



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO: PRODUZIONE E PROTEZIONE DELLE  
COLTURE

EFFETTI DI DS-RNA DA RADICI DI VITE TRASFORMATE SULLA  
SOPRAVVIVENZA E RIPRODUZIONE DEL LOMBRICO EISENIA FETIDA.  
RISULTATI PRELIMINARI

Effects of ds-RNA produced by modified vineyard roots on life and reproduction of the earthworm  
Eisenia Fetida. Preliminary results

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studentessa:  
VALENTINA TRONTI

Relatore:  
PROF. COSTANTINO VISCHETTI

Correlatore:  
DOTT. ARIANNA DE BERNARDI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

“E per quanta strada ancora c'è da fare, amerai il finale”

# SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	7
1.1 Pesticidi .....	7
1.1.1 Legislazione .....	11
1.1.2 Rischi dei pesticidi .....	12
1.1.3 Riduzione dei pesticidi .....	14
1.1.4 Biopesticidi come alternativa ai pesticidi sintetici .....	15
1.2 Silenziamento Genico.....	16
1.2.1 RNAi nella difesa delle piante.....	17
1.3 Vitis Vinifera.....	19
1.3.1 Caratteri morfologici.....	20
1.3.2 La viticoltura in Italia e nel mondo.....	21
1.3.3 Avversità fungine.....	22
1.3.4 Rame nei vigneti.....	24
1.4 Ecotossicologia.....	25
1.4.1 Organismi sentinella nel suolo: i lombrichi .....	28
1.4.2 Classificazione dei lombrichi .....	29
1.4.3 Eisenia Fetida .....	32
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	34
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	35
3.1 Piante di vite usate nella sperimentazione.....	35
3.2 Substrato.....	35
3.3 Lombrichi.....	36
3.4 Design sperimentale.....	36
3.4.1 Test di ecotossicità su lombrichi.....	37

3.5 Analisi statistica.....	39
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>41</b>
4.1 Biomassa dei lombrichi.....	42
4.2 Valutazione sulla fertilità dei lombrichi.....	42
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>47</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>48</b>

## ELENCO DELLE TABELLE

<b>Tabella 1: Substrato di coltivazione.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabella 2. Tasso di crescita dei lombrichi dopo 28 giorni di esposizione.....</b>	<b>42</b>

## ELENCO DELLE FIGURE

<b>Figura 1:</b> Tipologie di pesticidi venduti in Europa nel 2021 .....	8
<b>Figura 2:</b> Vendita di pesticidi in Europa, periodo 2011-2021.....	9
<b>Figura 3:</b> Produzione di vino negli Stati EU 2022/2023 .....	21
<b>Figura 4:</b> Sintomi Botrytis Cinerea su acini di uva.....	22
<b>Figura 5:</b> Sintomi di Plasmopara Viticola .....	23
<b>Figura 6:</b> Sintomi di Oidio .....	24
<b>Figura 7:</b> Sintomi di Mal dell'esca .....	24
<b>Figura 8:</b> Endpoint tossicologici .....	27
<b>Figura 9:</b> Esempi di lombrichi.....	30
<b>Figura 10:</b> Tipologie di lombrichi .....	32
<b>Figura 11:</b> Eisenia Fetida .....	32
<b>Figura 12:</b> Piante usate nella prova sperimentale .....	35
<b>Figura 13:</b> Cocoons su piastra Petri.....	37
<b>Figura 14:</b> Stratificazione su vetrini HT Trevigen.....	38
<b>Figura 15:</b> Lionheart FX .....	39
<b>Figura 16:</b> Andamento dei pesi medi per trattamento registrata a inizio (0) e fine (28 giorni) prova di ecotossicità. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis.....	41
<b>Figura 17:</b> Cocoons medi per ogni trattamento. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis.....	43
<b>Figura 18:</b> Giovani lombrichi per ogni trattamento. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis.....	44
<b>Figura 19:</b> Tasso di schiusa o fertilità per ogni trattamento. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis .....	45
<b>Figura 20:</b> Tasso di schiusa o fertilità per ogni trattamento. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis .....	46

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Pesticidi

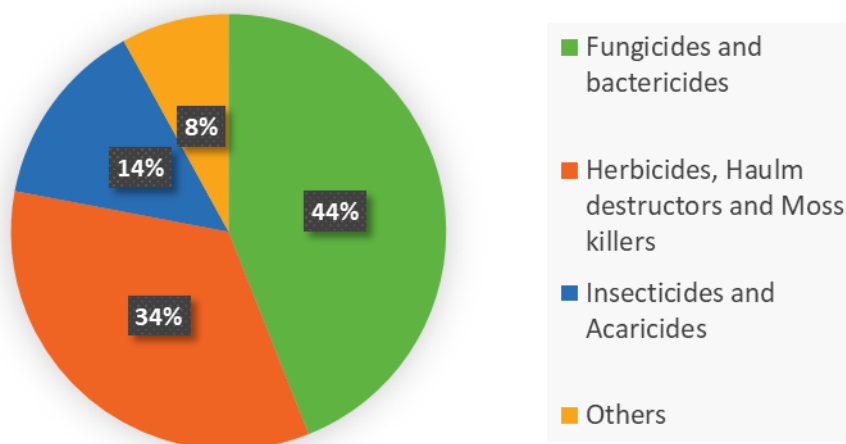
Il termine "pesticidi" è comunemente usato come sinonimo di prodotti fitosanitari ed indica una categoria di composti xenobiotici, ossia che sono estranei all'ecosistema naturale, utilizzati per il controllo di qualsiasi organismo nocivo per le piante coltivate (insetti, acari, funghi, batteri, roditori, ecc.), oltre che per l'eliminazione delle erbe infestanti e la regolazione dei processi fisiologici dei vegetali (ad esclusione dei fertilizzanti) (*MASE*).

I prodotti fitosanitari contengono almeno una sostanza attiva. Tali sostanze possono essere sostanze chimiche oppure microrganismi, inclusi i virus, che permettono al prodotto di svolgere la sua azione (*EFSA Europa*).

Questi composti sono ampiamente utilizzati nell'agricoltura moderna e sono un modo efficace ed economico per migliorare la qualità e la quantità di resa, garantendo così la sicurezza alimentare per la popolazione in continua crescita in tutto il mondo (*Sharma, et al., 2019*).

L'Unione Europea, in particolare, registra i maggiori volumi di vendita nel 2021 per le seguenti categorie: "fungicidi e battericidi" (44%), "erbicidi, distruttori e antimuschio" (34%) e "insetticidi e acaricidi" (14%) (**Figura 1**) (*EUROSTAT, 2021*).

## EU sales of pesticides (2021)

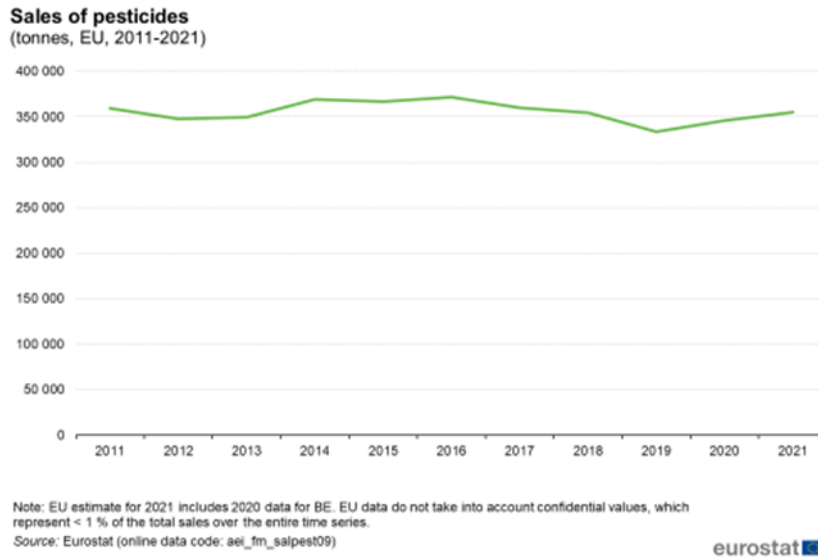


**Figura 1: Tipologie di pesticidi venduti in Europa nel 2021 (EUROSTAT)**

Tra tutti i paesi dell'UE, in termini di volume di pesticidi venduti nel 2021, spiccano: la Spagna con il 21% del totale UE, la Francia con il 20%, Germania e Italia entrambe al 14%. Questi paesi sono anche i principali produttori agricoli dell'UE, con il 51 % della superficie agricola utilizzata (SAU) totale dell'UE e il 49 % della superficie arabile totale dell'UE (EUROSTAT, 2021).

Tra il 2011 e il 2021 inoltre, il volume totale delle sostanze attive antiparassitarie vendute nei 16 paesi dell'UE che hanno fornito dati completi è diminuito del 4,9% (**Figura 2**). È importante notare che durante questo periodo di tempo molte sostanze pericolose sono state revocate dell'autorizzazione al commercio e di conseguenza ritirate dal mercato a seguito della loro valutazione a norma del regolamento CE n. 1107/2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari (EUROSTAT, 2021).





**Figura 2: Vendita di pesticidi in Europa, periodo 2011-2021 (EUROSTAT)**

I pesticidi sono classificati come insetticidi, fungicidi, erbicidi, rodenticidi, nematocidi, molluschicidi e fitoregolatori. Ogni gruppo è specificamente progettato per colpire i parassiti, ma ha effetti tossici indesiderati sugli organismi non bersaglio. (Cortet et al., 2002).

La classificazione dei pesticidi è in base ai tipi di parassiti target:

### **1. Insetticidi**

Sostanza utilizzata per controllare o eliminare o prevenire l'attacco degli insetti che distrugge/uccidono/mitigano piante/animali. Possono agire in diversi modi in funzione delle modalità di assorbimento e diffusione nel corpo di insetti e acari (EPA):

- **Azione per contatto:** si manifesta sia con il contatto diretto sui fitofagi al momento del trattamento, sia per contatto fra la superficie vegetale trattata e il corpo dei medesimi. Le sostanze che agiscono con tale modalità non sono molto selettive nei confronti della fauna utile che è presente sulla vegetazione contemporaneamente a quella dannosa;
- **Azione per ingestione:** provoca la morte dei fitofagi nel momento in cui si nutrono con parti di vegetali contenenti una sufficiente quantità di prodotto. I principi attivi che agiscono in questo modo sono, nella maggior parte dei casi, selettivi nei confronti delle specie utili che si nutrono a spese di insetti od acari parassiti (2007-2013: Regione del Veneto – Dipartimento Agricoltura e Sviluppo Rurale);
- **Azione per asfissia:** provoca la morte dei fitofagi che assumono, attraverso le vie respiratorie, una quantità sufficiente di PF allo stato gassoso. Le sostanze che agiscono per asfissia non sono selettive nei confronti degli organismi utili.

## 2. Erbicidi

Sostanze che vengono utilizzate per controllare le piante nocive e altra vegetazione che cresce con le specie desiderate causando una scarsa crescita di queste ultime.

Diserbanti o erbicidi, in base alla loro modalità d'azione e in funzione della capacità di essere assorbiti o meno da parti e/o organi della pianta bersaglio, possono essere così suddivisi:

- **Di contatto**, quando un erbicida che agisce dissecca o ritarda la crescita di quelle piante che vengono a contatto diretto (*Shariq I. Sherwani, Ibrahim A. Arif and Haseeb A. Khan, 2014*)
- **Per assorbimento fogliare sistemico**, quando, applicati all'apparato fogliare, entrano in circolo nella pianta infestante e vanno ad interferire o a bloccare i processi vitali della stessa. Alcuni prodotti fitosanitari sistemici possono anche devitalizzare gli organi sotterranei di propagazione come rizomi, bulbi, ecc..;
- **Per assorbimento radicale** (azione residuale o antigerminello), nel momento in cui avviene l'assorbimento per via radicale dai semi in via di germinazione o dalle infestanti nei primissimi stadi di sviluppo. A causa del loro "effetto residuale", possono sopraggiungere dei danni sulle colture in successione se non si rispettano le indicazioni riportate in etichetta. (2007-2013: *Regione del Veneto – Dipartimento Agricoltura e Sviluppo Rurale*)

## 3. Fungicidi

Sostanze utilizzate per distruggere o inibire la crescita di funghi/malattie che infettano piante/animali. Fungicidi e battericidi possono avere diverse modalità d'azione:

- **Azione preventiva**, previene l'infezione fungina mediante attività sporicida. Questi arrestano la germinazione delle spore o uccidono le ife fungine mentre penetrano nella foglia o ne impediscono la penetrazione. È presente sulla superficie esterna della pianta o anche all'interno della stessa impedisce lo sviluppo dell'infezione nei tessuti sani (*EAGRI.com*).
- **Azione curativa**, Si tratta di sostanze che si spostano nel luogo in cui si è verificata l'infezione e impediscono l'ulteriore sviluppo dell'agente patogeno. Permettono di contrastare la malattia, penetrando all'interno dei tessuti della pianta, durante il suo periodo d'incubazione (nei primi giorni dell'infezione, è detta retroattività), bloccandone lo sviluppo ed evitando la comparsa dei sintomi (*Mukesh Doble, Anil Kumar, 2005*);
- **Azione eradicante**, Gli eradicanti sono quelli che rimuovono i funghi patogeni da un "area di infezione" (area dell'ospite intorno a un'unità di propagazione di un fungo in cui potrebbe verificarsi l'infezione). Queste sostanze chimiche sradicano l'agente patogeno dormiente o attivo dall'ospite. Possono rimanere efficaci sull'host o nell'host per un certo periodo di tempo. Queste sostanze che possiedono questa capacità devono essere usate con molta cautela per evitare fenomeni di resistenza (*V. Prakasam, 2020*);

• **Attivazione delle difese naturali della pianta**, sono sostanze di recente introduzione che non svolgono la loro attività in linea retta nei confronti dei patogeni responsabili delle malattie, ma stimolano la pianta a produrre delle sostanze naturali chiamate fitoalessine che le consentono di difendersi dagli attacchi di alcuni microrganismi (funghi e batteri).

#### **4. Rodenticidi**

Sostanze chimiche utilizzate per uccidere i roditori, ad esempio topi, ratti, ecc.

