

RELAZIONE DI PROGETTO
(A cura del coordinatore e del responsabile di gestione del progetto)

1. Tematica e Filiera	MIPAAF- BANDO Progetti speciali 2015 in materie agricole alimentari e forestali		
2. Titolo	Nanoparticelle di chitosano per veicolare antiossidanti nel grano, prevenire danni da stress biotici e abiotici e migliorare quantità e qualità della granella		
3. Acronimo	NA-NOTOX		
4. Progetto	Bando	Affidamento diretto	Sportello
	¹ Decreto Ministeriale n. 5000 del 4 marzo 2015	²	³
5. Durata (mesi) 18 mesi totali	15 mesi + proroga di 3 mesi	Report⁴ Intermedio <input type="checkbox"/> Finale X <input type="checkbox"/>	Nota⁵ Il report si riferisce all'intero periodo
6. Dati finanziari	Finanziamento concesso totale (€)	Finanziamento ricevuto (€)	Importo rendicontato (€)⁶
	63.969,60	30.385,56	
7. Coordinatore di progetto	Nome e COGNOME	FRANCO FAORO	
	Qualifica	Professore associato confermato- tempo pieno	
	Istituzione di appartenenza	Università degli Studi di Milano Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali	
	Indirizzo	Via Celoria 2, 20133 Milano	
	Tel/fax	02 5031 6590	
	e-mail	Franco.faoro@unimi.it	
8. Ente coordinatore	<p>Università degli Studi di Milano –Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Produzione, Territorio e Agroenergia Indirizzo: Via Celoria 2, 20133 Milano Tel.: 02 5031 6598, -mail: eugenia.cirincione@unimi.it</p> <p>Conto di Tesoreria n. 0036879 IBAN: IT89E0100003245139300036879 (ai sensi del D.L. 1/2012 art. 35, commi 8-13, Circolare MEF del 24/3/2012, per le operazioni di girofondi delle Pubbliche Amministrazioni)</p> <p>Responsabile amministrativo della rendicontazione finanziaria: Nome: Eugenia Cirincione Tel/fax 02 5031 6598 Email: eugenia.cirincione@unimi.it</p>		

<p>9. Sintesi del progetto (max 20 righe) <i>(può essere oggetto di pubblicazione)</i></p>	<p>Il progetto NA-NOTOX ha come obiettivo il miglioramento della produttività e della qualità del grano duro, diminuendo nel contempo l'uso di agrofarmaci e il relativo impatto ambientale mediante l'utilizzo di trattamenti antiossidanti veicolati da nanoparticelle (NP) di chitosano. Il miglioramento della produttività dovrebbe essere ottenuto prevenendo i danni fogliari dovuti ad ozono e contenendo in maniera più sostenibile le malattie fungine. Il miglioramento della qualità sarebbe, innanzitutto, conseguenza della crescita di piante sottoposte ad una minor pressione ossidativa, ma anche del contributo dell'apporto di cisteina e quindi dell'aumento di residui -SH nelle proteine. Inoltre, le NP di chitosano, elicitando i meccanismi di difesa della pianta, contribuirebbero ad innalzare il contenuto di polifenoli delle cariossidi con risvolti positivi sulle loro proprietà nutrizionali.</p>
---	--

Parole chiave	Fumento, nanoparticelle, chitosano, antiossidanti, <i>Fusarium graminearum</i>, NAC
----------------------	--

10. Relazione del progetto (totale max. 10 pagine)

10.1 Descrizione dei risultati in relazione agli obiettivi generali e specifici previsti nel periodo di riferimento (max. 2 pagine)

L'**OBIETTIVO GENERALE** di NA-NOTOX è quello di migliorare la produttività e la qualità del grano duro diminuendo nel contempo l'uso di agrofarmaci e il relativo impatto ambientale, mediante l'utilizzo di trattamenti antiossidanti veicolati da NP di chitosano.

Gli **OBIETTIVI SPECIFICI** sono:

1. Messa a punto di un metodo semplice e affidabile di produzione di NP di chitosano rivestite di NAC e determinazione della loro attività in plantule di grano in serra
2. Individuazione del tipo di particelle (dimensione, conc. NAC, ecc) e della loro concentrazione in grado di elevare significativamente il pool di antiossidanti nelle foglie
3. Verifica della capacità delle NP di elicitare i meccanismi di difesa della pianta mediante infezioni sperimentali in serra con *Fusarium graminearum*
4. Verifica della capacità delle NP di prevenire i danni da stress ossidativo e da patogeni in pieno campo e di innalzare il pool di antiossidanti e polifenoli a tempi diversi dal trattamento
5. Verifica del miglioramento della produttività e della qualità delle cariossidi
6. Verifica delle caratteristiche reologiche delle farine ottenute da cariossidi di piante trattate.

Nei primi 9 mesi di attuazione del progetto è stato possibile raggiungere alcuni degli obiettivi prefissati, sia di carattere generale che più specifico, **come dettagliato nel report intermedio** delle attività relative alle singole task nell'ambito dei WP1 e WP2.

In sintesi, i principali **RISULTATI** raggiunti rispetto agli obiettivi prefissati nei primi 9 mesi riguardano WP1 e WP2 sono:

WP1. Allestimento NP e prove preliminari di attività in serra**1. Condizioni di crescita e Determinazione del metodo di produzione di NP di chitosano.**

Percentuale di raggiungimento dell'obiettivo: 100%

Sono state definite le condizioni ambientali e di substrato culturale, per la crescita delle piante di frumento sia in serra sia in fitotrone ed è stato messo a punto un **metodo di allestimento delle nanoparticelle di chitosano** (Cs-NP) di dimensioni omogenee (100-200 nm) mediante gelificazione ionotropica. Successivamente è stata **messa a punto un metodo di carica delle CS-NP con N-acetil cisteina (NAC)**, che ha avuto successo, come dimostrato dall'analisi con HPLC delle particelle stesse

2. Individuazione del tipo e concentrazione di Cs-NP-NAC in grado di aumentare il pool di antiossidanti nelle foglie

Percentuale di raggiungimento dell'obiettivo: 70%

Le Cs-NP-NAC sono state nebulizzate su plantule di grano (cv Colombo) in fitotrone, allo stadio di 4-5 foglie espanse. A 3, 24 e 72 ore dal trattamento l'analisi del contenuto di acido ascorbico (AA) e glutatione (GSH) ha dimostrato che sia le Cs-NP che le Cs-NP-NAC alla concentrazione di 0.1 mg/ml erano in grado di aumentare il livello di AA in maniera significativa rispetto al controllo a tutti i tempi considerati ma particolarmente a 72 h. Anche il glutatione aumentava in ambedue i casi ma con minore intensità

3. Verifica della capacità delle NP di elicitare i meccanismi di difesa della pianta

Percentuale di raggiungimento dell'obiettivo: 80%

L'Attività fungicida in vitro di Cc, Cs-NP e Cs-NP-NAC nei confronti di *Fusarium graminearum* è stata valutata in vitro mediante prove di inibizione della crescita miceliare su piastre e della germinazione dei conidi. Cs e Cs-NP, ma non Cs-NPs-NAC, hanno mostrato una riduzione significativa della crescita di *F. graminearum*. Per quanto riguarda l'attività fungicida *in planta*, dati preliminari hanno mostrato che nelle spighe trattate con Cs e Cs-NP prima dell'inoculazione l'infezione si sviluppava con un ritardo di qualche settimana e rimaneva localizzata nelle 2-3 spighe inoculate, come dimostrato microscopicamente seguendo lo sviluppo del fungo marcato con GFP.

