

SCHEDA DI PROGETTO (MODELLO A)

1. Priorità art.4¹	Applicazione di tecniche innovative di difesa contro gli organismi nocivi con particolare riferimento alle principali problematiche fitosanitarie emergenti; PRIORITA' B	
2. Titolo	Citrus tristeza virus e Huanglongbing: sviluppo di tecniche di difesa integrata rapida, efficiente e di facile utilizzo	
3. Acronimo	DIREF	
4. Durata (mesi)	24 mesi	
5. Coordinatore responsabile del progetto e organismo di ricerca di appartenenza	Nome e Cognome	Salvatore Davino
	Qualifica	Ricercatore
	Istituzione di appartenenza	Istituto Euro-Mediterraneo di Scienza e Tecnologia – IEMEST
	Indirizzo	Via E. Amari, 123 – 90139 Palermo
	Tel/fax	091/7816506 / 091/6622514
	e-mail	salvatedavino@iemest.eu

6. Curriculum² del coordinatore e pubblicazioni significative	<p>Nell'A.A. 1999-2000 ha conseguito la Laurea in Scienze Agrarie indirizzo "Produzione vegetale" presso l'Università degli Studi di Catania con voto 110/110 e lode discutendo una tesi sperimentale dal titolo "Trasformazione genetica di agrumi con geni ROL" - Relatore la Prof.ssa Alessandra Gentile del Dipartimento di Orto-Floro-Arboricoltura e Tecnologie Agro-Alimentari, dell'Università degli studi di Catania.</p> <p>Nell'A.A. 2002-2003 ha conseguito il titolo di Dottore di Ricerca in "Produttività delle piante coltivate" – curriculum "Difesa delle piante" discutendo una tesi sperimentale dal titolo "Variabilità molecolare di alcuni isolati del virus della tristezza degli agrumi (CTV) riscontrati in Italia e messa a punto di nuove tecniche di diagnosi rapida e di caratterizzazione" tutor Prof. Antonino Catara.</p> <p>Dal mese di Ottobre 2006 al 30 Settembre 2008 è Assegnista di ricerca presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie essendo risultato vincitore di un assegno di ricerca biennale settore scientifico disciplinare AGR/12.</p> <p>Nell'A.A. 2008-2009 è risultato vincitore di un concorso per Ricercatore Universitario settore AGR/12 Patologia vegetale presso l'Università degli Studi di Palermo dove lavora tutt'ora.</p> <p>Durante la sua esperienza lavorativa ha effettuato numerosi stage all'estero ed in Italia, in particolare presso il laboratorio di virologia vegetale dell'Istituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), presso il Laboratorio di Virologia vegetale del CNR di Torino e presso l'Universidad Politecnica de Valencia. Dal 2009 fa parte del comitato scientifico dello IEMEST nelle vesti di responsabile della sezione di Fitopatologia vegetale.</p> <p>Nell'anno 2011 è risultato vincitore di una borsa di studio europea bandita dal Governo Spagnolo per un periodo di 18 mesi dove ha frequentato il Laboratorio di Virologia dell'Istituto de Biologia Molecular y Celular de Plantas. Durante tale periodo ha svolto corsi di Patologia vegetale presso la stessa Università in qualità di Invited Professor.</p> <p>Tra i temi di ricerca più importanti vi è lo studio delle malattie virali degli agrumi e delle ortive con particolare riguardo ai meccanismi di evoluzione e variabilità di tali agenti.</p> <p>Dall'A.A. 2008 a tutt'oggi è professore aggregato del settore AGR/12 del Dipartimento DEMETRA dove svolge diversi corsi.</p> <p>È stato revisore di progetti di ricerca per il Ministero dell'agricoltura del Portogallo.</p> <p>MIUR.</p> <p>È autore di oltre 100 pubblicazioni (circa il 40% riguardano tematiche inerenti le malattie degli agrumi) molte delle quali su riviste di rilevanza nazionale ed internazionale nonché partecipazione a congressi con referee sia nazionali che internazionali. È stato revisore per diverse riviste internazionali come: Phytopathologia Mediterranea, Journal of Virological Methods, Physiological and molecular Probe, Cientia Agricola, Journal of Plant Pathology. Dal Gennaio 2008 fa parte dell'Editorial Advisor della rivista internazionale "The Open Horticulture Journal" edita da Bentham Science Publisher</p> <p>Dall'A.A. 2008-2009 a tutt'oggi è stato relatore di 4 tesi di laurea presso l'Università degli Studi di Palermo, di 1 tesi di laurea presso l'Università degli di Catania, è stato correlatore di una tesi di laurea presso l'Università di Torino, è tutor di un Borsista di Dottorato presso l'Università degli Studi di Palermo, è Cotutor di un borsista di dottorato presso l'Universidad Politecnica de Valencia. È stato nominato membro esterno in una commissione di Dottorato per gli esami finali presso l'Universidad Politecnica de Valencia. Revisore dei progetti di ricerca del ministero dell'Università e della ricerca scientifica del Portogallo.</p> <p>E' membro delle seguenti società scientifiche: Società Italiana di Patologia Vegetale (SIPAV) International Organization of Citrus Virologists (IOCV) American Phytopathological Society (APS)</p>
---	--

<p>7. Organismo destinatario del contributo³</p>	<p>Denominazione: Istituto Euro-Mediterraneo di Scienza e Tecnologia Indirizzo: via Emerico Amari 123, 90139, Palermo Tel.: 091/7816506, Fax: 091/6622514, e-mail: amministrazione@iemest.eu Natura giuridica: Organismo privato con personalità giuridica.</p> <p>IBAN IT 08 L 02008 04697 000300759491</p>
--	---

<p>8. Piccole e medie imprese proponenti il progetto⁴</p>	<p>Denominazione: Vivai Chiarello Fabio Indirizzo: Via Vittorio Emanuele III, 98056 Mazzarrà Sant' Andrea (ME) Tel.:3388308089, Fax: <u>0932/1842209</u>, e-mail: dr.fchiarello@tiscali.it</p> <p>Natura giuridica: Ditta individuale</p>
---	---

<p>9. Altri organismi di ricerca coinvolti nel progetto⁵</p>	<p>Denominazione: Dipartimento delle Produzioni Agrarie ad Alimentari - Sezione di Fitopatologia e Genetica agraria Indirizzo: Via Santa Sofia 98, 95123 Catania Tel.:095/7147360, Fax:095/234449, e-mail: mdavino@unict.it</p> <p>Natura giuridica: Università pubblica</p>
--	--

