

SCHEDA PROGETTO UNITA' OPERATIVA

1. Titolo del progetto	Riduzione di input di origine extra-aziendale per la difesa delle coltivazioni biologiche mediante approccio agroecologico				
2. Acronimo	DIBIO				
3. Titolo del WP o linea di ricerca	Composti naturali e microorganismi per la difesa ed il PRIMing di colture BIOlogiche MEditerranee. Acronimo - BIOPRIME				
4. Durata (mesi)	36				
5. Importo	Costo progetto U.O. (comprensivo delle spese non ammissibili a finanziamento)	Spesa ammessa	Contributo concesso sulla spesa ammessa. (Mipaaf)		
	€280.448	€ 162.384	€ 160.760		
6. Unità Operativa	Nome Ente	CREA- Genomica e Bioinformatica			
	Tipologia Ente	CREA	Università pubblica	CNR	Privati
		X			
Indirizzo, telefono, pec	CREA-GB Via San Protaso 302 – 29017-Fiorenzuola d'Arda PEC. gb@pec.crea.gov.it				
7. Responsabile scientifico della U.O.	Nome e Cognome	Valeria Terzi			
	Qualifica	Dirigente tecnologo			
	Indirizzo	Via San Protaso 302 – 29017-Fiorenzuola d'Arda			
	Telefono	0523-983758			
	e-mail o altri contatti	valeria.terzi@crea.gov.it			

8. Curriculum del responsabile scientifico della U.O. e pubblicazioni più significative relative all'argomento (max 1 pag)

Valeria Terzi, nata a Parma il 17.02.1957. Diploma di Maturità classica. Laurea in Scienze Biologiche presso l'Università di Parma.
Dirigente tecnologo presso il CREA-GB di Fiorenzuola d'Arda. Membro del direttivo accademico della Scuola di dottorato di ricerca in "Scienze, Tecnologie e Biotecnologie Agro-alimentari" dell'Università di Modena e Reggio Emilia, delle Scuole di dottorato di ricerca in "Biologia vegetale" e "Biotecnologie e Bioscienze" dell'Università di Parma. Responsabile della Scuola di Genetica Agraria SIGA per il periodo 2009-2011. Accademica dei Georgofili di Firenze.
Ha partecipato ed ha coordinato progetti di ricerca regionali, inter-regionali, nazionali ed internazionali comprendenti tematiche di tipo teorico, applicativo e di sviluppo. Socia della Società Italiana di Genetica Agraria, del cui Direttivo è stata membro nel biennio 2010-2011
La sua attività scientifica si è focalizzata nel settore della genetica e genomica applicata ad aspetti relativi alla risposta delle piante a stress biotici ed abiotici ed allo sviluppo. Ha applicato tecnologie molecolari nel settore del miglioramento genetico dell'orzo (pianta modello) e di altre specie cerealicole autogame (frumento duro ed avena) e nel settore delle tecnologie agroalimentari, con studi ed azioni di valorizzazione di risorse genetiche e sviluppo dei processi di filiera. Ha attivato linee di ricerca applicata, dirette verso l'innalzamento ed il controllo di aspetti di qualità e sicurezza entro filiere agroalimentari convenzionali e biologiche. A questo proposito è particolarmente impegnata in studi sull'impiego di molecole naturali per il controllo di fitopatogeni e nello studio fisiologico e molecolare dell'interazione tripartita cereali-microrganismi del suolo-ambiente. E' autrice di più di 200 pubblicazioni su riviste scientifiche e tecniche nazionali e capitoli di libri. E' co-autrice di domanda di brevetto relativa ad un "fertilizzante a base di digestato arricchito con microrganismi biostimolanti per l'agricoltura biologica".
Scopus IF: 18

Pubblicazioni relative all'attività proposta

- Fiorilli V, Vannini C, Ortolani F, Garcia-Seco D, Chiapello M, Novero M, Domingo G, Terzi V, Morcia C, Bagnaresi P, Moulin L, Bracale M, Bonfante P 2018. Omics approaches revealed how arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances yield and resistance to leaf pathogen in wheat. *Scientific Reports*, 8:9625 (I.F. 4.6)
- Morcia C., Tumino G., Ghizzoni R., Bara A., Salhi N., Terzi V. 2017. *In vitro* evaluation of sub-lethal concentrations of plant derived antifungal compounds on *Fusaria* growth and mycotoxin production. *Molecules*, 22 (8), 1271, DOI 10.3390/molecules22081271 (I.F. 3.2)
- Bernardo L., Morcia C., Carletti P., Ghizzoni R., Badeck F-W., Rizza F., Lucini L., Terzi V. 2017. Proteomic insight into the mitigation of wheat root drought stress by arbuscular mycorrhizae. *Journal of Proteomics* 169:21-32 (I.F. 3.7)
- Caradonia F., Ronga D., Setti L., Laviano L., Hagassou D., Rizza F., Badeck F., Morcia C., Ghizzoni R., Terzi V., Moulin L., Bonfante P., Francia E. 2016. Filatura del pomodoro: controllarla con i biostimolanti. *L'Informatore Agrario*, supplemento A, 47/2016, pp. 20-22
- Morcia C., Mehani M., Salhi N., Nazari L., Khelil A., Bara A., Ghizzoni R., Tumino G., Terzi V. 2015. On the role of natural compounds in mycotoxigenic fungi control. In: *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, Publisher: Formatex Research Center, Editors: A. Méndez-Vilas, pp.193-198. ISBN: 978-84-942134-6-5
- Morcia C., Tumino G., Ghizzoni R., Terzi V. 2015. Carvone (*Mentha spicata* L.) oils. "Essential Oils in Food Production, Preservation, Flavour and Safety" Edited by Victor R. Preedy, 35: 309-316. ISBN: 978-0-12-416641-7
- Degola F., Morcia C., Biscaglie F., Mussi F., Tumino G., Ghizzoni R., Pelosi G., Terzi V., Buschini A., Restivo F.M., Lodi T. 2015. *In vitro* evaluation of the activity of thiosemicarbazone derivatives against mycotoxigenic fungi affecting cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 200:104-111. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.009
- Morcia C, Malnati M, Terzi V. 2012. *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives and Contaminants*, 29: 415-422. DOI:10.1080/19440049.2011.643458

9. Competenze e ruolo della U.O. in relazione al progetto

L'attività proposta coinvolge 8 unità di personale a tempo indeterminato (dirigenti, ricercatori, tecnici) con competenze specifiche rispettivamente di

i. Genomica e Bioinformatica (CREA-GB)

Partecipanti: Valeria Terzi (dirigente tecnologo), Caterina Morcia (ricercatore), Roberta Ghizzoni (collaboratore tecnico), sede CREA-GB di Fiorenzuola d'Arda; Simona Baima (ricercatore), Barbara Felici (collaboratore tecnico) sede CREA-GB Roma

Il Centro si occupa di genomica, bioinformatica, genetica e di fisiologia vegetale con particolare riferimento all'ampliamento delle conoscenze sulla struttura e funzione dei geni e dei genomi e con attività prevalenti nei settori del miglioramento genetico, della qualità e sicurezza dei prodotti agricoli, della sostenibilità e tracciabilità dei processi produttivi. CREA-GB metterà a disposizione campi sperimentali, serre e celle climatiche per la realizzazione delle infezioni in condizioni controllate e naturali, una piattaforma di trascrittomica, con sistema NGS per sequenziamento massivo parallelo e apparecchiature per qPCR, un laboratorio di bioinformatica, con server per l'analisi massiva di dati di sequenziamento, un laboratorio per la fenotipizzazione di piante in condizioni di stress biotico e per l'identificazione e quantificazione di patogeni fungini. Sono inoltre a disposizione del progetto expertise nel settore della quantificazione di micotossine e identificazione e quantificazione di funghi micotossigeni.

