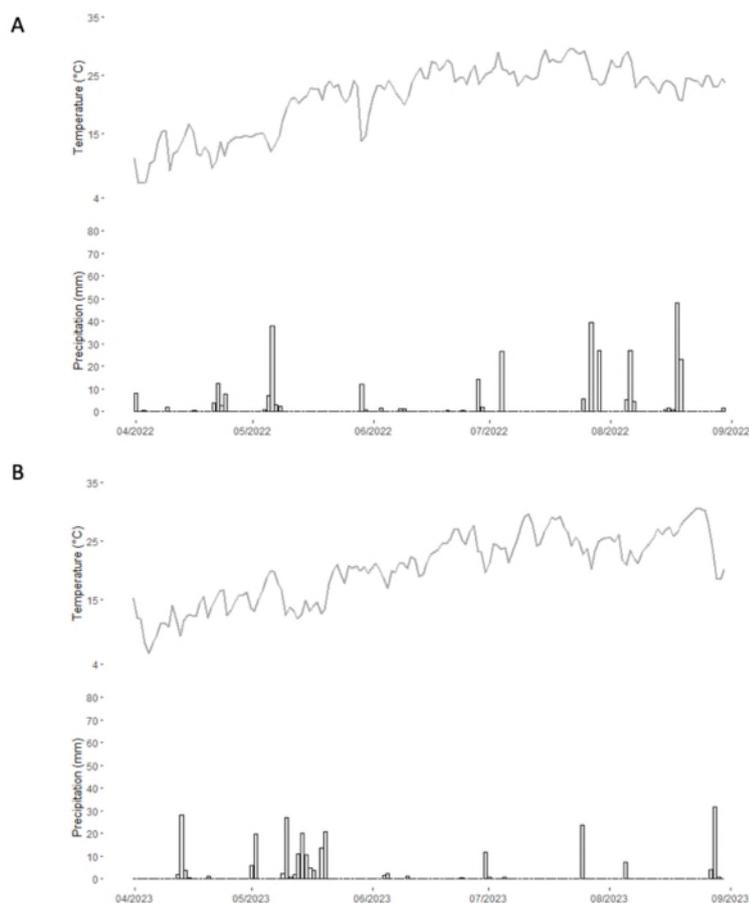


Figura 11. Andamento stagionale della pressione infettiva nel 2021 calcolata sui dati della stazione meteorologica di Lugo, riferimento per i tre vigneti della zona (Lugo, Conselice e Bagnacavallo). L'indice di pressione infettiva rappresenta un'integrazione delle infezioni primarie e secondarie simulate dai modelli previsionali di vite.net®.

#### Azienda Barattieri, Vigolzone (PC) (2022-2023)

Vigolzone (PC) è risultata la località più fresca nei tre anni. Nel 2022 la temperatura media stagionale è stata di 21,3 °C con abbondanti precipitazioni durante la stagione (334,8 mm), particolarmente concentrate nel periodo di Maggio (64 mm) e forti temporali in Luglio (98,8 mm) e in Agosto (112,6 mm) (Fig. 12A). Nell'anno 2023 la temperatura media è stata di 20,4 °C con un totale di precipitazioni di 264,8 mm, quasi tutte concentrate nel mese di Maggio (142,8 mm) (Fig. 12B).



*Figura 12. Condizioni meteo rilevate presso la località di Vigolzone (PC). I valori riportati indicano la temperatura media giornaliera (°C) (linea continua) e le precipitazioni giornaliere (mm) (barre) dal 1 aprile al 31 agosto 2022 (A) e 2023 (B).*

A Vigolzone nella stagione 2022 il germogliamento è iniziato a fine aprile. Nel mese di maggio numerosi eventi piovosi si sono susseguiti nel corso del mese, dando il via all'epidemia nella prima decade di maggio e portando a un aumento progressivo della pressione di malattia (Fig. 13). La fioritura è iniziata nella terza decade di maggio ed è terminata con l'allegagione nei primi giorni di giugno. I mesi di giugno e luglio sono stati piuttosto secchi, con poche piogge all'inizio del mese di giugno e alla fine del mese di luglio, determinando un aumento della pressione di malattia, fino al raggiungimento del valore massimo di 17 a fine luglio (Fig. 13). Nel 2023 il germogliamento è iniziato a metà aprile. Le prime piogge infettanti sono state registrate nella prima decade di maggio, ma le piogge più intense, che hanno aumentato la pressione di malattia, sono avvenute nell'ultima decade di maggio, in corrispondenza dell'inizio della fioritura, e nella prima decade di giugno in corrispondenza dell'allegagione. Successivamente i mesi di giugno e luglio sono stati piuttosto secchi con poche precipitazioni concentrate fra la fine giugno e inizio luglio e alla fine di luglio, portando a un ulteriore aumento della pressione di malattia fino al valore massimo di 30 (Fig.13).

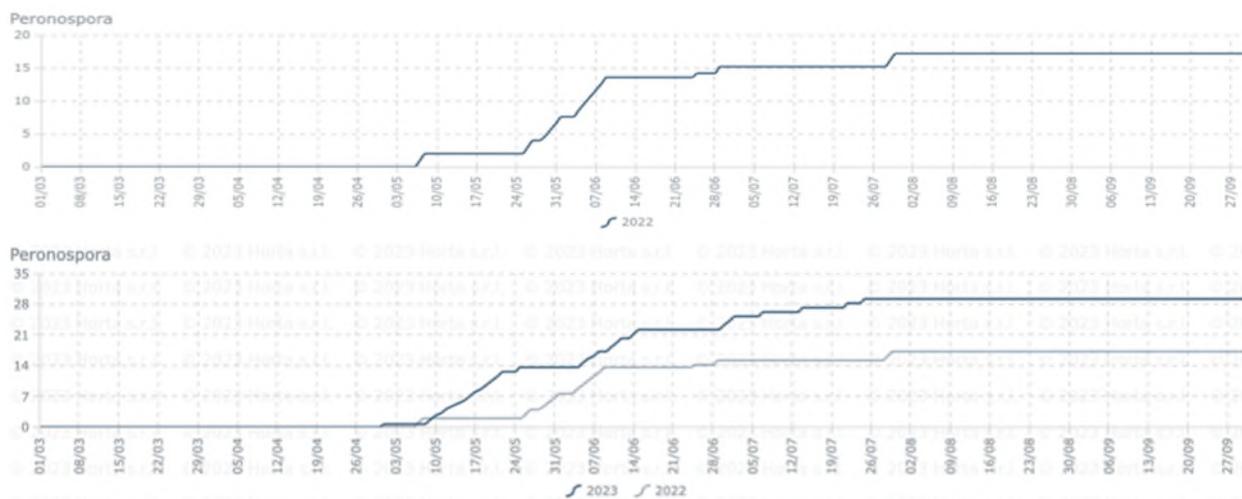


Figura 13. Andamento stagionale della pressione infettiva nel 2022 (sopra) e nel 2023 (sotto) calcolata sui dati della stazione meteorologica di Vigolzone (PC). L'indice di pressione infettiva rappresenta un'integrazione delle infezioni primarie e secondarie simulate dai modelli previsionali di vite.net®.

## RISULTATI E CONCLUSIONI COMPLESSIVE

Il monitoraggio svolto per il rilievo della presenza di sintomi di peronospora è stato ripetuto in tre punti differenti per ciascun parcellone in ogni vigneto. In particolare, il dato dell'ultimo rilievo eseguito in fase BBCH 77 (pre-chiusura grappolo) per l'incidenza e la gravità di malattia su foglia è stato utilizzato per un confronto statistico tra il parcellone dove sono stati seminati gli inerbimenti e il confronto aziendale (terreno lavorato) (Tab. 1). In tutti i casi, ad eccezione del vigneto di Ortrugo a Castell'Arquato nel 2022 (dove l'incidenza della malattia è stata significativamente più alta nel parcellone lavorato, rispetto all'inerbito), la malattia non si è diffusa in modo statisticamente differente nei diversi parcelloni gestiti con inerbimento controllato e lavorazione del terreno (Tab. 1). Considerando il numero ridotto dei trattamenti di difesa eseguito nei parcelloni inerbiti (mediamente 1,5 in meno rispetto al riferimento aziendale), questo risultato può essere considerato molto positivamente perché indica come la presenza dell'inerbimento ha compensato il minor apporto di PPP per la protezione del vigneto (Tab. 1).

