Borsa di studio attivata ai sensi di quanto disposto dal D.M. n. 1061 del 10/08/2021

Titolo del progetto: METAGENOMICA APPLICATA ALLO STUDIO DELLA “MORIA DEL KIWI” E GESTIONE DEGLI IMPIANTI COLPITI

La borsa sarà attivata sul seguente corso di dottorato accreditato per il XXXVII ciclo:
BIOLOGIA AMBIENTALE ED EVOLUZIONISTICA

Responsabile scientifico: Prof. Massimo Reverberi, Prof. Luigi Faino
Area per la quale si presenta la richiesta: GREEN
Numero di mensilità da svolgere in azienda: 6
Numero di mensilità da svolgere all'estero: 6 presso Institut für Pflanzenwissenschaften, University of Koln
Azienda: Zespri Fresh Produce italy S.r.l.
Il Dipartimento è disponibile a cofinanziare per un importo pari a euro: 10.000,00 euro
Dipartimento finanziatore: DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA AMBIENTALE con delibera del 21/09/2021

Progetto di ricerca:
L’attività proposta nel progetto ha lo scopo di trovare soluzioni innovative ed ecocompatibili per combattere la “moria del kiwi”, malattia che causa la morte delle piante comportando la diminuzione drastica della produzione fino all’espianto nei casi più gravi.
La sindrome è di natura multifattoriale, includendo fra le diverse cause fattori di natura abiotica, principalmente stress idrico, asfissia radicale, temperature del suolo eccessivamente elevate e impoverimento del suolo e, soprattutto ultimamente, cause di natura biotica. In particolare, sono stati segnalati in diversi paesi produttori di kiwi, Italia compresa, specie patogene quali Phytopythium vexans e Phytophtora spp appartenenti al gruppo degli oomiceti, nonché funghi del genere Cylindrocarpon e batteri anaerobi del genere Clostridium.
I sintomi delle piante colpite si manifestano nell’apparato radicale, ipogeo, con le radici strutturali che evidenziano imbrunimenti diffusi, inizialmente rosure del floema fino a vaste porzioni marce con la manifestazione della caratteristica “coda di topo”. Inoltre, si riscontra la mancanza di radici assorbenti (capillizi radicali) e tutto ciò comporta la perdita delle funzioni radicali. Conseguenza dei danni radicali sono i sintomi della parte epigea della pianta, dapprima con diffusi disseccamenti centripeti delle foglie, successiva filloptosi, eventuale caduta dei frutti, fino alla morte della pianta. Questa sintomatologia può diffondersi in vaste aree degli impianti tale da comportare l’espianto dello stesso.

Lo scopo del lavoro è la messa a punto di una tecnica di diagnosi dei patogeni fungini e non, implicati nella moria del Kiwi, con un approccio di metagenomica, al fine di identificare i patogeni presenti e valutare gli effetti delle diverse pratiche agronomiche nella dinamica della microflora radicale e del suolo.

Lo studio verrà condotto confrontando piante sane e malate in modo da comprendere quali comunità microbiche debbano essere considerate come potenziali agenti patogeni. Inoltre, trattandosi di una sindrome multifattoriale, verranno confrontati i microbiomi di piante di diversa varietà, sottoposte a differenti trattamenti agronomici, ovvero diversi metodi di irrigazione, concimazione, trattamenti fitosanitari e gestione del suolo.
L’impianto metodologico si basa su analisi molecolari su materiale vegetale (radici) e del suolo prossimo alle radici, raccolti in pieno campo da aziende che applicano pratiche agronomiche note e differenti tra loro nonché con livelli di gravità della malattia diversi. I campioni raccolti verranno analizzati presso i laboratori del CREA-DC di Roma.

Risulterà necessario mettere a punto dapprima il metodo di estrazione del DNA dal materiale target che, da analisi preliminari, ha dimostrato diverse criticità a causa dell'elevato contenuto di polisaccaridi ed inibitori. Successivamente, la diagnosi prevederà il confronto di due tipi di sequenziamento per l'analisi Metabarcoding: Illumina e Oxford Nanopore, al fine di valutare i pro e i contro de entrambe le piattaforme per sceglire poi la piattaforma più adatta per le analisi di routin.
Lo studio del microbioma nelle radici e nel suolo permetterà di confrontare le differenti condizioni pedo-climatiche e le differenti conduzioni agronomiche che possono influenzare lo sviluppo della malattia, in particolare i vari metodi di irrigazione e di gestione del suolo.
Nell'ottica di raggiungere gli obiettivi previsti, durante il primo anno verranno:
-individuate le aziende rappresentative da includere nei confronti agronomici che attuino i principi delle "Best Practice", rappresentative delle varietà coltivate e dei vari sistemi di coltivazione;
-condotti i campionamenti presso gli impianti affetti dalla "moria del kiwi";
-messa a punto del metodo di estrazione del DNA dai campioni di radice e terreno raccolti;
-amplificati i campioni di DNA estratto e preparati per l'invio al Service per il Metabarcoding e confronto dei risultati ottenuti dalle due tecniche (Illumina e nanopore)
Durante il secondo anno saranno:
-condotte le ripetizioni dei campionamenti presso gli impianti affetti e non dalla "moria del kiwi", e sarà condotto il campionamento di radici da impianti con le diverse tecniche colturali (es irrigazione a goccia, irrigazione e spruzzo, terreno baulato e non baulato, ecc);
-condotte le estrazioni di DNA sul nuovo materiale raccolto;
-amplificati i campioni di DNA estratto e preparati per l'invio al Service per il Metabarcoding
Il terzo anno sarà dedicato all'analisi dei risultati ottenuti per comprendere e verificare se ci siano delle correlazioni dirette tra la comunità microbica patogena e non diagnosticata e i diversi controlli agronomici attenzionati.