WP2. Trattamenti in pieno campo per prevenire stress abiotici e biotici

1. Verifica della capacità delle NP di prevenire i danni da stress ossidativo e da patogeni in pieno campo - Percentuale di raggiungimento dell'obiettivo: 100%

È stata allestita una sperimentazione di campo nella zona di Voghera (PV) utilizzando 16 parcelle di 10 mq ciascuna, dove sono stati ripetuti in triplo quattro tipi trattamenti: acido acetico 0.05 % (T1), Cs 0.5 mg/mL (T2), Cs-NP (T3), Cs-NP-NAC 0.1 mg/mL (T4), a tre stadi fenologici diversi della cv Fabulis di frumento duro. Tutti e due i due tipi di NP hanno ridotto la percentuale di aree fogliari sintomatiche ed in sostanza lo stress ossidativo. Tuttavia le Cs-NP-NAC sono state, ma solo inizialmente, più efficaci verosimilmente per il loro potere antiossidante dovuto a NAC. Invece non si sono osservate variazioni significative del contenuto di metaboliti antiossidanti, ad eccezione di un aumento del livello di AA dopo il secondo trattamento con Cs-NP.

Nei successivi 9 mesi del progetto sono state svolte le attività previste dai WP3 e WP4. Infine nei tre mesi di proroga è stata fatta una replica parziale delle attività previste nel WP2 e WP3 per una conferma dei dati di campo. Queste attività sono state incluse nel WP2-BIS e nel WP3-BIS. Sono state inoltre completate le prove di resistenza a *Fusarium* previste dal WP1.

WP 3) Analisi quantitativa e qualitativa della produzione

1. Verifica del miglioramento della produttività e della qualità delle cariossidi (WP3) - Percentuale di raggiungimento dell'obiettivo: 100%

La resa in granella delle parcelle è stata tendenzialmente diversa ($p=0,093$): infatti, quelle trattate con CHT-NP-NAC hanno avuto una produzione per ha statisticamente più alta di quella delle parcelle trattate con CHT-NP (8,46 vs. 7,35 t/ha) e tendenzialmente maggiore di quelle con solo CHT (7,6 t/ha). Il peso elettrolitico, invece, non è cambiato significativamente in seguito ai trattamenti, mentre il peso di 1000 semi è risultato variare statisticamente tra i campioni ($p<0,001$), con valori di 55,4 g nelle parcelle trattate con il CHT-NP e 55,4 g in quelle CHT-NP-NAC (54,6 g) vs. 51,88 g di CHT e 52,77 g del controllo (acido acetico).

2. Verifica delle caratteristiche reologiche delle farine ottenute da cariossidi di piante trattate (WP3) - Percentuale di raggiungimento dell'obiettivo: 100%

Le semole ottenute dalla macinazione delle cariossidi di frumento ottenute dalle piante trattate sono state sottoposte a caratterizzazione delle performance tecnologiche mediante test al GlutoPeak e al Microviscoamilografo. Il GlutoPeak® è strumento recentemente proposto da Brabender (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Germania) per la caratterizzazione della qualità del glutine di sfarinati di frumento.

Tra i campioni considerati, la semola ottenuta dalle piante sottoposte al trattamento T3 ha mostrato una cinetica di aggregazione significativamente differente da quella del campione prodotto mediante trattamento T4, indicando la formazione di un reticolo glutinico più forte nel caso del trattamento T4.

L'effetto del trattamento sulle proprietà di gelatinizzazione e retrogradazione dell'amido dei campioni di semola è stato valutato mediante il Micro Visco-Amilografo (Brabender OHG, Duisburg, Germania). I risultati ottenuti non evidenziano differenze significative tra i campioni ad indicare che i diversi trattamenti considerati in questo studio non modificano la capacità di gelatinizzare e retrogradare dell'amido.

10.2 Attività svolte (max 7 pag)

Le attività dei WP1 e WP2 sono stati riportati in dettaglio nella relazione intermedia, a cui si rimanda. Qui di seguito sono descritte le attività nell'ambito di WP3 e WP4, nonché di WP2 BIS e WP3 BIS, quest'ultimi non previsti nel progetto e condotti per confermare i dati di campo del 2017. Sono state inoltre completate le prove di resistenza a *Fusarium* previste dal WP1.

WP 3. Analisi quantitativa e qualitativa della produzione

UO Partecipanti: UNIMI e CREA

Task 1 (CREA). Raccolta granella e analisi produzione, peso elettrolitico e contenuto proteico, amilaceo e di antiossidanti delle semole da essa prodotte. Rilevazione di eventuali micotossine

Durata: mese 8 - mese 15

Risultati

A fine ciclo della coltura (30 Giugno) la granella delle diverse parcelle è stata raccolta tramite mini trebbiatrice e si è provveduto a calcolare la resa (t/ha), il peso ettolitrico ed il peso di 1000 semi. I risultati a questi tre parametri sono elencati e rappresentati di seguito.

L'ANOVA condotta sui dati di resa delle parcelle ha mostrato che i valori medi di produttività differivano leggermente anche se non in maniera statisticamente significativa ($p=0.093$). Effettuando i confronti a coppia, tuttavia, si notava che le parcelle nebulizzate con CHT-NP-NAC (T4) avevano una produzione ad ettaro statisticamente più alta di quella delle parcelle trattate con CHT-NP (T3), ma anche mediamente maggiore di quella delle parcelle trattate con solo CHT (T2), superandole di circa 1 t/ha (Figura 1).