È senz'altro utile approfondire il rapporto costi/benefici di questa modalità di gestione degli inerbimenti di cui è fatto dettaglio nel capitolo finale delle ricadute.

**PERSONALE**

Cognome e nome		Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo orario	Costo totale
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto prove	85	27	2.295,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto prove	19	27	513,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto prove	16	27	432,00
	UNIV. BOLOGNA	Ricercatrice Confermata	Responsabile Scientifico	325	31	10.075,00
	UNIV. BOLOGNA	Assegnista di Ricerca	Prove di laboratorio	359	13,88	4.982,92
	UNIV. BOLOGNA	Assegnista di Ricerca	Prove di laboratorio	1637	15,1	24.718,70
	UNIV. BOLOGNA	Assegnista di Ricerca	Prove di laboratorio	573	13,89	7.958,97
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Ricerca	Prove di laboratorio	716	9,07	6.494,12
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Studio	Prove di laboratorio	1720	7,22	12.418,40
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Studio	Prove di laboratorio	429	8,98	3.852,42
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Studio	Prove di laboratorio	970	6,97	6.760,90
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Studio	Prove di laboratorio	1003	7,07	7.091,21
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Studio	Prove di laboratorio	716	8,72	6.243,52
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Studio	Prove di laboratorio	1003	7,07	7.091,21
	UNIV. BOLOGNA	Borsa di Studio	Prove di laboratorio	716	8,72	6.243,52
	UCSC (Univ. Piacenza)	Professore	Referente scientifico	360	48	17.280,00
	UCSC (Univ. Piacenza)	Ricercatore	Prove di laboratorio	280	31	8.680,00
	UCSC (Univ. Piacenza)	Professore associato	Rilievi campo e prove	330	31	10.230,00
	UCSC (Univ. Piacenza)	tecnico laboratorio	Prove di laboratorio	385	31	11.935,00
	UNIV. FERRARA	Ricercatore	Referente scientifico	140	31	4.340,00
	UNIV. FERRARA	Personale tecnico	Prove di laboratorio	122	31	3.782,00
	UNIV. FERRARA	Borsista di ricerca	Prove di laboratorio	1296	13,89	18.000,00
	UNIV. FERRARA	Borsista di ricerca	Prove di laboratorio	576	10,42	6.000,00
	CNR	Ricercatore III livello	Referente scientifico	248	33	8.184,00
	CNR	Ricercatore III livello	Supporto tecnico	70	33	2.310,00
	CNR	Ricercatore III livello	Analisi laboratorio	244	33	8.052,00
	CNR	Assegnista di ricerca	Analisi laboratorio	2661	17,8	47.365,80
	Az. Agr. RIZZATI	Imprenditore agricolo	Supporto prove campo	150	19,5	2.925,00
					<b>Totale:</b>	<b>256.254,69</b>

**TRASFERTE**

<b>Cognome e nome</b>		<b>Descrizione</b>	<b>Costo totale</b>
	UCSC (Univ. Piacenza)	Raccolta campioni e rilievi in campo	1.583,52
	UCSC (Univ. Piacenza)	Raccolta campioni	630,50
	UNIV. FERRARA	Firma presso il Notaio Castellari dell'ATS e rilievi campo	62,00
	UNIV. FERRARA	estare feromoni di psilla con olfattometro dell'Università di Pisa	227,50
	UNIV. FERRARA	Valutazione tramite EAG di molecole feromoniche della Psilla (CB)	372,58
	CNR	Convegno AISSA#under40	357,80
	CNR	Presentazione attività al Campus Cloud	30,20
<b>Totale:</b>			<b>3.264,10</b>

**COLLABORAZIONI, CONSULENZE, ALTRI SERVIZI**

<b>Ragione sociale della società di consulenza</b>	<b>Importo contratto</b>	<b>Attività realizzate / ruolo nel progetto</b>	<b>Costo</b>
RINOVA	1.200,00	Realizzazione sensoristica	1.200,00 €
<b>Totale:</b>			<b>1.200,00 €</b>

## AZIONE 4 – DIVULGAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar) RI.NOVA

### 2.1 Attività e risultati

#### Piano di comunicazione

La diffusione dell'innovazione alle imprese agricole rappresenta un'importante attività per il Gruppo Operativo. RI.NOVA per conto del partenariato ha messo a disposizione il proprio personale per curare questa attività sin dalle prime fasi del progetto. Già pochi mesi dopo l'attivazione delle attività sperimentali sono state svolte azioni divulgative per contribuire a rendere concreto un collegamento funzionale multi-actor tra innovazione, trasferimento e applicazione, che è obiettivo intrinseco del PSR e della Misura 16.1, al fine di stimolare un nuovo approccio tra tutti gli attori delle filiere orticole.

In particolare, nell'ambito del progetto, dal 01/05/2020 al 26/10/2023 sono state svolte:

- 3 visite di campo
- 3 incontri tecnici
- 1 campus cloud
- 1 audiovisivo
- 5 pubblicazioni

Nella tabella di seguito l'elenco delle iniziative svolte con indicati anche i numeri dei partecipanti (fra parentesi a lato di ogni iniziativa).

**Tabella 1** – Descrizione delle iniziative di divulgazione svolte dal 1 maggio 2020 – 26 ottobre 2023

Visite guidate		Incontri tecnici		Pubblicazioni	
Data	Titolo (Provincia) (n. presenze)	Data	Titolo (Provincia) (n. presenze)	Data	Titolo
20/07/2021	Visita in campo su sperimentazione della tecnica confusione sessuale della Psilla del Pero (FE) 24 <a href="#">RESISTIVisita200721FE</a>	02/03/2022	incontro on line di presentazione primi risultati del Progetto 50 <a href="#">RESISTIncontroonline02032022</a>	20/05/2020	<a href="#">Afidi che resistono agli insetticidi, svelato l'enigma genetico - Cattolicanews 20/5/2020</a>
18/05/2022	visita e incontro in campo su inerbimenti e loro ruolo nel controllo delle malattie fogliari in vigneto (PC) 36 <a href="#">RESISTIVisitaInc18052022PC</a>	18/05/2022	visita e incontro in campo su inerbimenti e loro ruolo nel controllo delle malattie fogliari in vigneto (PC) * <a href="#">RESISTIVisitaInc18052022PC</a>	20/11/2020	<a href="#">Dall'Europa all'Emilia-Romagna: le cover crops in vigneto per limitare la diffusione delle malattie - Piacenza Agricola n. 11/2020</a>
25/05/2022	visita e incontro in campo su inerbimenti e loro ruolo nel controllo delle malattie fogliari in vigneto (PC) 21 <a href="#">RESISTIVisitaInc25052022PC</a>	25/05/2022	visita e incontro in campo su inerbimenti e loro ruolo nel controllo delle malattie fogliari in vigneto (PC) * <a href="#">RESISTIVisitaInc25052022PC</a>	26/09/2021	<a href="#">Difesa delle colture e sostenibilità: focus sulle resistenze - Libertà 26/9/2021 Sez.</a>

					<a href="#">Agricoltura p.7</a>
				14/05/2022	<a href="#">A New Approach: Determining cyt b G143A Allele Frequency in Zymoseptoria tritici by Digital Droplet P Stato della resistenza ai fitofagi in Italia- Giornate fitopatologiche 2022CR - Biology 2022, 11, 240</a>
				14/06/2022	<a href="#">Stato della resistenza ai fitofagi in Italia - Giornate fitopatologiche 2022</a>
Tot = 3		Tot = 3		Tot =4+1	

*\* Le persone che hanno seguito la visita hanno partecipato all'incontro sullo stesso tema*

E' stato inoltre organizzato il 22 /03/2021 un **campus cloud** on line sui primi risultati del progetto cui hanno aderito 43 persone

E' stato poi realizzato il **video** dal titolo [RESISTI - Diagnosi e tecniche a basso impatto contro la resistenza di patogeni, fitofagi e malerbe](#)

Uno strumento diagnostico rapido e sensibile per rilevare resistenze a patogeni è stato pubblicato ed è accessibile a questo indirizzo: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/2/240>.

