



Regione Lombardia

Struttura Servizi alle imprese agricole e sviluppo dell'approccio Leader

SCHEDA FINALE PROGETTO DI RICERCA N. 7 GARDING

TITOLO:

GENI BARCODING: DIAGNOSI DI PATOGENI PER UN VERDE SICURO

Occhiello al titolo

- Il progetto consiste nello sviluppo di nuovi metodi sensibili, accurati, rapidi e ripetibili per rilevare patogeni da quarantena in piante d'importazione attraverso l'impiego di sequenziatori portatili di terza generazione
- progetto triennale terminato nell'anno 2023

Arial 10 grassetto

Gli attori

Enti coinvolti nel progetto

- In maniera discorsiva descrivere quali Enti sono stati coinvolti e in che veste (attuatori, partner, cofinanziatori ecc. – se vi fossero aziende agricole citare "aziende agricole"). Inserire qui anche il Responsabile scientifico

Il progetto GARDING ha coinvolto tre partner, dei quali due enti di ricerca (università) e un operatore nel settore d'interesse (vivaio). L'ente capofila del progetto è stata l'Università degli Studi di Verona (Dipartimento di Biotecnologie), e i due partner sono stati l'Università degli Studi di Milano (Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali) e l'azienda di produzione di piante ornamentali da esterno Vivai Nord di Lurago D'erba (CO). Il consorzio è stato guidato dal responsabile scientifico del progetto, Prof. Massimo Delledonne. I tre partner hanno collaborato mettendo in campo in maniera sinergica le rispettive competenze e dotazioni, complementari fra di loro: il gruppo di Verona ha una lunga esperienza e grandi competenze con le tecnologie di sequenziamento del DNA più all'avanguardia; il gruppo di Milano ha comprovata esperienza nel campo della diagnostica fitopatologica utilizzando metodi di biologia molecolare; il partner Vivai Nord ha contribuito con la propria esperienza della pratica florovivaistica e fornendo materiale vegetale per gli esperimenti degli altri partner.

Sebbene non fosse un membro del consorzio, il Servizio Fitosanitario di Regione Lombardia ha spesso interagito e collaborato con i tre partner, durante lo svolgimento dell'intero progetto GARDING.

(Arial 10)

Gli obiettivi

- Rispondere in maniera discorsiva alla/e domanda/e "Quale problema voleva risolvere il progetto? A quale esigenza e/o domanda ha risposto?"

Collegamenti: inserire qui un cenno sul collegamento ad altri specifici progetti di ricerca anche non regionali, pregressi o in corso

Il progetto GARDING ha avuto come obiettivo lo sviluppo di nuove metodologie diagnostiche che utilizzassero il potenziale delle più recenti tecnologie per garantire la salute e la sicurezza delle piante, utilizzando i sequenziatori di ultima generazione e la digital PCR per rilevare la presenza di patogeni da quarantena.

Il progetto si è concentrato sul superare le limitazioni delle tecniche diagnostiche attualmente disponibili, in particolare aumentando le informazioni ottenibili con i saggi (caratterizzazione molecolare con il sequenziamento, quantificazione del patogeno con la digital PCR) e riducendo costi, tempistiche e la necessità di impiego di strumentazione ingombrante per svolgere queste analisi.

Inoltre, grazie al sequenziamento delle regioni barcode, il progetto GARDING ha indagato la possibilità di effettuare analisi ad ampio spettro che permettessero la diagnosi di più patogeni con un singolo saggio, una possibilità molto ridotta con le tecniche diagnostiche attualmente utilizzate.

(Arial 10)

I risultati ottenuti e le nuove conoscenze acquisite

- (minimo 3000 - massimo 5000 battute)
- Descrizione discorsiva e avvincente che contenga:

- *Descrizione dei risultati non finalizzata a riassumere il lavoro svolto, ma ad invogliare il lettore a consultare il materiale di approfondimento prodotto*
- *Target dei risultati (a chi sono rivolti e chi e in che modo ne beneficerà)*
- *Prodotti (metodologie analitiche, cartografie, data base ecc.)*
- *Momenti di comunicazione (pubblicazioni, CD, convegni, giornate dimostrative, degustazioni ecc.); nel caso in cui siano stati realizzati materiali divulgabili (pubblicazioni, articoli, ecc.) inserire due righe di spiega e allegare il file in pdf*

Il progetto GARDING ha sviluppato nuove metodologie di rilevamento di patogeni da quarantena basati sull'utilizzo del sequenziatore portatile di terza generazione MinION di Oxford Nanopore Technologies (ONT). I primi esperimenti sono stati finalizzati a dimostrare la validità di questa tecnologia per la diagnostica fitopatologica sequenziando ampliconi (barcode) ottenuti impiegando primer altamente specifici per dei patogeni batterici (*Xylella fastidiosa*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*) e funghi (*Phytophthora ramorum*) e confermando che il sequenziamento con la tecnologia ONT è in grado di discriminare correttamente fra questi patogeni ed organismi innocui, anche molto affini filogeneticamente, risolvendo con grande precisione anche campioni complessi dove sono presenti diverse sottospecie dello stesso patogeno, in particolare di *Xylella fastidiosa*.