10. Descrizione del progetto

Sintesi del progetto⁶

L'agrumicoltura siciliana vanta tradizioni storiche di grande rilievo e da secoli ha rappresentato una preziosa fonte di reddito per tutta la filiera agroalimentare, basti ricordare che sui circa 180.000 ha di agrumi coltivati in Italia circa 100.000 sono coltivati in Sicilia, quindi rappresentano una fonte di reddito non indifferente per migliaia di imprenditori agricoli. L'evolversi del sistema socio-economico, la globalizzazione dei mercati, le spiccate asimmetrie nei costi di produzione esistenti fra Paesi altamente industrializzati come l'Italia e Paesi emergenti stanno contribuendo ad erodere il ruolo prioritario dell'agrumicoltura in Sicilia. Tra le malattie più distruttive che riguardano gli agrumi possiamo annoverare senza dubbio il virus della tristezza degli agrumi (CTV) e l'Huanglongbing (HLB ex greening). Purtroppo negli ultimi anni queste due gravi malattie stanno provocando ingenti danni in tutti i Paesi agrumicoli del mondo mettendo a rischio la sopravvivenza della stessa agrumicoltura. La concomitanza di queste due malattie nello stesso areale di produzione, come è accaduto in Brasile ed in altri Stati del Sud America ed in alcuni Stati degli USA, azzerava i redditi del comparto agrumicolo mettendo il produttore nelle condizioni di abbandonare tale coltura sia essa di natura alimentare, sia essa di natura ornamentale.

Citrus tristeza virus (CTV) appartiene alla famiglia *Closteroviridae*. Gli isolati di CTV sin ora conosciuti sono molteplici e si distinguono sia in base alla virulenza nei diversi ospiti sia in base alla caratterizzazione molecolare. In particolare si possono distinguere 3 grandi gruppi: i) isolati virulenti; ii) isolati atipici e iii) isolati blandi. Il virus è stato riscontrato in Italia in forma di sporadici focolai sin dagli anni '50. Negli anni 1999-2000 sono stati individuati due grossi focolai in Sicilia e data la loro dimensione il contenimento è risultato inutile. Pertanto negli ultimi anni si è assistito ad un progressivo aumento della malattia che sta diventando di forma pandemica ai giorni nostri. Questo patogeno ha due forme di trasmissione molto importanti: mediante materiale vegetativo infetto che solitamente rappresenta la fonte di trasmissione primaria in un areale e mediante insetti vettori, in questo caso afidi, che rappresentano la fonte di trasmissione secondaria nell'areale. È un virus che può rimanere in forma asintomatica molti anni pertanto la diagnosi precoce rappresenta un utile strumento per cercare di arginare la malattia. Se a CTV si aggiunge

Huanglongbing, sino ad oggi non presente nel territorio nazionale, i danni prodotti da ambedue i patogeni potrebbero aumentare notevolmente e mettere a rischio la stessa agrumicoltura nazionale con gravi ripercussioni economiche per le aree del Sud ove l'economia è sostenuta dal comparto agrumicolo.

Gli agenti associati all'HLB sono dei batteri che differiscono tra loro per l'*optimum* di temperatura, per le proprietà genomiche e per quelle sierologiche. Oggi a questa malattia vengono associati almeno tre gruppi di batteri: *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus* e *Candidatus Liberibacter americanus*. Tutti questi batteri hanno un *habitus* floematico e sono trasmessi in natura mediante materiale vegetativo o mediante insetti vettori rappresentati da 2 psille, mentre la trasmissione mediante semi appare ad oggi ancora controversa.

Il progetto si propone di mettere a punto tecniche di diagnosi innovative e metodi di contenimento efficaci da poter essere utilizzati direttamente in vivaio ed in campo e quindi di conseguenza metodi di facile utilizzo da parte di personale non altamente qualificato che possano servire per il contenimento di CTV e per la prevenzione del HLB. Per lo sviluppo di tale progetto saranno coinvolte tre Unità Operative: l'Istituto Euro-Mediterraneo di Scienza e Tecnologia, l'Università degli Studi di Catania e l'azienda agricola Vivai Chiarello Fabio.

Il progetto avrà durata biennale, gli enti coinvolti collaboreranno per sviluppare tecniche di diagnosi, testare alcuni prodotti repellenti per gli insetti vettori dei due patogeni e predisporre delle screenhouse con differenti tipi di reti in modo da garantire un microclima idoneo per le piante di agrumi e che, allo stesso tempo, non permettano l'ingresso, all'interno di tali strutture, dei vettori dei due patogeni presi in esame. Le fasi operative saranno illustrate nei punti seguenti.

Parole chiave	Diagnosi rapida, HLB, CTV, Difesa integrata
----------------------	--

10.1 Piano di attività⁷.**Stato dell'arte e base di partenza scientifica**

Tra le malattie più distruttive che riguardano gli agrumi possiamo annoverare senza dubbio il virus della tristezza degli agrumi (CTV – Citrus tristeza virus) e il Huanglongbing (HLB ex greening). La concomitanza di queste due gravi malattie nello stesso areale di produzione, come è accaduto in Brasile e in quasi tutte le aree agrumicole del mondo, ha ridotto notevolmente i redditi del comparto agrumicolo mettendo i produttori nelle condizioni di abbandonare tale coltura sia per quanto riguarda la produzione di arance (per il consumo fresco e/o per la trasformazione), sia per quanto riguarda la produzione di piante a scopo ornamentale.

Di seguito si descrive lo stato dell'arte e la natura dei due patogeni oggetto di studio:

Citrus tristeza virus (CTV) appartiene alla famiglia *Closteroviridae*. Gli isolati di CTV sin ora conosciuti sono molteplici e si distinguono sia in base alla virulenza nei diversi ospiti sia in base alla caratterizzazione molecolare. In particolare si possono distinguere 3 grandi gruppi: i) isolati virulenti; ii) isolati atipici e iii) isolati blandi. Il virus della tristezza è stato riscontrato in Italia in forma di sporadici focolai sin dagli anni '50. Negli anni 1999-2000 sono stati individuati due grossi focolai in Sicilia, il primo a Cassibile in provincia di Siracusa su mandarino Fortune e su altri agrumi ed il secondo in provincia di Catania su diverse linee di arancio dolce Tarocco e Navelina (Davino *et al.*, 2003) l'elevato numero di piante infette in diverse aree agrumicole non ha consentito di eradicare i diversi focolai. Pertanto negli ultimi 10 anni si è assistito ad un progressivo aumento della malattia che oggi sta diventando di forma pandemica e si sta diffondendo su tutto il territorio nazionale. Questo patogeno ha due forme di trasmissione molto importanti: mediante materiale vegetativo, che solitamente rappresenta la fonte di trasmissione primaria in un areale e mediante insetti vettori, in questo caso afidi, che rappresentano la fonte di trasmissione secondaria nell'areale. I più efficienti risultano *Toxoptera citricidus* e *Aphis gossypii* che trasmettono questo virus in modo semipersistente dalle indagini effettuate dalle UOOO partecipanti al progetto è emerso che *A. gossypii* trasmette con estrema facilità tutti gli isolati riscontrati in Sicilia e Calabria (Davino *et al.*, 2003). CTV è un *Closterovirus* sottogruppo C della famiglia dei *Closteroviridae*, con particelle flessuose aventi dimensioni di 11 x 2000 nm. I virioni hanno un singolo filamento di RNA (a polarità positiva), con un genoma di 19.226 nucleotidi organizzati in 12 "griglie di lettura" che codificano almeno 17 proteine. (Karasev *et al.*, 1995; Vives *et al.*, 1999). L'RNA genomico è incapsidato in 2 diverse proteine di 25 e 27 Kda che coprono rispettivamente il 95% e il 5%. Oltre all'RNA genomico, gli estratti delle piante infette contengono degli RNA subgenomici ed un numero variabile di RNA difettivi (Mawassi *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997; Ayllon *et al.*, 1999). I sintomi causati dai tre componenti del virus (tristezza propriamente detta, butteratura del legno e giallume dei semenzali) non sono stati ancora chiariti. Come riportato in letteratura gli isolati di CTV possono variare molto nell'espressione dei sintomi nei differenti ospiti ma le basi molecolari di queste differenze sono ancora sconosciute. Come riportato anche per altri virus gli isolati di CTV possono contenere differenti varianti di sequenza che possono "alterare" il processo di trasmissione ad un nuovo ospite. Variazioni nella trasmissione mediante afidi, nell'espressione dei sintomi, nella reattività con antisieri monoclonali, nelle analisi dei dsRNA sono stati ben documentati in letteratura.