Negli Allegati 1 e 2 di seguito citati, sono riportati rispettivamente: i dettagli delle iniziative organizzate e la lista dei link alle diverse attività di divulgazione

**Allegato-1\_AttDivulRESISTI**

**Allegto-2\_GO5149124RESISTILink**

### **Portale RI.NOVA**

RI.NOVA ha messo a disposizione del Gruppo Operativo il proprio Portale Internet, affinché le attività ed i risultati conseguiti nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza. All'interno del portale RI.NOVA ([www.RI.NOVA.eu](http://www.RI.NOVA.eu)) è stata individuata una pagina

(<https://rinova.eu/it/progetti/resisti-diagnosi-e-tecniche-contro-la-resistenza-di-patogeni-fitofagi-e-malerbe/>) dedicata al Piano, composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto e gli aggiornamenti relativi alle attività condotte.

Inoltre, attraverso un contatto continuo con il Responsabile di Progetto, un referente RI.NOVA ha proceduto all'aggiornamento della pagina con notizie, informazioni e materiale divulgativo ottenuti nell'ambito del Piano. Questo lavoro permette, unitamente alla pubblicazione dei risultati, la consultazione dell'elenco dei Piani coordinati da RI.NOVA, dal quale, selezionando un singolo Piano/progetto si accede a una nuova pagina simile a quella del Portale RI.NOVA, 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.

### **Collegamento alla rete PEI-Agri**

Come indicato nell'Azione 1, il personale RI.NOVA si è fatto carico di predisporre in lingua italiana e inglese, le modulistiche richieste per la presentazione del Piano al fine del collegamento alla Rete PEI-Agri.

### **PERSONALE**

Cognome e nome		Mansione/qualifica	Attività svolta nell'azione	Ore	Costo orario	Costo totale
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto divulgazione	208	27	5.616,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto divulgazione	167	27	4.509,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto divulgazione	101	27	2.727,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto divulgazione	64	43	2.752,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	organizzazione divulgazione	86	43	3.698,00
	RINOVA	Impiegato tecnico	supporto divulgazione	200	43	8.600,00
	Az. Agr. RIZZATI	Imprenditore agricolo	supporto divulgazione	30	36,41	1.092,30
<b>Totale:</b>						<b>28.994,30</b>

### **TRASFERTE**

Cognome e nome	Descrizione	Costo totale
RINOVA	Interviste per video	326,89
RINOVA	Partecipazione campus cloud + visita campo	327,73
<b>Totale:</b>		<b>654,62</b>

**COLLABORAZIONI, CONSULENZE, ALTRI SERVIZI**

Ragione sociale della società di consulenza		Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
	RINOVA	2.000,00	Realizzazione pagina web	2.000,00 €
	RINOVA	550,00	Realizzazione video	550,00 €
			<b>Totale:</b>	<b>2.550,00 €</b>

## **AZIONE 5 – FORMAZIONE**

### **2.1 Attività e risultati**

Unità aziendale responsabile (Uar) DINAMICA

Sono state svolte tutte le attività previste in questa azione ed in particolare eseguiti 3 corsi di formazione e 1 viaggio studio a Catalogo Verde. Di seguito sono elencati sinteticamente.

#### **Domanda di rendiconto formazione e consulenza Goi n. 5295499 collegata all'avvio della formazione e consulenza n. 5238589 focus 4B 1.1.01**

n. utenti iscritti 20 arrivati a completamento del percorso n. 20

data di avvio del percorso 30/03/21, data termine 27/05/21

Costo totale formazione € 14.360,80 di cui a contributo € 12.924,80

#### **Domanda di rendiconto formazione e consulenza Goi n. 5547697 collegata all'avvio della formazione e consulenza n. 5527981 focus 4B 1.1.01**

n. utenti iscritti 20 arrivati a completamento del percorso n. 20

data di avvio del percorso 31/01/23, data termine 14/03/23

Costo totale formazione € 14.360,80 di cui a contributo € 12.924,80

#### **Domanda di rendiconto formazione e consulenza Goi n. 5562737 collegata all'avvio della formazione e consulenza n. 5531683 focus 4B 1.1.01**

n. utenti iscritti 19 arrivati a completamento del percorso n. 19

data di avvio del percorso 16/02/23, data termine 30/03/23

Costo totale formazione € 13.642,76 di cui a contributo € 12.278,56

### VIAGGIO STUDIO IN FRIULI

#### **Domanda di rendiconto formazione e consulenza Goi n. 5684158 collegata all'avvio della formazione e consulenza n. 5594874 focus 4B 1.3.01**

n. utenti iscritti 7 arrivati a completamento del percorso n. 7

data di avvio del percorso 11/05/23, data termine 01/06/23

Costo totale formazione € 7.862,40 di cui a contributo € 5.503,68

In allegato alla presente relazione è presente il frontespizio del materiale didattico impiegato e distribuito ai partecipanti nei corsi di formazione (Allegato-3\_Materiale-didattico\_eseempio).

Richiesta variazione dell'attività formativa, approvata con D.G.R. n. 24167 del 15/11/2023

Rendiconto corso n. <u>5295499</u>	14.360,80 €
Rendiconto corso n. <u>5547697</u>	14.360,80 €
Rendiconto corso n. <u>5562737</u>	13.642,76 €
Rendiconto viaggio n. <u>5684158</u>	7.862,40 €
<b>TOTALE</b>	<b>50.226.76 €</b>

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

Criticità tecnico-scientifiche	In generale le criticità incontrate nel corso del progetto sono state prevalentemente imputabili alla pandemia da COVID-19 ed alle difficoltà a poter svolgere le attività nelle aree di laboratorio così come sul reperimento di alcuni materiali necessari allo scopo. Inoltre, trattandosi di attività particolarmente innovative e non ancora del tutto prototipate, è stato necessario aggiustare in corso d'opera le procedure per la messa a punto degli studi e per individuare tecniche e protocolli funzionali alle verifiche rapide di resistenza a carico delle avversità studiate. Gli aggiustamenti dei protocolli sono tutti comunque in linea e coerenti con gli obiettivi generali del piano e sono stati attivati per massimizzare gli obiettivi del piano.
Criticità gestionali (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Nessuna criticità gestionale incontrata nella realizzazione dell'attività
Criticità finanziarie	Nessuna Criticità incontrata nella realizzazione dell'attività.

### 4 Altre informazioni

In data 8 luglio 2022 è stata inoltrata una richiesta di **PROROGA di 12 mesi** (a seguito della D.G.R. n. 833 del 23/05/2022) sulla scadenza del progetto in oggetto (posticipando, quindi, la chiusura al 26/10/2023), a causa delle difficoltà nella realizzazione dell'attività di formazione e consulenza, legate in gran parte all'emergenza COVID. La richiesta è stata funzionale anche a completare alcune indagini nell'ambito delle Azioni 3.1 e 3.2. La proroga è stata approvata con Determina n. 13487 del 12/07/2022 dalla Regione Emilia Romagna.

### 5 Considerazioni finali

Nessuna

## **6 RELAZIONE TECNICA**

### **ATTIVITÀ COMPLESSIVAMENTE EFFETTUATE, RISULTATI INNOVATIVI E PRODOTTI**

#### **AZIONE 3.1 Metodi innovativi per una diagnosi precoce della resistenza**

**Attività 3.1.1 – Allestimento di un protocollo diagnostico “LAMP” per la rapida individuazione della resistenza *target-site* agli erbicidi inibitori dell’ALS in *Amaranthus retroflexus*, *A. hybridus*, *A. tuberculatus* e preparazione di strategie di gestione specifiche.**

La diagnosi precoce della resistenza agli erbicidi nelle infestanti è un fattore chiave per evitarne la diffusione ed ottimizzarne il controllo razionalizzando l’uso degli erbicidi. L’attività del presente progetto ha consentito di sviluppare e validare un test molecolare LAMP (Loop mediated isothermal amplification) per il rilevamento rapido in loco della mutazione puntiforme che conferisce resistenza agli erbicidi inibitori dell'acetolattato sintasi (ALS) in tre specie di infestanti di *Amaranthus* diffuse in Emilia-Romagna, *A. retroflexus*, *A. hybridus* e *A. tuberculatus*.