I partecipanti di CREA-GB sono coinvolti nello studio fisiologico e molecolare dell'impatto del microbiota del suolo e di composti naturali nella difesa dei cereali. In questo ambito CREA-GB ha partecipato al progetto MIC-CERES Microbial eco-compatible strategies for improving wheat quality traits and rhizospheric soil sustainability (Cariplo-Agropolis Found) ed è coordinatore del progetto "Natural molecules for sustainable cereal cropping" (MAE, Progetto di grande rilevanza Italia-Algeria)

I partecipanti del CREA-GB di Roma hanno competenze per lo studio dell'effetto degli stress ambientali sul contenuto in molecole bioattive in germogli di brassicaceae, per la valutazione degli effetti biologici di matrici acquose con diversa composizione derivate dai germogli, nello screening degli effetti di biostimolanti di diversa natura sulla crescita delle piante e nell'analisi delle comunità microbiche del suolo.

Pubblicazioni attinenti al progetto:

Maldini, M.T., Baima, S., Morelli, G., Scaccini, C., e Natella, F. (2012) "A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry approach to study "glucosinoloma" in broccoli sprouts" *Journal of Mass Spectrometry*, 47(9):1198-206.

Maldini M, Natella F, Baima S, Morelli G, Scaccini C, Langridge J, Astarita G. (2015) "Untargeted Metabolomics Reveals Predominant Alterations in Lipid Metabolism Following Light Exposure in Broccoli Sprouts." *Int J Mol Sci*. 16, 13678-13691.

Natella, F., Maldini, M., Nardini, M., Azzini, E., Foddai, M.S., Giusti, A.M., Baima, S., Morelli, G., Scaccini, C., (2016) "Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation" *Food Chem* 201, 101-109.

D'Orso F, Peñalosa A, Baima S, Possenti M., Morelli G. "Potenziale di tolleranza agli stress delle piante coltivate e ricadute sulla qualità nutrizionale degli alimenti". In corso di stampa, Rapporto di ricerca "Indagine multidisciplinare dei legami tra territorio, biodiversità, nutrizione e la sostenibilità dell'agro- alimentare italiano" progetto Terravita finanziato dal MIPAAF (D.M. 25870/7303/2011).

Migliore M., Felici B., Benedetti A., Florio A., Baroccio F. (2013) "Proposal of Bioassays as a Tool for Screening Biostimulant Properties of Protein Hydrolyzates from Animal Waste Materials" *Acta horticulturae* 1009, 235-240.

Il CREA-GB di Roma in questo progetto svolge attività di produzione di estratti acquosi da germogli di Brassicaceae cresciuti in diverse condizioni in ambiente controllato al fine di ottenere materiale riproducibile, con composizione arricchita in diverse componenti bioattive, da utilizzare in test di attività sia per le proprietà biocide (su semi e su foglie) sia per le proprietà biostimolanti anche in collaborazione con le altre U.O. del WP. Il CREA-GB di Roma dispone di laboratori attrezzati per le colture in vitro, la microbiologia, la biologia molecolare e di camere di crescita per la produzione dei germogli e i test sulle piante.

ii Agricoltura e Ambiente (CREA-AA)€

Partecipanti: Stefania Galletti (ricercatore), Stefano Cianchetta (Operatore tecnico), sede CREA-AA Bologna.

CREA-AA ha competenze nel settore della patologia vegetale, in particolare della difesa non convenzionale da patogeni delle colture agrarie e sugli effetti dell'applicazione al seme o alla pianta di microrganismi benefici e di estratti o molecole di origine naturale, che possono attivare nella pianta i meccanismi di difesa sistemica. Tali competenze derivano dalla partecipazione a diversi progetti di ricerca in tema di agricoltura biologica, che hanno prodotto pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali. Il ruolo di AA nel progetto consiste nel produrre estratti di alghe marine e di cianobatteri e nel saggiarne l'attività quando applicati al seme di orticole per indurre fenomeni di priming. Il priming attiva nella pianta processi metabolici correlati all'innalzamento dei livelli di resistenza ai patogeni. Il Centro ha a disposizione personale qualificato, laboratori di chimica, biologia, micologia e fitotroni per preparare gli estratti, mettere a punto protocolli e condurre prove riproducibili. Tali disponibilità consentono di interagire con gli altri partecipanti dell'U.O. per saggiare anche altri formulati prodotti nell'ambito del progetto.

Pubblicazioni inerenti:

- Cianchetta S., Nota M., Galletti S. (2017). Biological activity of alkali pre-treated *Arundo donax* extract towards different filamentous fungi. *Journal of Plant Pathology*, 99: S43-S44.
- Roberti R., Galletti S., Burzi P. L., Righini H., Cetrullo S., Perez C. (2015). Induction of defence responses in zucchini (*Cucurbita pepo*) by *Anabaena* sp. water extract. *Biological control*, 82: 61-68.
- Galletti S., Fornasier F., Cianchetta S., Lazzeri L. (2015). Soil incorporation of brassica materials and seed treatment with *Trichoderma harzianum*: effects on melon growth and soil microbial activity. *Industrial Crops and Products*, 75 Part A: 73-78.
- Galletti S., Paris R., Cianchetta S., Burzi P. L., Lupotto E. (2014). *Trichoderma* seed treatment can induce resistance to *Fusarium verticillioides* in maize. *Proceeding MPU-ISM congress, Istanbul, 25-29 Agosto 2014*, p. 153.
- Galletti S., E. Sala, O. Leoni, P. L. Burzi, C. Cerato (2008). *Trichoderma* spp. tolerance to biocidal compounds from *Brassica carinata* seed meals for a combined use in biofumigation. *Biological control*, 45: 319-327.

iii Viticoltura ed Enologia (CREA-VE) €

Partecipanti: Walter Chitarra (ricercatore), sede CREA-VE Conegliano.

Il CREA-VE ed i partecipanti svolgono ricerca in ambito di ecofisiologia vegetale, patologia vegetale, biologia molecolare e bioinformatica con attenzione all'ecologia microbica nei sistemi agrari ed in particolare in vite.

Il CREA-VE in questo progetto svolgerà attività sulla stimolazione delle risposte di difesa della vite tramite l'utilizzo di funghi micorrizici notoriamente conosciuti per la loro potenziale capacità di attivare risposte di difesa nella pianta, inducendo uno stato di *priming*, oltre a migliorare la capacità di assorbire sostanze nutritive dal suolo. È inoltre possibile accoppiare la stimolazione con microrganismi alla valutazione dei parametri fisiologici per valutare gli effetti complessivi che questi trattamenti hanno sulla pianta. Queste competenze sono ben descritte nei lavori pubblicati dal Dr. Chitarra e visionabili sul profilo Scholar.

In aggiunta a quanto descritto, con la disponibilità di un laboratorio attrezzato con strumentazione adatta a lavorare con microrganismi e strumentazione per le analisi molecolari, sarà possibile approfondire le risposte della pianta. In particolare, con le competenze microbiologiche e bioinformatiche del Dr. Luca Nerva, che collaborerà al progetto, si vuole procedere all'individuazione, isolamento e sequenziamento dei trascritti dei microrganismi coinvolti nella sindrome del mal dell'ESCA (MdE). Inoltre, con le informazioni ottenute da questo studio sarà possibile valutare soluzioni innovative per il trattamento di questa sindrome. In particolare, recenti pubblicazioni hanno suggerito la possibilità di utilizzare long non-coding double-stranded RNA (dsRNA) per il contenimento di patogeni fungini, che si è intenzionati a sviluppare per la sindrome dell'ESCA, che fino ad oggi risulta una malattia senza possibilità di cura.