#### **5. Nematocidi**

Sostanze utilizzate per respingere o inibire i nematodi che danneggiano varie colture.

#### **6. Molluschicidi**

Sostanze utilizzate per inibire la crescita e uccidere lumache e lumache.

#### **7. Regolatori di crescita delle piante**

Una sostanza che provoca il ritardo o accelera il tasso di crescita o il tasso di maturazione (*R. Miglani, S. S. Bisht, 2020*).

I pesticidi sono classificati anche in base alla loro composizione chimica, troviamo infatti pesticidi sintetici o naturali.

- I pesticidi **sintetici**, *L'USDA* li definisce come "una sostanza formulata o prodotta mediante un processo chimico o un processo che modifica chimicamente una sostanza estratta da fonti vegetali, animali o minerali presenti in natura". Sono spesso indicati come pesticidi convenzionali.
- I pesticidi **naturali** sono generalmente considerati pesticidi derivati da fonti naturali come minerali, piante o animali. Queste sostanze chimiche vengono degradate in tempi relativamente brevi dalle condizioni atmosferiche o dai microbi del suolo (*T. McCoy, D. Frank, 2020*).

### *1.1.1 Legislazione*

La produzione agricola è di grande importanza per l'UE e l'uso di pesticidi svolge un ruolo importante nella gestione della produzione alimentare, aumentando la resa agricola attraverso la prevenzione e l'eradicazione degli organismi nocivi dalle piante (*EU, 2022*).

La produzione e l'uso di queste sostanze all'interno degli Stati europei sono strettamente regolamentati per proteggere la salute umana e ambientale, nonché per garantire la coesione nel funzionamento del mercato interno e mantenere o migliorare la produzione agricola. In

questo contesto, l'UE e i suoi Stati membri svolgono un ruolo fondamentale nel ridurre i rischi e gli impatti dei pesticidi e nell'incoraggiare lo sviluppo e l'attuazione di approcci più sostenibili (C. Feijao et. al, 2022).

I prodotti fitosanitari devono essere autorizzati dal Ministero della Salute per essere immessi in commercio ed utilizzati per esempio nel settore agricolo, conformemente alle disposizioni previste dal Regolamento (CE) N. 1107 del 21/10/2009 (EU, 2010).

Questa normativa si applica in tutti gli Stati membri e stabilisce il superamento della precedente normativa comunitaria in materia che continuerà ad applicarsi solamente a quanto previsto nelle disposizioni transitorie.

Gli Stati membri adottano piani d'azione nazionali per definire i propri obiettivi quantitativi, gli obiettivi, le misure e i tempi per la riduzione dei rischi e degli impatti dell'utilizzo dei pesticidi sulla salute umana e sull'ambiente e per incoraggiare lo sviluppo e l'introduzione della difesa integrata e di approcci o tecniche alternativi al fine di ridurre la dipendenza dall'utilizzo di pesticidi (Gazzetta ufficiale P. Europeo, 2019).

Il Regolamento (CE) n. 1107/2009 ha apportato diversi aspetti innovativi, tra cui l'introduzione di autorizzazioni zonali; infatti, si è ritenuto opportuno dividere la Comunità Europea in zone caratterizzate da condizioni agronomiche simili e comparabili. Come conseguenza l'Italia insieme ad altri 7 Stati Membri è stata inserita nella zona C (sud zonale) (CNCS, 2013).

È necessario inoltre tener conto di quanto stabilito anche dalla direttiva 2009/128/CE che istituisce un quadro per realizzare un uso sostenibile dei pesticidi riducendone i rischi e gli impatti sulla salute umana e sull'ambiente e promuovendo l'uso della difesa integrata e di approcci o tecniche alternative non chimiche ai pesticidi (MASE).

L'UE prevede inoltre di rivedere questa direttiva sull'uso sostenibile dei pesticidi (direttiva 2009/128/CE), come oltre a promuovere un maggiore utilizzo di metodi alternativi sicuri per proteggere i raccolti da parassiti e malattie (UE, 2009). Ciò sarà raggiunto sfruttando al meglio le soluzioni basate sulla natura, tecnologiche e digitali per ottenere migliori risultati climatici e ambientali e ridurre e ottimizzare l'uso dei pesticidi (UE, 2020).

### 1.1.2 Rischi dei pesticidi

L'attenzione verso i pesticidi non è solo associata alla loro importanza per la produzione di prodotti alimentari globali, ma anche al loro rilascio involontario dai settori agricolo e urbano in ecosistemi non bersaglio (Schreiner et al., 2016; Chow et al., 2020; Mojiri et al., 2020). Una

volta rilasciati nell'ambiente, i pesticidi possono spostarsi attraverso il suolo o le acque superficiali fino ai corsi d'acqua e alle falde acquifere, dove possono avere effetti ecologici indesiderati come l'accumulo negli organismi acquatici e la perdita di biodiversità dell'ecosistema (*Beketov et al., 2013; Stehle e Schulz, 2015*).

I pesticidi esistenti nell'ambiente derivano da un processo in quattro fasi:

1. Applicazione dei pesticidi al terreno
2. Deflusso verso corsi d'acqua e fiumi
3. Ripartizione nei sedimenti
4. Desorbimento/risospensione dai sedimenti

A seconda delle loro proprietà (ad esempio polarità), i pesticidi possono essere adsorbiti sul suolo o sulle particelle di sedimento, con i pesticidi idrofobi particolarmente colpiti (*Khaznada et al., 2020*). Livelli elevati di inquinanti nei sedimenti possono dar luogo a un ulteriore inquinamento dei corsi d'acqua a causa della possibile risospensione degli inquinanti nell'acqua durante la movimentazione o lo smaltimento dei sedimenti contaminati (*Pizzini et al., 2021; Mishra et al., 2022*).

Sebbene l'uso dei prodotti fitosanitari risulti in molti casi necessario per proteggere i prodotti vegetali destinati all'alimentazione dell'uomo (e degli animali), le sostanze in essi contenute possono presentare effetti nocivi per l'ambiente e la salute umana (*MASE*). Le sostanze attive contenute nei prodotti fitosanitari, ovvero le sostanze che esercitano la loro azione tossica nei confronti delle specie da combattere, possono rivelarsi dannose anche per altri organismi che costituiscono elementi essenziali degli ecosistemi (e per ciò detti organismi "non bersaglio") (*MASE*).

Di fondamentale importanza risulta quindi stabilire il giusto grado di utilizzo dei fitofarmaci in relazione alla loro pericolosità intrinseca e alla loro utilità, e aver un'adeguata informazione sul loro corretto utilizzo (*MASE*).

L'Unione Europea (UE) per questi motivi mira a rendere i sistemi alimentari equi, sani e rispettosi dell'ambiente attraverso la sua attuale strategia Farm to Fork (*J. McGinley, et. al. 2023*).

### 1.1.3 Riduzione dei pesticidi

L'uso sostenibile dei pesticidi è stato oggetto di crescente preoccupazione all'interno della politica dell'Unione europea (UE) sin dagli anni '80, con molteplici direttive e politiche sviluppate e attuate per affrontare le sfide associate. Tuttavia, la molteplicità di interessi e i diversi punti di vista delle parti interessate (ad esempio l'industria agrochimica, i responsabili politici, gli agricoltori, i cittadini) mettono in discussione il raggiungimento degli obiettivi dell'UE per ridurre l'uso dei pesticidi e il loro rischio per l'ambiente e la salute umana (C. Feijao et. al, 2022).

Molte organizzazioni internazionali hanno stabilito normative relative ai pesticidi e ai limiti di concentrazione rilevabili nell'ambiente (OMS, 2017; US EPA, 2019; UE, 2021b; Governo australiano, 2022). All'interno dell'Unione Europea (UE), il Regolamento sui prodotti fitosanitari (Regolamento (CE) N. 1107/2009) sull'immissione dei pesticidi sul mercato garantisce un elevato livello di protezione della salute umana e animale e dell'ambiente (UE, 2009).

Il parlamento europeo ha predisposto una proposta di Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio relativo all'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari e recante modifica del regolamento (UE) 2021/2115.

La proposta si basa su quattro obiettivi:

1. Ridurre l'uso e i rischi dei pesticidi chimici, incrementare l'applicazione e il rispetto della difesa integrata, promuovere l'uso di alternative meno pericolose e non chimiche
2. Accrescere la disponibilità di dati di monitoraggio (applicazione, uso, rischi, monitoraggio ambientale e sanitario)
3. Rispetto delle disposizioni giuridiche in tutti gli stati membri
4. Promuovere l'adozione di nuove tecnologie al fine di ridurre l'uso e i rischi complessivi dei pesticidi

Importante è anche ricordare il Green Deal europeo lanciato nel 2019 che mira a rendere l'economia dell'UE sostenibile entro il 2030 e a fare dell'Europa il primo continente neutro in termini di emissioni di carbonio entro il 2050 (C. Feijao et. al, 2022). Nell'ambito del Green Deal è stata elaborata una serie di strategie, piani d'azione e missioni, tra cui la strategia "Farm To Fork" 4, la "Biodiversity Strategy", il piano d'azione per l'inquinamento zero<sup>47</sup> e la missione di Orizzonte Europa sulla salute del suolo e l'alimentazione. Queste iniziative hanno indotto una revisione del quadro politico dell'UE in materia di pesticidi per allinearsi agli ambiziosi obiettivi ambientali del Green Deal (EU 2022).

Il 22 Giugno del 2022 la commissione ha pubblicato inoltre la proposta di aggiornamento della normativa dei prodotti fitosanitari attraverso la quale si prefigge di raggiungere le ambizioni obiettivi della Strategia Farm to Fork che punta a:

- Ridurre del 50% entro il 2030 l'uso complessivo e il rischio dei pesticidi chimici e
- Ridurre del 50% entro il 2030 l'uso di pesticidi più pericolosi. Questi obiettivi sono inclusi anche nella strategia sulla biodiversità, che mira a invertire il degrado degli ecosistemi e a proteggere la natura entro il 2030 (C. Feijao et. al, 2022).

#### 1.1.4 Biopesticidi come alternativa ai pesticidi sintetici

Con l'aumento dell'uso dei pesticidi negli ultimi decenni, la pressione sugli ecosistemi è aumentata in tutto il mondo (Tang F.H.M et. al. 2021, Zaller J.G. 2020).

A causa degli inconvenienti dei pesticidi sintetici, viene incoraggiato un mezzo alternativo di controllo dei parassiti, ovvero l'uso di biopesticidi (Ojuederie, O. B., Ayilara et al., 2022).

I biopesticidi sono mezzi efficaci e più sicuri per controllare i parassiti, hanno un lieve effetto sull'ambiente rispetto alla loro controparte sintetica e sono specifici nel loro obiettivo, prevenendo quindi il bioaccumulo (Saberi et al., 2020; Kumar et al., 2021).

La selezione di pesticidi con un'impronta ecologica ridotta è un fattore chiave nello sviluppo di sistemi agricoli sostenibili. Le politiche che guidano la selezione dei pesticidi spesso enfatizzano i prodotti naturali e i pesticidi certificati biologici per aumentare la sostenibilità, a causa dell'opinione pubblica prevalente secondo cui i prodotti naturali sono uniformemente più sicuri, e quindi più rispettosi dell'ambiente, rispetto ai prodotti chimici di sintesi (A. Bahlai et. al, 2010).

I biopesticidi possono essere scelti perché sono selettivi nei parassiti che controllano. Questo è utile perché può ridurre i potenziali danni alle specie non bersaglio (ad esempio, impollinatori e altri insetti utili). Uccidendo solo i parassiti bersaglio, è possibile sostenere popolazioni di organismi benefici che possono aiutare a mantenere bassa la pressione generale dei parassiti. Tuttavia, se sono presenti più specie di parassiti, i prodotti selettivi potrebbero non fornire il controllo desiderato per tutti i parassiti (T. McCoy, D. Frank, 2020).

A differenza dei biopesticidi, i pesticidi convenzionali sono una delle principali fonti di inquinamento ambientale, che promuove la resistenza ai parassiti con elevata contaminazione post-raccolta e bioaccumulo nelle colture alimentari (Fenibo et al., 2021).

Sebbene alcuni inconvenienti ne abbiano ridotto l'accettabilità e l'utilizzo commerciale, i biopesticidi sono altamente specifici nel loro obiettivo e si ha la necessità di saperne di più sul parassita bersaglio se vogliono controllarlo con successo. Essi, inoltre, hanno una breve durata

di conservazione, sono meno persistenti nell'ambiente del suolo e provengono da materie prime sostenibili, a differenza dei pesticidi sintetici (*Kumar et al., 2021*).

L'identificazione accurata dei parassiti e la conoscenza del ciclo di vita dei parassiti sono fondamentali quando si utilizzano pesticidi naturali.

## 1.2 Silenziamento Genico

Il silenziamento genico è un meccanismo attraverso il quale molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA, double-stranded RNA) innescano il processo di degradazione di RNA bersaglio contenenti sequenze complementari al dsRNA. Tuttavia, il termine RNAi (RNAi, interference) oggi si riferisce a una serie di fenomeni guidati da molecole di dsRNA che controllano l'espressione dei geni sia a livello della trascrizione (per es., formazione di eterocromatina e metilazione del DNA) sia a livello posttrascrizionale (degradazione di RNA messaggeri e inibizione della traduzione) (*Cai Q., et. al 2018*).

Le prime applicazioni di questo metodo sono state effettuate con piante transgeniche. Queste piante sono in grado di produrre dei dsRNA specifici per una patogeno chiave, in grado di proteggerle dal suo attacco (*Mcloughlin, et al, 2018*).

Gli RNA non codificano per alcuna proteina, ma la loro azione è quella di esercitare una sorta di controllo su quegli RNA che invece codificano per proteine, cioè l'RNA messaggero (mRNA).