Il protocollo LAMP sviluppato su piante suscettibili e mutanti ALS ha rivelato che l'approccio di amplificazione con solo il set di primer specifico per l'allele mutante (574-Leu) era il più promettente. La validazione e la stima delle prestazioni della LAMP valutate confrontando i risultati con quelli del marcatore molecolare CAPS hanno indicato che, mentre la sensibilità e la specificità sono risultate relativamente elevate in tutte le specie, la precisione è stata più elevata per *A. hybridus* e *A. retroflexus* rispetto ad *A. tuberculatus*. Il test LAMP si è rivelato efficace anche sull'estrazione del DNA genomico grezzo, consentendo il rilevamento rapido di piante mutanti in situazioni di campo (rilevamento della resistenza in loco).

Il test LAMP proposto si è dimostrato una tecnica promettente per il rilevamento rapido della resistenza dovuta a Trp-574-Leu sulle due specie monoiche di *Amaranthus* ed ha mostrato una minore efficacia nella specie dioica geneticamente variabile *A. tuberculatus*. Il suo utilizzo può aiutare i decisori a gestire tempestivamente i casi di resistenza, per proteggere meglio sia le colture che l’ambiente.

**Attività 3.1.2 – Allestimento di protocolli diagnostici “LAMP” per la rapida individuazione della resistenza *target-site* agli insetticidi neonicotinoidi e piretroidi in *Myzus persicae* e *Aphis gossypii* e ad abamectina e bifenazate in *Tetranychus urticae***

Sono stati cercati i primers per amplificazione isotermica in grado di discriminare le mutazioni responsabili delle resistenze target site a piretroidi, neonicotinidi e dimetilcarbammati in *Myzus persicae* e *Aphis gossypii*, ai prodotti inibitori di crescita degli acari interferenti con la chitino sintasi 1, agli inibitori del complesso mitocondriale III di trasporto degli elettroni e ai modulatori allosterici dei canali del cloro attivati dal glutammato in *Tetranychus urticae*. Sono state provate varie combinazioni di condizioni di reazione (temperature, concentrazioni, aggiunta di inibitori selettivi) ma nella quasi totalità dei casi la tecnica non si è rilevata in grado di individuare le mutazioni con la stessa efficienza delle tecniche precedentemente utilizzate. Di fatto la tecnica ha fornito risultati affidabili solo per quanto riguarda l’individuazione della mutazione L1014F al locus *kdr*, responsabile di una relativamente ridotta resistenza ai piretroidi sia in *Myzus persicae* che *Aphis gossypii*.

### **Attività 3.1.3 – Metodi molecolari innovativi per una diagnosi in campo della presenza di mutazioni coinvolte nella resistenza ai prodotti fitosanitari e valutazione della loro frequenza in patogeni delle piante**

L'individuazione precoce e puntuale delle mutazioni SNP è fondamentale per gestione pratica dei fungicidi in campo. Le metodiche molecolari, in diversi casi, sono in grado di sostituire i saggi *in vivo* e *in vitro* più tradizionali che spesso necessitano di tempi più lunghi e a volte non in grado di fornire informazioni di tipo quantitativo: due aspetti però fondamentali per consentire interventi di difesa tempestivi e più mirati e precisi. Il progetto ha dunque consentito di approfondire meglio la tecnica molecolare LAMP per applicazioni nella ricerca di mutazioni coinvolte nella resistenza dei patogeni ai fungicidi, anche se purtroppo ha dato solo parziali risultati: in validazione per quanto riguarda il binomio *B. cinerea*/SDHI, mentre con maggiori difficoltà per *P. viticola*/CAA/Qil. Se i protocolli LAMP non hanno dato i risultati sperati, quelli in ddPCR (3) sono stati tutti portati a termine individuando le mutazioni SNP che conferiscono resistenza in *P.viticola*/CAA (G1105S/V), *S. vesicarium*/SDHI (H134L,P230L) e *Z. tritici*/QoI (G143A). Per le classi di fungicidi CAA e SDHI, abbiamo validato due mutazioni SNP anziché una come da progetto, considerando che la metodica LAMP non stava dando i risultati attesi. Per la mutazione G1105V/CAA e la mutazione P230L/SDHI, le validazioni della sonda e dei primer sono concluse e quindi a breve potremmo utilizzarle nei monitoraggi territoriali.

### **Azione 3.2 Valutazione di strategie alternative di difesa contro la psilla**

Sono state svolte prove in sequenza dal semicampo condotta in laboratorio al pieno campo per verificare se alcune delle quattro sostanze volatili identificate in precedenti lavori nella cuticola di *Cacopsylla pyri* possono essere impiegate nella confusione sessuale verso gli adulti di *C. pyri*. Nonostante i risultati positivi ottenuti nelle prime fasi della ricerca, i saggi successivi su piantine intere in semi-campo e in pieno campo non hanno confermato questi risultati. Neppure i risultati della sperimentazione di semi-campo e di campo che ha combinato ai due feromoni le vibrazioni specifiche della femmina sono stati sufficienti per indurre confusione sessuale. La modalità e la dose di rilascio in semicampo e campo devono essere rivalutate alla luce del loro possibile utilizzo economicamente applicabile in campo.

### **Azione 3.3 – la biodiversità del sistema viticolo come strumento di prevenzione delle resistenze**

Il monitoraggio svolto per il rilievo della presenza di sintomi di peronospora è stato ripetuto in tre punti differenti per ciascun parcellone in ogni vigneto. In particolare, il dato dell'ultimo rilievo eseguito in fase BBCH 77 (pre-chiusura grappolo) per l'incidenza e la gravità di malattia su foglia è stato utilizzato per un confronto statistico tra il parcellone dove sono stati seminati gli inerbimenti e il confronto aziendale (terreno lavorato) (Tab. 1). In tutti i casi, ad eccezione del vigneto di Ortrugo a Castell'Arquato nel 2022 (dove l'incidenza della malattia è stata significativamente più alta nel parcellone lavorato, rispetto all'inerbito), la malattia non si è diffusa in modo statisticamente differente nei diversi parcelloni gestiti con inerbimento controllato e lavorazione del terreno (Tab. 1). Considerando il numero ridotto dei trattamenti di difesa eseguito nei parcelloni inerbiti (mediamente 1,5 in meno rispetto al riferimento aziendale), questo risultato può essere considerato molto positivamente perché indica come la presenza dell'inerbimento ha compensato il minor apporto di PPP per la protezione del vigneto.

## RICADUTE E INDICATORI

### **RICADUTE IN AMBITO PRODUTTIVO, TERRITORIALE ED AMBIENTALE**

Il **protocollo LAMP** è stato sviluppato per diagnosticare la presenza di avversità resistenti alle molecole chimiche più comunemente impiegate in agricoltura. Nella fattispecie fra le avversità considerate di particolare rilievo sono le erbe infestanti e fra queste l'attenzione è stata posta sull'amaranto per la sua gravosa diffusione in regione in diverse colture estensive e orticole. Il protocollo LAMP è stato quindi sviluppato proprio per diagnosticare la presenza di piante di amaranto resistenti agli inibitori dell'ALS per la presenza di una mutazione nel gene *als* (574-leu). Il protocollo è stato validato per *A. retroflexus*, *A. hybridus* e *A. tuberculatus* ed è in grado di fornire i risultati in tempi rapidi (meno di 1 ora). Sapendo già all'inizio della stagione se ci sono delle piante resistenti in campo è possibile adottare una diversa strategie (chimica e non) di controllo. Questo **consente di evitare di impiegare un prodotto che non sarebbe più efficace e che porterebbe solo alla selezione di ulteriori piante resistenti**. L'ottimizzazione dell'uso degli erbicidi e l'adozione di una gestione integrata del controllo degli amaranti deve essere la pratica da preferire per aumentare la diversità degli interventi, ridurre l'impiego degli erbicidi e migliorare l'efficacia dei principi attivi ancora disponibili ed in ultima analisi ridurre l'inquinamento del suolo e delle acque. Le strategie di gestione degli amaranti in soia sono riportati nella scheda allegata (**Allegato-10\_Scheda strategie gestione amaranti in soia**). L'adozione di questo protocollo faciliterà le imprese agricole nella gestione delle erbe infestanti ed in particolare per amaranti, riducendo l'impiego degli erbicidi e ottimizzandone l'uso. Inoltre questo strumento innovativo consentirà a rendere più semplice per gli agricoltori e i tecnici la visione del fenomeno della resistenza agli erbicidi e sensibilizzarli ulteriormente sull'importanza di monitorare il proprio campo in modo da adottare le migliori strategie di controllo, ma soprattutto sarà di supporto per la predisposizione di strategie di gestione delle infestanti più efficienti a sostegno delle produzioni agricole e della redditività degli agricoltori.