L'agente associato all'HLB è un batterio confinato nei fasci vascolari, osservato al microscopio elettronico (EM) per la prima volta nel 1970. In Sud Africa, Moll *et al.* (1974) hanno posto l'attenzione sulla similarità tra la parete cellulare dell'agente dell'HLB e i batteri Gram negativi. La natura Gram negativa del batterio HLB fu stabilita nel 1984 quando è stato possibile dimostrare attraverso il microscopio elettronico che l'agente dell'HLB possedeva una parete cellulare di tipo Gram negativo, composta da una membrana esterna e una interna costituite da uno strato di peptidoglicani. (Garnier *et al.*, 1984a, b).

I confronti con sequenze di batteri conosciute di rDNA 16 S da database hanno mostrato che l'organismo HLB è realmente un batterio Gram negativo, come dimostrato precedentemente attraverso il microscopio elettronico, e più precisamente un membro di un nuovo subgruppo nella suddivisione alpha dei *Proteobacteria*. Organismi di questa suddivisione vivono in stretta intimità con cellule eucariotiche e, in molti casi, hanno acquisito l'abilità di sopravvivere e svilupparsi senza un vettore artropodo. Il batterio dell'HLB si adatta molto bene a questa descrizione. Infatti, esso si sviluppa in una nicchia specializzata nella sua pianta ospite eucariote, i tubi floematici, ed è trasmesso da due insetti, le psille degli agrumi *T. erytrae* e *D. citri*, nei quali circola e si replica. Poiché il batterio dell'HLB è stato il primo rappresentante del nuovo subgruppo dell'alpha-Proteobacteria, è stato chiamato "*Liberobacter*" dal latino libero=corteccia e

bacter=batterio (Jagoueix *et al.*, 1994). *Liberobacter* è stato successivamente modificato con *Liberibacter* (Garnier *et al.*, 2000). Sono stati individuati diversi tipi di batteri associati all'HLB tutti con caratteristiche diverse. In particolare possiamo parlare di: *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus*.

Piano operativo del progetto:

Il progetto avrà durata biennale e prevede l'interazione tra tre distinte Unità Operative. Gli enti coinvolti sono l'Istituto Euro-Mediterraneo di Scienza e Tecnologia (IEMEST), il Dipartimento DISPA dell'Università degli Studi di Catania e l'azienda agricola Vivai Chiarello Fabio di seguito saranno elencati i compiti di ciascuna unità e le interazioni tra le diverse strutture. Il presente progetto si propone di mettere a punto tecniche di diagnosi innovative e veloci, nonché metodi di lotta integrata tali da poter essere utilizzati direttamente in vivaio ed in campo e quindi di facile utilizzo da parte di personale non altamente qualificato che possano servire per il contenimento di CTV e per la prevenzione dell'HLB.

Il capofila del progetto sarà l'Istituto Euro-Mediterraneo di Scienza e Tecnologia - IEMEST.

Durante l'intera durata del progetto saranno coinvolte tutte e tre le UU.OO. Di seguito verranno elencati i compiti, le tempistiche ed il coinvolgimento delle tre UU.OO.

Lo IEMEST, si occuperà del coordinamento, della verifica *in itinere* del raggiungimento dei punti programmatici e della divulgazione dei dati mediante la stampa di opuscoli a carattere divulgativo, pubblicazioni scientifiche, l'organizzazione di almeno due convegni e l'organizzazione di corsi volti agli operatori dei settori sia privati (aziende, vivai, ecc) che pubblici (corsi per i funzionari dell'Osservatorio per le malattie delle piante delle Regioni agrumicole del Sud Italia e della Toscana ove si coltivano in diversi vivai piante di agrumi ornamentali, ecc.). Durante il primo anno di attività saranno bandite delle borse di studio per giovani ricercatori con esperienza nell'ambito delle malattie degli agrumi con particolare riguardo per il settore della Virologia vegetale. Tali giovani ricercatori saranno coinvolti pienamente nel progetto sia per sviluppare la parte scientifica, sia per sviluppare la parte divulgativa. I borsisti interagiranno con tutte e tre le UU.OO. e avranno assegnati compiti di laboratorio e di stesura di elaborati. Ogni 3 mesi ad opera del coordinamento IEMEST saranno effettuate riunioni operative per verificare lo stato di avanzamento dei lavori. Durante il primo anno di attività sarà presentato un opuscolo di caratteri divulgativo per mettere in guardia gli operatori del settore sul pericolo di queste malattie, le modalità di trasmissione ed i sintomi rilevabili in campo. Sarà, inoltre, fornita un'opportuna documentazione fotografica al fine di aiutare gli operatori al riconoscimento delle malattie. Alla fine del primo anno di attività sarà organizzato un corso in laboratorio per gli operatori del settore al fine di apprendere le principali tecniche diagnostiche che possono essere utilizzate in campo come prima diagnosi. Sarà bandita una borsa dallo IEMEST per un giovane ricercatore che intenda trascorrere un periodo di almeno sei mesi all'estero per specializzarsi nella diagnosi di queste due malattie con particolare riferimento al HLB. Durante il secondo anno di attività, una volta messa a punto la tecnica di diagnosi rapida mediante sonde clonate (U.O. DISPA-CT) saranno assemblati dei kit che saranno distribuiti in numero limitato alle aziende agricole che ne faranno richieste, tutto ciò per incentivare la diagnosi in vivaio e sensibilizzare gli operatori all'utilizzo di tecniche diagnostiche rapide e di facile utilizzo. Durante il secondo anno di attività sarà organizzato un altro convegno invitando relatori internazionali di chiara fama e con grande esperienza con particolare riguardo verso il HLB. Tutti i risultati ottenuti saranno resi pubblici mediante pubblicazioni scientifiche in riviste internazionali e mediante opuscoletti divulgativi sia in forma elettronica che cartacea a cura dello IEMEST.