Pubblicazioni inerenti:

- Volpe V.*, Chitarra W.*, Cascone P., Volpe M.G., Bartolini P., Moneti G., Pieraccini G., Di Serio C., Maserti B., Guerrieri E., Balestrini R. (2018). The association with two different arbuscular mycorrhizal fungi differently affects the water stress tolerance in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1480. *Authors equally contributed to this work. (IF 3.67)
- Chitarra W.*, Perrone I.*, Avanzato C.G., Minio A., Boccacci P., Santini D., Gilardi G., Siciliano I., Gullino M.L., Delledonne M., Mannini F., Gambino G. (2017). Grapevine grafting: Scion transcript profiling and defense-related metabolites induced by rootstocks. *Frontiers in Plant Science*, 8: 654. *Authors equally contributed to this work. (IF 3.67)

-Chitarra W., Pagliarani C., Maserti B., Lumini E., Siciliano I., Cascone P., Schubert A., Gambino G., Balestrini R., Guerrieri E. (2016). Insights on the impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on tomato tolerance to water stress. *Plant Physiology*, 171: 1009-1023. (IF 5.95)

-Nerva, L., Chitarra, W., Siciliano, I., Gaiotti, F., Ciuffo, M., Forgia, M., Varese, G.C. & Turina, M. (2018). Mycoviruses mediate mycotoxin regulation in *Aspergillus ochraceus*. *Environmental microbiology*. (IF 4.97)

iv Zootecnia ed Acquacoltura (CREA-ZA) €

Partecipanti: Aldo Tava (Dirigente di ricerca), sede CREA-ZA Lodi.

Il CREA-ZA ed i partecipanti svolgono ricerca in ambito di preparazione, caratterizzazione (GC, GC/MS, HPLC, LC/MS, IR, UV ed NMR) e utilizzo di composti naturali ad azione biocida e biostimolante. Inoltre, i partecipanti hanno esperienza nei campi della chimica, della biochimica, dell'agronomia, dell'ecofisiologia vegetale con particolare attenzione alla coltivazione di piante foraggere, oleaginose, proteaginose ed orticole nei diversi sistemi agrari (convenzionale, integrato e biologico). Presso l'Istituto sono disponibili laboratori, fitotroni, serre e campi per preparare e testare gli estratti, mettendo a punto protocolli e prove riproducibili. Tali disponibilità consentono di interagire con gli altri partecipanti dell'U.O. per una piena condivisione dei preparati naturali nell'ambito del progetto.

Il CREA-ZA in questo progetto svolgerà attività di produzione, caratterizzazione ed applicazione di composti naturali da valutare nelle risposte di difesa di colture foraggere (p. es. mais, orzo, girasole, favino) ed orticole (p. es. pomodoro da industria e lattuga) tramite l'utilizzo di oli essenziali, saponine estratti acquosi titolati di e polifenoli notoriamente conosciuti per la loro azione biocida e/o la loro potenziale capacità di attivare risposte di difesa e biostimolazione nella pianta, inducendo meccanismi di resistenza/tolleranza verso i principali stress biotici ed abiotici, oltre a migliorare la capacità di assorbimento delle sostanze nutritive dal suolo. È inoltre possibile accoppiare la biostimolazione con composti naturali alla valutazione dei parametri chimici, biochimici, agronomici e fisiologici per valutare le risposte complessive (con un approccio multidisciplinare) che questi trattamenti hanno sulla pianta. Queste competenze sono ben descritte nei lavori pubblicati dal Dott. Tava e visionabili sul profilo Scholar.

In aggiunta a quanto descritto, con la disponibilità di un laboratorio attrezzato con strumentazione adatta a lavorare con estratti naturali e strumentazione per le analisi chimiche e biochimiche, permetteranno di approfondire i meccanismi biologici di risposte della pianta. In particolare, con le competenze agronomiche e fisiologiche del Dott. Domenico Ronga e chimiche/biochimiche della Dott.ssa Elisa Biazzi, con i quali è prevista una collaborazione, si procederà all'individuazione della migliore concentrazione di utilizzo dei diversi preparati naturali, per massimizzare le rese agricole sia in termini quantitativi che qualitativi. Infine, con le informazioni ottenute da questi studi sarà possibile ottenere soluzioni innovative per la difesa e biostimolazione delle colture summenzionate.

Pubblicazioni inerenti:

- Vitalini S., Madeo M., Tava A., Iriti M., Vallone L., Avato P., Cocuzza C.E., Simonetti P., Argentieri M.P. Chemical profile, antioxidant and antimicrobial activities of *Achillea Moscata* Wulfen, an endemic species from Alps. *Molecules* 2016, 21, 830; doi: 10.3390/molecules21070830.

- Abbruscato P., Tosi S., Crispino L., Biazzi E., Menin B., Picco A.M., Pecetti L., Avato P., Tava, A. Triterpenoid glycosides from *Medicago sativa* as antifungal agents against *Pyricularia oryzae*. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 11030-11036.

- Pollier, J.; Moses, T.; Gonzalez-Guzman, M.; De Geyter, N.; Lippens, S.; Vanden Bossche, R.; Marhavy, P.; Kremer, A.; Morreel, K.; Guerin, C.J.; Tava, A.; Oleszek, W.; Thevelein, J.M. Campos, N.; Goormachtig, S. and Goossens, A. The protein quality control system manages plant defense compound synthesis. *Nature*, 2013, 504, 148-152. doi:10.1038/nature12685.

- D'Addabbo T., Carbonara T., Leonetti P., Radicci V., Tava A., Avato P. Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochem Rev.* 2011, 10, 503-519.



10. Descrizione della ricerca

10.1 Descrizione;

BIOPRIME è incentrato sullo studio e validazione di biostimolanti per la protezione di colture biologiche da stress biotici ed abiotici. I biostimolanti possono essere costituiti da molecole e / o microrganismi la cui funzione, applicata alle piante o alla rizosfera, è quella di stimolare i processi naturali per migliorare non solo l'assorbimento dei nutrienti e la loro efficienza d'impiego, ma anche la tolleranza a stress biotici ed abiotici ed in ultima analisi la qualità delle colture. La ricerca scientifica e tecnologica nel settore dei biostimolanti e del loro ruolo per un'agricoltura biologica è emersa di recente, attirando l'attenzione da parte di diversi portatori d'interesse, quali agricoltori, investitori, consumatori, mondo dell'industria. La ricerca nel settore dei biostimolanti è quindi innovativa e centrale e le maggiori sfide sono di natura scientifica, tecnica e relative alla regolamentazione. BIOPRIME è un progetto di ricerca scientifica applicata che vuole contribuire ad implementare classi di microrganismi, molecole e composti botanici naturali utili per la difesa delle colture biologiche. È noto come microrganismi del suolo e composti naturali possano avere rispettivamente proprietà biostimolanti e biocide. Oltre a questo possono però anche agire come agenti di priming, inducendo nella pianta meccanismi di resistenza agli stress ambientali, senza un rilevante costo fisiologico.

Il progetto intende rispondere al fabbisogno della sostituzione/riduzione dell'impiego di fitofarmaci di sintesi nella difesa di cereali, orticole e vite e nella concia delle sementi biologiche. L'innovazione di progetto sta nel fatto che verrà valutato un panel di composti naturali quali oli essenziali e molecole ben caratterizzate per proprietà farmacologiche e per le quali esiste un'attività di produzione su vasta scala che ne assicura l'economicità d'uso, ma anche composti non ancora indagati per proprietà biocide e di priming.

In maggior dettaglio in BIOPRIME verranno prese in considerazione:

tre categorie di colture:

- cereali autunno-vernini
- colture orticole (pomodoro, zucchino, lattuga)
- colture arboree (vite)

i seguenti composti naturali per la concia del seme e la difesa:

- estratti naturali titolati nei vari principi attivi (oli essenziali, loro componenti primari e miscele; saponine, sostanze fenoliche, glucosinolati)

tre principali classi di potenziali induttori di priming:

- AMF (micorrize arbuscolari) e SBB (batteri benefici del suolo);
- estratti titolati da piante aromatiche e medicinali, estratti da germogli di brassiche a composizione riproducibile e modulabile in base al genotipo e alle condizioni di crescita per cui arricchibili in molecole diverse e da alghe brune, rosse e cianobatteri;
- long non-coding dsRNA per la produzione da parte della pianta di siRNA

i seguenti patosistemi:

- cereali + malattie fogliari (*Fusaria* micotossigeni, *Blumeria graminis*) e trasmesse da seme (*Pyrenophora graminea*)
- orticole+ malattie telluriche e fogliari (*Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Verticillium*, *Podosphaera xanthii*) e trasmesse da seme (*Ralstonia solanacearum*)
- vite e sindrome del Mal dell'Esca (MDE), malattia complessa imputabile a diversi consorzi microbici e per la quale non esiste attualmente nessuna tecnica per il trattamento, la cura ed il contenimento.