Analoghe ricadute possono essere rilevate anche per quanto concerne la resistenza delle altre avversità fungine e fitofaghe analizzate nel presente piano, favorendo conseguentemente una gestione più oculata e mirata delle strategie di difesa alle colture agrarie, evitando l'impiego reiterato dei principi attivi su cui in modo più accelerato sarà possibile individuare il rischio di insorgenza di resistenze. Ad esempio i protocolli validati in ddPCR (vedi in <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/2/240>) per i patogeni vegetali consentono di rendere più veloce ma soprattutto più precisa la valutazione dei fenomeni di resistenza (grazie all'apprezzamento della frequenza di mutazione estremamente elevato e molto maggiore rispetto ad altri metodi molecolari capaci di fornire quantificazione), contribuendo in modo maggiore, rispetto a metodi già in uso, alla gestione oculata dei principi attivi disponibili permettendone una adozione più mirata e corretta e quindi, conseguentemente, ad una loro riduzione in funzione delle

specifica situazione di campo. La maggiore velocità di ottenimento dei risultati consente infatti anche di analizzare un numero maggiore di campioni nell'unità di tempo.

Per quanto concerne la tecnica di **confusione sessuale alla psilla del pero**, malgrado non tutti i risultati ottenuti in queste prove siano soddisfacenti, in particolare quelli svolti in pieno campo, la tecnica della confusione sessuale con feromoni rimane una possibile strategia di controllo della psilla, specie in visione della mancanza o estrema limitata disponibilità di specifici insetticidi di sintesi autorizzati in un prossimo futuro. I dati raccolti indicano che in condizioni di saturazione dell'ambiente queste molecole abbiamo svolto la loro funzione di confusione. Resta quindi da valutare se, aumentando ulteriormente la dose di feromone sia possibile raggiungere condizioni analoghe anche in campo e tali di soddisfare il principio della confusione sessuale verso il fitofago. Questo risultato consentirebbe infatti di controllare il fitofago senza l'utilizzo di insetticidi chimici salvaguardando così non solo l'ambiente ma anche l'operatore ed il consumatore finale.

Le ricadute in termini concreti sulla produzione vitivinicola, in relazione alla valutazione svolta sull'effetto di specifici **inerbimenti per il contenimento delle infezioni di peronospora della vite**, merita un particolare inciso in **relazione ai costi/benefici per i viticoltori** della regione. Se infatti si stima che il costo relativo alla semina interfila con cantiere combinato è di ca. 80 €/ha (tariffe UNCAI 2023) più il costo della semente: i miscugli impiegati nelle prove del PSR RESISTI avevano un costo di 110 €/ha per la semina autunnale e di 90 €/ha per la semina primaverile. Il range di costo è pertanto variabile tra 170 e 190 €/ha/stagione, al quale andrebbe aggiunto il costo della terminazione dell'inerbimento con una fresatura (se fuori dall'ordinarietà) di ca. 60 €/ha per un costo complessivo di 230-250 €/ha/stagione.

Il costo dei trattamenti di difesa, considerando ca. 60 €/ha/trattamento per l'irrorazione con atomizzatore (tariffe UNCAI 2023) più il costo dei prodotti fitosanitari, è quantificabile indicativamente 80 €/ha/trattamento considerando l'impiego in biologico, ovvero solo con rame e zolfo. Il range di costo è pertanto di 140€/ha per ogni trattamento.

Considerando il risparmio medio di 1,5 trattamenti per ettaro nell'arco della stagione sulle parcelle inerbite, la quantificazione risulta di ca. 200 €/ha/stagione a fronte di un costo di gestione dell'inerbimento di 230-250 €/ha. Benchè possa sembrare che la tecnica non sia conveniente per l'agricoltore risulta estremamente difficile quantificare gli altri benefici ecosistemici che questa tecnica potrebbe fornire fra cui ad esempio favorire la presenza dell'entomofauna utile e le ricadute conseguenti su altre avversità fitofaghe (esempio sulle cocciniglie della vite o la tignoletta).

Inoltre, è importante sottolineare come l'Ecoschema 2 previsto dalla Pac 2023-2027, a cui possono accedere tutte quelle aziende agricole che hanno superfici occupate da colture permanenti legnose agrarie (come i vigneti), garantisce il pagamento di 120 euro ad ettaro a quelle aziende che negli impianti arborei prevedono l'inerbimento del terreno. Il contributo dato a chi aderisce a questo ecoschema è di 120 €/ha, che si andrebbe quindi a sommare al risparmio per i minori interventi eseguiti, rendendo sì fatto economicamente sostenibile l'applicazione della tecnica validata e sopraccitata. A ciò si potrebbe poi aggiungere anche una integrazione del 20% (pari a 24 €/ha) per quelle parcelle che si trovano nelle aree Natura 2000 e Zvn (Zone di Vulnerabilità ai Nitrati di origine agricola).

Il risparmio di interventi potrebbe anche essere ulteriormente incrementato anche su una più larga scala (ovvero anche a tutti i vigneti della Regione Emilia Romagna), a seguito di una valutazione specifica del rischio di infezione, sia attraverso i modelli previsionali gestiti dalla Regione e dei conseguenti Bollettini di indicazione regionale, ma anche grazie ad un sistema DSS, in modo da poter meglio calibrare e calendarizzare i trattamenti di difesa in funzione del rischio, come ad esempio è stato svolto in modo puntuale nell'ambito del progetto (ad es. presso l'azienda Res Uvae o il campus dell'Università), evidenziando che la riduzione del numero di trattamenti rispetto al confronto tradizionale è stata significativamente più rilevante (-2,25), quantificabile in 315 €/ha/stagione (vedi Tabella 1).

Vigneto	Località	Provincia	Anno	Varietà	Tesi	Incidenza (%)	Err. st.	P<0,05	Gravità (%)	Err. st.	P<0,05	Trattamenti (n)
Res Uvae	Castell'Arquato	PC	2022	ortrugo	cover crops	8,1	1,5		0,4	0,1		6
Res Uvae	Castell'Arquato	PC	2022	ortrugo	lavorato	10,7	1,3	0,047	0,4	0,1	n.s.	8
Res Uvae	Castell'Arquato	PC	2023	ortrugo	cover crops	2,7	0,7		0,0	0,0		9
Res Uvae	Castell'Arquato	PC	2023	ortrugo	lavorato	3,3	1,8	n.s.	0,1	0,0	n.s.	12
Gasparini	Piacenza	PC	2022	merlot	cover crops	14,7	2,5		2,2	0,7		5
Gasparini	Piacenza	PC	2022	merlot	lavorato	12,0	2,0	n.s.	1,9	0,6	n.s.	7
Gasparini	Piacenza	PC	2023	merlot	cover crops	8,0	2,3		0,2	0,1		9
Gasparini	Piacenza	PC	2023	merlot	lavorato	5,7	1,2	n.s.	0,1	0,0	n.s.	11
Barattieri	Vigolzone	PC	2022	ortrugo	cover crops	3,7	0,3		0,1	0,0		6
Barattieri	Vigolzone	PC	2022	ortrugo	lavorato	5,7	1,8	n.s.	0,2	0,1	n.s.	7
Barattieri	Vigolzone	PC	2023	ortrugo	cover crops	0,7	0,7		0,0	0,0		13
Barattieri	Vigolzone	PC	2023	ortrugo	lavorato	0,7	0,7	n.s.	0,0	0,0	n.s.	14
Ziano	Ziano Piacentino	PC	2023	Pinot Nero	cover crops	4,8	1,1		0,1	0,0		14
Ziano	Ziano Piacentino	PC	2023	Pinot Nero	lavorato	5,3	1,0	n.s.	0,1	0,0	n.s.	15
Ziano	Ziano Piacentino	PC	2023	Croatina	cover crops	1,1	0,5		0,0	0,0		13
Ziano	Ziano Piacentino	PC	2023	Croatina	lavorato	4,0	2,0	n.s.	0,1	0,1	n.s.	14
Tamburini	Bagnacavallo	RA	2021	Trebbiano	cover crops	0,0	0		0	0		9
Tamburini	Bagnacavallo	RA	2021	Trebbiano	lavorato	0,0	0	n.s.	0	0	n.s.	10
Cremon	Conselice	RA	2021	Pinot grigio	cover crops	0,1	0		0	0		8
Cremon	Conselice	RA	2021	Pinot grigio	lavorato	0,1	0	n.s.	0	0	n.s.	9
Tamburini	Lugo	RA	2021	Pinot grigio	cover crops	0,1	0		0	0		9
Tamburini	Lugo	RA	2021	Pinot grigio	lavorato	0,1	0	n.s.	0	0	n.s.	10