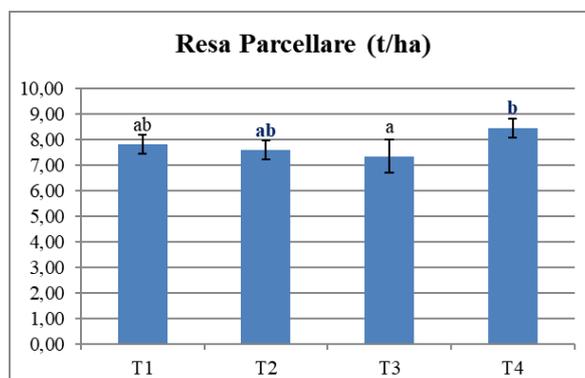


Figura 1. Resa (t/ha) delle parcelle trattate con acido acetico (T1), CHT (T2), CHT-NP (T3), CHT-NP-NAC (T4). Lettere diverse indicano differenze significative secondo il test LSD di Fisher, con $p=0.21$. Le lettere dello stesso colore indicano una tendenziale differenza ($p<0.1$, Fisher LSD test).

La granella proveniente dai diversi campioni, non mostrava, invece, nessuna differenza significativa relativamente al peso ettolitrico, anche se i valori medi erano maggiori nei trattamenti T3 e T4 (Figura 2).

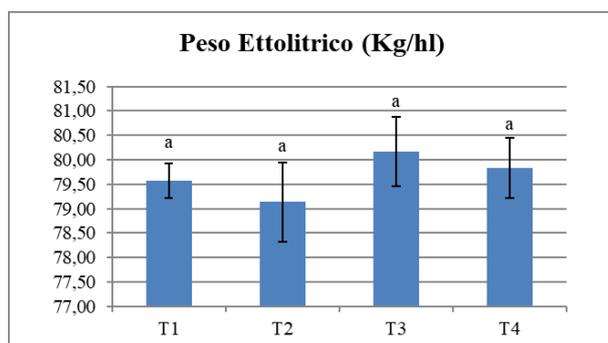


Figura 2 – Peso ettolitrico della granella ottenuta nei vari trattamenti.

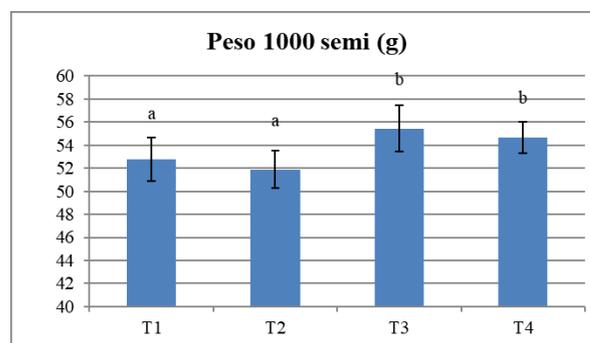


Figura 3 – Peso di mille semi nei vari trattamenti. Lettere diverse indicano differenze significative secondo il test LSD di Fisher, con $p<0.05$.

L'ANOVA ha invece evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p<0.0001$) fra i valori medi del peso di mille semi (Fig. 3). In particolare, le parcelle trattate con CHT-NP e CHT-NP-NAC (T3 e T4) producevano cariossidi più pesanti rispetto a quelle trattate con solo CHT (T2) e ai controlli (T1), mentre i valori di T3 e T4 non differivano fra loro. Dopo le analisi quantitative sulla produzione, la granella è stata macinata con un mulino da

laboratorio (Labormill 4RB, BONA srl, Monza, Italia), ottenendo la semola separata dalla crusca. Le due frazioni sono state conservate a -20°C fino al momento delle analisi.

Il tenore in proteine non risulta essere influenzato in maniera significativa ($p=0.373$) dalla tipologia di trattamento. Il contenuto in proteine varia da un minimo di 12.4% per il campione T3 e un valore massimo di 13.03% per il campione T4. Il tenore in amido totale delle semole non cambia in funzione del trattamento considerato ($p=0.898$). I valori per questo parametro variano dal 71.3% per il campione T1 al 72.7% per il campione T4.

Le determinazioni relative al profilo polifenolico (HPLC) e al contenuto di polifenolo totali (spettrofotometro, saggio Folin-Ciocalteu) non hanno mostrato differenze significative fra i trattamenti (Tab. 1). Merita però sottolineare che fra i diversi acidi fenolici individuati, il principale di essi, ovvero l'acido ferulico, mostrava valori medi più alti nelle crusche dei trattamenti T2 e T4 ($p=0.52$). Lo stesso risultato non era però apprezzabile nelle semole.

CRUSCA	Ac. Ferulico $\mu\text{g/g}$	Ac. Vanillico $\mu\text{g/g}$	Ac. Siringico $\mu\text{g/g}$	Ac. Caffeico $\mu\text{g/g}$	Ac. p-Coumarico $\mu\text{g/g}$	Ac. Sinapico $\mu\text{g/g}$	Total phenolics mgGAE/g
T1	3753 \pm 597	60 \pm 12.1	160 \pm 47.9	20 \pm 3.3	80 \pm 9.9	390 \pm 63.5	7.4 \pm 0.8
T2	4259 \pm 326	76 \pm 0.2	159 \pm 36.6	25 \pm 1.8	88 \pm 14.9	440 \pm 39.8	8.0 \pm 1.1
T3	3862 \pm 375	61 \pm 5.9	134 \pm 23.8	22 \pm 4.5	77 \pm 8.9	420 \pm 23.9	6.9 \pm 0.6
T4	4145 \pm 739	85 \pm 3.1	177 \pm 31.0	20 \pm 7.1	90 \pm 14.0	426 \pm 88.2	7.5 \pm 1.4

SEMOLA	Ac. Ferulico $\mu\text{g/g}$	Ac. Vanillico $\mu\text{g/g}$	Ac. Siringico $\mu\text{g/g}$	Ac. Caffeico $\mu\text{g/g}$	Ac. p-Coumarico $\mu\text{g/g}$	Ac. Sinapico $\mu\text{g/g}$	Total phenolics mgGAE/g
T1	283 \pm 7.6	10.18 \pm 2.1	17.9 \pm 1.3	1.7 \pm 0.4	7.9 \pm 1.2	52 \pm 4.3	1.2 \pm 0.2
T2	288 \pm 34.9	8.23 \pm 2.0	15.4 \pm 0.5	1.8 \pm 0.8	6.8 \pm 0.3	50 \pm 8.4	1.2 \pm 0.2
T3	301 \pm 42.3	7.51 \pm 1.4	15.4 \pm 4.1	1.7 \pm 0.0	6.8 \pm 1.0	57 \pm 10.7	1.3 \pm 0.5
T4	256 \pm 20.3	8.65 \pm 2.4	15.6 \pm 3.9	1.3 \pm 0.6	5.9 \pm 0.3	46 \pm 5.7	1.1 \pm 0.0

Tabella 1. Contenuto in polifenoli nei campioni di crusca e semola appartenenti ai diversi trattamenti. L'ultima colonna si riferisce al contenuto di polifenoli totali, determinato per via spettrofotometrica ed espresso come mg di acido gallico equivalenti.