A seconda della coltura e del patosistema considerato verranno utilizzate e valutate diverse strategie di somministrazione, quali nebulizzazione, modalità di concia, confettatura del seme, endoterapia. Le prove per la concia delle sementi e la difesa saranno condotte in ambiente controllato, in serra o in campo, con inoculazioni naturali o artificiali dei patogeni o con l'impiego di materiale a livello di infezione noto.

L'effetto di *priming* verrà determinato in microcosmo o in un sistema di mesocosmo in campo. Verrà impiegato un approccio multidisciplinare che prevede i) misurazione di parametri agronomici ed eco-fisiologici, ii) analisi molecolari considerando geni target legati alla difesa, iii) analisi biochimiche per valutare lo stato ormonale e la produzione di specifici metaboliti secondari (es. stilbenoidi). Le prove condotte in ambiente controllato per verificare gli effetti della riduzione della malattia, verranno sfruttate per mettere a punto i protocolli di applicazione da trasferire in campo.

BIOPRIME è organizzato in 4 WorkPackages (WPs), ognuno dei quali è condotto da un WP leader e prevede attività in collaborazione con gli altri partecipanti.

BIOPRIME WP1 (Leader CREA-GB). Difesa in cereali biologici. Questo WP è focalizzato sulla difesa di cereali autunno-vernini ai due livelli dell'impiego di sostanze biocide per la concia del seme ed il controllo diretto di fitopatologie e dell'individuazione di composti e ceppi microbici con potenzialità di priming. Verranno inoltre preparati estratti di germogli di brassiche che rappresentano una matrice naturalmente arricchita di nutrienti e molecole bioattive rispetto alla pianta matura, e possono essere facilmente cresciuti in condizioni controllate e sottoposti a trattamenti in grado di stimolare la produzione di specifiche molecole d'interesse. I germogli di *Brassicaceae*, in particolare, presentano un alto contenuto di molecole bioattive coinvolte nelle risposte agli stress tra cui i polifenoli e soprattutto i glucosinolati (GLS), pressochè esclusivi delle brassiche, il cui contenuto è da 10 a 100 volte maggiore nei germogli rispetto al broccolo adulto (Fahey *et al.*, 1997). E' noto che lo stress applicato in modo mirato (elicitazione) a piante d'interesse agricolo durante le prime fasi della germinazione o durante la coltivazione può essere utilizzato come tecnologia per stimolare le difese della pianta ed aumentare il contenuto di molecole bioattive con proprietà biocide e di priming. In studi precedenti abbiamo confrontato, in modo sistematico, l'effetto di diverse concentrazioni di vari elicitori (stress osmotico e salino, ACC, MeJA) sul contenuto di diverse molecole bioattive (glucosinolati, composti fenolici totali, flavonoidi, antocianine, β -carotene vitamine C ed E) sui germogli di broccolo (Natella *et al.*, 2016). L'esposizione ai diversi induttori ha prodotto dei cambiamenti specifici e dose-dipendenti nel contenuto di tutte le molecole analizzate. Per la valutazione dell'effetto del cambiamento compositivo sull'attività biologica sono stati preparati dei succhi ottenuti dalla spremitura dei germogli freschi mediante un estrattore a pressa a partire da germogli cresciuti in condizioni che massimizzano le differenze di composizione. Inoltre, per verificare la riproducibilità della composizione a seguito dell'applicazione di condizioni di crescita standardizzate, diversi lotti di succo sono stati preparati a partire da germogli ottenuti da crescite indipendenti. L'analisi del profilo metabolico "targeted" e "untargeted" mediante LC-MS ha confermato che le condizioni di crescita determinano delle differenze qualitative e quantitative riproducibili nel contenuto dei succhi (Ferruzza *et al.*, 2016).

Fahey J.W., Zhang Y., Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of β -enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10367-10372.

Natella, F., Maldini, M., Nardini, M., Azzini, E., Foddai, M.S., Giusti, A.M., Baima, S., Morelli, G., Scaccini, C., (2016) "Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation" *Food Chem* 201, 101-109.

Ferruzza S, Natella F, Ranaldi G, Murgia C, Rossi C, Trošt K, Mattivi F, Nardini M, Maldini M, Giusti AM, Moneta E, Scaccini C, Sambuy Y, Morelli G, Baima S. (2016) "Nutraceutical improvement increases the protective activity of broccoli sprout juice in a human intestinal cell model of gut inflammation" *Pharmaceuticals*, 9, 48

BIOPRIME WP2 (Leader CREA-AA). Estratti di alghe marine e cianobatteri per il priming delle colture biologiche. Gli estratti di alghe marine e di cianobatteri possono rappresentare un'opzione per la riduzione degli stress abiotici e biotici in agricoltura biologica. Sul mercato europeo è registrato come agrofarmaco ammesso in agricoltura biologica un solo prodotto a base di laminarina estratta dall'alga bruna *Laminaria digitata* (Vacciplant, Arysta). Sono disponibili inoltre diversi prodotti naturali a base di alghe per un uso come ammendanti o biostimolanti. Gli estratti di alghe e di cianobatteri contengono diversi componenti bioattivi tra cui polisaccaridi e oligosaccaridi (Vera *et al.* 2011, Righini *et al.* 2018). Alcuni articoli scientifici hanno dimostrato che i polisaccaridi ottenuti da alghe marine possono agire come molecole segnale per proteggere le piante da infezioni di patogeni sia agendo da elicitori di risposte di difesa sia provocando uno stato di resistenza indotta (Paulert *et al.*, 2010). Quest'ultima è spesso associata alla capacità di reagire rapidamente a un successivo attacco di un patogeno (priming) (Conrath, *et al.*, 2002). Recentemente il gruppo di lavoro ha dimostrato che un estratto acquoso di un ceppo del cianobatterio *Anabaena sp.* è in grado di potenziare le difese sistemiche di zucchini nei confronti di *Podosphaera xanthii*, incrementando livelli enzimatici di glucanasi e di chitinasi, che sono proteine di patogenesi, noti marcatori di induzione di resistenza (Roberti *et al.*, 2015). L'attività proposta è rivolta a saggiare l'efficacia di estratti di alghe brune, rosse e di cianobatteri, nell'indurre fenomeni di priming in seguito alla loro applicazione su seme di pomodoro e zucchini nei confronti di successivi attacchi di patogeni tellurici, come *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum* e *Fusarium oxysporum*, o fogliari, come l'oidio.

Conrath, U., Pieterse, C. M., & Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science*, 7(5), 210-216.

Paulert, R., Ebbinghaus, D., Urlass, C., & Moerschbacher, B. M. (2010). Priming of the oxidative burst in rice and wheat cell cultures by ulvan, a polysaccharide from green macroalgae, and enhanced resistance against powdery mildew in wheat and barley plants. *Plant pathology*, 59(4), 634-642.

Righini, H., Roberti, R., & Baraldi, E. (2018). Use of algae in strawberry management. *Journal of Applied Phycology*, 1-14.

Roberti R., Galletti S., Burzi P. L., Righini H., Cetrullo S., Perez C. (2015). Induction of defence responses in zucchini (*Cucurbita pepo*) by *Anabaena sp.* water extract. *Biological control*, 82: 61-68.

Vera, J., Castro, J., Gonzales, A., Moenne, A., 2011. Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. *Mar. Drugs* 9: 2514-2525.