Il dipartimento DISPA si occuperà dello sviluppo di tecniche diagnostiche rapide e di facile utilizzo.

Tra le tecniche di facile utilizzo si possono annoverare senza dubbio le tecniche diagnostiche che sfruttano l'ibridazione molecolare.

Dalla letteratura si evince come le tecniche di ibridazione molecolare siano circa 1000 volte più sensibili rispetto alle convenzionali tecniche immunoenzimatiche tipo il DAS-ELISA. Durante il primo anno di attività si cercherà di sintetizzare una polisonda che contenga sequenze specifiche per i tre distinti tipi di *Candidatus Liberibacter* e le sequenze specifiche dei tre distinti componenti che fanno capo al complesso della tristezza degli agrumi. Così facendo si otterrà una sonda molecolare che sarà costituita da sei pezzi di sequenza ognuna altamente specifica che ibridi con il rispettivo patogeno. Al fine di ottenere una diagnosi rapida ed in tempi brevi sarà acquistato ed utilizzato un ibridatore di flusso. Questo strumento permette di avere una risposta in tempi estremamente rapidi. Poiché i due patogeni oggetto di studio sono floematici si

tenterà di utilizzare direttamente le impronte del ramo dell'ultimo stacco vegetativo per la diagnosi. Al fine di rendere più sensibile la reazione di ibridazione si utilizzeranno sonde ad RNA anziché a DNA marcate con digossigenina e poiché il fine ultimo è quello di elaborare un procedimento che possa essere sfruttato direttamente nei vivai si cercherà di effettuare la colorazione mediante NCBI+NBT, in questo modo si eviterà di sviluppare una lastra autoradiografica sottoposta a chemiluminescenza. Il prodotto finale sarà assemblato e utilizzato come kit diagnostico. Nella tabella seguente sono illustrate le fasi e le differenze di tempo rispetto ad un DAS-ELISA tradizionale e ad una ibridazione convenzionale.

Ibridazione di flusso		Ibridazione tradizionale		DAS-ELISA	
Preparazione del campione	30 secondi	Preparazione del campione	30 secondi	Preparazione del campione	2 minuti
Preibridazione	2 minuti	Preibridazione	2 ore	Coattazione	4 ore
				Lavaggi	15 minuti
Ibridazione	5 minuti	Ibridazione	16 ore	Incubazione	16 ore
				Lavaggi	15 minuti
Lavaggio (3 lavaggi)	1 minuto	Lavaggio (3 lavaggi)	45 minuti	Coniugazione	4 ore
				Lavaggi	15 minuti
Sviluppo	15 minuti	Sviluppo	1 ora	Sviluppo	1 ora
Totale	Circa 24 minuti	Totale	Circa 20 ore	Totale	Circa 26 ore

Poiché la malattia del HLB non è presente in Italia non sarà introdotto materiale agrumicolo infetto da HLB nel nostro territorio. Per tale motivo la parte riguardante la sintesi della polisonda di HLB sarà svolta in collaborazione con il laboratorio di quarantena dell'Universidad Politecnica de Valencia. Il laboratorio dell'Instituto de Patologia vegetal dell'Universidad Politecnica de Valencia possiede un laboratorio di quarantena per organismi non presenti in Europa ed il coordinatore del Progetto Dott. Davino già da anni collabora con questa Istituzione dove è stato parecchie volte in qualità di ricercatore o "Invited Professor" e con la quale ha intrapreso nuovi accordi per creare la polisonda di HLB.

Una volta sintetizzata la sonda ed assemblato il kit quest'ultimo sarà utilizzato per monitorare una serie di agrumeti campione nelle province agrumicole siciliane. Saranno sintetizzate anche delle piccole sonde sempre ad RNA ognuna specifica per i tre differenti tipi di *Liberibacter* e per i differenti componenti del virus della tristezza degli agrumi, queste sonde saranno utilizzate in caso di segnale positivo con la polisonda per individuare l'esatto patogeno o componente presente nella pianta riscontrata infetta. E' inoltre importante sottolineare che in Brasile e in Florida sono state riscontrate nel 2005 e nel 2006 piante di *Murraya paniculata* infette dal batterio che provoca HLB. Successivamente sono state riscontrate piante di *Murraya esotica*, piante di *Clausena lansium* e *Severinia buxifolia*. Osservazioni condotte in alcuni vivai hanno permesso di individuare piante di *Murraya* importate dal Brasile. Ciò costituisce un grave pericolo in quanto attraverso queste specie si potrebbe importare il batterio responsabile della malattia HLB.

Durante il secondo anno di attività saranno condotte delle prove in celle climatiche riguardanti il tema della protezione crociata. Dalla letteratura si evince che esistono pareri discordanti sulla efficacia o meno di questa tecnica, in alcuni paesi come il Brasile dove esistono ceppi di tristezza estremamente virulenti questa tecnica è utilizzata da parecchi anni dando dei buoni risultati, in altri Paesi invece i risultati non sono stati molto incoraggianti. Lavori scientifici pubblicati dal gruppo di Moreno e collaboratori indicano che se in una pianta viene inoculato un ceppo ipovirulento, quest'ultimo col passare del tempo e con la trasmissione mediante afidi può evolvere in un ceppo virulento. Poiché un ceppo virale è costituito da una popolazione di virioni a diversa virulenza l'espressione dei sintomi è legata al numero di virioni che si trovano in maggioranza nella popolazione. Pertanto saranno condotte prove in celle climatiche dove piccoli bionti di diverse cultivar saranno inoculati con ceppi ipovirulenti del virus della tristezza degli agrumi e mediante real time RT-PCR saranno individuate le differenti varianti di sequenza che si svilupperanno con il passare del tempo. In questo modo potremmo avere un'idea del differente tasso di evoluzione di un ceppo blando in differenti ospiti. In una fase successiva solo quando l'isolato ipovirulento si sarà stabilizzato nella pianta queste verranno inoculate con un isolato virulento per cercare di capire se si riesce a fornire alla pianta una protezione crociata o se l'isolato virulento è in grado di prendere il sopravvento.

