

Allegato 2: allegato tecnico alla convenzione operativa annuale 2023

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_5)

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 del 2023. Il protocollo operativo e le specie con il quale si intenderà procedere saranno stabilite, in collaborazione con l'AMAP, 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 496 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)
- la caratterizzazione molecolare

Nel corso dell'anno 2023, si proseguirà con la verifica della germinabilità delle accessioni conservate al fine di potere programmare in modo razionale l'attività di moltiplicazione periodica e l'eventuale sostituzione o nuova acquisizione delle stesse. 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 AMAP e CREA - OF.

2. Caratterizzazione morfologica

Le accessioni annuali, di nuova e vecchia acquisizione, saranno allevate in un "campo catalogo" nel rispetto del loro ciclo colturale. Per le accessioni da ringiovanire sarà raccolto il seme mentre per quelle di nuova acquisizione oltre al seme, saranno rilevati i dati fenologici, le caratteristiche bio-morfologiche della tipologia di appartenenza che, insieme ad una esaustiva documentazione fotografica, saranno riportati nelle schede descrittive. Per le accessioni ad alto rischio di erosione genetica e quindi di maggiore interesse, saranno compilate 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 ai fini dell'iscrizione al Repertorio Regionale. Tutta la documentazione prodotta sarà inviata alla Commissione vegetale che valuterà e deciderà se le accessioni presentate sono rispondenti ai requisiti e quindi meritevoli di essere iscritte al Repertorio Regionale. Le accessioni di nuova iscrizione saranno inserite nel portale dell'Anagrafe Nazionale. Nel corso del 2023 si completerà l'inserimento nell'Anagrafe Nazionale di tutte le accessioni iscritte al Repertorio Regionale. Il campo di collezione già dedicato alla conservazione delle accessioni poliennali (topinambur, zucchini spinosa, erba medica, carciofo, asparago, ecc.) sarà mantenuto e distanziato dal campo catalogo delle colture annuali.

3. Caratterizzazione molecolare

Su richiesta della Commissione vegetale e ai fini dell'iscrizione al Repertorio Regionale, saranno analizzate alcune accessioni non facilmente distinguibili su base morfologica. A queste accessioni si aggiungeranno quelle che l'AMAP chiederà di valutare ai fini del loro recupero e acquisizione, in quanto l'indagine genetico-molecolare rappresenta un valido strumento per fare chiarezza su errori di sinonimia e omonimia tramandati dagli agricoltori nel corso degli anni. 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 per le tipologie da analizzare quali SSR (Simple Sequence Repeat).

4. Organizzazione eventi e divulgazione

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 2023 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 **27.000,00** euro di cui:

Voce di spesa	Costo
Personale	
A tempo determinato	19.111,13 €
A tempo indeterminato	3.521,71 €
Materiale di consumo	3.967,16 €
Missioni e partecipazione a manifestazioni e convegni	300,00 €
Divulgazione	100,00 €
Totale finanziamento	27.000,00 €

Le voci di spese sono relative alle seguenti attività:

MATERIALI DI CONSUMO

Attività di campo e verifica della germinabilità delle accessioni

- **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, cernita e imbustamento dei semi per la loro conservazione
- **SMANTELLAMENTO DEL CAMPO:** recupero dei tutori e trinciatura dei residui

- **CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA:** fenotipizzazione, raccolta dati biometrici e produttivi

Materiale di consumo tecnico	Costo/euro
Torba	410,00 €
Film plastico per pacciamatura	150,00 €
Fertilizzanti BIO e convenzionali	100,00 €
Anticrittogamici e insetticidi	100,00 €
Telo ombreggiante	117,16 €
Materiale per l'analisi della germinabilità di circa 100 accessioni	90,00
TOTALE	967,16 €

Attività di laboratorio (caratterizzazione molecolare)

Le attività inerenti alla caratterizzazione molecolare delle accessioni comprendono il prelievo del materiale, la liofilizzazione, l'estrazione del DNA, il controllo quanti/qualitativo del DNA estratto (nanodrop e gel di agarosio), la preparazione delle "working solution", la preparazione delle reazioni di amplificazione del DNA (PCR = Polymerase Chain Reaction), la visualizzazione del pattern polimorfico e l'analisi dei dati. Per lo svolgimento di tali attività si prevede l'acquisto di reagenti chimici e l'impiego di attrezzature e software già disponibili presso il laboratorio del CREA-OF, sede di Monsampolo del Tronto (AP). Il costo di n. 1 "reazione" è di **30€**. Il numero esatto delle accessioni da valutare dal punto di vista molecolare sarà concordato in collaborazione con AMAP. Sulla base di quanto emerso dalla Commissione Vegetale riunitasi a dicembre 2022 e da quanto già concordato con AMAP, si prevede di analizzare circa 100 campioni. Il costo delle analisi molecolari è pertanto di **3000,00 €**. 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.

