

GESTIONE DELLA BANCA DEL GERMOPLASMA REGIONALE E CARATTERIZZAZIONE DELLE VARIETÀ LOCALI DI SPECIE ERBACEE NELLE MARCHE, NELL'AMBITO DEL PROGETTO "BIODIVERSITÀ E RISORSE GENETICHE – L.R. 12/2003" (Acronimo: BanGeCar_4)

ALLEGATO TECNICO

L'istituzione della Banca del germoplasma regionale presso il CREA-OF di Monsampolo del Tronto (AP), rende necessaria l'esecuzione continuativa delle attività di conservazione delle varietà locali di specie erbacee reperite sul territorio Marchigiano e della loro caratterizzazione morfologica e molecolare. Pertanto, le attività descritte nell'allegato tecnico riguardano sia quelle pregresse e tuttora in corso di svolgimento sia quelle che si intenderanno svolgere nel corso della presente convenzione. Il protocollo operativo e le specie con il quale si intenderà procedere saranno stabilite, in collaborazione con l'ASSAM, al momento dell'avvio delle attività.

1. Gestione della Banca del germoplasma regionale marchigiano

La Banca Regionale del Germoplasma delle Marche, istituita presso il CREA-OF di Monsampolo del Tronto, è volta a garantire la tutela, mediante la conservazione *ex situ*, delle specie erbacee autoctone di interesse agrario che hanno determinato e determinano il "paesaggio storico e tradizionale" della regione. Il CREA di Monsampolo dispone di frigoriferi per la conservazione di medio e lungo periodo dei semi e di campi per l'allevamento e ringiovanimento delle accessioni da salvaguardare da qualsiasi forma di contaminazione, alterazione e distruzione. Attualmente nella Banca sono conservate 492 accessioni di specie erbacee autoctone afferenti a specie diverse di interesse agrario ed a rischio di erosione. Le accessioni sono conservate sottovuoto in sacchetti multistrati di alluminio e polietilene, dimensionati in funzione della specie, a temperatura di - 18°C per lungo periodo e +18°C per breve e medio periodo. Le attività inerenti alla gestione della Banca del germoplasma prevedono:

- la conservazione dei semi in idonee condizioni ambientali;
- la moltiplicazione delle accessioni;
- il recupero e l'acquisizione di nuovo germoplasma mediante visite (missioni/sopralluoghi) presso agricoltori già registrati e di nuova individuazione;
- la valutazione del potenziale di germinazione (percentuale di semi puri capaci di produrre germinelli normali in grado di svilupparsi in piante) e dell'energia germinativa (tempo medio di germinazione)

Nell'ambito della convenzione 2022 si proseguirà con la verifica della germinabilità di tutte le accessioni conservate al fine di potere programmare in modo razionale l'attività di moltiplicazione periodica e l'eventuale sostituzione o nuova acquisizione delle accessioni conservate. Le accessioni per le quali si renderà necessaria la moltiplicazione per il rinnovo del seme, saranno allevate in apposite parcelle e a seconda del sistema riproduttivo e della loro fisiologia, saranno adottati sistemi atti a garantire la corretta riproduzione per evitare contaminazioni da esincroci. Si provvederà ad aggiornare il database della Banca ovvero l'archivio informatico in cui è riportata ogni accessione conservata, corredata di informazioni riguardanti la provenienza territoriale, la data di acquisizione, l'agricoltore donatore, la germinabilità, e tutte le attività di moltiplicazione e caratterizzazione svolte. I dati saranno disponibili e consultabili da ASSAM e CREA - OF. Nel corso dell'anno 2022, in collaborazione con ASSAM si avvierà la compilazione dell'Anagrafe Nazionale nel quale saranno registrate le accessioni recentemente iscritte al repertorio regionale ma anche quelle di iscrizione più datata.