L'azienda agricola Vivai Chiarello Fabio si occuperà di diversi aspetti inerenti la difesa integrata contro questi due patogeni. Come è noto ad oggi non esistono prodotti fitosanitari efficaci contro la difesa da agenti virali, mentre per quanto riguarda l'HLB gli unici rimedi realmente efficaci sono gli antibiotici che però non possono essere utilizzati in agricoltura. Pertanto, la lotta contro questi due patogeni risulta essere di natura preventiva. Durante i ventiquattro mesi del progetto saranno messi a punto dei protocolli di difesa integrata in grado di ostacolare l'insorgenza di queste malattie o per lo meno di limitarle quanto più possibile. L'attività sarà volta a sviluppare metodi a basso costo e a basso impatto ambientale in modo da essere utilizzati da tutti gli operatori del settore. Come specificato nello stato dell'arte questi due patogeni sono trasmessi o da materiale infetto propagato o da insetti vettori. In questo contesto risulta estremamente utile lo sviluppo di protocolli di diagnosi rapida ed efficace che saranno sviluppati dallo IEMEST e dal Dipartimento DISPA dell'Università degli Studi di Catania. Nel primo anno di attività nell'azienda agricola sarà costruita una screenhouse a basso costo e saranno provate differenti tipi di reti anti insetto. Provare differenti reti anti insetto risulta necessario poiché bisogna trovare il giusto compromesso tra le reti che bloccano gli insetti e il microclima che si forma all'interno della screenhouse. Un microclima eccessivamente umido favorirebbe l'insorgenza di funghi che potrebbero compromettere l'apparato radicale delle piante, un microclima eccessivamente ombreggiato, invece, influirebbe negativamente sul normale sviluppo vegetativo delle piante. Per monitorare le temperature ed il grado di umidità all'interno della screenhouse, si procederà secondo il seguente schema: la struttura sarà suddivisa in diversi settori ognuno dei quali isolato con differenti pareti isolanti. All'interno dei vari settori saranno posizionati dei sensori in grado di monitorare la temperatura e l'umidità. I dati raccolti saranno analizzati al computer dai borsisti dello IEMEST in modo da individuare il compromesso ottimale per la crescita delle piante e allo stesso tempo impedire l'ingresso dei vettori. Nella screenhouse sarà costruita una doppia porta e saranno posizionati dei ventilatori per impedire l'ingresso degli insetti durante l'apertura delle porte. Dopo il primo anno di attività la rete risultata migliore sarà utilizzata per coprire tutta la screenhouse e all'interno le piante precedentemente suddivise in parcelle saranno trattate con prodotti biologici a base di oli essenziali o sostanze volatili che manifestano repellenza nei confronti dei vettori. Alla fine del secondo anno i dati raccolti saranno analizzati dal gruppo di lavoro al fine di individuare uno o più prodotti utili di basso costo e di basso impatto ambientale che formeranno parte del piano di difesa insieme alle reti selezionate. Un'ulteriore prova sarà effettuata nei mesi estivi utilizzando film plastici riflettenti o film plastici filtranti in modo da creare un ambiente sfavorevole agli insetti vettori. Con l'utilizzo di particolari film plastici, che filtrano la luce ultravioletta (UV), sarà possibile regolare il controllo di questi patogeni, poiché la azione di tali film è basata sull'interferenza della capacità visiva da parte degli insetti, ciò si traduce in un abbassamento della loro popolazione in relazione alle difficoltà di spostamento per l'assenza di luce UV, nonché nella difficoltà di individuare le piante ospiti, per cui adottando tale sistema si può abbassare notevolmente la carica di inoculo presente all'interno della screenhouse.

Pertanto la combinazione di reti, sostanze repellenti e film plastici filtranti e/o riflettenti potrebbe risultare il metodo di lotta più efficace per combattere queste due malattie, ovviamente associato ad un buon metodo di diagnosi rapida e sensibile. Inoltre saranno provati differenti portinnesti e quindi combinazioni nesto/p.i. che potrebbero dare delle risposte diverse all'infezione da parte dei due patogeni in questione nei confronti di queste malattie.

Al fine dello svolgimento del progetto lo IEMEST si avvarrà della consulenza gratuita dei suoi ricercatori. In particolar modo saranno coinvolti Architetti, per quanto riguarda lo sviluppo della screenhouse, Chimici per la prova delle differenti molecole repellenti nei confronti degli insetti, Informatici per lo sviluppo di pagine o documenti web, creazione di CD ed analisi dei dati e di un Sociologo per quanto riguarda la divulgazione dei dati ottenuti e la programmazione dei convegni.

In particolar modo lo IEMEST punta ad auto valutare il percorso dell'intero progetto mediante riunioni trimestrali delle tre U.O. durante le quali verrà focalizzata l'attenzione sullo svolgimento dei vari WP. Le riunioni saranno coordinate dal Dr. S. Davino, che oggi risulta essere uno dei massimi esperti nel campo della virologia vegetale e della diagnostica in Sicilia. In particolar modo lo sviluppo di questo progetto si inserisce nell'ambito delle attività già condotte e sviluppate dal Dr. S. Davino in Spagna presso l'Universidad Politecnica de Valencia dove ha svolto un periodo di studio di 18 mesi in qualità di Invited Professor. Un fattore importante da non sottovalutare è che con lo svolgimento e la realizzazione di quanto previsto da questo progetto verranno coinvolti in maniera diretta ed indiretta i differenti anelli della filiera

produttiva. È utile ricordare che si avranno ricadute dirette su imprese produttrici di Kit diagnostici, sui vivaisti produttori di piante sia da impianto per la produzione di arance per il consumo fresco e per la industria di trasformazione, che di piante ornamentali, sugli agricoltori, sui servizi fitosanitari e sul consumatore finale.