Tocoferoli e tocotrienoli sono importanti molecole antiossidanti che costituiscono la vitamina E ed agiscono come donatori di atomi di idrogeno ai radicali perossilici, impedendo la propagazione della perossidazione lipidica. I risultati delle analisi HPLC hanno mostrato che il trattamento delle piante con CHT-NP caricate con l'antiossidante NAC induce un incremento del contenuto di tocotrienoli nelle semole ($p<0.05$, Fig. 4).

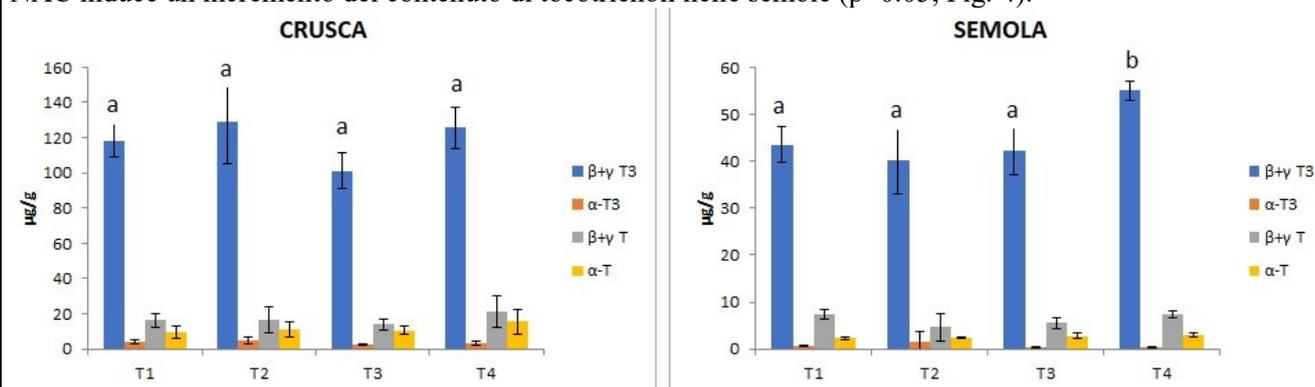


Figura 4. Contenuto in tocotrienoli (α , $\beta+\gamma$ T3) e tocoferoli (α , $\beta+\gamma$ T) nei campioni di crusca e semola appartenenti ai diversi trattamenti. Lettere diverse indicano medie significativamente diverse ($p<0.05$, LSD test).

Infine, su farina integrale (crusca+semola) è stata effettuata un'analisi per verificare la presenza di eventuali micotossine, in particolare relativamente al Deossinivalenolo (DON). I valori di DON riscontrati nei campioni analizzati erano molto bassi e variavano da 0 a 2.758 $\mu\text{g/kg}$, indicando quindi un contenuto molto al di sotto dei valori limite indicati dal Regolamento CE 1126/2007, che stabilisce a 1750 $\mu\text{g/kg}$ il tenore massimo di DON per il grano duro non trasformato. I risultati suggerivano quindi una bassissima infestazione di *Fusarium graminearum* che non ha reso possibile la valutazione di un eventuale effetto positivo dei trattamenti sul contenuto di micotossine.

Task 2 (UNIMI). Analisi reologica degli impasti ottenuti con le varie semole.

Durata: mese 10-mese 15

Risultati

Le semole ottenute dalla macinazione delle cariossidi di frumento ottenute dalle piante trattate sono state sottoposte a caratterizzazione delle performance tecnologiche mediante test al GlutoPeak e al Microviscoamilografo. Il GlutoPeak® è strumento recentemente proposto da Brabender (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Germania) per la caratterizzazione della qualità del glutine di sfarinati di frumento. I principali indici forniti dallo strumento sono:

- 1) la consistenza massima (BEM, valore espresso in GPU, GlutoPeak Unit) corrispondente al picco di aggregazione del glutine)
- 2) il tempo al picco (PMT) ovvero il tempo necessario per raggiungere la consistenza massima
- 3) l'energia di aggregazione espressa in GPE (GlutoPeak Equivalents) corrispondente all'area sottesa alla curva tra 15 s prima (AM) e 15 s dopo (PM) il picco.

Tra i campioni considerati, la semola ottenuta dalle piante sottoposte al trattamento T3 ha mostrato una cinetica di aggregazione significativamente differente da quella del campione prodotto mediante trattamento T4. In particolare, l'aggiunta di NAC ha determinato lo shift del picco di aggregazione verso tempi inferiori (PMT: 37 vs 46 s, per T4 e T3, rispettivamente) e consistenze maggiori (49 vs 55 GPU per T3 e T4, rispettivamente). Ne consegue un aumento dell'energia di aggregazione (1257 vs 1418 GPE per T3 e T4 rispettivamente). I risultati ottenuti suggeriscono la formazione di un reticolo glutinico più forte nel caso del trattamento T4.

L'effetto del trattamento sulle proprietà di gelatinizzazione e retrogradazione dell'amido dei campioni di semola è stato valutato mediante il Micro Visco-Amilografo (Brabender OHG, Duisburg, Germania). Lo strumento consente di valutare le variazioni di viscosità di sfarinati (12 g) miscelati con acqua (100 ml) nel corso di fasi di riscaldamento e raffreddamento in condizioni controllate. In particolare, la sospensione inizialmente viene portata a 30°C, temperatura alla quale inizia l'analisi. Da 30°C la sospensione viene riscaldata fino a 95°C, con una velocità di riscaldamento di +3°C/min. Raggiunti 95°C la temperatura viene mantenuta costante per 20 minuti e successivamente diminuita, ad una velocità di -3°C/min, fino a 30°C.

Con l'analisi micro viscoamilografica si ottiene un tracciato (Figura 5) nel quale sono riportati:

- Sull'asse delle ordinate la viscosità (espressa in Unità Brabender, UB)
- Sull'asse delle ascisse il tempo (espresso in minuti, min.)
- Sull'asse secondario la temperatura del sistema (espressa in °C).

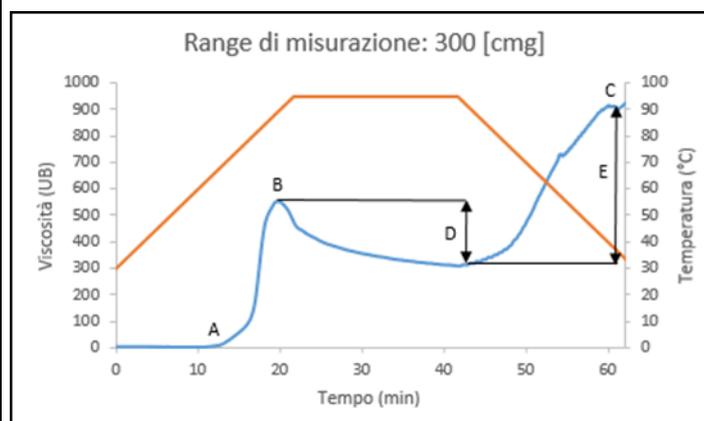


Figura 5. Esempio di tracciato micro viscoamilografico.