2. Caratterizzazione morfologica

In collaborazione con ASSAM, saranno individuate le accessioni annuali di nuova e vecchia acquisizione per le quali sarà allestito un "campo catalogo" per verificare le caratteristiche bio-morfologiche della tipologia di appartenenza, nel rispetto del loro ciclo colturale. Per tutte le accessioni allevate saranno raccolti i dati fenologici e bio-morfologici che, insieme ad una esaustiva documentazione fotografica, saranno riportati nelle schede descrittive. Nel corso dell'anno, saranno individuate le accessioni di maggiore interesse ai fini dell'iscrizione al Repertorio Regionale, per le quali saranno preparate le domande vegetali corredate oltre che dalla scheda descrittiva, anche dalla scheda UPOV, dalle informazioni ottenute intervistando gli agricoltori e riguardanti le esigenze agronomiche, i cenni storici e gli usi gastronomici tradizionali. Tutta la documentazione prodotta sarà inviata alla Commissione vegetale che valuterà e deciderà le accessioni rispondenti ai requisiti e meritevoli di essere iscritte al Repertorio Regionale. In seguito alla recente istituzione dell'Anagrafe Nazionale, si provvederà, in collaborazione con l'ASSAM, ad inserire nel portale informatico le accessioni di nuova

iscrizione ma anche quelle già iscritte al Repertorio Regionale negli anni precedenti. Il campo di collezione già dedicato alla conservazione delle accessioni poliennali (topinambur, zuccina spinosa, erba medica, carciofo, asparago, ecc.) sarà mantenuto e distanziato dal campo catalogo delle colture annuali.

3. Caratterizzazione molecolare

Le accessioni per le quali si renderà necessario un approfondimento finalizzato a risolvere i dubbi sollevati dalla Commissione Vegetali in merito alla loro iscrizione al repertorio regionale, saranno oggetto di indagine molecolare. A queste accessioni si aggiungeranno quelle che l'ASSAM deciderà di valutare in quanto varietà non facilmente distinguibili su base morfologica e per risolvere i casi di sinonimia e omonimia derivati da errori tramandati nel corso degli anni dagli stessi agricoltori. Per ogni specie oggetto di studio, sarà effettuata un'approfondita ricerca bibliografica al fine di individuare i marcatori molecolari più informativi tra quelli "universali" quali RAPDs (Random Amplification of Polymorphic DNA) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) e quelli specifici quali SSR (Simple Sequence Repeat).

4. Organizzazione eventi e divulgazione

Nel corso dell'anno 2022 nel caso le condizioni sanitarie lo permetteranno, si prevede la partecipazione a manifestazioni e/o convegni per divulgare la tematica della conservazione e valorizzazione delle risorse genetiche, e l'organizzazione di incontri con esperti del settore e studenti delle scuole superiori delle Marche.

Per lo svolgimento delle attività per l'anno 2022 inerenti la "Gestione della Banca del Germoplasma regionale e caratterizzazione delle varietà locali di specie erbacee delle Marche, nell'ambito del progetto Biodiversità agraria – L.R. 12/2003" sarà necessario un finanziamento di **30.000,00** euro di cui:

Voce di spesa	Costo
Personale	
A tempo determinato	18.901,07 €
A tempo indeterminato	3.913,66 €
Materiale di consumo	6.485,27 €
Missioni e partecipazione a manifestazioni e convegni	500,00 €
Divulgazione	200,00 €
Totale finanziamento	30.000,00 €

Le voci di spese saranno relative alle seguenti attività:

Attività di campo

- **PRECOLTIVAZIONE:** Allevamento, Semina, Irrigazione, Trattamenti, Rimpiolatura
- **ALLEVAMENTO IN CAMPO:** Preparazione del terreno, Predisposizione dell'impianto di irrigazione, irrigazione, Concimazione di fondo, Trapianto, Trattamenti, Concimazioni, Tutoraggio, Scerbature, Sarchiature
- **RACCOLTA:** Raccolta del seme e cernita, Preparazione e imbustamento dei semi per la loro conservazione
- **SMANTELLAMENTO DEL CAMPO:** Recupero dei tutori, trinciatura dei residui
- **CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA:** Fenotipizzazione, Raccolta dati biometrici e produttivi