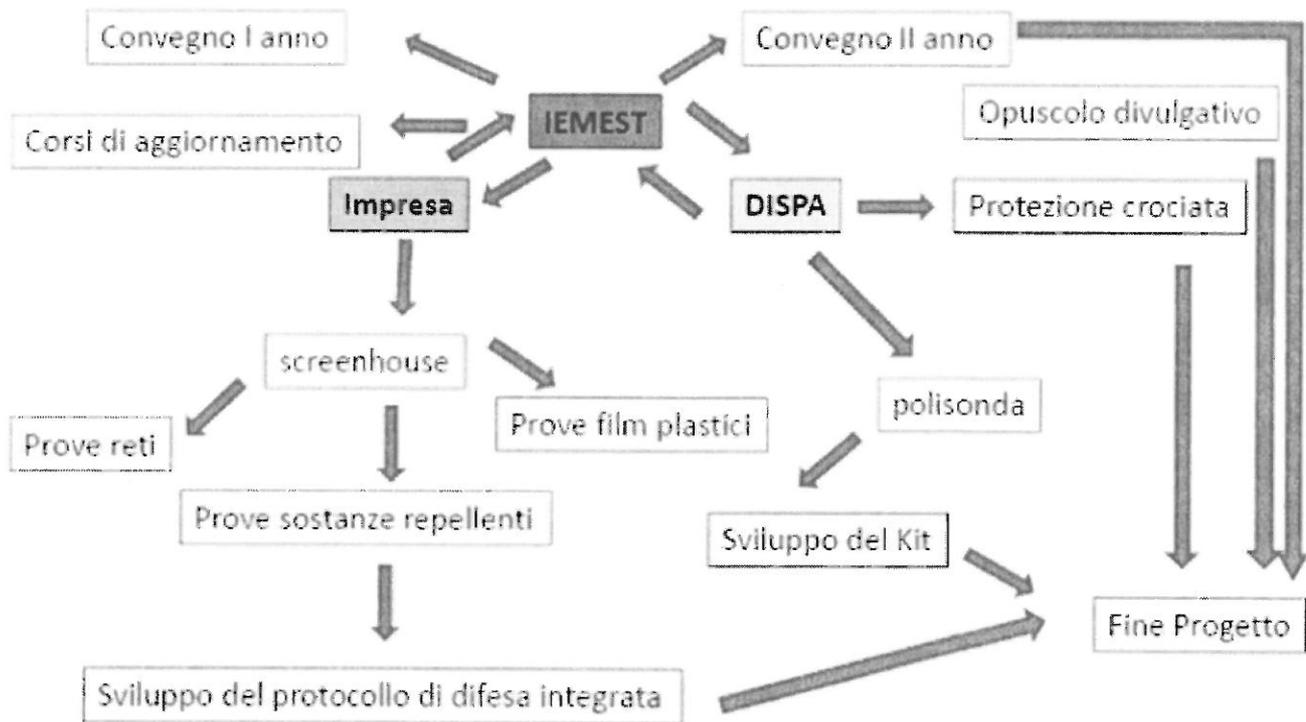
Il progetto sarà svolto integrando a pieno le tre Unità Operative, ogni azione intrapresa da ciascuna U.O avrà ricadute sulle altre due e sarà necessaria per il completo espletamento del progetto stesso. A tal fine nella tabella di seguito vengono riportati i principali WP svolti durante l'esecuzione dei lavori. I compiti svolti dalle UU.OO. saranno indicati come segue: U.O.1 IEMEST, U.O.2 DISPA, U.O.3 Vivai Chiarello Fabio.

WP	Titolo WP	Attività e metodi	Risultati	UO	Indicatori di verifica
WP 1	Coordinamento	divulgazione	Opuscolo e materiale informatico	U.O.1	Numero di copie rilasciate di opuscoli e materiale informatico
WP1	Diagnostica	Sviluppo dei Kit	Kit da campo	U.O.2	Numero di kit rilasciati e gradimento dei consumatori
WP2	Gestione dello Screenhouse ecosostenibile	Costruzione e prova delle differenti plastiche e reti	Ottenimento di una screenhouse idoneo per la crescita degli agrumi	U.O.1; U.O.2; U.O.3	Pubblicazioni scientifiche e divulgative
WP3	Studio della protezione crociata	Prove in cella climatica	Individuazione dei ceppi proteggenti	U.O.1; U.O.2	Pubblicazioni di carattere scientifico e divulgativo
WP4	Studio di differenti portinnesti	Prove in serra e studio del comportamento	Individuazione di portinnesti tolleranti a CTV e a HLB	U.O.2; U.O.3	Pubblicazioni scientifiche e divulgative
WP5	Sensibilizzazione della filiera agricola	Convegni con relatori internazionali	Opuscoli, sensibilizza del personale addetto ai lavori	U.O.1; U.O.2; U.O.3	Numero di copie rilasciate di opuscoli e materiale informatico
WP6	Corso di aggiornamento Servizi di sviluppo agricolo	Convegni con relatori internazionali	Rilascio di un certificato su base teorica e pratica in laboratorio	U.O.1; U.O.2	Numero di certificati rilasciati

Diagramma di Gantt

	<i>I anno</i>				<i>II anno</i>			
	<i>I trimestre</i>	<i>II trimestre</i>	<i>III trimestre</i>	<i>IV trimestre</i>	<i>I trimestre</i>	<i>II trimestre</i>	<i>III trimestre</i>	<i>IV trimestre</i>
IEMEST <i>coordinamento</i>		<i>Verifica in itinere</i>	<i>Verifica in itinere</i>	<i>Verifica fine anno</i>	<i>Verifica in itinere</i>	<i>Verifica in itinere</i>	<i>Verifica in itinere</i>	<i>Verifica fine anno</i>
			<i>Corso di formazione</i>	<i>Distribuzione dei kit diagnostici</i>			<i>Corso di formazione</i>	
				<i>Convegno sulle tematiche fitosanitarie di CTV e HLB</i>				<i>Convegno con relatori di chiara fama su CTV e HLB e divulgazione dei risultati ottenuti</i>
				<i>Stesura di un opuscolo a carattere divulgativo</i>				<i>Valutazione del miglior programma di difesa integrata</i>
DISPA	<i>Sviluppo di tecniche diagnostiche</i>	<i>Sviluppo di tecniche diagnostiche</i>	<i>Sviluppo di tecniche diagnostiche</i>	<i>Validazione delle tecniche diagnostiche</i>	<i>Prove di protezione crociata</i>			
VIVAI CHIARELLO	<i>Costruzione della screenhouse</i>	<i>Messa a dimora delle piante</i>	<i>Valutazione dell'impatto delle reti</i>	<i>Valutazione dell'impatto dei film oscuranti</i>			<i>Valutazione dell'impatto delle reti</i>	<i>Valutazione dell'impatto dei film oscuranti</i>
		<i>Valutazione dei prodotti biologici utilizzati</i>	<i>Valutazione dei prodotti biologici utilizzati</i>	<i>Valutazione dei prodotti biologici utilizzati</i>	<i>Valutazione dei prodotti biologici utilizzati</i>	<i>Valutazione dei prodotti biologici utilizzati</i>	<i>Valutazione dei prodotti biologici utilizzati</i>	<i>Valutazione dei prodotti biologici utilizzati</i>

Diagramma di Pert


11. Elenco degli strumenti tecnico-scientifici (attrezzature) funzionali alla ricerca proposta già in dotazione degli enti partecipanti

Descrizione	Utilizzo nel progetto	Unità operativa
PCR	24 mesi	DISPA
Ibridatore	24 mesi	DISPA
GelDOC	24 mesi	DISPA
Lettore di piastre	24 mesi	DISPA
Centrifughe da banco	24 mesi	DISPA
Congelatore -80° C	24 mesi	DISPA
Congelatore -20° C	24 mesi	DISPA
Frigorifero +4° C	24 mesi	DISPA
Termoblock	24 mesi	DISPA
Vaschette elettroforetiche	24 mesi	DISPA
Incubatori	24 mesi	DISPA
Computer	24 mesi	IEMEST
Software Elaborazione dati	24 mesi	IEMEST
Macchine uso agricolo	24 mesi	Vivai Chiarello
Irroratrici per trattamenti	24 mesi	Vivai Chiarello