Dalla curva possono essere ricavati i seguenti parametri:

- Temperatura di inizio gelatinizzazione: temperatura (°C) in corrispondenza della quale la viscosità inizia ad aumentare rapidamente (punto A).
- Picco di viscosità (UB), che è la massima viscosità registrata durante la fase di riscaldamento (punto B).
- Temperatura al picco di viscosità (°C) (punto B), temperatura a cui si registra la massima viscosità durante il riscaldamento.
- La viscosità alla fine del raffreddamento (UB), ovvero la viscosità raggiunta dal campione grazie alla retrogradazione dell'amido (punto C).
- Breakdown (UB): è dato dalla differenza tra la viscosità al picco e la viscosità all'inizio del raffreddamento (viscosità minima) (punto D).
- Setback (UB): è dato dalla differenza tra la viscosità alla fine del raffreddamento e la viscosità all'inizio del raffreddamento (viscosità minima) (punto E).

I risultati ottenuti non evidenziano differenze significative tra i campioni ad indicare che i diversi trattamenti considerati in questo studio non modificano la capacità di gelatinizzare e retrogradare dell'amido, fenomeni importanti durante qualsiasi processo di trasformazione della semola.

Indicatori di verifica di WP3

I risultati di questo WP sono stati oggetto di una tesi di laurea, discussa a marzo 2018 nell'ambito del corso di laurea magistrale in Scienze della Produzione e Protezione delle Piante dell'Università degli Studi di Milano (Matteo Fattizzo, matr.875351, *Prevenzione dei danni da Ozono su frumento duro mediante nanoparticelle di chitosano caricate con N-acetil cisteina*). I risultati sono stati anche presentati al Convegno del gruppo di Biologia Cellulare e Biotecnologie della società Botanica Italiana, Sanremo giugno 2018 (V. Picchi, S. Gobbi, M. Fattizzo, F. Faoro, *Chitosan nanoparticles loaded with N-Acetyl cysteine to mitigate ozone oxidative stress in durum wheat*) il cui programma è visibile qui <https://differenziamentosbi.wordpress.com/programma/>

Infine, i dati soprariportati sono stati oggetto di una comunicazione al convegno annuale della Società di Patologia Vegetale, Ancona, settembre 2018 e pubblicati sul Journal of Plant Pathology, xxx (V. Picchi, S. Gobbi, M. Fattizzo, F. Faoro, *N-Acetyl cysteine-loaded chitosan nanoparticles to control oxidative stress in durum wheat*).

WP4. Analisi globale dei risultati e loro divulgazione agli operatori tramite la rete aziendale italiana del consulente del progetto.

Unità partecipanti: UNIMI e CREA)

Durata: mese 18

Al termine del primo anno di sperimentazione in campo e con la partecipazione del consulente del progetto è stata organizzata una giornata di divulgazione dei risultati presso il campo sperimentale di Voghera, sponsorizzata dalla Limagrain Italia, società del gruppo LIMAGRAIN, azienda leader in Europa nelle sementi dei cereali a paglia. Durante la giornata, rivolta agli stakeholders del settore e ai coltivatori di frumento, è stato presentato il progetto e illustrati i risultati del primo anno di sperimentazione in campo.



Figure 6-7. Giornata di divulgazione dei risultati agli operatori tramite la rete aziendale italiana del consulente del progetto.

WP 2 BIS. Trattamenti 2018 in pieno campo per prevenire stress abiotici e biotici

UO Partecipanti: UNIMI e CREA.

Sono stati replicati tutti i 4 task dell'anno precedente.

Task 1 (UNIMI). *Scelta delle parcelle di frumento e loro isolamento e randomizzazione all'interno dell'appezzamento*

Durata: mese 15 del Gaant

Risultati

Come nel 2017, la prova in pieno campo è stata realizzata utilizzando una varietà di frumento duro (cv Fabulis) particolarmente sensibile all'ozono. La prova è stata allestita in zona Voghera, presso la Cascina Pellegrina (44°59'48" N; 9°2'59" E) ma in un campo adiacente a quello dell'anno precedente. Il lotto dedicato alla sperimentazione era costituito da 16 parcelle, dove i quattro trattamenti erano ripetuti in quadruplo in maniera randomizzata. Come controllo si è deciso di utilizzare acqua invece di acido acetico come nell'anno precedente, perché era emersa una sua leggera attività antiossidante e perché le NP non contenevano questo solvente

I trattamenti corrispondevano a: acqua (T1), chitosano 0.5 mg/mL (T2), NP di chitosano (T3), NP di chitosano addizionate di NAC 0.1 mg/mL (T4). Ogni parcella aveva le dimensioni di 10 mq come da schema mostrato in figura 8. Figura 9 mostra il campo durante uno dei sopralluoghi effettuati.

Task 2 (UNIMI). *Effettuazione dei trattamenti.*

Durata: mese 17- mese 18 del Gaant

Risultati

Sono stati effettuati tre trattamenti mediante nebulizzazione con pompa irroratrice munita di camera di protezione per evitare la deriva dei prodotti applicati (figura x) nelle seguenti date:

--8/05/2018- Fase fenologica BBCH37 (foglia a bandiera non ancora del tutto sviluppata);

-14/05/2018- Fase fenologica BBCH43 (rigonfiamento appena visibile a livello della guaina della foglia a bandiera);

-23/05/2018 - Fase fenologica BBCH65 (piena fioritura).

	3	4	5	6	7	8	9	10
	FABULIS T4	FABULIS T3	FABULIS T2	FABULIS T1	FABULIS T3	FABULIS T2	FABULIS T1	FABULIS T4
	FABULIS T1	FABULIS T2	FABULIS T3	FABULIS T4	FABULIS T4	FABULIS T1	FABULIS T2	FABULIS T3
	Rep 1		Rep 2		Rep 3		Rep 4	

Figura 8 – Disposizione parcelle sperimentali di 10 mq (T1: non trattato; T2: Chitosano (CHT); T3: Nanoparticelle di chitosano (NP); T4: Nanoparticelle di chitosano addizionate di N-Acetilcisteina (NP+NAC))



Figura 9 – Trattamento con pompa irroratrice

Task 3 (UNIMI). Monitoraggio parcelle e rilevazione di danni visibili e microscopici da stress ossidativo o da patogeni

Durata: mese 17- mese 18 del Gaant

Risultati

È stato effettuato un monitoraggio delle parcelle durante la crescita della coltura, dal momento della comparsa della foglia a bandiera (8/05) fino a fine fioritura (25/05). A quest'ultima data sono state prelevate 10 foglie bandiera a random per ogni parcella, digitalizzandole con scanner e analizzando le relative immagini con Photoshop. Nella figura 10 sono visibili, come esempio, le 10 foglie prelevate dalle parcelle di controllo il 25 maggio.