I reagenti chimici per le analisi molecolari e i materiali tecnici per la verifica della germinabilità che si prevedono di acquistare sono riportati nella tabella seguente:

Estrazione del DNA	Amplificazione del DNA	Analisi della quantità e qualità DNA	Plastiche varia
Kit di estrazione del DNA genomico	dNTP Mix 10Mm	1 Kb DNA Ladder	Guanti in nitrile, SMALL
Pestelli autoclavabili	Taq DNA Polimerasi	100 bp DNA ladder	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	Puntali volume 0-10 ul
CTAB			Puntali volume 2-200
TRIS-HCL			Puntali volume 100-1000
Cloroformio			Nastro adesivo autoclavabile
Isopropanolo			Scatole per la conservazione del DNA
Chlorformio:isoamilico 24:1			Piastre Petri per test di geminabilità
Etanolo			
TRIS base			
Acido Borico			
Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA)			
Cloruro di sodio (NaCl)			
Cloruro di potassio (KCl)			
Cloruro di idrogeno (HCl)			
Polyvinilpyrrolidone (PVP)			

Tabella riepilogativa di tutto il materiale di consumo:

Voci di costo	Costo/euro
Materiale di consumo per il laboratorio	3.000,00 €
Materiale di consumo per l'attività di campo	967,16 €
TOTALE	3.967,16 €

PERSONALE

Personale a tempo determinato: è prevista l'assunzione di operai agricoli specializzati per le attività di campo e di un collaboratore tecnico TD al 70% a supporto dell'attività di campo e di laboratorio per una spesa complessiva di 18.901,07 €. Si prevede l'allevamento in campo di un numero non inferiore alle 90 accessioni. Il numero delle accessioni potrà subire variazioni nel corso dell'attività e sarà concordato con AMAP. Il costo del personale TD, in base agli stipendi tabellari, è così ripartito:

Qualifica	n. persone	costo	mesi/uomo	costo totale
Operaio agricolo	1	2332,00	5,6	13.066,67
Collaboratore tecnico al 70%	1	3022,23	2,0	6.044,46
Totale costo personale a tempo determinato				19.111,13

Personale a tempo indeterminato: i ricercatori, collaboratori e operatori tecnici saranno impegnati nella gestione di tutte le attività inerenti alla convenzione BaGeCar_5. In particolare: attività di campo, attività di laboratorio, valutazione della germinabilità, aggiornamento del database, inserimento delle accessioni nel portale dell'Anagrafe Nazionale, preparazione di tutta la documentazione da presentare alla Commissione Vegetale per l'iscrizione delle accessioni al Repertorio Regionale. Il costo per il personale a tempo indeterminato è pari a 3.521,71 €.

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	I Ric, II Liv, F2	14,24	40,67	579,08 €
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 e inserimento delle accessioni nell'Anagrafe Nazionale	CTER VI	63,51	29,38	1.865,80 €
Armando Falcioni	Supporto nel reperimento delle nuove accessioni	CTER V	3,56	33,04	117,62 €
Maria Assunta Dattoli	Supporto in base alle esigenze lavorative	OP VIII	17,80	24,99	444,74 €
Totale costo personale a Tempo Indeterminato					3.521,71 €

MISSIONI E DIVULGAZIONE

Il numero di sopralluoghi *in situ* (missioni) che saranno effettuati nel corso del 2023 non è definito in

quanto soggetto alle segnalazioni, da parte dell'AMAP delle biodiversità da valutare ai fini della loro acquisizione. Nell'ambito della voce di costo "missioni" 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. Nell'ambito delle attività di divulgazione è prevista l'organizzazione possibilmente in presenza dell'evento annuale rivolto agli studenti degli istituti tecnici agrari della regione Marche, nell'ambito del "Fascination of Plants Day" (FoPD 2023) e all'eventuale pubblicazione di risultati di rilevanza scientifica. Il costo di 400,00 per tali attività è pertanto indicativo e soggetto a variazione nel corso dell'anno 2023.

AMAP	CREA
Agenzia Marche Agricoltura Pesca	Centro di Ricerca Orticoltura e Florovivaismo
Il Direttore Dott. Andrea Bordoni	Il Direttore Dott. Daniele Massa

Documento informatico firmato digitalmente