Ulteriori esperimenti, più avanzati, sono poi stati condotti per la diagnosi contemporanea di più patogeni, in particolare batteri e virus della famiglia Ortospovirus. Questi esperimenti hanno utilizzato primer generici in grado di amplificare una sequenza presente in tutti i batteri (16S) o due coppie di primer contemporaneamente per la rilevazione di diversi virus di questa famiglia. L'esperimento sui virus, mirato ad una gamma ristretta di patogeni, si è dimostrato efficace nel diagnosticare correttamente la presenza dei virus testati: *Tomato spotted wilt virus*, *Impatiens necrotic spot orthospovirus*, *Iris yellow spot virus*, *Polygonum ringspot virus*, *Melon severe mosaic tospovirus*.

La metodica messa a punto per il rilevamento batterico basata sul metabarcoding, a spettro decisamente più ampio, ha avuto successo nell'identificare i patogeni ma non in maniera abbastanza accurata da essere direttamente impiegabile per i saggi diagnostici, dato che non è stata in grado di rilevare i target *Bacillus pumilus* e *Pantoea agglomerans*. Questo risultato rappresenta comunque una 'proof of concept' importante che ha dimostrato che questo tipo di saggio diagnostico è possibile, anche se ancora da perfezionare.

I risultati ottenuti dal progetto GARDING, in parte già resi disponibili alla comunità scientifica mediante pubblicazioni su riviste scientifiche open-access di rilievo internazionale, hanno come target diretto e specifico gli operatori fitosanitari, sia a livello di lavoratori dei servizi fitosanitari che a livello accademico, e avranno quindi una ricaduta indiretta sui florovivaisti, che vedranno le tecniche messe a punto in questo progetto diventare la prassi nella diagnostica nei prossimi anni. Una volta perfezionate e rese disponibili a livello di analisi routinarie, queste tecniche permetteranno di ridurre considerevolmente i tempi delle analisi ed i costi ad esse associate, e di incrementarne l'accuratezza e le informazioni ottenute migliorando quindi sensibilmente la capacità di monitorare la presenza di patogeni da quarantena.

La disseminazione dei risultati ottenuti ha utilizzato diversi canali, quali pubblicazioni scientifiche, comunicazioni a convegni di settore, articoli divulgativi, volantini e presenze a fiere. Questi strumenti di comunicazione hanno contribuito alla diffusione attiva delle informazioni e aumentato la visibilità del progetto. In conclusione, il progetto GARDING ha contribuito allo sviluppo delle conoscenze teoriche sull'uso del sequenziamento degli acidi nucleici nell'ambito della diagnostica fitopatologica e al suo trasferimento tecnologico verso la pratica di laboratorio nell'ottica delle sfide fitopatologiche che andranno affrontate negli anni a venire.

Arial 10

Altre informazioni

▪ Valore totale progetto	▪ 555.085,90 €
▪ Spesa a carico del bilancio regionale	▪ 443.566,49 €
▪ Compartecipazione	▪ 111.519,41€
▪ Anno di approvazione	▪ Decreto n. 19442/2018

Allegati: *Prodotti divulgativi da mettere a disposizione degli utenti:*

- Presentazione conferenza stampa 2021 Bianco (Prodotto 1.pdf)
- Presentazione conferenza stampa 2021 Delledonne (Prodotto 2.pdf)
- Poster SIGA 2022 Ferraris (Prodotto 3.pdf)
- Poster SIPAV 2022 Passera (Prodotto 4.pdf)

- Presentazione orale ICBB 2022 Passera (Prodotto 5.pdf)
- Poster AISSA 2023 Passera (Prodotto 6.pdf)
- Presentazione orale RME Amsterdam 2022 Rossato (Prodotto 7.pdf)
- Presentazione orale FLORMART 2023 Ferraris (Prodotto 8.pdf)
- Articolo scientifico: Real-Time On-Site Diagnosis of Quarantine Pathogens in Plant Tissues by Nanopore-Based Sequencing (Prodotto 9.pdf)
- Articolo scientifico: Nanoplate digital PCR assays for detection and quantification of *Xylella fastidiosa* (Prodotto 10.pdf)