Figura 10 – Scansioni di campioni fogliari prelevati dalle parcelle di controllo in data 25 maggio 2018.

Con questo programma sono state selezionate le aree clorotiche o necrotiche e rapportate percentualmente all'area totale della foglia. La gravità del danno è espressa quindi come area clorotica o necrotica sul totale dell'area fogliare e i risultati riportati nel grafico di figura 11, dove questa percentuale è indicata alla data del 25 maggio 2018, dopo l'ultimo trattamento.

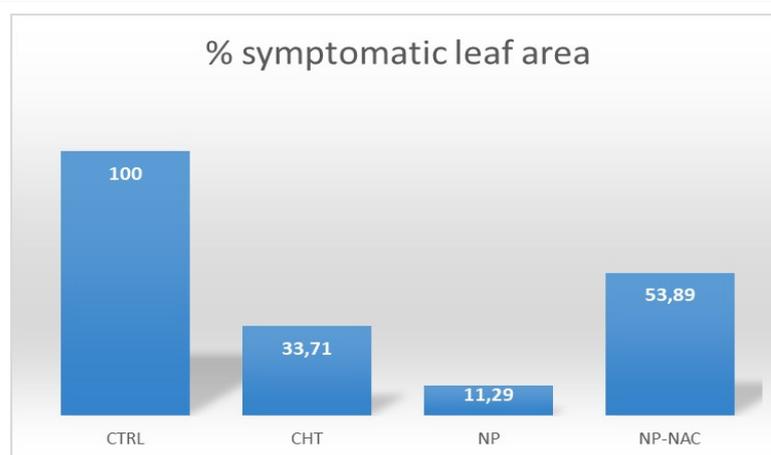


Figura 11 - Percentuale delle aree clorotiche rilevate in corrispondenza dei campionamenti del 25 maggio 2018: Rispetto al controllo non trattato a cui è dato il valore 100, la riduzione dell'area lesionata è stata del 66,29% per il chitosano, dell'88,81% per le NP di chitosano e 46,11% per le NP caricate con NAC.

Come si vede dalla Figura 11, sia chitosano (CHT) che tutti i due tipi di NP sono stati in grado di ridurre significativamente le aree sintomatiche ed in sostanza lo stress ossidativo. Tuttavia le CHT-NP-NAC sono state meno efficaci, verosimilmente perché NAC ha, in parte mascherato la capacità di chitosano di indurre chiusura stomatica e quindi l'uptake dell'inquinante. Pertanto, il fatto che sia CHT da solo che le CHT-NP siano state più efficaci di CHT-NP-NAC fa pensare che la chiusura stomatica sia stata, almeno in questo caso, maggiormente responsabile nel ridurre lo stress ossidativo rispetto a NAC.

Task 4 (CREA). Prelievo campioni fogliari prima e dopo ogni trattamento e analisi del pool antiossidante

Il prelievo dei campioni è stato effettuato a distanza di 48 h dal trattamento, ovvero nelle date del 10, 16 e 25 maggio 2018. I campioni fogliari sono stati congelati immediatamente in azoto liquido, quindi conservati a -80°C fino al momento delle analisi. Sulle foglie campionate è stato valutato il contenuto dei principali metaboliti antiossidanti fogliari, ovvero acido ascorbico (AsA) e glutazione totale (GSH).

I risultati relativi all'andamento del contenuto di metaboliti antiossidanti durante la prova di campo sono mostrati in Fig. 12.

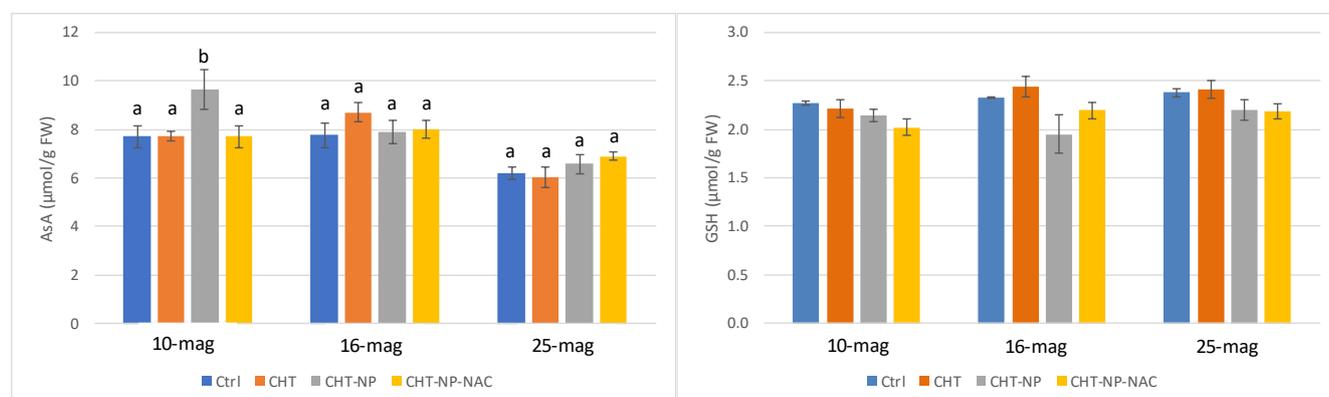


Figura 12. Contenuto in acido ascorbico (AsA) e glutazione (GSH) nei campioni fogliari nelle tre date di campionamento. Lettere diverse corrispondono a medie statisticamente diverse ($p < 0.05$, LSD test).

I risultati della prova di campo non hanno mostrato variazioni statisticamente significative del contenuto di metaboliti antiossidanti in seguito al trattamento con Cs-NP o Cs-NP-NAC, ad eccezione di un aumento del contenuto di AsA nelle foglie trattate con Cs-NP al primo campionamento. Nelle date successive i valori medi di AsA e GSH non hanno differito significativamente fra i trattamenti.

WP 3 BIS. Analisi quantitativa e qualitativa della produzione 2018

Di questo WP è stato ripetuto (CREA) il **Task 1** e limitatamente alla raccolta della granella e all'analisi della produzione (t/ha, peso ettrolitico, peso dei mille semi).

A fine ciclo della coltura (30 Giugno) la granella delle diverse parcelle è stata raccolta tramite mini trebbiatrice e si è provveduto a calcolare la resa (t/ha), il peso ettrolitico ed il peso di 1000 semi. I risultati a questi tre parametri sono elencati e rappresentati di seguito.