Di questo gruppo ne fanno parte:

- I microRNA (miRNAs), caratterizzati da una lunghezza di 22-24 nucleotidi. Sono codificati da loci endogeni di pianta, trascritti nel nucleo, con funzione regolatrice di vari processi di sviluppo nell'ospite. Questi sono coinvolti nel silenziamento genico poiché si legano all'RNA messaggero (mRNA) e ne impediscono la traduzione in proteine;

- gli short interfering RNA (siRNAs), caratterizzati da una lunghezza di 21-24 nucleotidi. Sono prodotti a partire da molecole esogene di dsRNAs più lunghe, derivanti da virus, transgeni e trasposoni. Sono responsabili del silenziamento genico, insieme ai miRNA, legandosi a filamenti target di mRNA con una sequenza ad essi complementare ed omologa, inducendone la successiva degradazione operata dagli enzimi idrolitici endonucleasi;

- Gli small nucleolar RNA (snoRNAs). Questi regolano il taglio dei lunghi pre-rRNA (RNA trascrizionale) nelle loro subunità funzionali, e partecipano anche alle modificazioni/maturazione che le subunità di rRNA subiscono;



- Gli small nuclear RNA (snRNAs). Sono RNA che entrano nella costituzione degli spliceosomi, le strutture nucleari coinvolte nella maturazione degli mRNA e che operano la rimozione delle regioni non codificanti dei geni (introni) e la saldatura di quelle codificanti (esoni) in modo da permettere a queste di essere tradotti in proteine.

Il meccanismo classico dell'RNAi è suddiviso in due fasi. Nella fase iniziale, lunghe molecole di dsRNA sono digerite dall'enzima Dicer che produce frammenti a doppia elica di circa 19÷26 nucleotidi chiamati piccoli RNA interferenti, siRNA (small interfering RNA).

Una delle due eliche, chiamata elica guida, è incorporata in una proteina della famiglia Argonaute, battezzata Slicer, che possiede attività endonucleasica. Nella seconda fase dell'RNAi la proteina Argonaute/Slicer seleziona l'RNA bersaglio mediante formazione di legami idrogeno fra il siRNA guida e sequenze complementari presenti nell'RNA bersaglio. Una volta riconosciuto l'RNA bersaglio, la proteina Argonaute/Slicer lo taglia idrolizzando un singolo legame fosfodiesterico e producendo due frammenti che vengono poi digeriti da ribonucleasi citoplasmatiche. Nel caso di RNA messaggeri, la loro degradazione ha come conseguenza l'inibizione della traduzione di proteine specifiche. È importante notare, tuttavia, che il meccanismo di RNAi diminuisce l'espressione genica ma non l'abolisce. L'RNAi è diventato il metodo più comune per inibire l'espressione dei geni in organismi che, come i Mammiferi, sono difficili da manipolare geneticamente. Dal punto di vista biologico si ritiene che l'RNAi si sia evoluta come meccanismo di difesa contro infezioni virali e per mantenere la stabilità del genoma riducendo l'espressione di elementi genetici mobili come i trasposoni e i retroposoni.

### 1.2.1 RNAi nella difesa delle piante

I funghi e gli oomiceti patogeni delle piante causano gravi perdite di raccolto in tutto il mondo. I fungicidi sono ampiamente applicati per gestire le malattie delle piante causate da funghi patogeni, ma sono state segnalate sempre più popolazioni fungine resistenti ai fungicidi. Tecniche recenti che utilizzano l'interferenza dell'RNA (RNAi), che definiscono la capacità dell'RNA a doppio filamento (dsRNA) di inibire l'espressione di geni omologhi, sono state suggerite per la protezione delle colture in modo rispettoso dell'ambiente (*Sang, H., Kim, JI., 2020*).

Vengono adottate due strategie diverse:

#### 1. SIGS – Spray-induced gene silencing

Il SIGS è una nuova strategia non trasformativa per la protezione delle piante. Il dsRNA che prende di mira un gene patogeno viene spruzzato sulle superfici delle piante. Il patogeno fungino assorbe direttamente i dsRNA e induce il meccanismo dell'RNAi fungino, e/o la pianta ospite assorbe prima i dsRNA, induce il meccanismo dell'RNAi della pianta; quindi, i dsRNA o i siRNA vengono trasferiti nelle cellule fungine e inducono il meccanismo dell'RNAi fungino (Sang, H., Kim, JI., 2020).

Tali progressi tecnici nella produzione di dsRNA e la preparazione di formulati per migliorare l'efficacia, la stabilità e la persistenza del dsRNA extracellulare rendono quindi realistico considerarne l'utilizzo come "biopesticida" di elevato interesse commerciale, in quanto applicabile come spray fogliare, concia dei semi o direttamente nel suolo, con elevata specificità e biosicurezza rispetto ad alcuni prodotti chimici o strategie alternative di biocontrollo.

## **2. Piante geneticamente modificate (OGM)**

Non si esprimono o applicano in pianta nuove molecole, proteine o enzimi, ma solo piccoli frammenti naturali di RNA con azione altamente specifica di silenziamento di geni di interesse.

Un importante punto di forza delle applicazioni del RNAi è l'elevata specificità di azioni sulle specie dannose, per cui già da ora ci si sta impegnando per valutare la biosicurezza di questi prodotti per gli organismi non bersaglio, in primo luogo per il consumatore.

Le sperimentazioni in corso permettono di vedere, per esempio, come agiscono questi biopesticidi sugli impollinatori. Una scoperta importante è che questa molecola è innocua per le api (Terraevita, 2019).

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha espresso parere positivo sulla biosicurezza di diverse piante modificate per l'espressione stabile di RNAi al fine di migliorare le caratteristiche nutrizionali, e più recentemente per la resistenza a diabrotica in mais.

Oltre a virus e insetti, l'RNAi è stato adottato anche per il controllo di molti altri parassiti e patogeni delle piante in ambito di ricerca, tra cui batteri come l'*Agrobacterium*, funghi come l'oidio e nematodi come i nematodi del nodo radicale (Rosa et al., 2018).

I limiti dell'approccio di modificazione genetica alla protezione delle colture sono tuttavia evidenti da tempo e includono la scarsa accettazione da parte del pubblico in molti mercati e l'incapacità di trasformare geneticamente molte specie di colture (Zotti et al., 2018).

Trattandosi di una tecnica relativamente recente, sono stati condotti pochi studi (Nerva et al., 2020) (Fischer et al., 2016) (Parker et al., 2019) (Fletcher et al., 2020) per valutare gli

eventuali effetti avversi sull'ecosistema e dunque ad oggi, per il principio di precauzione, non possono essere considerati totalmente sicuri soprattutto sugli organismi non target del suolo.

Di conseguenza, gran parte della recente attenzione sull'RNAi per la protezione delle colture si è spostata verso strategie non trasformative. (*Dalakouras et al., 2019*).

### 1.3 Vite (*Vitis vinifera*)

Le piante d'uva appartengono al genere *Vitis* L. della famiglia delle Vitaceae. La quasi totalità delle viti coltivate appartiene alla specie *Vitis vinifera* L., originaria del Mediterraneo e del Vicino Oriente. (*R. Buono, G. Vallariello, 2002*).

Crescendo in condizioni ambientali profondamente difformi, si diversificò dando origine a due sottospecie: *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris*, in Europa, e *Vitis vinifera* L. subsp. *sativa*, in Oriente.

1. Sub-specie *sylvestris*, comprende le forme selvatiche, si riscontrano infiorescenze solo maschili o solo femminili (pianta dioica), i grappoli e gli acini piccoli (frequentemente a baccanera) (*G. Scalabrelli et al. 2012*).
2. Sub-specie *sativa*, comprende quasi tutte le varietà coltivate nel mondo per la produzione di uva, presenta quasi sempre fiori ermafroditi, dotati di pistillo e stami (*M. Ferrari, et al, 2022*).

#### 1.3.1 Caratteri morfologici

La vite è un arbusto rampicante che può raggiungere i 35 m dal portamento irregolare, spesso determinato dalla modalità di allevamento; è una pianta caducifolia che entra in fase di riposo vegetativo durante il periodo invernale (*A. Palliotti, et al., 2018*).

Il sistema radicale della vite è formato dall'insieme delle radici che si sviluppano in profondità, influenzate dalle caratteristiche del suolo, dalla combinazione d'innesto e dalle tecniche colturali adottate. Troviamo le:

- Radici di sostegno: permanenti, con funzione di ancoraggio, di riserva e di trasporto di nutrienti.
- Radici esploranti: sono permanenti, con funzione di esplorazione e conquista di nuove zone di terreno.
- Radici assorbenti: sono numerose, chiare, di diametro molto piccolo (*A. Palliotti et al., 2018*).

Lo scheletro è la parte perenne della parte epigea della pianta, è caratterizzato da strutture legnose (alcune poliennali) ricoperte da ritidoma quali fusto, branche e tralci.

Il fusto è avvolto dal ritidoma che si sfalda longitudinalmente, esso è verticale ma può avere diversa inclinazione a seconda della forma di allevamento. Le ramificazioni sono chiamate germogli quando sono erbacee, tralci quando sono lignificate, sarmenti quando sono staccati dalla pianta dopo la potatura. I tralci sono costituiti da nodi e internodi in numero e lunghezza variabile (*Eynard I., Dalmaso G., 1990*).

Sul fusto si inseriscono le branche (rami di più anni). La branca è una struttura legnosa di almeno due anni di età, che rappresenta la connessione tra il tronco e i tralci.

Le foglie sono picciolate, di 5-15 cm, generalmente palmate, mostrano spiccata eterofilia, per cui forma e dimensioni possono variare; hanno disposizione alterna distica (*A. Palliotti et al., 2018*).

I fiori sono piccoli, attinomorfi, disposti in pannocchie pendenti e opposte alle foglie. Il calice ha cinque sepali sottosviluppati. Il fiore di vite è generalmente ermafrodito ed autofertile (*A. Palliotti et al., 2018*).

Il frutto della vite è un acino o bacca, prende origine dalla fecondazione del fiore ed è costituito da buccia (5-12%), polpa di frutta (80-90%) e semi (1-2%). (*T. Ozcan, 2022*).

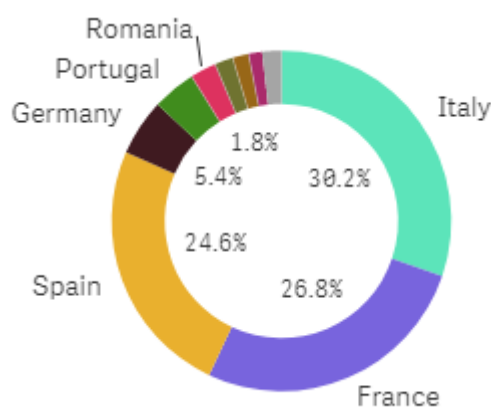
La colorazione dell'acino può variare a seconda del vitigno, va dal verde al giallo, dal roseo al rosso-violaceo, dal nero o al nero-bluaastro (*A. Palliotti et al., 2018*).

### 1.3.2 Viticoltura in Italia e nel mondo

Attualmente, sia la viticoltura che la vinificazione sono pratiche importanti che rappresentano un'attività economica chiave in molte regioni del mondo (Fraga et al., 2013). Nell'ultimo rapporto dell'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino (OIV), tra i migliori Paesi produttori di vino in Europa nel 2022, c'è anche l'Italia che si conferma “ancora primo produttore mondiale di vino con 50,3 milioni di hl” (OIV, 2022).

Le regioni italiane in cui si concentra la maggiore produzione di vini certificati sono Piemonte, Trentino-Alto Adige, Toscana, Veneto e Friuli-Venezia Giulia. Secondo un recente studio di UniCredit, si registra un contributo importante anche dalle regioni del Mezzogiorno per la produzione di vini da tavola, con Puglia, Sicilia e Campania che registrano ottimi livelli produttivi (UniCredit, 2022).

All'interno del territorio dell'Unione Europea (UE) sono presenti i primi tre Paesi produttori di vino a livello mondiale come Italia, Francia e Spagna (EUROSTAT, 2019). L'Europa rappresenta quindi il principale produttore di vino a livello mondiale (tra il 2014 e il 2018 la produzione media annua è stata di 167 milioni di ettolitri), ed è il primo continente per consumo e per esportazioni di vino (Figura 3) (European Commission, 2021).



**Figura 3: Produzione di vino negli Stati EU 2022/2023 (EUROSTAT)**

La produzione globale di uva da tavola (*Vitis vinifera* L.) invece, è stata stimata in 27 milioni di tonnellate nella stagione 2020/2021 (Agulheiro-Santos et al., 2021; Pisciotta et al., 2022). Nella classifica della produzione mondiale di uva da tavola, la Cina si colloca al primo posto con il 36,2% della produzione mondiale totale, seguita da India (11,9%) e Turchia (6,2%), Egitto (4,9%), Italia (3,3%) (OIV, 2022).

### 1.3.3 Avversità fungine

Vitis Vinifera è una specie particolarmente suscettibile a una serie di disturbi e agenti patogeni che possono portare a perdite di qualità e decadimento significativi (I. E. Kgang, et al. 2023). Tra i vari agenti patogeni conosciuti sulla vite, importante è il danno causato dai funghi (Úrbez-Torres 2011).

Le principali **patologie fungine** sono:

- *Botrytis cinerea*: essa causa la muffa grigia nella vite è in grado di vivere come parassita nei tessuti verdi e come saprotrofo nel materiale vegetale morto (Armijo et al. 2016). La *Botrytis cinerea* è un fitopatogeno filamentoso facilmente riscontrabile in qualsiasi parte del mondo e che provoca lesioni necrotiche su un'ampia gamma di piante e frutti (**Figura 4**). In particolare, *B. cinerea* danneggia gravemente gli acini d'uva tra l'inizio della maturazione e la raccolta, attraverso la secrezione di enzimi extracellulari che degradano la parete cellulare della pianta per la penetrazione dei patogeni e per il consumo di nutrienti, tra cui proteasi aspartica, laccasi, pectina metil esterasi e poligalatturonasi (Wubben et al., 1999; Valette-Collet et al., 2003; ten Have et al., 2004; Cilindre et al., 2008). L'infezione dell'acino d'uva da parte di *B. cinerea* nel vigneto porta inoltre a riduzioni della resa e della qualità dell'uva e del vino, come conseguenza di significative modifiche nella composizione chimica dell'acino stesso (Bocquet et al., 1995).



**Figura 4: Sintomi Botrytis Cinerea su acini di uva (AIAB)**

- *Plasmopara viticola*, l'agente della peronospora delle Vitacee, è uno dei principali patogeni dei vigneti in Europa. *P. viticola* è un organismo biotrofico appartenente agli Oomiceti, famiglia delle Peronosporaceae (K. Gindro, 2003).