Costo del personale

Personale a tempo determinato: è prevista l'assunzione di operai agricoli specializzati per le attività di campo e di un operatore tecnico a supporto dell'attività di campo e di laboratorio per una spesa complessiva di 18.901,07 €. Si prevede l'allevamento in campo di circa 90 accessioni. Il numero delle accessioni potrà subire variazioni nel corso dell'attività e sarà concordato con ASSAM. Il costo del personale TD, in base agli stipendi tabellari, è così ripartito:

Qualifica	n. persone	costo	mesi/uomo	costo totale
Op. agricolo	1	2.332,00 €	2,94	6.849,17 €
Operatore tecnico al 75%	1	2.410,38 €	5,00	12.051,90 €
Totale costo personale a Tempo Determinato				18.901,07 €

Personale a tempo indeterminato: i ricercatori, collaboratori e operatori tecnici saranno impegnati nella gestione di tutte le attività inerenti alla convenzione BaGeCar_4. In particolare: attività di campo, attività di laboratorio, valutazione della germinabilità, aggiornamento del database, supporto alla compilazione del portale Anagrafe Nazionale, preparazione delle schede descrittive, della relazione finale e della documentazione per l'iscrizione delle accessioni al Repertorio Regionale. Il costo per il personale a tempo indeterminato è pari a 3.913,66 €.

Il costo orario del personale a tempo indeterminato, in base agli stipendi tabellari di ogni singolo dipendente, è ripartito in base all'impegno del singolo dipendente e alla sua qualifica:

Personale TD	Descrizione dell'attività	Qualifica	ore totali per la biodiversità	Costo/orario	Costo totale
Sara Sestili	Gestione di tutte le attività (mantenimento accessioni, campo, laboratori), preparazione della relazione annuale, preparazione della documentazione per l'iscrizione al repertorio, organizzazione di eventi, partecipazioni a manifestazioni e convegni	III Liv F3	14,24	34,25	487,75 €
Gabriele Campanelli	Gestione dell'attività di campo	Dir. di Ric., V Liv	7,12	72,26	514,47 €
Enrico Piccinini	Attività di campo, caratterizzazione morfologica presso le aziende esterne e presso il CREA, acquisizioni e interviste presso gli agricoltori al fine di elaborare i dati anagrafici, storici e tecnici da riportare nelle domande vegetali, preparazione delle schede descrittive	CTER VI	58,38	29,38	1.715,14 €
Armando Falcioni	Supporto nel reperimento delle nuove accessioni	CTER V	14,24	33,04	470,50 €
Maria Assunta Dattoli	Contributo in base alle esigenze lavorative	OP VIII	29,05	24,99	725,81 €
Totale costo personale a Tempo Indeterminato					3.913,66 €

Materiale di consumo

Attività di laboratorio

Le attività inerenti alla caratterizzazione molecolare delle accessioni comprendono il prelievo del materiale, la liofilizzazione, l'estrazione del DNA, il controllo della quantità estratta e della qualità (nanodrop e gel di agarosio), la preparazione delle "working solution", la preparazione della reazione per la PCR (Polymerase Chain Reaction = amplificazione del DNA), visualizzazione del pattern polimorfico. Per lo svolgimento di tali attività si prevede l'acquisto di reagenti chimici e l'impiego di attrezzature specifiche già disponibili presso il laboratorio del CREA-OF, sede di Monsampolo del Tronto (AP). I reagenti chimici che si prevedono di acquistare sono riportati nella tabella seguente:

