

**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\_3)**

**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. La Banca del Germoplasma è costituita da strutture idonee (frigoriferi e campi catalogo) per la conservazione di medio e lungo periodo del seme di popolazioni e varietà erbacee da salvaguardare da qualsiasi forma di contaminazione, alterazione e distruzione. Attualmente nella Banca sono conservate 486 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 di gestione della Banca del germoplasma, oltre a conservare i semi in idonee condizioni ambientali, prevederanno la moltiplicazione delle accessioni, il recupero e l'acquisizione di nuovo germoplasma mediante visite (missioni/sopralluoghi) presso agricoltori già registrati e di nuova individuazione e la valutazione del potenziale di germinazione (percentuale di semi puri capaci di produrre germinelli normali potenzialmente in grado di svilupparsi in piante) e dell'energia germinativa (tempo medio di germinazione). Nell'ambito della convenzione 2021 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. Per tutta la durata della convenzione 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.

**2. Caratterizzazione morfologica**

Dalle indicazioni riportate nel database aggiornato, all'avvio della convenzione, 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. Il campo di collezione già dedicato alla conservazione delle accessioni poliennali (topinambur, zucchini spinosa, erba medica, carciofo ecc.) sarà mantenuto e distanziato dal campo catalogo delle colture annuali. Nel corso dell'attività, saranno raccolti i dati fenologici e bio-morfologici che, insieme ad una esaustiva documentazione fotografica, saranno riportati nelle schede descrittive di ogni singola accessione allevata in campo. In collaborazione con l'ASSAM, saranno individuate le accessioni di maggiore interesse ai fini dell'iscrizione al Repertorio Regionale. Per ogni accessione scelta, 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.

### 3. Caratterizzazione molecolare

In collaborazione con l'ASSAM, sarà programmata l'attività di caratterizzare molecolare finalizzata a discriminare le 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). L'indagine molecolare sarà prioritaria per quelle accessioni che la Commissione Vegetale deciderà di non iscrivere temporaneamente al Repertorio Regionale, riservandosi di decidere in modo definitivo una volta ottenuti i risultati dell'analisi del DNA.

### 4. Divulgazione

Sarà organizzato un webinar rivolto ad agricoltori, ricercatori e studenti degli istituti agrari, al fine di divulgare e valorizzare le attività svolte nell'ambito della convenzione. Nel caso in cui le condizioni sanitarie lo permettano, l'evento sarà organizzato in presenza.

Per lo svolgimento delle attività per l'anno 2021 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:

Personale:	17.567,54 €
A tempo determinato	13.066,67 €
A tempo indeterminato	4.500,87 €
Materiale di consumo	5.849,61 €
Missioni	445,90 €
<b>TOTALI USCITE</b>	<b>30.000,00 €</b>

Le voci di spese saranno relative alle seguenti attività:

#### Costo del personale

##### Personale a tempo determinato

<b>Personale a tempo determinato</b>	Operaio agricolo a tempo determinato (OTD); attività di campo	13.066,67 €
<b>Personale a tempo indeterminato</b>	Gestione delle attività di campo, di laboratorio (analisi molecolare e germinabilità), aggiornamento database e anagrafe nazionale, preparazione delle schede descrittive e della documentazione per l'iscrizione al repertorio, relazioni	4.500,87 €
	<b>TOTALE</b>	<b>17.567,54 €</b>

Le attività di campo saranno le seguenti:

- **PRECOLTIVAZIONE:** Preparazione dei plateau, Semina, Irrigazione, Trattamenti, Rimpiolatura
- **ALLEVAMENTO IN CAMPO:** Preparazione del terreno, Predisposizione dell'impianto di irrigazione, irrigazione, Concimazione di fondo, Trapianto, Trattamenti, Concimazioni di copertura, 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:** Raccolta dei dati biometrici, Raccolta dei dati produttivi

Il costo di n. 1 operaio agricolo OTD è 14 euro/ora pertanto il costo relativo al solo personale a tempo determinato destinato alle attività di campo per l'allevamento di 70 accessioni è di **13066,67** euro

min/accessione	ore/accessione	n. accessioni	ore totali	giorni/uomo	Costo/accessione	Costo/OTD
800	13,33	70	933,33	129,63	186,67 €	13.066,67 €

#### *Personale a tempo indeterminato*

Il tempo produttivo annuo in ore del personale a tempo indeterminato è pari a **1.560,34 euro**.