BIOPRIME WP3 (Leader CREA-VE). Tecnologie ecosostenibili per l'induzione di resistenza in vite. In un contesto di cambiamenti climatici, l'influenza della temperatura e della distribuzione delle precipitazioni sulla produzione vegetale può essere diretta e/o indiretta. Questi nuovi scenari richiedono uno sforzo interdisciplinare per sviluppare e attuare un monitoraggio estensivo di aree agricole e naturali e la valutazione di una gestione sostenibile delle colture, oltre che, come nel caso della vite, la selezione di portinnesti tolleranti.

L'utilizzo di biofertilizzanti naturali, quali i funghi micorrizici arbuscolari (AM), può contribuire ad un notevole risparmio in materia di consumo d'acqua e allo stesso tempo migliorare la qualità della produzione. Questi funghi benefici del suolo possono infatti aumentare la tolleranza delle piante a stress biotici e abiotici (Volpe et al. 2018; Balestrini et al. 2017; Jung et al. 2012), tra cui lo stress idrico o l'attacco da patogeni fungini (Chitarra et al., 2016). E' risaputo che in natura le radici della vite sono colonizzate dai funghi AM (Balestrini et al., 2010; Magurno et al., 2011), che portano ad una serie di modificazioni a livello del trascrittoma della radice (Balestrini et al., 2016).

In questo progetto, si propone di utilizzare inoculi di funghi micorrizici per valutare i parametri eco-fisiologici, la produzione di metaboliti secondari di difesa (stilbenoidi e ormoni vegetali) e lo stato sanitario della pianta. Le attività proposte hanno come scopo quello di verificare la possibilità di utilizzare biofertilizzanti naturali in un contesto di gestione sostenibile dei vigneti che possano avere un impatto sulle performance fisiologiche e sullo stato di *priming* della pianta.

Il mal dell'esca è una malattia della vite causata da un gruppo di funghi che colonizzano i vasi linfatici e il legno, compromettendo la traslocazione dell'acqua e dei nutrienti dalle radici alla parte aerea della pianta. Ad oggi si sta osservando un aumento esponenziale dell'incidenza di MDE su tutto il territorio, con danni considerevoli sia dal punto di vista economico che qualitativo. I tipici sintomi sono stati associati alla presenza di alcuni funghi nei vasi linfatici della pianta. È inoltre ritenuta una malattia complessa, poiché costituita da almeno due patologie che possono susseguirsi o coesistere nella pianta colpita: una tracheomicosi, imputata a due principali ascomiceti, *Phaeoconiella chlamydospora* e *Phaeoacremonium minimum*, e una carie bianca, imputata invece dal basidiomicete *Fomitiporia mediterranea*. Numerose attività di ricerca hanno individuato la presenza di diversi consorzi di microrganismi coinvolti nella manifestazione dei sintomi gravi. Ad oggi non è ancora definito in modo chiaro quali siano le condizioni (ambientali, fisiologiche e sanitarie della pianta) e i meccanismi (consorzio specifico e/o interazioni sinergiche dei microrganismi) che portano allo sviluppo della malattia. In risposta ai cambiamenti climatici in corso e alle eccessive attività antropiche particolarmente nel settore agricolo e, nel nostro caso vitivinicolo, si è resa sempre più necessaria l'adozione di tecnologie sostenibili e rispettose dell'ambiente e della salute umana. La comprensione dei fattori chiave, richiede un approccio multidisciplinare in grado di considerare nel suo insieme l'interazione e le risposte che intercorrono tra la pianta (sintomatica e asintomatica) e i microrganismi da essa ospitati. La gravità di questa patologia è legata soprattutto al fatto che, contrariamente a peronospora ed oidio, **attualmente non esiste nessuna tecnica per il trattamento, la cura e il contenimento**. È recentemente emersa la possibilità di utilizzare una tecnologia innovativa, che utilizza long non-coding dsRNA, per il contenimento dei patogeni. Questa tecnica è molto studiata per gli insetti (Whyard, 2015; Joga et al., 2016) ed è **sostenibile sia per l'ambiente che per la pianta**. In questo caso uno degli approcci in fase di studio, riguarderebbero l'endoterapia o la nebulizzazione degli stessi in foglia (Wang et al., 2017): essendo i funghi associati a questa malattia residenti nei vasi, la risposta sistemica indotta nella pianta permetterebbe il contenimento dei principali funghi patogeni responsabili dello sviluppo della sindrome.

Balestrini R., Chitarra W., Fotopoulos V., Ruocco M. (2017). Potential role of beneficial soil microorganisms in plant tolerance to abiotic stress. In: Lukac M, Gamboni M, Grenni P (Eds), Soil biological communities and ecosystem resilience. Sustainability in Plant and Crop Protection Series, Springer.

Balestrini R., Magurno F., Walker C., Lumini E., Bianciotto V. (2010). Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. Environmental Microbiology Reports 4:594-604.

Balestrini R., Salvioi A., Dal Molin A., Novero M., Gabelli G., Paparelli E., Marroni F., Bonfante P. (2017). Impact of an arbuscular mycorrhizal fungus versus a mixed microbial inoculum on the transcriptome reprogramming of grapevine roots. Mycorrhiza (online first) doi:10.1007/s00572-016-0754-8.

Chitarra W., Pagliarini C., Maserti B.E., Lumini E., Siciliano I., Cascone P., Schubert A., Gambino G., Balestrini R., Guerrieri E. (2016). Insights on the impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on tomato tolerance to water stress. Plant Physiology 171:1009-1023.

Jung S.C., Martinez-Medina A., Lopez-Raez J.A., Pozo M.J. (2012). Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. Journal of Chemical Ecology 38:651-664

Magurno F., Balestrini R., Lumini E., Bianciotto V. (2010). Outside and inside grapevine roots: arbuscular mycorrhizal fungal communities in a Nebbiolo vineyard-Langhe, Piedmont-Italy In: 3rd International Symposium Macrowine 2010 16-18 June; Quad VITIC UNIV Torino 2009-2010.

Volpe V., Chitarra W., Cascone P., Volpe M.G., Bartolini P., Moneti G., Pieraccini G., Di Serio C., Maserti B.E., Guerrieri E., Balestrini R. (2018). The association with two different arbuscular mycorrhizal fungi differently affects the water stress tolerance in tomato. Frontiers in Plant Science, 9:1480. *Authors equally contributed to this work

Joga Mallikarjuna R., et al. (2016). RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. Frontiers in Physiology 7: 553.

Wang M., Hailing J. (2017). Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. Trends in microbiology 25(1): 4-6.

Whyard S. (2015). Insecticidal RNA, the long and short of it. Science 347(6225): 950-951.

BIOPRIME WP4 (Leader CREA-ZA). Estrazione, purificazione e caratterizzazione di composti naturali da specie vegetali, valutazione della loro composizione in principi attivi, valutazione della loro attività biocida (fungicida, nematocida, battericida, emolitica)