Tabella 1. Per ciascun vigneto nelle diverse località e diversi anni sono riportate la varietà coltivata e il valore dell'incidenza e gravità di sintomi di peronospora su foglia, l'errore standard, il confronto delle medie (tre ripetizioni per ciascun dato) secondo il test t di Student e il numero di trattamenti di difesa (rame e zolfo) eseguiti.

## INDICATORI DI RISULTATO

### Azione 3.1:

**1) L'indicatore della robustezza ed attendibilità del protocollo diagnostico sviluppato per l'individuazione degli individui resistenti sarà calcolato confrontando il numero di quelli individuati direttamente in campo con il protocollo LAMP con quello rilevato in laboratorio utilizzando i protocolli correnti. Sarà considerata accettabile una differenza del 5% tra i 2 valori.**

- Gli indici di prestazione della metodica LAMP applicata alla diagnosi della resistenza in amaranto sono stati valutati con la matrice di confusione. Essa ha mostrato che il protocollo sviluppato ha una elevata sensibilità, specificità e precisione per le 3 specie di amaranti presi in

esame. La prova LAMP condotta in condizione di simulazione di campo su una popolazione di *Amaranthus tuberculatus* raccolta in riso e sospetta resistente ha evidenziato l'elevata corrispondenza tra il genotipo predetto con la LAMP e quello ottenuto con il marcatore tradizionale CAPS (>95%).

- I protocolli diagnostici implementati per individuare le mutazioni legate a resistenze target-site negli non hanno consentito di individuare correttamente le mutazioni legate a resistenza a dimetilcarbammati e neonicotinoidi negli afidi studiati come pure le mutazioni che interessano il genoma di *Tetranychus urticae*. Limitatamente a *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* e la mutazione L1014F al locus *kdr* il protocollo LAMP ha invece dimostrato una pressoché completa affidabilità con una differenza di individuazione tra le due tecniche inferiore al 5%. Predisposto un PROTOCOLLO DI LAVORO "LAMP" PER INSETTI (incluso nella presente relazione).
- Lo studio basato sulla fattibilità e messa a punto del protocollo per l'individuazione delle mutazioni coinvolte nella resistenza di *Botrytis cinerea* agli SDHI mediante la tecnica LAMP (unico binomio che ha avuto buoni risultati con questa tecnica) ha bisogno di poche ma ulteriori modifiche per essere pronta per la validazione in campioni di campo e quindi non è possibile esprimere un risultato sotto questo specifico punto di vista. Al contrario, tutti i tre protocolli programmati con la tecnica ddPCR sono stati completati e saggiati su un certo numero di campioni da campo e hanno sempre fornito corrispondenza interpretativa della situazione con la metodologia, *in vitro* o *in vivo*, utilizzata precedentemente (differenza < 5%) tanto da renderli affidabili e sensibili per l'adozione nella valutazione di campioni di *P. viticola*/CAA, *S. vesicarium*/SDHI e *Z. tritici*/QoI nei monitoraggi territoriali in corso e futuri.

## 2) Quantificazione delle differenze di tempo necessario ad ottenere il risultato con la tecnica LAMP rispetto alle tecniche tradizionali

Numerosi metodi molecolari esistono per diagnosticare la presenza di piante mutate resistenti ma pochi sono in grado di dare una risposta in meno di 1 ora ed essere applicati direttamente in campo. Nello specifico, la metodica CAPS utilizzata nel presente lavoro richiede l'impiego di una strumentazione disponibile in laboratorio (PCR, bagnetto termostatico) ed almeno un pomeriggio di lavoro. Al contrario la tecnica LAMP messa a punto impiegando un DNA grezzo fornisce il risultato in meno di 1 ora (vedi **Allegato-9\_Protocollo estrazione DNA LAMP**). Con un singolo test LAMP e con il dispositivo (macchinetta portatile) usato in questo progetto è possibile testare 15 piante in 30 minuti.

Per quanto riguarda gli artropodi fitofagi, allo stato attuale, il vantaggio dell'applicazione della tecnica LAMP alla ricerca di mutazioni legate alla resistenza in afidi sta' in tempi di risposta solo leggermente inferiori rispetto ad una PCR allele specifica di tipo QSGG (Qualitative Sybr Green Genotyping - Puggioni, V., Chiesa, O., Panini, M. & Mazzoni, E., 2017. Qualitative Sybr Green real-time detection of single nucleotide polymorphisms responsible for target-site resistance in insect pests: the example of *Myzus persicae* and *Musca domestica*. *Bulletin of Entomological Research* 107, 96–105. <https://doi.org/10.1017/S0007485316000675>). Tuttavia questo piccolo vantaggio è del tutto annullato dalla verificata impossibilità di ottenere amplificazioni selettive o positive come pure dalla necessità di dover individuare altre mutazioni su altri target per lo stesso individuo. Questo preclude al momento la possibilità di effettuare una analisi diretta da singolo individuo.

Relativamente all'utilizzo della LAMP nell'ambito della resistenza di patogeni vegetali ai prodotti fitosanitari si considera che a breve sarà disponibile un protocollo per *B. cinerea*. La possibilità di

poter effettuare la valutazione della presenza della mutazione H227R (sostituzione principale in caso di resistenza agli SDHI) direttamente in campo prelevando la sporulazione presente sui frutti (es. fragola, vite) e sottoporla ad analisi *in situ* rispetto alla procedura che prevede l'invio del campione al laboratorio e la verifica analitica con metodi molecolari più tradizionali (RFLP o ricorso a primer specifici) consente di risparmiare almeno una settimana per l'ottenimento del risultato ed è quindi particolarmente importante concluderne la messa a punto.

I tre protocolli in ddPCR, pur obbligatoriamente da svolgere in laboratori specializzati, consentono una notevole velocizzazione nell'ottenimento del risultato specialmente per patogeni biotrofi come *P. viticola*. La necessità non derogabile, con i saggi su dischetto fogliare *in vivo*, di ricorrere al passaggio su ospite, comporta già da sola l'impiego di almeno una settimana alla quale va aggiunto il tempo, di almeno 7-10 giorni, per l'effettuazione del saggio. Quindi qualsiasi tecnica molecolare è certamente più rapida del biosaggio. Tra le tecniche molecolari, quella attraverso ddPCR, consente di ottenere non un sostanziale risparmio di tempo ma certamente un dato quantitativo di frequenza della mutazione (che il biosaggio non fornisce e neanche diversi metodi molecolari con lettura su gel di agarosio) in tempi leggermente più rapidi rispetto a quelli di una quantificazione attraverso *Real-time PCR* ma soprattutto, rispetto a quest'ultima, è molto più sensibile e precisa (nell'ordine di centinaia di volte). Ciò consente quindi di poter fornire alla assistenza tecnica una interpretazione del fenomeno della resistenza puntuale e puntiforme ancora più utile per l'impostazione della difesa di campo.