Con condizioni climatiche adeguate, cioè, elevata umidità e temperature moderate, gli sporangi maturi di *P. viticola* rilasciano zoospore che sono in grado di depositarsi sulla superficie abassiale delle foglie (**Figura 5**). Il micelio si sviluppa anche per formare sporangiofori che emergono dallo stoma rilasciando sporangi agli altri tessuti della vite (foglie, rametti o grappoli) e alle piante circostanti (*Buonassisi et al., 2017; Gessler et al., 2011*).



**Figura 5: Sintomi di Plasmopara Viticola (EdaAgricole)**

Di conseguenza, *P. viticola* ha effetti devastanti sulle colture non protette, riducendo la qualità dell'uva e distruggendo fino al 75% della produzione in una singola stagione, con conseguenti enormi perdite economiche (*Armijo et al., 2016; Buonassisi et al., 2017; Gessler et al., 2011; Kamoun et al., 2015; Madden et al., 2000*).

- *Oidio* (*Erysiphe necator* e *Oidium tuckeri*), l'infezione primaria si manifesta tramite la presenza macchie di piccole dimensioni, di forma rotonda e di colore grigio sia sulla pagina inferiore delle prime foglie dei germogli basali; i primi sintomi di malattia si notano durante le fasi di accrescimento primaverile ovvero nel momento in cui i germogli hanno circa 6-8 foglie sviluppate. Le infezioni secondarie si manifestano invece sui grappoli e sulle foglie e hanno luogo dalla fioritura all'invaiaitura periodo i cui si ha la massima virulenza della malattia (**Figura 6**). Gli acini colpiti nella fase di accrescimento mostrano delle spaccature che possono a loro volta agevolare attacchi di altri patogeni come Botrite e Marciume acido (*A. Palliotti, et al., 2018*).



**Figura 6: Sintomi di Oidio** (EdaAgricole)

- *Mal dell'esca*. Il mal dell'esca generalmente si presenta a macchia di leopardo nel vigneto e il sintomo specifico si manifesta con le foglie che arrossano e disseccano nella zona internervale mentre la nervatura rimane verde, i grappoli cominciano ad appassire e nei casi più gravi la pianta dissecca completamente (colpo apoplettico) (**Figura 7**). Il mal dell'esca è determinato dalla sovrapposizione o successione di due principali malattie: la tracheomicosi, ossia la colonizzazione dei vasi linfatici da parte dei funghi, e la carie (Regione Trentino Alto – Adige 2007-2020).



**Figura 7: Sintomi di Mal dell'esca** (Agronotizie.it)

#### 1.3.4 Rame nei vigneti

Il rame è una delle molecole con azione fungicida più utilizzate in viticoltura e negli ultimi decenni diversi prodotti a base di rame sono stati ampiamente impiegati come fungicidi in particolare per combattere la peronospora della vite (Adrees *et al.*, 2015), di conseguenza è frequente riscontrare elevate concentrazioni di questo metallo pesante nell'ambito di questo



tipo di gestione colturale, ma anche in oliveti e coltivazioni di alberi da frutto (*Ballabio et al., 2018*).

L'azione fungicida consiste nella liberazione dello ione  $\text{Cu}^{++}$  che avviene grazie all'anidride carbonica contenuta nell'atmosfera, in varie sostanze prodotte dalla pianta e nelle spore del fungo. Queste spore sono in grado di assorbire lo ione rame che poi va ad attuare la sua attività tossica a livello delle membrane cellulari: lo ione  $\text{Cu}^{++}$  si va a sostituire agli ioni  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$  portando ad una denaturazione della membrana che risulta irrimediabilmente compromessa (*Belli, 2012*). Il rame è anche in grado di modificare l'attività respiratoria del fungo, nonché bloccare la biosintesi delle proteine portando alla morte del patogeno (*Stefanelli, 1993*).

Diversi studi effettuati nelle aree dell'Italia centrale hanno evidenziato concentrazioni elevate di rame nel suolo dei vigneti condotti a biologico rispetto ai vigneti convenzionali, in quanto al momento non esistono alternative all'uso di questo metallo per la gestione delle malattie all'interno di questo sistema di gestione (*Beni et al., 2009*).

Il rame viene utilizzato sia in agricoltura convenzionale che in agricoltura biologica.

In viticoltura convenzionale non è possibile apportare più di 28 kilogrammi per ettaro in un arco di 7 anni per un complessivo di 4 kg/ha/anno, al fine di ridurre al minimo il rischio di accumulo nel suolo e l'esposizione degli organismi non bersaglio (*Karimi et al., 2021*),

In viticoltura biologica, invece, il limite di rame applicabile nell'arco di un anno risulta essere superiore in quanto unica sostanza ammessa e considerato tuttora come unica opzione di lotta efficace contro *Plasmopara viticola*: se ne possono distribuire fino a 6kg/ha/anno, rimane tuttavia il limite da rispettare di 28kg/ha nell'arco di 7 anni (*Perria et al., 2019*).

Nella situazione legislativa attuale, i prodotti endoterapici a base di rame permessi sono i seguenti:

- Idrossido di rame: ha un'azione rapida ed è meno tossico per le colture.
- Ossicloruro di rame
- Ossido di rame
- Poltiglia bordolese: ha un'azione lenta ma prolungata nel tempo.
- Solfato di rame tribasico (*Delaiti & Sandri, 2005*).

## 1.4 Ecotossicologia

L'eco-tossicologia è la scienza che studia gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici sugli organismi viventi, le modalità di diffusione di questi agenti e le loro interazioni con l'ambiente. Rappresenta una scienza multidisciplinare che unisce la tossicologia, l'ecologia e la chimica ambientale, per prevedere gli effetti potenzialmente tossici degli agenti chimici e fisici sull'ambiente e sugli organismi facenti parte di tutti gli anelli della catena trofica (*Merli et al. 2008*).

Tutti fitofarmaci che troviamo in commercio devono seguire un iter per la registrazione e immissione molto rigido, con la produzione di un dossier che derivi da studi decennali per verificarne la tossicologia e soprattutto l'eco-tossicologia. Il dossier di registrazione deve contenere informazioni sia sul principio attivo che sulle varie formulazioni, che siano sufficienti a condurre una valutazione di rischio per la salute e per l'ambiente (*Buratti et al. 2008*).

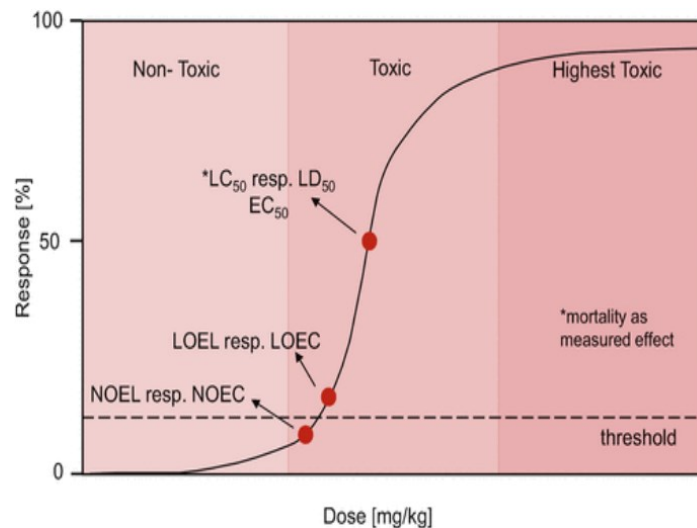
In tossicologia ed ecotossicologia, “descrittore di dose” è il termine utilizzato per identificare la relazione tra un effetto specifico di una sostanza chimica e la dose alla quale avviene. I descrittori di dose saranno utilizzati successivamente per ricavare i livelli soglia senza effetto per la salute umana (cioè DNEL o dose di riferimento RfD) e l'ambiente (PNEC). I descrittori della dose sono determinati negli studi tossicologici sui pericoli della sostanza e sono generalmente espressi come CL50, LD50, NOEL, LOEL, NOEC, EC50, DT50, ecc. Sono utilizzati per la classificazione dei pericoli GHS e la valutazione del rischio (*ChemSafety, 2020*).

I parametri più comunemente utilizzati per quantificare l'effetto degli agrofarmaci sugli organismi sono chiamati endpoint tossicologici. Il principio base dei saggi ecotossicologici da cui essi derivano, è la misura della curva dose risposta, che mette in relazione la concentrazione somministrata e la risposta dell'organismo (*Merli et al. 2008*).

I principali endpoint ecotossicologici sono:

- LC50 (Lethal Concentration 50): concentrazione letale per il 50% degli individui di una popolazione, da riferirsi al tempo di esposizione.
- EC50 (Effective Concentration 50): come la LC50 prendendo però in considerazione effetti diversi dalla morte.
- NOEL (No Observed Effect Level): è il livello di esposizione più elevato al quale non si verificano aumenti biologicamente significativi della frequenza o della gravità degli effetti avversi tra la popolazione esposta e il suo controllo appropriato;

- LOEL (Lowest Observed Effect Level): è il livello di esposizione più basso al quale si verificano aumenti biologicamente significativi della frequenza o della gravità degli effetti avversi tra la popolazione esposta e il gruppo di controllo appropriato.
- PNEC (Predicted No Effect Concentrations): è la concentrazione di una sostanza chimica che segna il limite al quale al di sotto non vengono misurati gli effetti negativi dell'esposizione in un ecosistema. Questo parametro viene calcolato utilizzando i dati di LC50, NOEL, LOEL ecc. e il fattore di sicurezza, che dipende dalla qualità e dal numero di informazioni (può variare a 1 a 1000) (ISS, 2016) (Figura 8).



**Figura 8: Endpoint tossicologici (IOR Norway center)**

I pesticidi utilizzati nei terreni agricoli provocano cambiamenti morfologici, comportamentali e fisiologici negli organi riproduttivi, nervosi, respiratori e osmoregolatori di molti organismi del suolo e contaminano il suolo esercitando un impatto dannoso su vari invertebrati (Fingerman, 1984; Mangala et al., 2009, De Silva PMCS 2009).

A seconda della natura chimica dei pesticidi e delle proprietà del suolo, gli organismi subiscono una serie di percorsi chimici, processi di trasporto, adsorbimento e desorbimento (Thapar et al., 2015, Baishya, 2015). Tra le diverse classi di pesticidi, gli insetticidi risultano essere la classe di pesticidi tossici più letali e rappresentano un rischio per gli organismi non bersaglio (Aktar et al., 2009, Mahmood, 2016). I residui di insetticidi sono stati segnalati dai sistemi agricoli insieme a molti altri ecotipi come campi coltivati, estuari, oceani e persino nei numerosi insediamenti urbani (Sánchez-Bayo, 2011; Guruge & Tanabe, 2001).

Gli organismi che prosperano nel suolo sono sempre minacciati dalle varie sostanze chimiche utilizzate nelle pratiche agricole, più specificamente dai pesticidi. È risaputo che molti di questi prodotti xenobiotici sono generalmente difficili da degradare da parte dei microbi del

suolo; pertanto, esiste sempre la possibilità che entrino in varie catene alimentari e reti alimentari con conseguente bioaccumulo e bioconcentrazione (*Maurya & Malik 2016; Dureja & Tanwar, 2012; Edward & Bolen, 1992; Paoletti, 1999*).

#### 1.4.1 *Organismi sentinella nel suolo: i lombrichi*

Lo stato ecologico di qualsiasi tipo di ambiente può essere determinato utilizzando organismi sentinella o bioindicatori come surrogati per indicare la qualità dell'ambiente in cui sono presenti. Le specie sentinella sono quindi degli organismi che ci avvertono di una disfunzione o di uno squilibrio dell'ambiente o, più restrittivamente, ci avvertono sulla pericolosità delle sostanze per la salute umana e ambientale. Tra i bioindicatori, ci sono cinque compartimenti biologici mantenuti nell' ECWFD (2000): fitoplancton, macroalghe, angiosperme, macrozoobenthos e pesci. Ulteriori gruppi possono essere raccomandati come: nematodi, zooplancton e lombrichi. (*Dauvin et al., 2010*).

Le attività dei lombrichi ha un effetto fondamentale nella formazione del suolo, principalmente attraverso attività di consumo di materia organica, frammentazione e miscelazione intimamente con particelle minerali del suolo per formare aggregati stabili all'acqua. Durante l'alimentazione, i lombrichi promuovono l'attività microbica, che a sua volta accelera anche i tassi di respirazione e stabilizzazione delle frazioni umiche della materia organica e diminuiscono le dimensioni non solo delle particelle organiche, ma anche delle particelle minerali contribuendo quindi allo sminuzzamento e miscelazione dei componenti organici e inorganici del suolo (*Shrickhande and Pathak 1951; Joshi and Kelkar 1952*).

Come osservato per la prima volta da Darwin, i lombrichi spostano grandi quantità di terreno dagli strati più profondi alla superficie. Le quantità movimentate in questo modo variano da 2 a 250 tonnellate per ettaro all'anno, equivalenti a portare uno strato di terreno tra 1 mm e 5 cm di spessore in superficie ogni anno, creando uno strato privo di pietra sulla superficie del suolo. (*Edwards e Bohlen 1996*).

Anche se tutte le specie di lombrichi contribuiscono alla ripartizione di materia organica di origine vegetale, differiscono notevolmente nel modo in cui disgregano la materia organica e la incorporano nel terreno. Le loro attività possono essere di tre tipi, ciascuno associato a un diverso gruppo di specie. Alcune specie sono limitate principalmente allo strato di lettiera vegetale sulla superficie del suolo, alla materia organica in decomposizione o al legno, e raramente penetrano nel suolo più che superficialmente.