L'agricoltura biologica negli ultimi anni è una delle filiere agricole maggiormente in crescita. Tuttavia, le rese delle colture in agricoltura biologica risultano essere minori del 20-50%, rispetto a quelle prodotte in agricoltura integrata. Recenti studi hanno evidenziato che diverse sono le cause di tale differenze tra i due sistemi di coltivazione (biologico vs integrato): utilizzo di genotipi sviluppati e specifici per sistemi tradizionali; difficoltà nel controllo delle infestanti; difficoltà nel controllo delle avversità biotiche e abiotiche; difficoltà nella gestione della nutrizione. Infatti, il sistema di agricoltura biologica risponde al Reg. CE 834/2007, nel quale non è ammesso l'uso di prodotti chimici di sintesi. È nel tema della difesa e nutrizione delle piante, in particolare che possono essere individuate le principali cause di riduzione delle rese, come mostrano due recenti lavori di Ronga et al. (2015) e Ronga et al. (2017). Come dimostrato nel lavoro di Ronga et al. (2015), utilizzando gli stessi genotipi di pomodoro in due differenti sistemi di coltivazione (biologico vs integrato), le rese produttive si sono dimezzate nel sistema biologico rispetto all'integrato senza però incidere negativamente sulla qualità dei frutti (dati non mostrati). Nel lavoro si è dimostrato che i genotipi coltivati in biologico presentavano valori più bassi di superficie fogliare e di contenuto di azoto in foglia, due parametri che influenzano fortemente la crescita e lo sviluppo della pianta e, di conseguenza, la resa produttiva. Alla luce di questi risultati, l'espansione dell'agricoltura biologica non risulta completamente sostenibile mantenendo gli attuali livelli produttivi (Köpke et al., 2008). Infatti, non bisogna dimenticare che la popolazione mondiale è in continua crescita e, di conseguenza, il trend di crescita della domanda di cibo. Se, allo stato attuale, si pensasse di coltivare solo in biologico, sarebbe necessario aumentare le superfici coltivate almeno del 20-50% e questo incremento servirebbe solo a compensare l'attuale gap produttivo col sistema integrato, senza, comunque, far fronte al prevedibile incremento della domanda di cibo. Quindi, alla luce di queste informazioni, la sostenibilità del sistema biologico non può prescindere dal miglioramento della tecnica colturale al fine di superare l'aspetto critico delle limitate rese. D'altra parte, è impensabile l'ipotesi di superare la criticità mettendo a coltura nuovi suoli, anche tenuto conto dell'attuale limite di sfruttamento attualmente raggiunto.

Pertanto, una delle possibili strategie sarà certamente quella di cercare di produrre di più, cioè di incrementare le rese, non mediante sistemi di forzatura colturale, ma utilizzando in maniera più efficiente le stesse superfici agricole oggi a disposizione. Per raggiungere questo obiettivo, nell'ambito del miglioramento dell'agrotecnica, vengono proposti, come soluzioni innovative, diversi preparati biocidi e biostimolanti, utilizzabili nei diversi sistemi produttivi agricoli (convenzionale, integrato e biologico) (D'Addabbo et al., 2011; Abbruscato et al., 2014; Vitalini et al., 2016). L'analisi chimica e biochimica dei vari preparati sarà fondamentale per un corretto utilizzo degli stessi.

Abbruscato P., Tosi S., Crispino L., Biazzì E., Menin B., Picco A.M., Pecetti L., Avato P., Tava, A. Triterpenoid glycosides from *Medicago sativa* as antifungal agents against *Pyricularia oryzae*. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 11030-11036.

D'Addabbo T., Carbonara T., Leonetti P., Radicci V., Tava A., Avato P. Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochem Rev.* 2011, 10, 503-519.

Köpke, U., Cooper, J., Petersen, H.L., van der Burgt, G.J., Tamm, L., 2008. QLIF workshop 3: performance of organic and low input crop production systems. In 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy.

Ronga, D., Lovelli, L., Zaccardelli, M., Perrone, D., Ulrici, A., Francia, E., Milc, J., Pecchioni, N., 2015. Physiological responses of processing tomato in organic and conventional Mediterranean cropping systems. *Sci. Hortic.* 190, 161-172.

Ronga, D., Zaccardelli, M., Lovelli, L., Perrone, D., Francia, E., Milc, J., Ulrici, A., Pecchioni, N., 2017. Biomass production and dry matter partitioning of processing tomato under organic vs conventional cropping systems in a Mediterranean environment. *Sci. Hortic.* 224, 163-170.

Vitalini S., Madedo M., Tava A., Iriti M., Vallone L., Avato P., Cocuzza C.E., Simonetti P., Argentieri M.P. Chemical profile, antioxidant and antimicrobial activities of *Achillea Moscata* Wulfen, an endemic species from Alps. *Molecules* 2016, 21, 830; doi: 10.3390/molecules21070830.

10.2 Obiettivi specifici

Obiettivo generale 1 Individuazione, produzione e caratterizzazione di un panel di composti potenzialmente utili per la difesa delle produzioni biologiche

Obiettivi specifici:

WP1. Difesa in cereali biologici: individuazione di un panel di 5-10 composti/estratti e valutazione delle attività antimicrobiche su patogeni dei cereali

WP4. Estrazione, purificazione e caratterizzazione di 5-10 composti naturali da specie vegetali, valutazione della loro composizione in principi attivi, valutazione della loro attività biocida (fungicida, nematocida, battericida, emolitica)

Obiettivo generale 2 Studio delle potenzialità di ceppi microbici, molecole e composti come agenti di priming

Obiettivi specifici:

WP1. Difesa in cereali biologici: valutazione delle potenzialità di *priming* in cereali di un panel di 5-10 composti/estratti e di due combinazioni AMF-batteri benefici

WP2. Estratti di alghe marine e cianobatteri per il *priming* delle colture orticole: messa a punto di tecniche di applicazione al seme di prodotti innovativi costituiti da estratti di alghe e di cianobatteri, per la difesa dai patogeni in agricoltura biologica; verifica dell'attività di estratti di alghe e cianobatteri su alcune orticole di interesse per l'agricoltura biologica, quali ad esempio pomodoro e zucchini, nei confronti di patogeni terricoli e fogliari causa di considerevoli danni economici e di difficile contenimento; messa a punto di protocolli operativi di trattamento del seme per la trasferibilità nella pratica agricola.

Obiettivo generale 3 Individuazione e valutazione del potenziale fenomeno di induzione del *priming* in vite

Obiettivi specifici:

WP3. Inoculo di funghi micorrizici arbuscolari e biostimolanti a partire dalle barbatelle di vite. Valutazione dello stato fisiologico e sanitario della pianta in risposta agli inoculi effettuati.

Identificazione e isolamento dei patogeni coinvolti nella sindrome del mal dell'ESCA per lo sviluppo di una tecnologia ecosostenibile in grado di controllare la malattia (dsRNA).

10.3 Piano di attività;

WP1. Verranno considerate tre classi di patogeni di rilievo in cereali autunno-vernini e caratterizzati da diversa modalità di trasmissione, ciclo vitale ed impatto sulla qualità e produzione di frumenti, orzo ed avena. In maggior dettaglio verranno presi in considerazione *Fusaria* (responsabili di FHB e di contaminazione da micotossine), *Blumeria graminis* (patogeno obbligato responsabile di rilevanti perdite produttive) e *Pyrenophora graminea* (malattia trasmessa da seme). Un panel di 5-10 composti/estratti a diverse concentrazioni verranno valutati per proprietà antimicrobiche in vitro ed in planta. Le concentrazioni efficaci contro i fitopatogeni verranno testate per fitotossicità attraverso test di germinazione. In particolare verranno preparati estratti acquosi, mediante spremitura a freddo, da germogli di broccolo cresciuti in condizioni semi-idroponiche in fitotrone. Condizioni di crescita già utilizzate in precedenza verranno applicate per la produzione di estratti arricchiti in glucosinolati, con attività biocida, e composti fenolici, con potenzialità di priming.

Dieci trattamenti includendo estratti botanici, molecole e combinazioni di AMF-Batteri benefici del suolo verranno valutati per induzione di *priming* in cereali autunno-vernini in prove di serra. L'induzione del *priming* verrà determinato sulla base di parametri fisiologici, modulazione del livello di resistenza, trascrizione di alcuni geni marcatori (es. geni di difesa).

WP 2. Si prepareranno estratti acquosi da tallo essiccato delle macroalghe *Ecklonia sp.* e *Corallina sp.* e dal liofilizzato della coltura del cianobatterio *Anabaena sp.* già utilizzati in esperimenti precedenti di attività antifungina e di induzione di resistenza in piante orticole. Il materiale di partenza verrà finemente frantumato, sospeso in acqua sterile e posto in agitazione a 52°C per 12 ore su di un agitatore magnetico poi filtrato e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Si saggeranno diverse concentrazioni effettuando i trattamenti al seme per immersione o nel terreno alla semina.