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, ed è così ripartito:

Nome del dipendente a tempo indeterminato	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 degli eventi, partecipazioni a meetings	Ricercatore, III Liv	25,63	34,25 €	877,95 €
Gabriele Campanelli	Responsabile dell'attività di campo	Dirigente di ricerca, V Liv	10,68	65,18 €	696,08 €
Enrico Piccinini	Attività di campo, caratterizzazione morfologica presso le aziende esterne e presso il CREA, acquisizione delle nuove accessioni, supporto tecnico nella preparazione delle domande vegetali, preparazione delle schede descrittive	CTER VI Liv	56,96	31,40 €	1.788,31 €
Vittoria Di Filippo	Contributo in base alle esigenze lavorative inerenti l'attività	OP VIII Liv	17,09	24,99 €	426,95 €
Maria Assunta Dattoli	Contributo in base alle esigenze lavorative inerenti l'attività	OP VIII Liv	28,48	24,99 €	711,58 €
<b>Totale costo personale a tempo determinato</b>					<b>4.500,87 €</b>

Totale costo personale a tempo indeterminato € 4.500,87 euro

#### **Materiale di consumo**

<b>Materiale di consumo</b>	<i>Analisi molecolari</i>	3.977,00 €
	<i>Allevamento accessioni e germinabilità</i>	€ 1.872.61
	<b>TOTALE</b>	<b>5.849,61 €</b>

#### *Analisi molecolari*

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
Cloroformio			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)			
Polyvinilpyrrolidone (PVP)			

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

Si prevede di analizzare 132 campioni afferenti ad accessioni diverse (fava, pisello, asparago), pertanto il costo delle analisi molecolari è di 30,13 euro x 132 campioni = **3.977,00 euro**

Il costo è suscettibile a variazione oltre che in relazione al numero delle accessioni da analizzare anche in base al numero di marcatori che si riterrà congruo utilizzare al fine di individuare il grado di polimorfismo sia all'interno dell'accessione sia tra le accessioni. La scelta della tipologia del marcatore e del numero di marcatori da utilizzare dipenderà dalla specie.

#### *Germinabilità delle accessioni*

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 le Piastre Petri e le buste goffate.

#### **Allevamento in campo delle accessioni**

Le accessioni saranno allevate in pieno campo e pertanto sarà necessario l'acquisto dei seguenti materiali e prodotti:

Attività	Materiale di consumo tecnico	Costo/euro
<i>Germinabilità</i>	Crescita in piastre Petri	158,00 €
<i>Allevamento in campo</i>	Carburante e Lubrificante	321,45 €
	Torba	57,23 €
	Plateaux	45,97 €
	Tutori vari	478,95 €
	Rete antinsetto	381,45 €
	Film plastico per pacciamatura	221,45 €
	Fertilizzanti BIO e convenzionali	107,56 €
	Fitofarmaci BIO e convenzionali	100,55 €
<b>TOTALE</b>		<b>1.872,61 €</b>

Il costo della germinabilità è indicativo e potrà subire variazioni in base al numero delle accessioni che si riusciranno a valutare. Il costo dei materiali di consumo tecnici è relativo alla coltivazione di n. 70 accessioni.

#### **Missioni**

Si prevede un costo di **445,90 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. Il numero delle missioni e quindi il costo previsto potranno variare in base allo stato di emergenza sanitaria in cui ci troveremo nel corso del 2021.

**Divulgazione**

Sarà organizzato un Webinar rivolto ad operatori del settore e agli studenti degli istituti tecnici agrari della regione Marche. Nel caso in cui fosse possibile organizzare l'evento in presenza il costo dell'organizzazione sarà detratto da una delle voci previste nel prospetto finanziario.