I lombrichi influenzano anche la struttura del suolo in altri modi. Alcune specie fanno cunicoli permanenti, mentre altre si muovono casualmente attraverso il terreno, lasciando crepe e fessure di diverse dimensioni. Entrambi i tipi di cunicoli sono importanti per mantenere

areazione del suolo, drenaggio e porosità. Inoltre, queste gallerie sono solitamente rivestite con un muco a base proteica che aiuta a stabilizzare le pareti oppure con le loro feci. Queste sostanze contengono un grande quantitativo di nutrienti che si trovano in una forma prontamente disponibile per i vegetali. (A. Edwards 2004). Questi anellidi prosperano su quasi tutti i tipi di terreno e sono conosciuti come indicatori della salute e della tossicità del suolo, compresi vari inquinanti del suolo e pesticidi, infatti spesso bioaccumulano inquinanti organici (Jager et al., 2005), metalli pesanti (Nahmani et al., 2007) e nanoparticelle (Canesi & Prochazkova, 2014) attraverso la pelle e l'ingestione del suolo. L'effetto di questi pesticidi applicati al suolo ha effetti sulla mortalità dei lombrichi (Roberts & Dorough, 1984; Panda S & Sahu, 2002), sulla riproduzione (Senapati et al., 1991; Schaefer 2004), sul metabolismo (Brown et al., 2004). e migliorano anche il meccanismo di bioamplificazione (Stephenson et al., 1997; Johnson et al., 1999). I lombrichi subiscono inavvertitamente tossicità dai pesticidi poiché l'esposizione al terreno contaminato da pesticidi è quasi diretta a causa del suo semplice apparato digerente e del limitato sistema tegumentario (De Bernardi et al., 2022) e questo assorbimento di sostanze chimiche aumenta la bioconcentrazione dei pesticidi nei lombrichi (Edward & Bolen, 1992).

Pertanto, la conoscenza della tossicocinetica terrestre dei pesticidi nei lombrichi è necessaria per prevedere i rischi di bioconcentrazione e bioaccumulo sulle popolazioni di lombrichi e sulle comunità ecologiche (Van Gestel & Weeks, 2004).

#### 1.4.2 Classificazione dei lombrichi

Lee (1985) ha classificato i lombrichi in base alle loro abitudini alimentari come detritivori (si nutrono vicino alla superficie su rifiuti in decomposizione e radici morte) e geofagi (rimangono nel sottosuolo consumando grandi quantità di terreno) (**Figura 9**).

Secondo Lavelle (1983), i lombrichi geofagi sono ulteriormente classificati in poliumici (si nutrono del terriccio e occupano diversi strati di terreno), oligoumici (si nutrono di suoli poveri di materia organica) e mesoumici (si nutrono di humus e suolo) e si trovano abbondantemente nelle regioni tropicali (R. Miglani, S. S. Bisht, 2020).



**Figura 9: Esempi di lombrichi (Study.com)**

I lombrichi sono membri importanti della comunità del suolo grazie alla loro capacità di modificare il loro habitat o addirittura di creare nuovi habitat per altri organismi attraverso varie attività (Brown, 1995; Maraun et al., 1999).

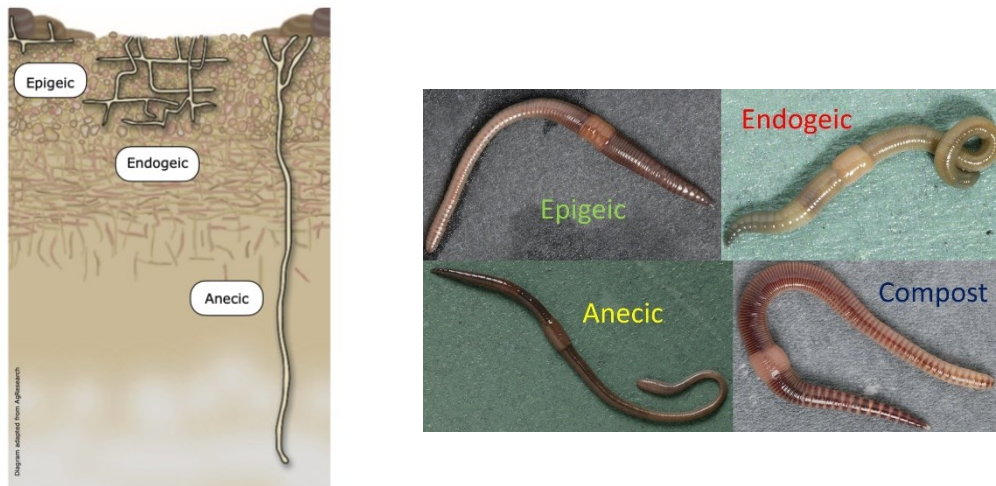
Essi sono in grado di:

- penetrare nel terreno costruendo tane e aumentando lo spazio dei pori;
- trasportare terreno e sostanza organica mediante colata;
- sminuzzare il materiale organico come primo passo nella decomposizione della materia organica;
- fornire nutrienti alle piante (ad esempio, concentrandoli nei rivestimenti delle tane o aumentando la disponibilità di nutrienti come il fosforo);
- riposizionare i semi nel profilo del terreno;
- modificare la diversità e migliorare l'attività della comunità microbica mediante un'alimentazione selettiva e fornire feci ricche di sostanze nutritive (p. es., il 42% dei microbi aerobi non simbiotici che fissano l'azoto si trovano vicino alle tane dei vermi (= 1% del volume del suolo).

Nelle regioni temperate, la maggior parte dei lombrichi responsabili delle attività sopra descritte appartengono alla famiglia Lumbricidae (classe Clitellata, phylum Annelida) (Zicsi, 1982). Queste attività migliorano la struttura del suolo, aumentano l'infiltrazione dell'acqua (in parte attraverso una maggiore capacità di ritenzione idrica, (Syers e Springett, 1983; Urbanek e Dolezal, 1992; Edwards e Shipitalo, 1998), spesso determinando la formazione di uno strato umico vicino alla superficie del suolo. (principalmente negli ecosistemi forestali, (Zachariae, 1965; Doube e Brown, 1998) e aumentare la resa nei frutteti o nei pascoli (Blakemore, 1997).

Seguendo Bouché (1977), Lee (1985) e Edwards e Bohlen (1996), i lombrichi possono essere divisi in tre gruppi ecologici:

- **Epigeici** (inibitori della lettiera): queste specie vivono sopra la superficie del suolo minerale, tipicamente negli strati di lettiera dei suoli forestali (in parte sulla corteccia degli alberi) e non scavano tane. Sono animali piccoli, rossastri, che si muovono rapidamente, con cicli di vita brevi e sono sottoposti ad un'elevata pressione predatoria. Sopravvivono alla siccità solitamente nella fase del bozzolo.
- **Anefici** (cunicoli verticali): queste specie vivono in tane verticali permanenti negli strati di terreno minerale (fino a 3 m di profondità). Questi vermi sono grandi e di colore scuro sul lato dorsale (almeno sul corpo anteriore) e sono in grado di ritirarsi rapidamente ma di solito si muovono lentamente. Specie relativamente longeve con cicli vitali lunghi, gli anefici sono sottoposti a un'elevata pressione predatoria quando sono in superficie, ma sono protetti nelle tane. Sopravvivono alla siccità solitamente in una fase quiescente.
- **Endogeici** (abitanti dei minerali): queste specie abitano il suolo minerale, creando tane orizzontali non permanenti, principalmente nei 10–15 cm più alti del suolo. Gli endogeici sono animali biancastri, che si muovono lentamente, di dimensioni variabili, longevità e durata del ciclo di vita intermedi e sono sottoposti a una pressione predatoria relativamente bassa da parte degli animali che vivono in superficie. Entrano in diapausa in risposta alla siccità.
- **Coprofagi**: Come suggerisce il nome, è più probabile che si trovino nel compost o in aree molto ricche di vegetazione in decomposizione. Prediligono ambienti caldi e umidi con una pronta scorta di materiale di compostaggio fresco. Possono consumare questo materiale molto rapidamente e anche riprodursi molto rapidamente. I lombrichi del compost tendono ad essere rosso vivo e a strisce, alcune persone chiamano le specie a strisce "vermi tigre". I vermi del compost sono spesso usati per aiutare a rimuovere i rifiuti, in quanto possono anche rimuovere i contaminanti dal terreno. (*Earthworm Society of Britain, 2017*) (**Figura 10**).



**Figura 10: Tipologie di lombrichi (ScienceLearn.org)**

#### 1.4.3 *Eisenia Fetida*

Il verme *Eisenia fetida* appartiene alla famiglia dei *Lumbricidae* e al genere *Eisenia*, è una delle specie coprofaghe di Lombrichi più diffuse in Europa ed è noto con altri nomi come verme tigre, verme dell'aglio, verme piatto, e verme per esche da pesca (Fadaee 2012). Questi vermi sono di colore rosso, rosa pallido e marrone e giallo sull'addome il che li rende facilmente riconoscibili all'occhio (Figura 11).



**Figura 11: *Eisenia Fetida* (Earthworm Watch)**

La temperatura ottimale per la crescita di questa specie è tra i 18 e i 25°C, e sebbene possa tollerare una vasta gamma di condizioni di umidità, l'umidità ottimale è di circa 85% (Venter et al. 1988, Yijun et al. 2019, Jialong et al 2019). Normalmente il ciclo di crescita di questa specie di lombrichi (dalla posa del bozzolo al lombrico adulto) affinché il giovane si sviluppi in un verme maturo o adulto, può richiedere dai 40 ai 60 giorni (Fadaee 2012). Per una



crescita ottimale dei vermi si richiedono temperature comprese tra 15 e 20 °C, contenuto e qualità ottimali della sostanza organica presente nel substrato, contenuto di umidità compreso tra 80 e 90%, ossigeno e pH che varia da > 5 e < 9 (Sherman 2003). *L'Eisenia fetida* è ermafrodita, il che significa che ogni verme ha organi riproduttivi sia femminili che maschili (Dynes 2003). *L'Eisenia fetida* può riprodursi sia mediante riproduzione sessuale che asessuata. Hanno un alto tasso di riproduzione dovuto alla loro natura ermafrodita, che consente a ciascun individuo di produrre 9 bozzoli, ciascuno contenente fino a 20 uova (cocoon) almeno ogni 14 giorni (Musyoka et al. 2019; Tripathi e Bhardwaj 2004). La maggior parte delle specie si riproducono per fecondazione incrociata, anche se alcune riproducono il bozzolo per partenogenesi.

Essendo *Eisenia fetida* considerata come uno dei rappresentanti della fauna del suolo e dei lombrichi in particolare, essa viene sottoposta a test effettuati dall'*OECD* a scopo di valutare gli effetti che le sostanze chimiche in esame nel suolo hanno sulla loro riproduzione. I vermi adulti sono esposti a una gamma di concentrazioni della sostanza chimica in esame miscelata nel terreno o, nel caso dei pesticidi, applicata nel o sul suolo utilizzando procedure coerenti con il modello d'uso della sostanza chimica in esame. La gamma di concentrazioni di prova è selezionata per comprendere quelle che possono causare effetti sia subletali che letali per un periodo di otto settimane.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare gli effetti di ds-RNA prodotti da radici geneticamente modificate di piante di *Vitis vinifera* sul lombrico *Eisenia fetida*, organismo sentinella dello stato di salute del suolo.

È stato impostato un test preliminare con piante di vite non trasformate utilizzate come controllo, piante non trasformate in un suolo trattato con rame alla dose di 200 ppm, spesso riscontrate nei vigneti, e piante trasformate sia completamente che soltanto nel portainnesto. Nel suolo di queste differenti tesi sono stati inseriti individui sani di *Eisenia fetida* per la valutazione degli effetti sia a livello di riproduzione e fertilità sia a livello di eventuali danni al DNA dei lombrichi tramite la tecnica del Comet assay (test della cometa).

La valutazione della sicurezza del suolo (soil biosafety) in seguito alla coltivazione di piante trasformate per la produzione di ds-RNA utile a combattere avversità fungine quali la *Botrytis cinerea*, è essenziale per fornire alle autorità competenti informazioni utili a regolamentare l'uso della tecnica RNAi quale metodo di lotta alternativo all'uso di pesticidi tradizionali in vigneto.

La prova in questione si inserisce nel progetto "Biosafety" in collaborazione con il gruppo di Coltivazioni Arboree dell'Università Politecnica delle Marche come test preparatorio necessario al settaggio dei protocolli e del corretto dimensionamento di uno studio valutativo più ampio che verrà ripetuto e migliorato nei prossimi anni.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Piante di vite usate nella sperimentazione

Nella prova sperimentale, sono state considerate quattro tesi:

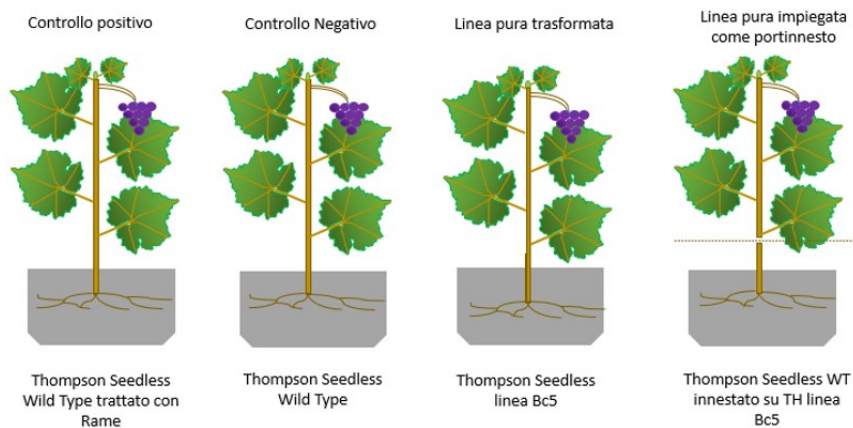
-Controllo positivo: piante della cultivar di vite Thompson Seedless wild type trattate con rame

-Controllo negativo: piante di Thompson Seedless wild type non trattate

-Linea pura trasformata: piante di Thompson Seedless della linea 5 geneticamente modificata per la resistenza a *Botrytis cinerea*.

-Linea pura impiegata come portinnesto: piante di Thompson Seedless della linea 5 geneticamente modificata per la resistenza a *Botrytis cinerea* impiegate come portinnesto su un nesto di Thompson Seedless non geneticamente trasformata (wild-type) (**Figura 12**).

Per ciascuna tesi trattata, quattro piante sono state considerate per l'esecuzione della prova, tutte opportunamente rinvasate su terreno fresco (biologico) per assicurare un buon ambiente di crescita per i lombrichi. Sono piante di due anni alla terza stagione vegetativa.



**Figura 12: Piante usate nella prova sperimentale**

### 3.2 Substrato

Il substrato di crescita delle piante di vite studiate nel presente lavoro di tesi è un terriccio universale commerciale marca COMPO SANA® BIO “Terriccio per orto e semina”. Di seguito in **Tabella 1** sono riportate alcune caratteristiche di tale substrato.