12. Elenco di strumenti tecnico-scientifici (attrezzature) che si intende acquistare con il presente contributo

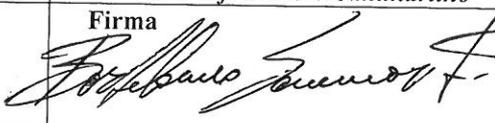
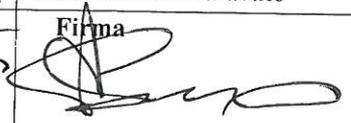
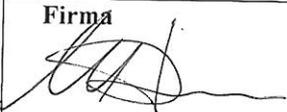
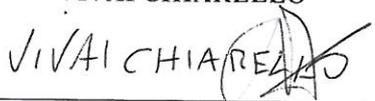
Descrizione	Motivazione	Unità operativa acquirente
Ibridatore a flusso	Messa a punto di tecniche diagnostiche	IEMEST-DISPA-Vivaio

Screenhouse a basso costo	Sviluppo dei protocolli di difesa integrata	Vivai Chiarello
Cella climatizzata	Necessaria per prove di protezione crociata	IEMEST – Vivai- DISPA

13. Eventuali altre fonti di finanziamento per lo stesso progetto⁹

Euro 5.000 a scopo di cofinanziamento dalla parte della ditta MolecularDynamics s.r.l.

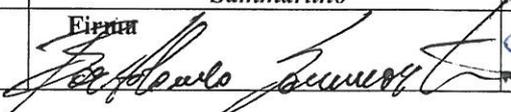
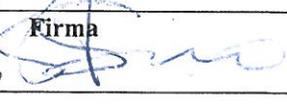
14. Firme dei responsabili di tutte le unità operative coinvolte (organismi di ricerca e imprese proponenti)

Timbro dell'organismo destinatario del contributo	Il responsabile di gestione (o delegato) ¹⁰	Il coordinatore del progetto
Istituto EuroMediterraneo di Scienza e Tecnologia IEMEST Mediterraneo di Scienza e Tecnologia 	On. Prof. Bartolo Sammartino Firma 	Dott. Salvatore Davino Firma 
Timbri imprese / organismi di ricerca Dipartimento DISPA - Università degli Studi di Catania 	Il responsabile di gestione (o delegato) ¹¹ Prof. Salvatore Cosentino Firma 	Il responsabile scientifico dell'Unità operativa Prof. Mario Davino Firma 
Timbri imprese / organismi di ricerca VIVAI CHIARELLO 	Il responsabile di gestione (o delegato) ¹² Dott. Agr. Fabio Chiarello Firma 	Il responsabile scientifico dell'Unità operativa Dott. Agr. Fabio Chiarello Firma 

SCHEMA DELLE RISORSE UMANE E FINANZIARIE DI PROGETTO (MODELLO B)¹³

<i>1. Sintesi dell'impegno delle risorse umane per categoria (mesi uomo¹⁴)</i>				
Categoria		Periodo di esecuzione del progetto		Totale
		1° annualità	2° annualità	
Coordinamento	Coordinatore	4	4	8
	Collaboratori tempo indet.	0	0	0
	Collaboratori tempo det.	0	0	0
Tempo Indet.	Ricercatori	4	4	8
	Tecnici	4	4	8
	Personale ausiliario	0	0	0
Tempo det.	Ricercatori	6	6	12
	Tecnici	8	8	16
	Personale ausiliario	4	4	8
Totale		30	30	60

Scheda finanziaria di progetto

3. Piano finanziario		
	Costo Totale (€)	Spesa ammessa ¹⁵
A1 Personale a tempo indeterminato • Ricercatori • Tecnici • Altro personale ausiliario	• 36.000 • 14.000 • 0	• ----- • ----- • -----
A2 Personale a tempo determinato • Ricercatori • Tecnici • Altro personale ausiliario	• 18.000 • 24.000 • 10.000	• ----- • ----- • -----
A3 Missioni	• 8.000	• -----
A) Subtotale Personale	• 110.000	• -----
B) Altri costi di esercizio (Materiali di consumo, spese di divulgazione, organizzazione incontri tecnico scientifici)	• 28.500	• -----
C) Costi della ricerca contrattuale • Costo dei brevetti da acquisire • Consulenze specializzate • Manutenzioni e riparazioni	• 0 • 0 • 0	• ----- • ----- • -----
D) Costi per strumentazioni e altri beni durevoli¹⁶ (Con ciclo vitale pari alla durata del progetto o imputati pro rata-ammortamenti)	• 45.000	• -----
Totale parziale (A+B+C+D)	• 183.500	• -----
E) Spese generali (max 10% del Totale Parziale)	• 11.500	• -----
F) Coordinamento¹⁷ (max 5% del Totale Parziale)	• 5.000	• -----
TOTALE	• 200.000	• -----
TOTALE CONTRIBUTO CONCESSO¹⁸% pari ad €.....		
Timbro dell'organismo destinatario del contributo	Il responsabile di gestione (o delegato)¹⁹ On. Prof. Bartolomeo Sammartino	Il coordinatore del progetto Dott. Salvatore Davino
	Firma 	Firma 

SCHEDA DI UNITÀ OPERATIVA IEMEST

1. Sintesi dell'impegno delle risorse umane per categoria (mesi uomo)				
Categoria		Periodo di esecuzione del progetto		Totale
		1° annualità	2° annualità	
Tempo Indet.	Ricercatori	0	0	0
	Tecnici	0	0	0
	Personale ausiliario	0	0	0
Tempo det.	Ricercatori	4	4	8
	Tecnici	4	4	8
	Personale ausiliario	0	0	0
Totale		8	8	16

2 Elenco degli strumenti tecnico-scientifici (attrezzature) e dei beni durevoli funzionali alla ricerca proposta già in dotazione o che si intende acquistate²⁰					
Descrizione (specificare se già in uso²¹ o da acquistare)	periodo di utilizzo nel progetto (mesi) (a) / Periodo di ammortamento utile (mesi) (b)	Costo totale € (c)²²	% di utilizzo per il progetto (d)	Importo imputato (a/b)*c*d	Spesa ammessa²³
TOTALE²⁴					

SCHEDA DI UNITÀ OPERATIVA DISPA

<i>1. Sintesi dell'impegno delle risorse umane per categoria (mesi uomo)</i>				
Categoria		Periodo di esecuzione del progetto		
		1° annualità	2° annualità	Totale
Tempo Indet.	Ricercatori	4	4	8
	Tecnici	0	0	0
	Personale ausiliario	0	0	0
Tempo det.	Ricercatori	6	6	12
	Tecnici	0	0	0
	Personale ausiliario	0	0	0
Totale		10	10	20

<i>2 Elenco degli strumenti tecnico-scientifici (attrezzature) e dei beni durevoli funzionali alla ricerca proposta già in dotazione o che si intende acquistate²⁵</i>					
Descrizione (specificare se già in uso ²⁶ o da acquistare)	periodo di utilizzo nel progetto (mesi) (a) / Periodo di ammortamento utile (mesi) (b)	Costo totale € (c) ²⁷	% di utilizzo per il progetto (d)	Importo imputato (a/b)*c*d	Spesa ammessa ²⁸
TOTALE²⁹					