### 3) Numero di schede di riconoscimento infestanti prodotte (>1)

È stata preparata una scheda per potere riconoscere in campo le 3 specie di amaranto, *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus hybridus* e *Amaranthus tuberculatus* che infestano la soia nella regione Emilia-Romagna. Allo stadio di plantula (3-4 foglie vere) è possibile riconoscere le specie monoiche *A. retroflexus* ed *A. hybridus* dalla specie dioica *A. tuberculatus* (vedi **Allegato-8\_RICONOSCIMENTO SPECIE DI AMARANTO**). Dato che i semi di quest'ultima specie possono germinare più tardivamente rispetto alle altre nel corso della stagione, è opportuno valutare di effettuare il trattamento erbicida o altri interventi agronomici più tardivamente per riuscire a controllare anche le germinazioni più tardi.

Allo stadio di fioritura è possibile riconoscere tutte le specie di amaranto basandosi su specifiche caratteristiche dell'infiorescenza e del seme. A tal fine sono state inserite nella scheda allegata le 6 specie di amaranto maggiormente diffuse nelle coltivazioni (vedi **Allegato-8\_RICONOSCIMENTO SPECIE DI AMARANTO**).

Recentemente, sono stati confermati nel Bresciano-mantovano e nel Padovano casi di resistenza di una nuova specie di amaranto invasiva, aliena, *Amaranthus palmeri*. Essere in grado di riconoscere questa specie per monitorare la sua presenza ed evitare che possa diffondersi anche in Emilia-Romagna è importante visto che questa specie ha una elevata capacità di crescita e di diffondersi. Per questo motivo nella scheda di riconoscimento delle specie di amaranto è stata aggiunta anche questa specie.

### 4) Numero di protocolli per gli abbinamenti avversità/mutazioni/classe di prodotti fitosanitari (>3)

Il numero dei protocolli attraverso la tecnica della ddPCR già utilizzabili per il monitoraggio territoriale in campo è certamente pari a 3 ed esattamente verso i seguenti binomi patogeno/gruppo di fungicidi: P. viticola/CAA, S. vesicarium/SDHI, Z. tritici/QoI (vedi protocollo per Z.tritici/QoI in <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/2/240>). Il quarto protocollo è quello LAMP riferito al binomio B. cinerea/SDHI che nel giro di pochi mesi giungerà ad effettiva validazione.

### **Azione 3.2:**

- 1) Utilizzando la confusione sessuale (con feromoni di sintesi e/o con microvibrazioni) per Cacopsylla pyri si può ridurre potenzialmente del 50% il carico di insetticidi specifici che di norma sono 2 su popolazioni importanti. In questo caso la riduzione del 50% delle applicazioni insetticida diminuisce inoltre il rischio di insorgenza di resistenza all'insetticida usato.**
- 2) Utilizzando la confusione sessuale si può ridurre totalmente del 100 % il carico di insetticidi specifici su popolazioni modeste che necessitano di solito di una singola applicazione insetticida.**

La tecnica che utilizza feromoni sessuali nella gestione della difesa fitoiatrica in sostituzione degli insetticidi specifici a breve non più utilizzabili ha fornito interessanti risultati in condizioni di semi-campo ma non è ancora pienamente sviluppata per poterla applicare efficacemente in campo. Nuove prove sono in corso con concentrazioni di feromoni maggiori per creare situazioni vicine a quelle ottenute in semi-campo confinato.

### **Azione 3.3:**

- 1) L'indicatore della robustezza ed attendibilità del protocollo di gestione del cotico erboso sarà calcolato confrontando l'intensità di malattia (% di danno riscontrato sui frutti e foglie), in una stessa località e gestita secondo lo stesso schema di trattamenti, in un plot inerbito in modo innovativo ed in uno gestito in modo tradizionale. Sarà considerata accettabile una differenza del 10% tra le due situazioni.**

Questo indicatore non è stato raggiunto in nessuna delle prove realizzate nel corso delle tre stagioni del progetto. Quello che, in fase di progettazione, era stato individuato come indicatore, in realtà non si è dimostrato un indicatore efficace: infatti, nonostante la mancata differenziazione dell'intensità di malattia tra le diverse tesi, il risultato del protocollo di inerbitamento impiegato può essere considerato positivo in quanto a parità di risultato ha permesso di ridurre, in media, di 1,5 trattamenti per stagione il programma di difesa fitosanitaria nei confronti della peronospora.

- 2) Quantificazione dei costi e delle necessarie operazioni colturali per la gestione delle cover crops.**

Il costo relativo alla semina interfila con cantiere combinato è di ca. 80 €/ha (tariffe UNCAI 2023) più il costo della semente: i miscugli impiegati nelle prove del PSR RESISTI avevano un costo di 110 €/ha per la semina autunnale e di 90 €/ha per la semina primaverile. Il range di costo è pertanto variabile tra 170 e 190 €/ha/stagione al quale andrebbe aggiunto il costo della terminazione dell'inerbitamento con una fresatura (se fuori dall'ordinarietà) di ca. 60 €/ha per un costo complessivo di 230-250 €/ha/stagione. Il costo dei trattamenti di difesa, invece, è quantificabile considerando

ca. 60 €/ha/trattamento per l'irrorazione con atomizzatore (tariffe UNCAI 2023) più il costo dei prodotti fitosanitari, indicativamente 80 €/ha/trattamento considerando l'impiego in biologico, ovvero solo con rame e zolfo. Il range di costo è pertanto di 140€/ha per ogni trattamento. Considerando il risparmio medio di 1,5 trattamenti per ettaro nell'arco della stagione sulle parcelle inerbite, la quantificazione risulta di ca. 200 €/ha/stagione a fronte di un costo di gestione dell'inerbimento di 230-250 €/ha. Questi risultati potrebbero essere migliorati da un impiego su larga scala (ovvero in tutti i vigneti) di un sistema DSS o comunque da una valutazione specifica del rischio di infezione in modo da poter meglio calibrare e calendarizzare i trattamenti di difesa in funzione del rischio: infatti, dove questo è stato possibile in modo puntuale (ad es. presso l'azienda Res Uvae o il campus dell'Università) la riduzione del numero di trattamenti rispetto al confronto tradizionale è stata significativamente più rilevante (-2,25) pari a 315 €/ha/stagione.

**3) Quantificazione del numero di trattamenti che sarebbe possibile evitare con la gestione del cotico erboso secondo la pratica innovativa.**

Come indicato ai 2 punti precedenti, la riduzione media è stata di 1,5 trattamenti rispetto alla tesi "tradizionale". Considerando le situazioni dove è stato possibile utilizzare un DSS in modo puntuale la riduzione media è stata pari a 2,25 trattamenti.

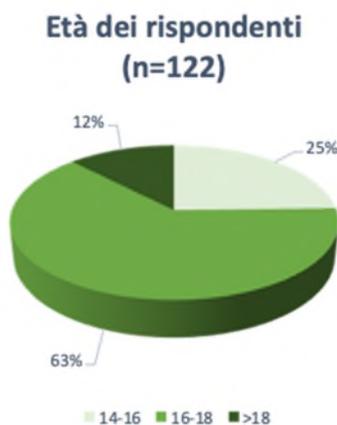
**RICADUTE SOCIALI:**

Il progetto Resisti è entrato in contatto con il mondo dei giovani e giovanissimi (studenti delle scuole superiori) e quindi con i futuri agricoltori, tecnici e consumatori, in diversi momenti durante la sua durata: due scuole hanno visitato l'azienda Res Uvae (Castell'Arquato, PC) dove erano in corso le prove di inerbimento, con semine sia autunnali che primaverili, il 18 e il 25 maggio 2022 (la classe del IIS Pastori di Brescia e le classi IIS Gae Aulenti di Biella); gli studenti delle classi dell'IT Romagnosi-Casali di Piacenza hanno visitato il vigneto sperimentale del campus della Facoltà di Agraria il 24 settembre 2022 (in occasione dell'accoglienza dei partner Erasmus di una scuola superiore di Esens, in Germania); le classi di tre licei di Piacenza (Gioia, Respighi e Colombini, quest'ultima scuola firmataria della lettera di supporto al progetto) che hanno partecipato alla Notte Europea della Ricerca presso l'ex Chiesa del Carmine a Piacenza il 29 settembre 2023 (Fig. 1).