**Tabella 1. Substrato di coltivazione**

pH (in H <sub>2</sub> O)	7
Conducibilità elettrica	0,6 dS/m
Densità apparente secca	375 kg/m <sup>3</sup>
Porosità totale (v/v)	80%

### 3.3 Lombrichi

I lombrichi allevati in laboratorio dal gruppo di ricerca di chimica del suolo provengono da generazioni successive di *Eisenia fetida* acquistati dall'azienda “Lombricoltura Bella Farnia”, (Sabaudia, LT, Italia) anni fa. Gli individui impiegati nel presente lavoro di tesi sono allevati su compost biologico in una stanza a temperatura di  $20 \pm 1$  °C, a 70-80% di umidità ed alimentati con scarti vegetali biologici.

I lombrichi adulti con clitello ben sviluppato (massa umida compresa tra i 300 ed i 600 mg) sono stati selezionati ed acclimatati nello stesso substrato usato per i test una settimana prima di iniziare le prove (Li, et. al., 2018; Zou, et. al., 2018; Zhang, et. al., 2019). All'inizio della prova di ecotossicità 10 lombrichi dall'acclimatemento sono stati lavati, pesati e posti sulla superficie del terriccio alla base della pianta di vite di ogni vaso-replica. Tutti i dieci esemplari sono stati osservati penetrare nel terriccio e ogni vaso è stato avvolto in un sacco di nylon a trama molto fine legato al colletto della pianta, di modo da evitare la fuga dei lombrichi durante la prova.

### 3.4 Design sperimentale

Nel presente lavoro di tesi sono state testate 4 condizioni; controllo negativo con vite non geneticamente modificata (CTRL-), controllo positivo con vite non geneticamente modificata (CTRL+), ma coltivata su terriccio contaminato con rame (Cu) alla concentrazione di 200 ppm, pianta di vite su portainnesto geneticamente modificato (WT/GM) e pianta

completamente modificata (GM). Ogni tesi è stata impostata con tre repliche. Nello specifico ogni replica era rappresentata da una pianta di vite, coltivata in vaso contenente 1 kg di substrato e 10 lombrichi adulti.

La scelta del controllo positivo è stata dettata da precedenti prove su *E. fetida* condotte dal gruppo di chimica del suolo; da tali studi la dose di 200 ppm di Cu è risultata nociva in termini di danno al DNA e di attività riproduttiva dei lombrichi ( *Mincarelli et al. 2019, De Bernardi et al., 2022*). La contaminazione è stata effettuata utilizzando il prodotto commerciale Siamam 20 WG (Isagro), un fungicida in granuli idrosolubili a base di solfato di rame neutralizzato, efficace nei confronti di numerose malattie fungine e batteriche che viene comunemente applicato in viticoltura contro la *Botrytis cinerea*. Il prodotto è stato opportunamente pesato e disciolto in acqua deionizzata e la giusta aliquota della soluzione, tale da apportare 200 mg di Cu in ogni vaso è stata inserita nel terriccio di crescita della pianta.

Tutte le repliche sono state mantenute nella serra dell'Università Politecnica delle Marche con una temperatura media diurna di  $24\pm 3^{\circ}\text{C}$  e una notturna di  $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ .ed innaffiate all'occorrenza.

#### 3.4.1 Test di ecotossicità su lombrichi

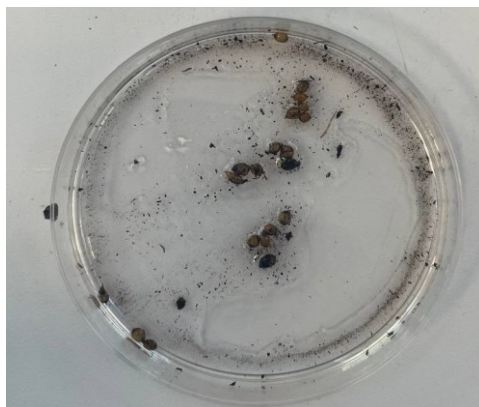
Per stimare gli eventuali effetti avversi delle piante geneticamente modificate nei confronti della performance riproduttiva dei lombrichi ed endpoint genotossici precoci, i lombrichi sono stati mantenuti nei vasi con le piante di vite per 28 giorni. Al termine dei 28 giorni i vasi sono stati accuratamente aperti e i lombrichi adulti sono stati prelevati da ogni replica, pesati ed eventuali morti o scomparsi sono stati registrati.

A questo punto è stato possibile calcolare il tasso di crescita dei lombrichi espresso in percentuale (%) è stato calcolato come segue:

$$\text{Tasso di Crescita} = [(Pt-P0) / P0] * 100\%$$

Dove P0 è il peso medio iniziale dei lombrichi in ogni contenitore e Pt è il peso medio dei lombrichi al giorno 28. Un tasso di crescita positivo (+) indica un incremento di peso, un tasso negativo indica un'inibizione dello stesso ( *Xie, et. al., 2013*).

Un lombrico per replica è stato messo in spurgo e conservato per l'analisi dell'eventuale danno al DNA tramite il test del Comet Assay. Ogni vaso è stato poi accuratamente riassembleato (terriccio + pianta senza lombrichi adulti) e lasciato incubare per ulteriori quattro settimane. Come indicato nelle linee guida OECD 222 ( *OECD, 2016*), al termine dei 56 giorni di prova, si è proceduto al setaccio accurato del terriccio per la conta di ooteche (cocoons, **Figura 13**) e giovani presenti.



**Figura 13: Cocoons su piastra Petri**

Di seguito viene riportato il protocollo seguito per il test di mutagenesi dell'elettroforesi su singola cellula, definito Comet assay o Single Cell Gel Electrophoresis SCGE; si tratta di un metodo relativamente semplice che consente di misurare il livello di danneggiamento della doppia elica di DNA a livello di cellule eucariotiche (Collins, 2004). Il saggio è in grado di esaminare le lesioni all'interno della catena di DNA, le quali sono considerate un marcatore biologico affidabile al fine di identificare e quantificare la capacità di alcuni agenti, in questo caso del rame, di danneggiare l'informazione genetica all'interno di una cellula (Qiao et al., 2007).

Il protocollo utilizzato prevede:

- Preparare la soluzione di estrusione, composta da 5% di etanolo, 95% di fosfato salino (PBS), 2.5 mg/ml di sale disodico etilendiaminotetracetico diidrato (Na<sub>2</sub>-EDTA) e 10 mg/ml di guaicol gliceril etere, quindi stabilizzarla a pH 7.3 mediante idrossido di sodio (NaOH);
- Inserire ciascun lombrico in 5 ml di soluzione di estrusione per 4 minuti a temperatura ambiente, in modo tale che la soluzione stessa induca l'estrusione dei celomociti dai lombrichi, che successivamente vengono rimossi dal mezzo;
- Centrifugare a 300 rpm per 10 minuti ad una temperatura di 4 °C, quindi eliminare il surnatante. I celomociti raccolti dai lombrichi di una stessa prova vengono uniti (3x1) e lavati due volte con PBS 1X, infine risospendere in 1 ml di PBS;
- Contare le cellule presenti nei campioni diluiti tramite microscopio, quindi risospenderle in agarosio (LMA 1%) a 37 °C e stratificare su vetrini HT Trevigen pre-rivestite con 1% di agarosio (NMA 1%). Ogni spot viene prodotto stratificando 35 µl di agarosio LMA contenente 3000 cellule, ogni campione in tre repliche (**Figura 14**);



**Figura 14: Stratificazione su vetrini HT Trevisen**

- Lasciar solidificare l'agarosio per 10 minuti al buio ad una temperatura di 4 °C, quindi immergere i vetrini in una soluzione alcalina per lisi (pH 10) composta da cloruro di sodio (NaCl) 2.5 mol/L, sale disodio etilendiaminotetracetico diidrato (Na<sub>2</sub>-EDTA) 0.1 mol/L, tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris-HCl) 10 mmol/L, dimetilsolfossido (DMSO) al 10% e Triton X-1000 1% (tensioattivo non ionico), e mantenuti a 4 °C per almeno un'ora (Mincarelli *et al.*, 2016);
- Lasciare i vetrini in unwinding per 20 minuti al buio ad una temperatura di 4 °C in un buffer elettroforetico alcalino composto da acido atilendiamminotetracetico (EDTA) 1 mmol/L e idrossido di sodio (NaOH) 300 mmol/L, a pH 13;
- Condurre l'elettroforesi a 11 V/cm per 20 minuti in una stanza refrigerata a 4 °C;
- Lavare i vetrini in H<sub>2</sub>O per 10 secondi e in buffer di neutralizzazione per 5 minuti, composto da 0.4 M Tris-HCl stabilizzato a pH 7.5, quindi disidratare in metanolo al 75% per 10 secondi (Valverde *et al.*, 1999; Mincarelli *et al.*, 2016);
- Colorare i vetrini con Sybir Gold 10 µg/ml e acquisire le immagini utilizzando un microscopio automatico Lionheart FX (**Figura 15**). Le osservazioni sono state eseguite ad un ingrandimento di 200X;



**Figura 15: Lionheart FX**

□ Eseguire 200 acquisizioni di comete per ogni trattamento ad ogni tempo di prelievo, in tre repliche.

Le immagini ottenute sono state elaborate tramite un software analitico appositamente creato, capace di estrapolare dalle comete i principali indici di danneggiamento del DNA. Tra questi indici si riporta la lunghezza della coda della cometa (Tail Length) che è direttamente proporzionale al danneggiamento del DNA (*Tiano et al., 2005; Orlando et al., 2018*).

### 3.5 Analisi statistica

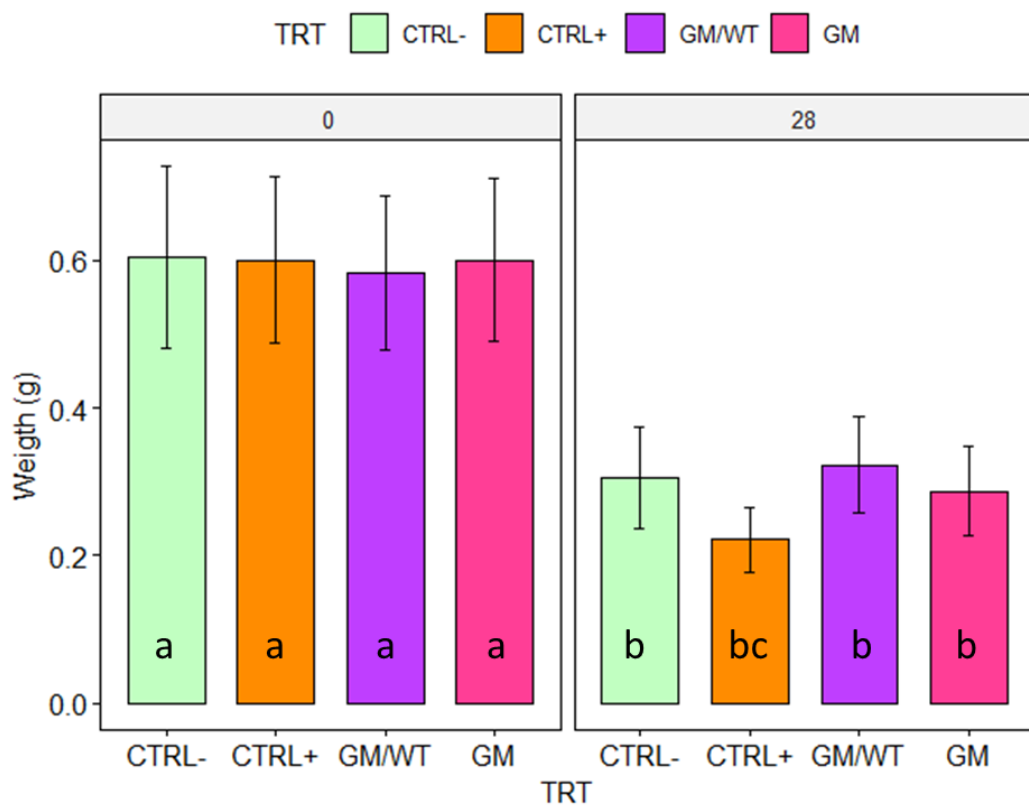
Differenze significative ( $\alpha = 0,05$ ) tra i trattamenti nei test applicati sono state valutate utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis ed il Dunn post-hoc. I trattamenti che non condividono alcuna lettera sono significativamente diversi. Quando non sono state riportate le lettere minuscole, non sono state riscontrate differenze statistiche tra i gruppi.



## 4. RISULTATI

### 4.1 Biomassa dei lombrichi

La **Figura 16** riporta l'andamento del peso medio dei lombrichi utilizzati nella prova all'inizio (0) e a 28 giorni.