L'inoculo dei patogeni tellurici (ad esempio *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum*) verrà ottenuto su substrato agarizzato in piastra Petri da colture in collezione presso l'U.O. e il DISTAL-Università di Bologna. Colture fungine in fase di attiva crescita verranno omogeneizzate in acqua sterile e opportunamente diluite per l'applicazione nel substrato di crescita a concentrazione definita sulla base di esperimenti precedenti. L'inoculo di patogeni fogliari, come *Podosphaera xanthii*, sarà ottenuto da piante con sintomi di mal bianco cresciute in serra. L'inoculazione sarà effettuata sulla pianta con una sospensione conidica in acqua sterile a concentrazione definita.

Le attività saranno condotte in ambiente controllato (fitotrone) e in serra condizionata, al fine di verificare gli effetti di riduzione della malattia e mettere a punto i protocolli di applicazione da trasferire in campo. Le prove saranno condotte in confronto a preparati commerciali a base di estratti di alghe. I semi di pomodoro trattati con gli estratti e semi non trattati (testimone) saranno seminati in substrato e all'emergenza si procederà all'inoculazione con i patogeni tellurici. Per *P. xanthii*, semi di zucchini trattati con gli estratti saranno seminati in substrato di crescita ed il patogeno verrà inoculato per nebulizzazione sulle prime foglie vere. Ciascun trattamento ed il controllo saranno replicati 4 volte secondo un disegno sperimentale a randomizzazione completa. Alla comparsa dei sintomi nel testimone non trattato e inoculato, verrà valutata la gravità di malattia in tutte le tesi ed i dati ottenuti verranno elaborati statisticamente.

Gli esperimenti verranno ripetuti per la verifica dei risultati al fine di individuare le dosi e le modalità di applicazione più efficaci contro i patogeni in studio e idonee ad un trasferimento nella pratica applicazione.

WP 3. Valutazione dello stato di priming in presenza di micorrize arbuscolari (AM)

Azione 1. Le attività saranno eseguite su barbatelle di 'Glera' innestate su due portinnesti con comportamento opposto: SO4 (portinnesto che porta a ridotta vigoria e sensibile agli stress abiotici) e 1103P (vigoroso e tollerante a stress abiotici). Come trattamenti si utilizzeranno:

- un inoculo misto comprendente funghi AM (*R. intraradices* e *F. mosseae*)
- biostimolanti (in combinazione con i funghi AM o individualmente)

Azione 2. Durante il corso del progetto, verranno valutate le interazioni tra la pianta e fattori di disturbo biotici, con l'obiettivo di valutare la diversa risposta dei due portinnesti in presenza dei diversi trattamenti (*trade-off*). Le attività prevedono l'utilizzo di un approccio multidisciplinare, in dettaglio: a) la misurazione di parametri agronomici e eco-fisiologici, b) analisi di espressione genica (in foglie e radici) considerando geni *target* legati al trasporto di acqua, nutrienti e di difesa nei confronti di fattori biotici, c) analisi biochimiche per valutare lo stato ormonale e la produzione di stilbenoidi (viniferina in particolare).

Individuazione di tecnologie sostenibili per il trattamento del Mal dell'ESCA (MdE)

Azione 3. Analisi, l'individuazione e isolamento dei funghi residenti nel legno di piante di vite in condizioni di campo che mostrano evidenti sintomi (foglie tigrate e/o colpo apoplettico) di MdE. Questo permetterà di identificare i funghi coinvolti nella patogenesi. Le stesse analisi verranno effettuate anche su piante asintomatiche presenti nello stesso areale di coltivazione.

Azione 4. In un secondo momento, con l'ausilio dei servizi di sequenziamento, si analizzerà il trascrittoma dei funghi isolati per investigarne il viroma e individuare i geni vitali utili alla successiva produzione dei dsRNA per il contenimento della sindrome.

Azione 5. Individuazione di un sistema biologico in cui produrre long non-coding dsRNA e loro applicazione e valutazione *in vitro*. In caso di risultati positivi seguiranno le applicazioni *in vivo*.

Azione 6. Divulgazione.

WP 4. Estrazione, purificazione e caratterizzazione di composti naturali da specie vegetali, valutazione della loro composizione in principi attivi, valutazione della loro attività biocida (fungicida, nematocida, battericida, emolitica)

Dal recupero di biomasse vegetali (**Azione 1**) si otterranno, oli essenziali, saponine, sostanze fenoliche, ed estratti acquosi già utilizzati in esperimenti precedenti di attività biocida e biostimolante (**Azione 2**). Il materiale di partenza verrà accuratamente caratterizzato e titolato nei principi attivi (**Azione 3**).

- i) Oli essenziali: estrazione in corrente di vapore della frazione volatile di piante di interesse e valutazione della loro composizione in GC e GC/MS
- ii) Saponine: estrazione e purificazione da specie del genere *Medicago* con mediante cromatografia a fase inversa e valutazione della loro composizione in NMR e ESI/MS/MS
- iii) Sostanze fenoliche: preparazione di estratti da materiale vegetale liofilizzato, valutazione della loro composizione in composti fenolici (acidi fenolici, flavoni, isoflavoni) con HPLC, LC/MS
- iv) Estratti acquosi: preparazione di estratti da biomasse vegetali, valutazione della loro composizione chimica e biochimica (p. es. C, N, fitormoni) con CHN, HPLC, LC/MS

Si saggeranno diverse concentrazioni effettuando i trattamenti sia allo stadio di seme che di plantula, e saranno valutate anche applicazioni dirette al suolo (**Azione 4**).

L'inoculo dei patogeni (p. es. *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia minor*, *Ralstonia solanacearum*) verrà effettuato mediante l'individuazione di opportune collaborazioni e consulenze.

Un panel di 5-10 composti/estratti a diverse concentrazioni verranno valutati per proprietà biocide *in vitro* ed *in planta*. Le concentrazioni efficaci verranno testate per fitotossicità attraverso test di germinazione e valutati per induzione di *priming* in piante foraggere ed orticole. L'induzione del *priming* verrà determinato sulla base di parametri biochimici, agronomici e fisiologici.

Le attività saranno condotte in laboratorio, in ambiente controllato (fitotrone), in serra condizionata e in pieno campo, al fine di verificare gli effetti di riduzione della malattia e mettere a punto i protocolli di applicazione da trasferire ai portatori di interesse. Ciascun trattamento ed il controllo saranno replicati 4 volte secondo un disegno sperimentale a randomizzazione completa. Le colture testate saranno valutate sia in termini produttivi che qualitativi mediante indagini chimiche e biochimiche e rilievi agronomici e fisiologici

WP 3. Tecnologie ecosostenibili per l'induzione di resistenza in vite

Numerazione trimestre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Azione 1, Applicazione funghi AM e biostimolanti	■	■										
Azione 2, Valutazione parametri piante inoculate e analisi risultati		■	■	■	■	■	■					
Azione 3, Identificazione e isolamento funghi ESCA			■	■	■							
Azione 4, Analisi del viroma e geni vitali funghi						■	■	■				
Azione 5, Produzione dsRNA e analisi risultati								■	■	■	■	
Azione 6, Divulgazione			■				■			■	■	■

WP 4. Estrazione, purificazione e caratterizzazione di composti naturali da specie vegetali, valutazione della loro composizione in principi attivi, valutazione della loro attività biocida (fungicida, nematocida, battericida, emolitica)

Numerazione trimestre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Azione 1, Recupero biomasse vegetali	■	■	■									
Azione 2, Estrazione dei composti		■	■	■								
Azione 3, Caratterizzazione dei composti			■	■	■	■						
Azione 4, Test su piante di interesse				■	■	■	■	■	■	■	■	■
Azione 6, Divulgazione				■	■	■	■	■	■	■	■	■

11. Collaborazioni esterne (consulenze e commesse esterne)

Nell'ambito delle attività previste nel WP2 è prevista la stipula di una convenzione con l'Università di Bologna, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari (DISTAL), responsabile scientifica dott.ssa Roberta Roberti. La convenzione è necessaria per consulenza tecnico-scientifica, per svolgere parte delle prove sperimentali, in particolare quelle in serra condizionata, al momento non utilizzabile presso il Centro, e per realizzare tesi di laurea e tirocini in collaborazione. Indicativamente la somma prevista ammonta a € 18.000,00.