Estrazione del DNA	Amplificazione del DNA	Visualizzazione/Controllo quantità e qualità DNA	Per tutte le analisi molecolari
Kit di estrazione del DNA genomico	dNTP Mix 10Mm	1 Kb DNA Ladder	Guanti in nitrile, SMALL
Pestelli autoclavabili	Taq DNA Polimerasi	DNA ladder BenchTop 100bp	Guanti in nitrile, MEDIUM
B-mercaptoetanolon	Provette 0,2 ml PCR 8 tube strips	Agarosio	Provette 1.5 ml safe-lock
Falcon da 15 ml sterili	Piastra da 96 pozzetti da 0.2 ml	Etidio bromuro	Provette 2.0 ml safe-lock
RNase	Oligonucleotidi 23-mer	methapore per SSR	Puntali volume 0-10 ul
CTAB			Puntali volume 2-200
TRIS-HCL			Puntali volume 100-1000
Clorofornio			Nastro adesivo autoclavabile
Isopropanolo			
Chlorformio:isoamilico 24:1			
Etanolo			
TRIS base			
Acido Borico			
Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA)			
Cloruro di sodio (NaCl)			
Cloruro di potassio (KCl)			
Cloruro di idrogeno (HCl)			
Polyvinylpyrrolidone (PVP)			

Il costo di n. 1 "reazione" è di **30,13 euro**

Si prevede di analizzare 171 campioni afferenti ad accessioni diverse individuate insieme all'ASSAM all'avvio della convenzione operativa. Il costo delle analisi molecolari è di 30,13 euro x 171 campioni = **5.152,00 euro**.

Il costo è suscettibile a variazione in base al numero delle accessioni/campioni da analizzare e a numero e tipologia di marcatore molecolare che si riterrà congruo utilizzare al fine di individuare il grado di polimorfismo sia all'interno dell'accessione sia tra le accessioni della stessa specie.

Germinabilità delle accessioni e allevamento in campo

La verifica della germinabilità prevederà la messa in coltura dei semi delle accessioni conservate in Banca e di nuova acquisizione, su piastre Petri contenenti carta bibula e in ambiente di crescita controllato. I materiali che si prevedono di acquistare sono: *piastre Petri, carta da filtro, carta argentata, e velina, ovatta e vaschette di alluminio*. Il costo della germinabilità previsto è pari a **90,00** euro per un numero indicativo di 100 accessioni. Le accessioni di nuova acquisizione e quelle sottoposte a ringiovanimento e caratterizzazione morfologica saranno allevate in pieno campo e pertanto saranno previste le seguenti voci di spesa:

Materiale di consumo tecnico	Costo/euro
Carburante e Lubrificante	321,45 €
Torba	57,23 €
Tutori vari	262,23 €
Film plastico per pacciamatura	144,80 €
Fertilizzanti BIO e convenzionali	107,56 €
Anticrittogamici e insetticidi	200,00 €
Concime di fondo	150,00 €
TOTALE	1.243,27 €

La spesa indicata è relativa all'allevamento di circa 90 accessioni ma potrà variare in base all'effettivo numero di accessioni che saranno valutate in campo nel corso dell'anno.

Tabella riepilogativa di tutto il materiale di consumo:

Voci di costo	Costo/euro
Materiale di consumo laboratorio	5.152,00 €
Materiale per la germinabilità	90,00 €
Materiale di consumo tecnico	1.243,27 €
TOTALE	6.485,27 €

Missioni e Divulgazione

Per le missioni, si prevede un costo di **500,00** euro per un numero indicativo di 5 sopralluoghi (missioni) presso gli agricoltori per acquisire nuove accessioni e reperire le informazioni necessarie per la compilazione delle schede descrittive e delle domande vegetali per l'iscrizione al repertorio regionale. Nel costo indicato è prevista anche l'eventuale partecipazione a manifestazioni, convegni, comitati tecnico-scientifici e commissioni inerenti alle tematiche della biodiversità, della conservazione e tutela delle risorse genetiche.

L'attività di divulgazione prevederà l'organizzazione di un evento rivolto agli studenti degli istituti tecnici agrari della regione Marche, nell'ambito del "Fascination of Plants Day" (FoPD 2022). Nel caso in cui la situazione pandemica permetta l'organizzazione dell'evento in presenza, si prevede una spesa di **200,00** euro per l'eventuale stampa della brochure.

ASSAM	CREA
Agenzia Servizi Settore Agroalimentare delle Marche	Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo
Il Direttore	Il Direttore
Dott. Andrea Bordoni	Dott. Daniele Massa

Documento informatico firmato digitalmente