**Figura 16:** Andamento dei pesi medi per trattamento registrata a inizio (0) e fine (28 giorni) prova di ecotossicità. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore  $p$ ,  $\alpha = 0,05$ ); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

All'inizio della prova tutti i lombrichi avevano un peso medio intorno a 0,60 g e non sono state evidenziate differenze significative tra il peso medio dei lombrichi caricati nei diversi trattamenti, questo ad indicare una condizione di partenza simile. A 28 giorni il peso risulta significativamente diminuito in tutti i trattamenti rispetto all'inizio, questa condizione è da

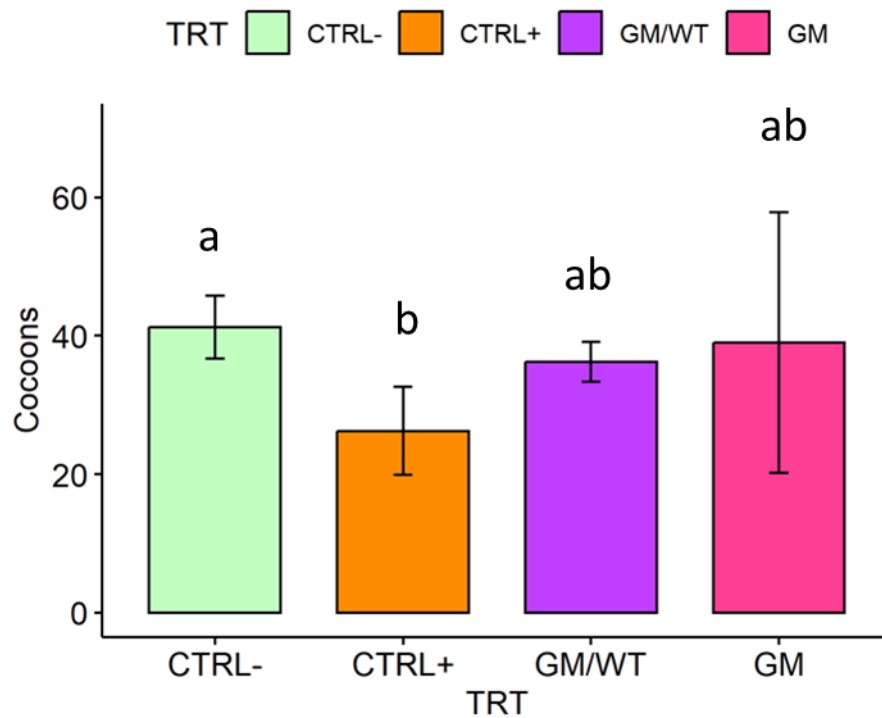
ritenersi un normale calo fisiologico, dovuto in parte alla non somministrazione di cibo durante i 28 giorni ed anche alla probabile competizione di nutrienti con le radici della vite come accade anche in studi di fito e vermi risanamento in cui pianta e lombrico si trovano a condividere lo stesso substrato (*De Bernardi et al., 2022*). Queste motivazioni sono confermate anche dai valori di Tasso di crescita misurati e riportati in **Tabella 2**, dove non sono state riscontrate differenze significative tra i trattamenti. È da notare come il peso medio nel controllo positivo contenente rame sia quello più basso registrato tra i trattamenti anche se non statisticamente significativo, a suggerire l'effetto tossico di questa concentrazione testata, come precedentemente osservato da altri studi (*De Bernardi et al., 2022*).

**Tabella 2. Tasso di crescita dei lombrichi dopo 28 giorni di esposizione.**

Trattamento	Tasso di crescita
CTRL -	-49,65±3,25
CTRL +	-48,03±3,99
GM/WT	-44,56±2,88
GM	-52,07±4,62

#### 4.2 Valutazione sulla fertilità dei lombrichi

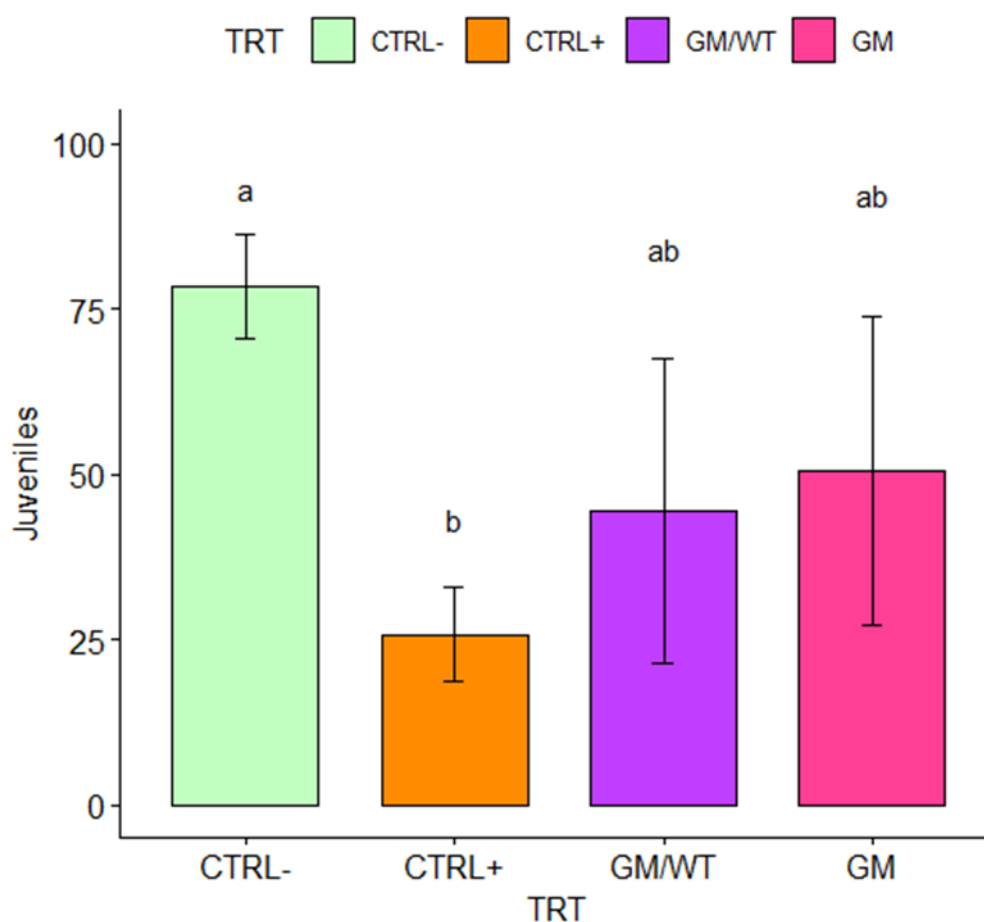
La **Figura 17** riporta la produzione di ooteche (cocoons) dopo 56 giorni da parte dei lombrichi nelle varie tesi.



**Figura 17:** *Cocoons medi per ogni trattamento. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore  $p$ ,  $\alpha=0,05$ ); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.*

Riguardo la produzione di cocoons in questo caso la tesi contenente rame (controllo positivo) è risultata statisticamente differente dal controllo negativo. Nel caso del trattamento con rame è evidente una più bassa produzione di ooteche mentre le due tesi con piante trasformate (GM/WT e GM) mostravano una situazione simile al controllo. A commento di ciò si può dedurre che il rame alla concentrazione utilizzata risulta inibire la riproduzione dei lombrichi come d'altronde già riportato in altri lavori con concentrazioni simili (Mincarelli et al., 2019; Marini et al, 2023, De Bernardi et al, 2022).

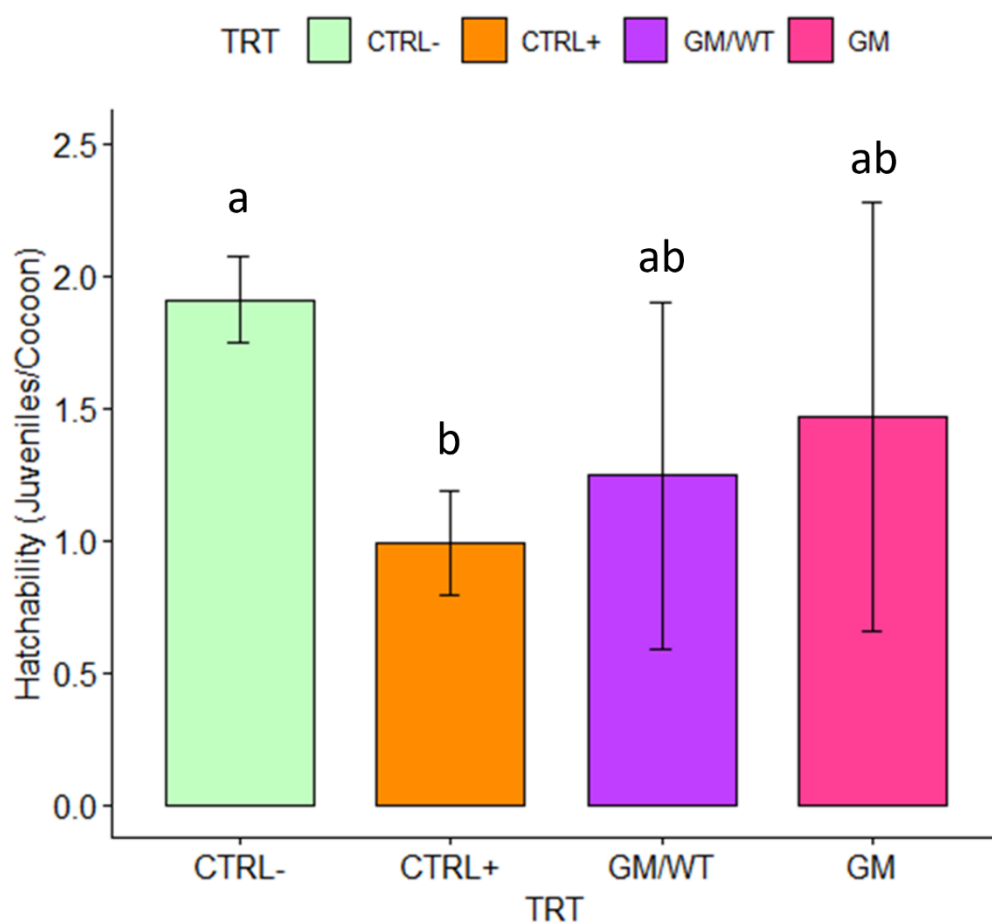
Una conferma della tossicità esercitata dal rame si ha in **Figura 18** dove sono riportati i dati riguardanti la produzione di giovani nelle varie tesi.



**Figura 18:** *Giovani lombrichi per ogni trattamento. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p,  $\alpha = 0,05$ ); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.*

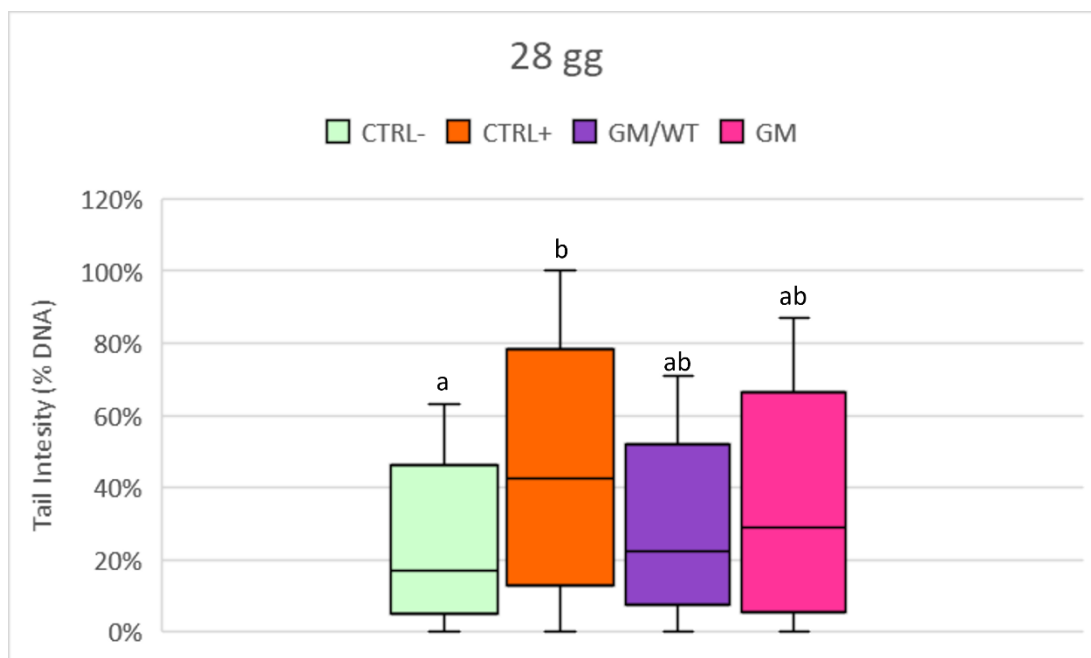
Anche in questo caso la tesi che mostra valori statisticamente più bassi rispetto alle altre è quella con il rame, mentre le due tesi con piante trasformate non mostrano differenze significative dal controllo, sebbene sia possibile notare un valore medio più contenuto e alta deviazione standard.

Il dato sulla fertilità in senso lato, cioè sul tasso di schiusa calcolato come rapporto tra giovani e cocoons per ogni tesi, riportato in **Figura 19**, non mostra differenze significative tra le tesi con piante trasformate, mentre questo avviene, come evidente nei precedenti parametri riportati, per quanto riguarda la tesi con rame.



**Figura 19:** Tasso di schiusa o fertilità per ogni trattamento. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore  $p$ ,  $\alpha=0,05$ ); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

Gli effetti sul DNA dei lombrichi allo studio, misurati attraverso la tecnica del Comet assay, che mostrano le differenze tra la lunghezza delle code di filamenti danneggiati, sono riportati in **Figura 20**.



**Figura 20: Tail intensity (un indice del danno al DNA) in *E. fetida*. Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore  $p$ ,  $\alpha = 0,05$ ); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.**

Per quanto riguarda i danni al DNA, parametro molto sensibile e precoce, si nota come nelle tesi con controllo positivo ovvero esposizione al rame e si verificano danni superiori al controllo negativo.

Nelle tesi con piante trasformate gli effetti non sono significativamente differenti dal controllo anche se la pianta trasformata per intero provoca danni leggermente superiori.

Questa affermazione necessita di una verifica più approfondita con un maggior numero di repliche e con un controllo delle condizioni di crescita più accurato.

Dai test di genotossicità emerge che il Comet assay permetta una *detection* del danno precoce (a 28 giorni) non è possibile con l'utilizzo di altri test.

Questo metodo, nato negli anni '90 per il biomonitoraggio in campo medico, è stato implementato per lunghi anni e viene utilizzato per la sua versatilità con organismi eucariotici e procariotici e con differenti tipi di cellule e matrici.

Questo test fornisce risultati robusti, sensibili e quantitativi comparati ad altri test classici (Collins et al. 2023, Vischetti et al. 2020).

## 5. CONCLUSIONI

Il lavoro effettuato si configura come un test preliminare per una prima valutazione degli effetti del ds-RNA liberato da piante trasformate sui lombrichi del suolo.

I risultati mostrano un effetto tossico del rame alla dose di 200 ppm sia in termini di riproduzione dei lombrichi che di danni al loro DNA mentre i due tipi di piante trasformate sia solo nel portainnesto che nella vite intera non hanno provocato effetti negativi sulla fertilità lombrichi per tutti gli aspetti controllati.

I dati dovranno essere confermati in una nuova sperimentazione con un maggior dimensionamento della prova sia in termini di numero di repliche che di condizioni sperimentali che è già stata programmata.