Anche per lo svolgimento delle attività del WP 3 è prevista la stipula di una convenzione con la Dott.ssa Raffaella Balestrini dell'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante del CNR (IPSP-CNR U.O. di Torino). La convenzione è necessaria per consulenza tecnico-scientifica, per svolgere parte delle prove sperimentali, in particolare quelle legate alla micorrizzazione e l'impatto sulla pianta. Indicativamente la somma prevista ammonta a € 2.000,00.

Nell'ambito delle attività previste nel WP4 sono previste la stipula delle seguenti convenzioni: i) manutenzione ordinaria e riparazione di attrezzature (indicativamente la somma prevista ammonta a € 17.000,00); svolgimento dei test ad azione biocida (indicativamente la somma prevista ammonta a € 2.000,00); noleggio attrezzature scientifiche (indicativamente la somma prevista ammonta a € 5.000,00). Le convenzioni sono necessarie per il corretto raggiungimento degli obiettivi prefissati. I fornitori saranno selezionati sulla base del miglior preventivo ricevuto.

12. Descrizione strumenti ed output divulgativi e formativi attesi (max 2 pagine)

11.1 Manualistica, schede e line guida tecnico-divulgative

Non previsto

11.2 Incontri e seminari, azioni dimostrative di "campo" con operatori e associazioni, test e strumenti formativi

In accordo con le indicazioni MiPAAF circa "il coinvolgimento dei giovani che si preparano ad entrare nel mondo agricolo come agricoltori o tecnici del settore (giovani imprenditori, istituti tecnici, facoltà di agraria, ecc.)" si prevedono attività di formazione (realizzazione di tesi di laurea ed organizzazione di una summer school). La disseminazione dei risultati avverrà attraverso pubblicazioni scientifiche e tecniche, organizzazione di seminari e giornate aperte, contributi a newsletter e diffusione attraverso social media. I risultati ottenuti dalle prove saranno oggetto di incontri e/o seminari per stimolare l'interesse degli operatori nel settore ad utilizzare mezzi naturali costituiti da estratti di alghe e cianobatteri, per potenziare le difese della pianta nelle fasi di vivaio. Nell'esecuzione delle prove saranno coinvolti studenti e tirocinanti del corso di laurea triennale in Tecnologie Agrarie o di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie agrarie per la preparazione di tesi sperimentali presso l'Università di Bologna ed altri Atenei con cui i partner hanno già rapporti di collaborazione.

11.3 Albi, liste, registri ed altri documenti utili allo sviluppo della normativa di settore ed alla corretta applicazione dei regolamenti sull'agricoltura biologica

Le esperienze condotte potranno contribuire allo sviluppo della normativa di settore fornendo indicazioni applicative mirate all'introduzione di preparati a base di estratti di alghe e cianobatteri, composti naturali e ceppi microbici utili per la difesa delle colture in biologico

11.4 Altre ricadute positive all'utilizzo dei risultati

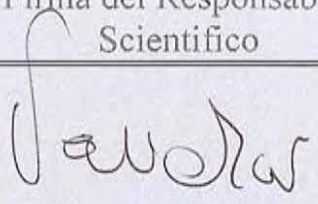
I mezzi innovativi e i protocolli operativi sviluppati in questo progetto potranno essere trasferiti ad altri pato-sistemi di interesse per il settore dell'agricoltura biologica.

Timbro Istituzione	Firma del Responsabile Amministrativo	Firma del Responsabile Scientifico
		

SCHEMA FINANZIARIA Unità Operativa "BIOPRIME"

1. Descrizione del personale

Categoria		Unità	Costo mese/uomo	Costo totale
Tempo indeterminato (non ammissibile a contributo nel caso di Enti Pubblici)	Professori – Dir Ricerca	2		26.064,2
	Ricercatori	4		64.000
	Tecnici	3		28.000
	Personale Ausiliario			
Tempo determinato e collaborazioni (se individuato)	Ricercatori			
	Tecnici			
	Amministrativi			
	Personale ausiliario			
	Borse di studio, dottorati, assegni di ricerca			
	Collaborazioni coordinate e continuative			
	Prestazioni professionali occasionali			
	Manodopera agricola			
	Altro			
Totale		9	€	118.064,2

Timbro Istituzione	Firma del Responsabile Amministrativo	Firma del Responsabile Scientifico
		

Costi e richiesta finanziamento U.O.

Voci di costo CREA-GB	Costo	Spesa ammessa a contributo
Tempo indeterminato (non ammissibile a contributo nel caso di Enti Pubblici)	18.000	0
Personale a tempo determinato	0	0
Missioni nazionali ed estere	3.000,00	3.000
Materiale di consumo (non inventariabile)	46.500	46.500
Consulenze e commesse esterne	8000,00	8.000
Attrezzature (materiale inventariabile da descrivere nella tabella successiva)	0	0
Spese generali (non superiori al 10% del totale del progetto, escluse le voci attrezzature e materiali di consumo)	1100	1100
Coordinamento		0
Totale	76.600	58.600

Voci di costo CREA-AA	Costo	Spesa ammessa a contributo
Tempo indeterminato (non ammissibile a contributo nel caso di Enti Pubblici)	56.323	0
Personale a tempo determinato	0	0
Missioni nazionali ed estere	3875	3875
Materiale di consumo (non inventariabile)	14122	14122
Consulenze e commesse esterne	14.000	14.000
Attrezzature (materiale inventariabile da descrivere nella tabella successiva)	0	0
Spese generali (non superiori al 10% del totale del progetto, escluse le voci attrezzature e materiali di consumo)	1787	1787
Coordinamento	0	0
	90.107	33.784

Voci di costo CREA-VE	Costo	Spesa ammessa a contributo
Tempo indeterminato (non ammissibile a contributo nel caso di Enti Pubblici)	12.000	0
Personale a tempo determinato	0	0
Missioni nazionali ed estere	2.500,00	2.500,00
Materiale di consumo (non inventariabile)	26.800,00	26.800,00
Consulenze e commesse esterne	3.500,00	3.500,00
Attrezzature (materiale inventariabile da descrivere nella tabella successiva)	0	0
Spese generali (non superiori al 10% del totale del progetto, escluse le voci attrezzature e materiali di consumo)	600,00	600,00
Coordinamento	0	0
Totale	45.400,00	33.400,00

Voci di costo CREA-ZA	Costo	Spesa ammessa a contributo
Tempo indeterminato (non ammissibile a contributo nel caso di Enti Pubblici)	31.741	0
Personale a tempo determinato	0	0
Missioni nazionali ed estere	3.000,00	3.000,00
Materiale di consumo (non inventariabile)	12.400,00	12.400,00
Consulenze e commesse esterne	19.000,00	19.000
Attrezzature (materiale inventariabile da descrivere nella tabella successiva)	0	0
Spese generali (non superiori al 10% del totale del progetto, escluse le voci attrezzature e materiali di consumo)	2.200,00	2.200,00
Coordinamento	0	0
Totale	68.341,00	36.600,00

Voci di costo BIOPRIME	Costo	Spesa ammessa a contributo
Tempo indeterminato (non ammissibile a contributo nel caso di Enti Pubblici)	118.064	0
Personale a tempo determinato	0	0
Missioni nazionali ed estere	12.375	12.375
Materiale di consumo (non inventariabile)	99.822	99.822
Consulenze e commesse esterne	44.500	44.500
Attrezzature (materiale inventariabile da descrivere nella tabella successiva)	0	0
Spese generali (non superiori al 10% del totale del progetto, escluse le voci attrezzature e materiali di consumo)	5.687	5.687
Coordinamento	0	0
Totale	280.448,00	162.384

Timbro Istituzione	Firma del Responsabile Amministrativo	Firma del Responsabile Scientifico