L'ANOVA condotta sui dati di resa delle parcelle ha mostrato che i valori medi di produttività differivano leggermente anche se non in maniera statisticamente significativa ($p=0.093$). Effettuando i confronti a coppia, tuttavia, si notava che le parcelle nebulizzate con CHT-NP-NAC (T4) avevano una produzione ad ettaro statisticamente più alta di quella delle parcelle trattate con CHT-NP (T3), ma anche mediamente maggiore di quella delle parcelle trattate con solo CHT (T2), superandole di circa 1 t/ha (Figura 13).

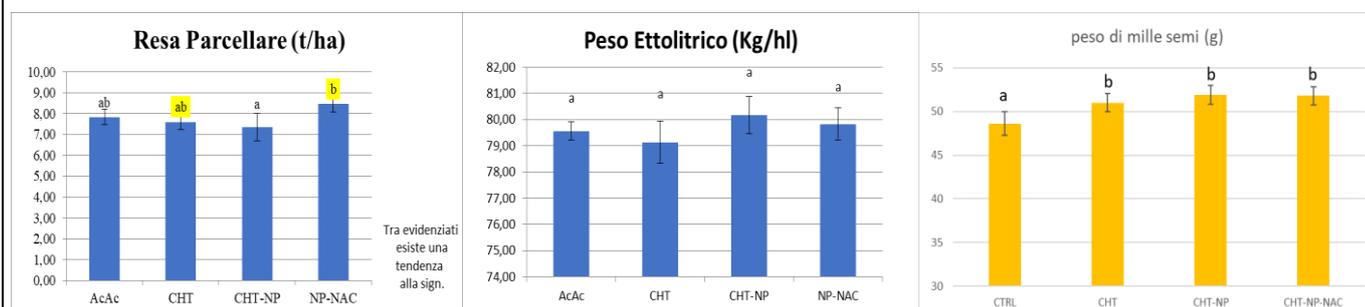


Figura 13. Produzione in granella, peso ettolitrico peso di mille semi dei vari trattamenti (campagna 2018).

Il peso ettolitrico non era significativamente diverso tra i vari trattamenti, mentre quello dei mille semi era significativamente più alto in tutti i trattati rispetto ai controlli (Figura 13).

WP 1 task 5. Infezione con conidi di *Fusarium graminearum* di piante trattate o meno con nanoparticelle

Questa task non si era potuta portare a termine nella prima parte del progetto per l'impossibilità di ottenere in serra piante con adeguato numero di spighe da infettare. Pertanto, nel 2018 sono state allevate piante di frumento in vasi da 30 cm, 5 piante per vaso, che hanno prodotto in media 15- 20 spighe. I vasi sono stati seminati in tre successive settimane dall'inizio di marzo e le piante, tenute all'aperto, sono fiorite tra il 20 maggio e il 10 giugno. Al momento della fioritura sono state nebulizzate rispettivamente con: 1) acqua come controllo, 2) chitosano 0,05% (CHT), 3) NP di chitosano alla stessa concentrazione (CHT-NP) e 4) CHT-NP caricate con NAC (1 mg/mL). Dopo 2-3 giorni, tutte le piante sono state inoculate con una sospensione di 10^5 conidi per mL, nebulizzati direttamente sulle spighe. In totale sono stati fatti 3 esperimenti, e i risultati sono stati analizzati dopo 15 gg, contando il numero di spighette infette per ogni spiga. La determinazione delle spighette infette è stata fatta in base ai sintomi macroscopici (annerimento della cariossidi) o, in caso di dubbio, microscopici con UV per rilevare la fluorescenza del fungo ingegnerizzato con GFP. I risultati sono riportati nella Figura 14. Come si vede, nei primi due esperimenti (Fig. 14 A e B), pur essendo il controllo più infetto di tutti i trattati non vi era significatività fra i trattamenti a causa dell'alta deviazione standard. Nel terzo esperimento (Fig. 14 C) invece tutte le tesi differivano significativamente una dall'altra e il controllo risultava il più infetto, mentre i trattati con NP e CHT erano i meno infetti. Le spighette trattate con CHT-NP-NAC, pur essendo significativamente meno infette del controllo, erano più sintomatiche rispetto agli altri 2 trattamenti. Questo risultato conferma che, come si era visto per l'ozono, anche nel caso del controllo del patogeno, sono le NP da sole le più efficaci. NAC quindi inibisce parzialmente la loro azione, probabilmente per i meccanismi sopra riportati.

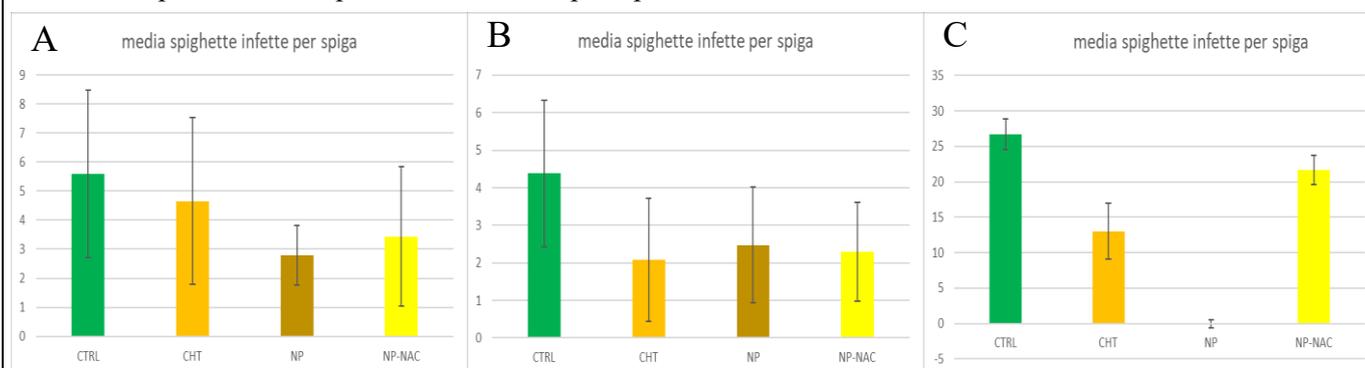


Figura 14. Infezione delle spighette con *Fusarium graminearum* nel primo (A) e secondo (B) esperimento. Nel terzo (C) esperimento la differenza tra i trattamenti è significativa.

Indicatori di verifica

I risultati di questo WP sono stati oggetto di una tesi di laurea, discussa a novembre 2018 nell'ambito del corso di laurea triennale in Produzione e Protezione delle Piante e dei Sistemi del Verde dell'Università degli Studi di

Milano (Induzione di resistenza a *Fusarium graminearum*: effetto comparato di chitosano e nanoparticelle di chitosano, Marco Golino matr. 869165).