**Figura 1.** Alcuni momenti della presentazione del progetto PSR Resisti alla Notte Europea della Ricerca (29 settembre 2023) e durante la visita del vigneto sperimentale presso il campus UCSC (24 settembre 2022).

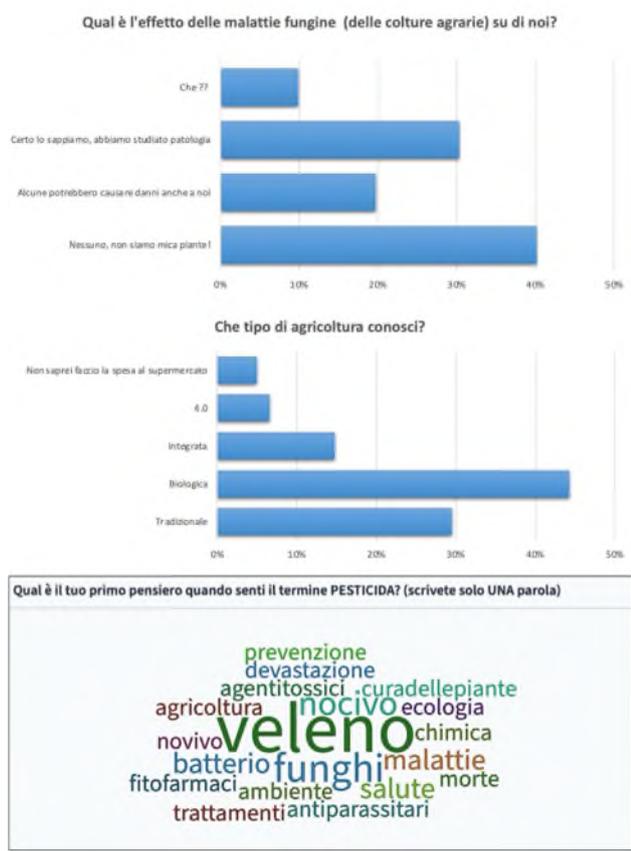
Nel complesso, 122 studenti sono stati coinvolti nel progetto presentando scopi, metodologie, obiettivi e risultati del PSR Resisti e sottoponendo loro un breve questionario del quale, qui di seguito, sono riportati i principali risultati circa l'età dei rispondenti (Fig. 2), le conoscenze pregresse nell'ambito delle tematiche trattate (Fig. 3) e delle consapevolezze maturate durante lo scambio (Fig. 4).



**Figura 2.** Età dei rispondenti al questionario, durante le varie fasi del progetto. Complessivamente sono 122 gli studenti tra le quattro scuole di Piacenza, una di Brescia, una di Biella e una di Esens (Germania) che hanno risposto alle domande del questionario.

Più del 60% del campione aveva un'età compresa tra 16-18 anni al momento in cui è stato sottoposto il questionario con una esigua percentuale di maggiorenni (tutti studenti delle classi quinte) (Fig. 2). La maggioranza degli studenti ha dimostrato di avere scarse o nulle conoscenze

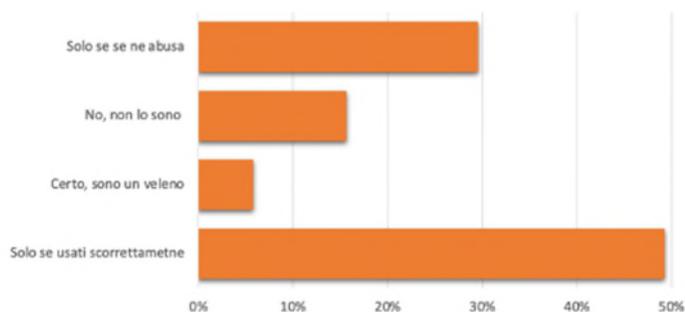
specifiche delle tematiche trattate (ad esclusione degli studenti degli Istituti Agrari) e di accostare genericamente un termine negativo (“veleno”, “nocivo”, “morte” e “devastazione” i termini più ricorrenti) al concetto di pesticida (Fig. 3). Inoltre, i ragazzi hanno dimostrato di conoscere (almeno per “sentito dire”) l’esistenza dell’agricoltura biologica e di quella tradizionale, ma solo il 15% degli studenti (tutti degli istituti tecnici agrari) conosceva la definizione di agricoltura integrata ed una sparuta minoranza dell’esistenza della cosiddetta agricoltura 4.0 (Fig. 3). Nel dibattito che ne è seguito, la totalità degli studenti ha ammesso di non sapere che, ad oggi, l’agricoltura tradizionale è, di fatto, agricoltura integrata secondo la Direttiva 128/2009 e la norma attuativa nazionale, ovvero il PAN del 2014.



**Figura 3.** Tre domande del questionario sottoposto agli studenti delle scuole superiori PRIMA della presentazione del PSR Resisti. Le domande sono servite a testare la preparazione dei rispondenti (n=122) circa le conoscenze pregresse rispetto alle tematiche trattate. I primi due grafici riportano le percentuali delle risposte mentre il word-cloud in basso riporta le parole liberamente scritte dagli studenti in risposta alla domanda n.3 (parole più grandi indicano che un maggior numero di studenti ha scritto la medesima parola).

La presentazione dei risultati del progetto, nel suo insieme, ha permesso di aumentare la consapevolezza degli studenti circa la necessità dell’utilizzo dei prodotti per la protezione delle piante, così come la necessità di proteggerne l’efficacia (attraverso l’adozione di pratiche, tecniche e strumenti che possano ridurre il rischio delle resistenze) e adottare misure innovative che permettano l’aumento della sostenibilità in agricoltura (Fig. 4).

#### I Prodotti per la Protezione delle Piante (PPP) sono pericolosi?



#### Come possiamo migliorare la sostenibilità in agricoltura?



**Figura 4.** Due domande del questionario sottoposto agli studenti delle scuole superiori DOPO la presentazione del PSR Resisti. Le domande sono servite a testare la consapevolezza maturata dai rispondenti (n=122) circa le tematiche trattate

A quanto sopra descritto, si aggiunge che i protocolli LAMP e ddPCR messi a punto per le avversità biotiche permettono di condividere un più diretto rapporto dei tecnici con le analisi di resistenza e la velocizzazione nella disponibilità degli esiti da poter quindi meglio inserire nella difesa di campo. L'approccio diretto in campo della tecnica LAMP favorisce il coinvolgimento dei tecnici nella comprensione e gestione dei fenomeni di resistenza che, in uno scenario di sempre maggiore riduzione di principi attivi utilizzabili, risultano ancora più gravi e capaci di limitare la produzione e quindi la sopravvivenza di intere filiere. Pertanto i risultati del progetto contribuiscono fornendo supporti a sostegno delle produzioni agricole per indirizzare più efficacemente la gestione della difesa dalle avversità, contribuendo altresì a sostenere, in ultima analisi, l'occupazione del settore agricolo.

**Elenco Allegati:**

Allegato-1\_AttDivulRESISTI

Allegto-2\_GO5149124RESISTILink

Allegato-3\_Mareriale-didattico\_esempio

Allegato-4\_5295499\_04237330370\_20221111\_1306\_stampaDefinitiva

Allegato-5\_5547697\_04237330370\_20230406\_1000\_stampaDefinitiva

Allegato-6\_5562737\_04237330370\_20230412\_1540\_stampaDefinitiva

Allegato-7\_5684158\_04237330370\_20230628\_1228\_stampaDefinitiva

Allegato-8\_RICONOSCIMENTO SPECIE DI AMARANTO

Allegato-9\_Protocollo estrazione DNA LAMP

Allegato-10\_Scheda strategie gestione amaranti in soia

Data 14/12/2023

IL LEGALE RAPPRESENTANTE

*(firma digitale)*