Le informazioni ricavate risultano comunque molto interessanti per la valutazione della biosicurezza del suolo in seguito ad intervento con pesticidi e/o con piante trasformate basati sulla tecnica dell'RNAi.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Altumeleng E. Kgang a c, Ashwil Klein a, Lizex Husselmann a, Andrew Nkomo a, Patricia M.K. Mathabe b, Zinash A. Belay c, Oluwafemi James Caleb, 2023 Bioassays and proteomics as early detection tools in postharvest management of table grapes (*Vitis vinifera* L.) diseases – A Review

Armijo G, Schlechter R, Agurto M, Muñoz D, Nuñez C, Arce-Johnson P (2016) Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. *Front Plant Sci* 7:382

Bahlai Christine A., Xue Yingen, M. McCreary Cara, W. Schaafsma Arthur, and H. Hallett Rebecca, “Choosing Organic Pesticides over Synthetic Pesticides May Not Effectively Mitigate Environmental Risk in Soybeans,” 2010.

Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., and Matambo, T. (2021). “Biopesticides in sustainable agriculture: A critical sustainable development driver governed by green chemistry principles.”

Belli G. (2012). *Elementi di patologia vegetale*. Padova: Piccin Nuova Libraiia S.p.A

B.M. Doube et al. *Life in a complex community: functional interactions between earthworms, organic matter, microorganisms, and plants* 1998

Bocquet F Moncomble D Valade M 1995 Etat sanitaire de la vendange et qualité des vins *Le Vigneron Champenois* 7/8 14–23

Buratti F. M., T.E., *Valutazione del rischio per la salute umana da esposizione ad agrofarmaci: aspetti regolatori e nuove prospettive*. In: *Agrofarmaci, conoscenze per un uso sostenibile a cura di Mara Gennari e Marco Trevisan*, 2008



Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.-M., Palmquist, J., Huang, S.-D., Jin, H., 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360, 1126–1129.

Canesi L, Procházková P. The invertebrate immune system as a model for investigating the environmental impact of nanoparticles. In: Boraschi D, Duschl A, editors. *Nanoparticles and the immune system, safety, and effects*. Oxford: Academic Press; 2014. pp. 91–112.

Collins, A., Møller, P., Gajski, G. *et al.* Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nat Protoc* **18**, 929–989 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>

Cortet Jérôme, Gillon Dominique, Joffre Richard, Ourcival Jean-Marc, Poinot-Balaguer Nicole, “Effects of pesticides on organic matter recycling and microarthropods in a maize field: use and discussion of the litterbag methodology, *European Journal of Soil Biology*” Volume 38, Issues 3–4, 2002

De Bernardi, A., Marini, E., Casucci, C., Tiano, L., Marcheggiani, F., & Vischetti, C. (2022). Copper Monitoring in Vineyard Soils of Central Italy Subjected to Three Antifungal Treatments, and Effects of Sub-Lethal Copper Doses on the Earthworm *Eisenia fetida*. *Toxics*, *10*(6), 310. Fingerman M. Pollution our enemy. *Proc. Symp. Physiol. Resp. Anim. Poll.* 1984:1–6.

Delaiti, M., e Sandri, O. (2005). Rame in viticoltura: selettività di diversi formulati commerciali. *Terra Trentina*, 1, 32-36

DeSimoneN,

B. Pace, F. Grieco, M. Chimienti, V. Tyibilika, V. Santoro, V. Capozzi, G. Colelli, G. Spano, P. Russo *Botrytis cinerea* and table grapes: A review of the main physical, chemical, and bio-based control treatments in post-harvest Foods, 9 (2020)

Doble Mukesh, Kumar Anil, CHAPTER 8 “Biodegradation of Pesticides, Biotreatment of Industrial Effluents”, 2005

Dr. Prakasam V., Course: “Principles of Crop Disease Management” 2020

Edwards CA, Bohlen PJ. The effect of toxic chemicals on earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1992; 125:23–99.

Edwards C.A. *Earthworm Ecology* (1998)

EFSA – Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare

Eynard I., Dalmaso G., 1990. *Viticultura moderna*, Hoepli, Milano

Feijao Carolina, d’Angelo Camilla, Flanagan Isabel, Abellan Beatriz, Ryen Gloinson Emily, Elta Smith, Daniel Traon (Arcadia International), Daniel Gehrt, Harriet Teare and Fay Dunkerley, “Development of future scenarios for sustainable pesticide use and achievement of pesticide-use and risk-reduction targets announced in the Farm to Fork and Biodiversity Strategies by 2030”, 2022.

Ferrari Mario, Menta Andrea, Di Pace Tonio, *Viticultura e difesa della vite*, 2022

Fischer Joshua, Zapata Fatima, Huizinga Kristin, Changjian Jiang, Uffman Joshua, Steven Levine, David Carson (2016). Environmental Fate of Double-Stranded RNA in Agricultural Soils. *PLoS ONE* 9(3): e93155. doi: 10.1371/journal.pone.0093155

Fletcher Stephen J., Philip T. Reeves, Bao Tram Hoang and Neena Mitter (2019). A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Front. Plant Sci.* 11:51. doi: 10.3389/fpls.2020.00051

Friis K., Damgaard C., Holmstrup M. “Sublethal soil copper concentrations increase mortality in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* during drought.” 2004; 57:65–73.

Gindro Katia, Pezet Roger, Viret Olivier 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections  
Author links open overlay panel.

Jager T, van der Wal L, Fleuren RH, Barendregt A, Hermens JL. Bioaccumulation of organic chemicals in contaminated soils: evaluation of bioassays with earthworms. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39:293–298.

Karimi, B., Masson, V., Guillard, C. *et al.* Ecotoxicity of copper input and accumulation for soil biodiversity in vineyards. *Environ Chem Lett* **19**, 2013–2030 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01155-x>

Khanzada, N.K., Farid, M.U., Kharraz, J.A., Choi, J., Tang, C.Y., Nghiem, L.D., Jang, A., An, A.K Removal of organic micropollutants using advanced membrane-based water and wastewater treatment: A review, 2020.

Kumar, V., and Chandel, S. (2018). Effect of different fungicides against *Podosphaera pannosa* causing rose powdery mildew under greenhouse conditions. *J. Crop Weed* 14, 168–173.

Lopes M.P., Fernandes K.M., Tomé H.V.V., Gonçalves W.G., Miranda F.R., Serrão J.E., Martins G.F. “Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honeybee workers.” *Pest Manag. Sci.* 2018; 74:1311–1318.

Lúquez Claudia Victoria, Formento Juan Carlos, 2002GRAPE FLOWER AND FRUIT (*Vitis vinifera* L.) Viticulture and Enology applied micrography.

Mackie K.A., Müller T., Zikeli S., Kandeler E. “Long-term copper application in an organic vineyard modifies spatial distribution of soil micro-organisms.” 2013; 65:245–253.

Maurya P, Malik D. Accumulation and distribution of organochlorine and organophosphorus pesticide residues in water, sediments, and fishes, *Heteropneustis fossilis* and *Puntius ticto* from Kali River, India. *J of Toxic and Environ Health Sci.* 2016;8(5):30–40

McCoy Tim, Frank Daniel, Director, “Organic vs. Conventional (Synthetic) Pesticides: Advantages and Disadvantages” 2020

McGinley J., M.G. Healy, P.C. Ryan, J. Harmon O'Driscoll, P.-E. Mellander, L. Morrison, A. Siggins, Impact of historical legacy pesticides on achieving legislative goals in Europe, *Science of The Total Environment*, Volume 873, 2023

Mcloughlin, A.G., Walker, P.L., Wytinck, N., Sullivan, D.S., Whyard, S., Belmonte, M.F., 2018. Developing new RNA interference technologies to control fungal pathogens. *Can. J. Plant Pathol.* 40, 325–335.

Merli, A., Capri, E., *Ecotossicologia: cenni, effetti, misure e indicatori in Agrofarmaci: conoscenze per un uso sostenibile a cura di Mara Gennari e Marco Trevisan*, 2008

Miglani Rashi, Singh Bisht Satpal, “World of earthworms with pesticides and insecticides,” 2020

Mikhail A. Beketov, Ben J. Kefford, Ralf B. Schäfer, and Matthias Liess, *Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates*, 2013.

Ministero dell’Ambiente e della Sicurezza Energetica

Mishra S., Huang, J. Li, X. Wu, Z. Zhou, Q. Lei, P. Bhatt, S. Chen *Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants*, 2022.

Mojiri A., Zhou John L., Robinson B., Ohashi A., Ozaki Noriatsu, Kindaichi Tomonori, Farraji Hossein, Vakili Mohammadtaghi, *Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods*, *Chemosphere*, Volume 253, 2020.

Morata A., Loira I., González (Eds.) C., *Grapes, and wine* (2021) A.C. Agulheiro-Santos, M. Laranjo, S. Ricardo-Rodrigues *Table grapes: There Is more to vitiviniculture than wine*.

Nerva Luca, Marco Sandrini, Giorgio Gambino, Walter Chitarra (2020). *Double-Stranded RNAs (dsRNAs) as a Sustainable Tool against Gray Mold (Botrytis cinerea) in Grapevine: Effectiveness of Different Application Methods in an Open-Air Environment*

Ojuederie, O. B., Chukwuneme, C. F., Samuel, O., Olanrewaju, M. A., Adegboyega, T. T., and Babalola, O. O. (2021). “Contribution of microbial inoculants in sustainable maintenance of human health, including test methods and evaluation of safety of microbial pesticide microorganisms” 207–240

Parker KM, Barragán Borrero V, van Leeuwen DM, Lever MA, Mateescu B, Sander M. Environmental Fate of RNA Interference Pesticides: Adsorption and Degradation of Double-Stranded RNA Molecules in Agricultural Soils. *Environ Sci Technol.* 2019 Mar 19;53(6):3027-3036. doi: 10.1021/acs.est.8b05576. Epub 2019 Feb 25. PMID: 30681839.

Pisciotta A., Barone E., Di Lorenzo R. Table-grape cultivation in soil-less systems: A review *Horticulturae*, 8 (2022)

Pizzini S., Morabito E., Gregoris E, Vecchiato M., F. Corami, R. Piazza, A. Gambaro Occurrence, and source apportionment of organic pollutants in deep sediment cores of the Venice lagoon *Mar. Pollut. Bull.*, 164 (2021), pp. 112053-112066

Regione del Veneto – Dipartimento Agricoltura e Sviluppo Rurale “Pf: definizione, composizione e utilizzo “Programma di Sviluppo Rurale per il Veneto 2007-2013 Organismo responsabile dell’informazione: Veneto Agricoltura Autorità di gestione:

Roberts B, Dorough W. Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Toxicol and Chem.* 1984; 3:67–78.

Ruvishika S. Jayawardena, Witoon Purahong, Wei Zhang, Tesfaye Wubet, XingHong Li, Mei Liu, Wensheng Zhao, Kevin D. Hyde, JianHua Liu & Jiye Yan Biodiversity of fungi on *Vitis vinifera* L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches.

Saberi, F., Marzban, R., Ardjmand, M., Shariati, F. P., and Tavakoli, O. (2020). “Optimization of culture media to enhance the ability of local *bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*.” *Journal of the Saudi society of. Agric. Sci.* 19, 468–475

Sánchez-Bayo F, Van den Brink PJ, Mann RM. *Ecological Impacts of Toxic Chemicals.* Bentham Science Publishers Ltd; 2011. p. 281.

Sang, H., Kim, JI. Advanced strategies to control plant pathogenic fungi by host-induced gene silencing (HIGS) and spray-induced gene silencing (SIGS). *Plant Biotechnol Rep* **14**, 1–8 (2020)

SANTOS BOBILLO M. Teresa, ALONSO BEATO M. Teresa, LADERO SANTOS Ignacio & MARTÍN RODRÍGUEZ M. Asunción, 2005 Plantas medicinales españolas. *Vitis vinifera* L. Subsp. *Vinifera* (vitaceae), Spanish medicinal plants. *Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera* (Vitaceae)

Scalabrelli Giancarlo, D’Onofrio Claudio, Bornice Marcello, LA VITIS SYLVESTRIS, 2012.

Shariq I. Sherwani, Ibrahim A. Arif, and Haseeb A. Khan "Modes of Action of Different Classes of Herbicides”

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B. *et al.* Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1, 1446 (2019)

Stefanelli, G. (1993). Difesa delle colture: utilizzo del rame in viticoltura; luci e ombre su uno dei più importanti anticrittogamici. Atti dell'Incontro Tecnico. Promossi dalla Comunità Montana del Gemonese.

Stephenson G, Wren C, Middleraad I C J, Warner J. Exposure of the earthworm, *Lumbricus terrestris*, to diazinon, and the relative risk to passerine birds. *Soil Biol and Biochem.* 1997;29(3/4):717–720.

Tang F.H.M., Lenzen M., McBratney A., Maggi F. “Risk of pesticide pollution at the global scale.” *Nat. Geosci.* 2021; 14:206–210

Terra e vita, 2019: RNA interferente, la biotecnologia che difende l’agricoltura. Sito web: <https://terraevita.edagricole.it/biotecnologie/rna-interferente-la-biotecnologia-che-difende-lagricoltura/>

Thapar A, Zalawadia A, Pokharkar OV, Satam SS. Classification of pesticides and its damaging effects: a review. *Biolife*. 2015;4(1):13–24.

Velki Mirna, Ečimović Sandra, “Changes in exposure temperature lead to changes in pesticide toxicity to earthworms: A preliminary study, *Environmental Toxicology and Pharmacology*” Volume 40, Issue 3, 2015, Pages 774-784.

Vischetti Costantino, Casucci Cristiano, De Bernardi Arianna, Monaci Elga, Tiano Luca, Marcheggiani Fabio, Ciani Maurizio, Comitini Francesca, Marini Enrica, Taskin Eren, Puglisi Edoardo. Sub-Lethal Effects of Pesticides on the DNA of Soil Organisms as Early Ecotoxicological Biomarkers (2020)

Wubben JP Mulder W ten Have A van Kan JAL Visser J 1999 Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea* *Applied and Environmental Microbiology* 65 1596–1602

Zaller J.G. “Daily Poison. Pesticides—An Underestimated Danger.” Springer Nature; Cham, Switzerland: 2020. 315p