10.3 Descrizione delle interazioni tra le UUOO partecipanti, eventuali collaborazioni esterne ed imprese (inserire diagramma) max 1 pag

Le due UUOO (UNIMI e CREA) hanno lavorato sempre a stretto contatto, sia per le attività di laboratorio che quelle di campo. Ciò è stato possibile grazie alla vicinanza fisica delle due UUOO e alla presenza di un assegnista di ricerca, finanziato dal progetto, che ha operato attivamente sia presso UNIMI che presso CREA. Nell'ambito di NA-NOTOX, UNIMI si è occupata della messa a punto del protocollo di preparazione delle Cs-NP e Cs-NP-NAC, mentre i laboratori del CREA hanno provveduto alle analisi HPLC delle NP. I trattamenti sul grano in condizione controllate, effettuati presso UNIMI, sono stati pianificati in accordo con l'UO CREA, che si è occupata dell'organizzazione del campionamento con azoto liquido e della corretta conservazione del materiale vegetale da destinare alle analisi biochimiche. Le 2 prove in campo hanno visto la partecipazione attiva di entrambe le UUOO, e in questo modo si è potuto svolgere nello stesso momento sia il monitoraggio delle parcelle e la rilevazione di danni (di competenza UNIMI) sia il campionamento delle foglie per le successive analisi biochimiche (di competenza CREA). Le attività progettuali hanno quindi visto una stretta e continua cooperazione fra le due UUOO, e la complementarietà delle singole expertise dei partecipanti ha reso possibile il raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Le prove di campo si sono poi avvalse della consulenza del Dr. Zefelippo che ha provveduto non solo ad allestire le parcelle di campo e ad effettuare i trattamenti con pompa irroratrice, ma anche ad assicurare un costante monitoraggio dell'andamento delle prove. Oltre a ciò, al termine della stagione vegetativa, il consulente si è occupato della trebbiatura delle parcelle e della elaborazione dei dati relativi alla produzione ed ha fornito alle due UUOO le cariossidi raccolte da destinare alle successive analisi qualitative.

10.4 Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto (max 1 pag)

I problemi connessi con le infezioni sperimentali di *Fusarium* di cui alla Task 5 WP1 (vedi dettagli nella relazione intermedia) hanno indotto alla richiesta di proroga di 3 mesi del progetto. Questo ha permesso di ripetere la sperimentazione di campo (WP 2BIS e WP3 BIS) con i risultati sopra riportati. Tuttavia è stato necessario prorogare di due mesi l'assegnamento di ricerca della collaboratrice Serena Gobbi con un aumento della spesa di € 2652,17 di cui € 2496,96, corrispondente 10% di rimodulazione ammissibile sono stati sottratti dalle spese di funzionamento e da quelle di missione, e i restanti 155,2 € finanziati con altri fondi.

WP 1 Task 3	Rottura della cella elettrochimica per misurazione HPLC di NAC	È stata comprata una nuova cella, utilizzando il budget a disposizione dell'UO CREA per l'acquisto di materiale di consumo
WP 1 Task 4	Ottenimento di una adeguata quantità di materiale fogliare a causa delle difficoltà incontrate nell'allevamento e crescita delle plantule in cella. La scarsità di materiale ottenuto ha fatto sì che si potessero effettuare soltanto le analisi del contenuto di metaboliti antiossidanti, mentre non è stata misurata la capacità antiossidante né il contenuto di polifenoli.	La prova dei trattamenti sulle plantule è stata ripetuta nei tre mesi di proroga del progetto cambiando il tipo di concimazione e le condizioni di allevamento delle piante e le analisi rifatte per una verifica dei risultati precedenti. In questo modo è stato possibile ottenere anche i dati riguardanti il contenuto di polifenoli e il potere antiossidante.
WP 1 Task 5	Difficoltà ad avere un numero adeguato di spighe di grano in serra o fitotrone e quindi di effettuare un numero sufficiente di infezioni per avere dati statisticamente significativi	Nel periodo di proroga da marzo a maggio 2018 il grano è stato allevato in fasi all'aperto e si sono potute effettuare le prove su un congruo numero di piante, come riportato nel WP1 task 5 alla fine della relazione.



Timbro Istituzione

Il coordinatore del progetto

nome e cognome: FRANCO FAORO

firma

RENDICONTO COMPLESSIVO (A cura del responsabile di gestione del progetto)

Voci di costo	Periodo Finale				Totale
	Costo approvato ⁷	Contributo concesso ⁸	Importo rendicontato		
			UNIMI	CREA	
A1) Personale a tempo determinato	25.000,00€	24.969,60€	€ 27.621,76		€ 27.621,76
A2) Missioni nazionali ed estere	3.000,00€	3.000,00€	€ 1.219,68	€ 986,85	€ 2.206,53
Subtotale Personale			€ 28.841,44	€ 986,85	€ 29.828,29
B) Materiale di consumo	23.000,00€	23.000,00€	€ 7.337,47	€ 13.550,76	€ 20.888,23
C) Attività esterne					€ 8.985,74
C1 – Consulenze	5.000,00€	5.000,00€	€ 5.000,00		€ 5.000,00
C2 – Convenzioni					
C3 - Manutenzioni ecc.				€ 3.985,74	€ 3.985,74
C4 - Servizi					
C5 - fitti					
D) Attrezzature					
E) Spese generali	3.000,00€	3.000,00€	€ 1.029,47	€ 1.852,34	€ 2.881,81
F) Coordinamento	1.000,00€	1.000,00€	€ 976,20		€ 976,20
TOTALE	64.000,00€	63.969,60€	€ 43.184,58	20.375,69	€ 63.560,27

 Timbro Istituzione beneficiaria
 del contributo


Il coordinatore del progetto

nome e cognome: FRANCO FAORO

firma

Il responsabile di gestione

 Dr. Eugenia Cirincione
 RESPONSABILE AMM.VO

Eugenia Cirincione

firma

Note alla compilazione

Nota generale: per la compilazione utilizzare carattere Times New Roman, non inferiore a 11, considerando che a tali criteri si riferisce la lunghezza massima delle parti testuali da compilare, ove indicato.

¹ Indicare DM di concessione.

² Indicare DM di concessione.

³ Indicare DM di concessione.

⁴ In caso di progetto di durata superiore a 36 mesi indicare nella colonna a fianco a quale periodo si riferiscono le attività descritte.

⁵ Solo per progetti di durata superiore a 36 mesi

⁶ le spese rendicontate devono essere pari al 70% dell'importo percepito a titolo di anticipo sul contributo complessivo previsto per l'intero progetto, pertanto a tale quota concorrono le percentuali di spesa di ciascuna UUOO; è possibile che una delle UO concorra in misura minore al raggiungimento del 70 % e comunque non inferiore al 50% dell'importo ricevuto come anticipo; in tal caso la quota di contributo "mancante" dovrà essere compensata dalle spese dell' altra istituzione partecipante.

⁷ Riferito al costo complessivamente approvato.

⁸ Indicare per ogni voce l'importo corrispondente alla % ricevuta del contributo complessivo ottenuto.