SCHEMA DI UNITÀ OPERATIVA VIVAI CHIARELLO

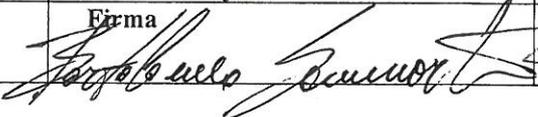
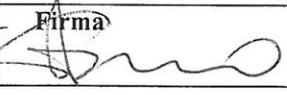
<i>1. Sintesi dell'impegno delle risorse umane per categoria (mesi uomo)</i>				
Categoria		Periodo di esecuzione del progetto		
		1° annualità	2° annualità	Totale
Tempo Indet.	Ricercatori	0	0	0
	Tecnici	4	4	8
	Personale ausiliario	0	0	0
Tempo det.	Ricercatori	0	0	0
	Tecnici	4	4	8
	Personale ausiliario	4	4	8
Totale		12	12	24

<i>2 Elenco degli strumenti tecnico-scientifici (attrezzature) e dei beni durevoli funzionali alla ricerca proposta già in dotazione o che si intende acquistate³⁰</i>					
Descrizione (specificare se già in uso ³¹ o da acquistare)	periodo di utilizzo nel progetto (mesi) (a) / Periodo di ammortamento utile (mesi) (b)	Costo totale € (c) ³²	% di utilizzo per il progetto (d)	Importo imputato (a/b)*c*d	Spesa ammessa ³³
q.p. ibridatore di flusso	24/24	6.000	100%	6.000	
Cella climatica	24/24	9.000	100%	9.000	
Screenhouse	24/24	30.000	100%	30.000	
TOTALE³⁴				45.000	

Scheda finanziaria di unità operativa IEMEST

3. Piano finanziario		
	Costo Totale (€)	Spesa ammessa ³⁵
A1 Personale a tempo indeterminato		
• Ricercatori	• -----	• -----
• Tecnici	• -----	• -----
• Altro personale ausiliario	• -----	• -----
A2 Personale a tempo determinato		
• Ricercatori	• -----	• -----
• Tecnici	• 12.000	• -----
• Altro personale ausiliario	• -----	• -----
A3 Missioni	• 4.000	• -----
A) Subtotale Personale	• 16.000	• -----
B) Altri costi di esercizio (Materiali di consumo, spese di divulgazione, organizzazione incontri tecnico scientifici)	• 11.500	• -----
C) Costi della ricerca contrattuale		
• Costo dei brevetti da acquisire	• -----	• -----
• Consulenze specializzate	• -----	• -----
• Manutenzioni e riparazioni	• -----	• -----
D) Costi per strumentazioni e altri beni durevoli³⁶ (Con ciclo vitale pari alla durata del progetto o imputati pro rata-ammortamenti)	• -----	• -----
Totale parziale (A+B+C+D)	• 27.500	• -----
E) Spese generali (max 10% del Totale parziale)	• 2.500	• -----
TOTALE	• 30.000	• -----

TOTALE CONTRIBUTO CONCESSO³⁷% pari ad €.....

Timbro dell'organismo destinatario del contributo	Il responsabile di gestione (o delegato) ³⁸ on. Prof. Bartolo Sammatino	Il coordinatore del progetto Dott. Salvatore Davino
	Firma 	Firma 

Scheda finanziaria di unità operativa DISPA

3. Piano finanziario		
	Costo Totale (€)	Spesa ammessa ⁴⁵
A1 Personale a tempo indeterminato		
• Ricercatori	• 36.000	• -----
• Tecnici	• -----	• -----
• Altro personale ausiliario	• -----	• -----
A2 Personale a tempo determinato		
• Ricercatori	• 18.000	• -----
• Tecnici	• -----	• -----
• Altro personale ausiliario	• -----	• -----
A3 Missioni	• 2.000	• -----
A) Subtotale Personale	• 56.000	• -----
B) Altri costi di esercizio (Materiali di consumo, spese di divulgazione, organizzazione incontri tecnico scientifici)	• 7.000	• -----
C) Costi della ricerca contrattuale		
• Costo dei brevetti da acquisire	• -----	• -----
• Consulenze specializzate	• -----	• -----
• Manutenzioni e riparazioni	• -----	• -----
D) Costi per strumentazioni e altri beni durevoli⁴⁴ (Con ciclo vitale pari alla durata del progetto o imputati pro rata-ammortamenti)	• -----	• -----
Totale parziale (A+B+C+D)	• 63.000	• -----
E) Spese generali (max 10% del Totale parziale)	• 3.000	• -----
TOTALE	• 66.000	• -----
TOTALE CONTRIBUTO CONCESSO⁴⁵% pari ad €.....		
Timbro dell'organismo destinatario del contributo DIPARTIMENTO DISPA	Il responsabile di gestione (o delegato) ⁴⁶ Prof. Salvatore Cosentino	Il coordinatore del progetto cognome Prof. Mario Davino
	Firma <i>Salvatore Cosentino</i>	Firma <i>Mario Davino</i>

Scheda finanziaria di unità operativa Vivaio Chiarello

3. Piano finanziario		
	Costo Totale (€)	Spesa ammessa ³⁹
A1 Personale a tempo indeterminato		
• Ricercatori	• -----	• -----
• Tecnici	• 14.000	• -----
• Altro personale ausiliario	• -----	• -----
A2 Personale a tempo determinato		
• Ricercatori	• -----	• -----
• Tecnici	• 12.000	• -----
• Altro personale ausiliario	• 10.000	• -----
A3 Missioni	• 2.000	• -----
A) Subtotale Personale	• 38.000	• -----
B) Altri costi di esercizio (Materiali di consumo, spese di divulgazione, organizzazione incontri tecnico scientifici)	• 10.000	• -----
C) Costi della ricerca contrattuale		
• Costo dei brevetti da acquisire	• -----	• -----
• Consulenze specializzate	• -----	• -----
• Manutenzioni e riparazioni	• -----	• -----
D) Costi per strumentazioni e altri beni durevoli⁴⁰ (Con ciclo vitale pari alla durata del progetto o imputati pro rata-ammortamenti)	• 45.000	• -----
Totale parziale (A+B+C+D)	• 93.000	• -----
E) Spese generali (max 10% del Totale parziale)	• 6.000	• -----
TOTALE	• 99.000	• -----
TOTALE CONTRIBUTO CONCESSO⁴¹% pari ad €.....		
Timbro dell'organismo destinatario del contributo Vivai Chiarello	Il responsabile di gestione (o delegato) ⁴² Dott. Agr. Fabio Chiarello	Il coordinatore del progetto Dott. Agr. Fabio Chiarello
VIVA I CHIARELLO	Firma Fabio Chiarello	Firma Fabio Chiarello