Risultati attesi:
- Determinare le specie microbiche potenzialmente patogene coinvolte nella moria del kiwi;
- Affinare un metodo diagnostico affidabile da poter applicare nello studio di malattie complesse che, complici condizioni climatiche estreme ed avverse, sono sempre più frequenti nelle colture agrarie;
- Individuare le condizioni agronomiche maggiormente favorevoli alla manifestazione della "moria del kiwi"

Titolo del progetto (inglese): METAGENOMICS APPLIED TO THE STUDY OF THE "KIWI DECLINE" AND MANAGEMENT OF THE AFFECTED PLANTS

Progetto di ricerca (inglese):
The activity proposed in the project aims to find innovative and environmentally friendly solutions to combat the "kiwi die-off", a disease that causes the death of plants resulting in a drastic decrease in production up to explantation in the most serious cases.

The syndrome is multifactorial in nature, including among its various causes factors of an abiotic nature, mainly water stress, root asphyxia, excessively high soil temperatures and soil depletion and, especially lately, biotic causes. In particular, pathogenic species such as Phytopythium vexans and Phytophtora spp belonging to the oomycetes group, as well as fungi of the genus Cylindrocarpon and anaerobic bacteria of the genus Clostridium have been reported in various kiwi producing countries, including Italy.

The symptoms of the affected plants are manifested in the root system, underground, with the structural roots showing widespread browning, initially phloem redness up to large rotten portions with the manifestation of the characteristic "rat's tail". Furthermore, there is a lack of absorbent roots (radical capillices) and all this leads to the loss of root

functions. Consequences of radical damage are the symptoms of the epigeal part of the plant, at first with widespread centripetal drying of the leaves, subsequent phylloptosis, possible fruit fall, up to the death of the plant. This symptomatology can spread over large areas of the systems such as to lead to the removal of the same.

The aim of the work is the development of a diagnosis technique of fungal and non-fungal pathogens involved in Kiwi die-off, with a metagenomic approach, in order to identify the pathogens present and evaluate the effects of the various agronomic practices in the dynamics of root and soil microflora.

The study will be conducted by comparing healthy and diseased plants in order to understand which microbial communities should be considered as potential pathogens. Furthermore, since it is a multifactorial syndrome, the microbiomes of plants of different varieties will be compared, subjected to different agronomic treatments, i.e. different methods of irrigation, fertilization, phytosanitary treatments and soil management.

The methodological system is based on molecular analyzes of plant material (roots) and of the soil close to the roots, collected in the open field by companies that apply known and different agronomic practices as well as with different disease severity levels. The collected samples will be analyzed at the CREA-DC laboratories in Rome.

It will be necessary to first develop the DNA extraction method from the target material which, from preliminary analyzes, has shown several critical issues due to the high content of polysaccharides and inhibitors. Subsequently, the diagnosis will include the comparison of two types of sequencing for Metabarcoding analysis: Illumina and Oxford Nanopore, in order to evaluate the pros and cons of both platforms to then choose the most suitable platform for routine analysis.

The study of the microbiome in the roots and in the soil will allow to compare the different pedo-climatic conditions and the different agronomic conditions that can influence the development of the disease, in particular the various methods of irrigation and soil management.

In order to achieve the expected objectives, during the first year there will be:

identified the representative companies to be included in agronomic comparisons that implement the principles of "Best Practice", representative of the cultivated varieties and of the various cultivation systems;

conducted the sampling at the plants affected by the "kiwi die-off";

development of the method of DNA extraction from the root and soil samples collected;

amplified samples of extracted DNA and prepared for sending to the Service for Metabarcoding and comparison of the results obtained by the two techniques (Illumina and nanopore)

During the second year they will be:

the repetitions of the sampling will be carried out at the plants affected and not by the "kiwi die-off", and the sampling of roots from plants with the different cultivation techniques will be conducted (eg drip irrigation, irrigation and spraying, bedded and non-bedded soil, etc.) ;

DNA extractions conducted on the newly collected material;

amplified the extracted DNA samples and prepared for sending to the Metabarcoding Service

The third year will be dedicated to the analysis of the results obtained in order to understand and verify whether there are direct correlations between the pathogenic and undiagnosed microbial community and the various agronomic controls in focus.

Expected results:

- Determine the potentially pathogenic microbial species involved in kiwi die-off;

- Refine a reliable diagnostic method that can be applied in the study of complex diseases that, complicit with extreme and adverse climatic conditions are increasingly frequent in agricultural crops;

- Identify the agronomic conditions most favorable to the manifestation of the "kiwi die-off"