

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

Titolo del progetto: Genome-barcoding di microrganismi batterici di quarantena di rilevanza per l'Unione Europea: sviluppo ed applicazione con metodologia Nanopore

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

Responsabile scientifico: Dr. 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 Dr. Joël Pothier ZHAW School of Life Sciences and Facility Management Institute of Natural Resource Sciences Einsiedlerstrasse Wädenswil Switzerland

Azienda: SEQUENTIA BIOTECH

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 30/09/2021

Progetto di ricerca:

La globalizzazione e i cambiamenti climatici stanno ridisegnando il paesaggio e la distribuzione degli organismi nocivi per le piante. Tale tendenza rappresenta una minaccia per gli ambienti naturali e quelli coltivati, per la produzione agricola e quella forestale, per gli ecosistemi e per la biodiversità nel territorio dell'Unione Europea. Nell'ultimo decennio l'UE si è trovata di fronte a diversi focolai infettivi su larga scala di nuovi organismi nocivi per le piante, che hanno avuto un impatto significativo. Un caso molto esplicativo è rappresentato da *Xylella fastidiosa* (Xf), che dal 2013, a partire dall'Italia, è stato intercettato in diversi Stati europei. Secondo i modelli previsionali l'attuale distribuzione di Xf in Europa è molto contenuta rispetto alla grande estensione delle aree climaticamente adatte all'insediamento del batterio. È emerso che la potenziale distribuzione di Xf sembra essere condizionata dalle temperature minime invernali, essendo il freddo il principale deterrente della moltiplicazione del batterio nell'ospite vegetale. Relativamente alle aree con temperature estremamente elevate in estate, le potenziali dinamiche di Xf rimangono incerte, poiché l'impatto del caldo estremo su Xf è poco conosciuto. Tuttavia, evidenze riportate in Puglia (Italia), su olivo, hanno evidenziato l'inopportunità della sospensione di trattamenti efficaci nel contenimento della popolazione batterica in pianta durante il periodo estivo, in quanto si osserva una ripresa della moltiplicazione batterica e dei sintomi della malattia. Da queste osservazioni emerge come i cambiamenti climatici, con conseguente aumento generalizzato delle temperature minime invernali e delle temperature estive, potrebbero alterare sensibilmente la distribuzione delle aree adatte all'insediamento e alla diffusione di Xf.

Un altro aspetto importante è rappresentato dall'impatto sul territorio degli organismi nocivi come Xf. Nel 2013, anno della prima segnalazione della malattia, erano stati stimati 8.000 ettari di oliveti pugliesi colpiti dal batterio. A dicembre 2014 l'area infetta nota era quasi triplicata; è stato recentemente calcolato che la velocità del fronte di avanzamento dell'infezione è di circa 10 km/anno e che l'invasione di Xf in Puglia probabilmente non è iniziata nel 2013, ma circa cinque anni prima. Le conseguenze di questo insediamento nel territorio pugliese sono state devastanti, colpendo gravemente l'economia locale e nazionale. Gli ulivi sono alberi simbolo per la regione e gli oliveti fanno parte del paesaggio e del patrimonio culturale locale. La perdita di alberi secolari ha inciso sul patrimonio culturale e sull'attrattiva della regione. Il paesaggio, caratterizzato da distese di ulivi come quelli della "Piana degli Ulivi monumentali", è stato completamente stravolto e attualmente sono presenti distese di piante disseccate e mutilate. Sono state colpite molte aziende familiari i cui danni sono difficili da monetizzare. Nelle aree colpite è stata

regolamentata la produzione e la movimentazione delle piante per la messa a dimora, determinando un calo del reddito della produzione vivaistica. Queste situazioni stanno modificando l'assetto socioeconomico e paesaggistico del tacco d'Italia.

In tale contesto, l'UE ha predisposto una strategia preparatoria coordinata e armonizzata per proteggere l'agricoltura, l'ambiente e l'economia da questi pericolosi organismi nocivi.

In particolare, la legislazione fitosanitaria dell'UE è stata aggiornata con l'adozione del Regolamento (UE) 2016/2031, noto come regime fitosanitario, entrato in vigore nel dicembre 2019. Tra le misure incluse vi è l'istituzione di un elenco degli organismi più pericolosi. Per ciascuno di essi gli Stati membri dovranno effettuare sondaggi annuali, redigere e aggiornare un piano di emergenza, effettuare esercitazioni di simulazione, emanare comunicazioni al pubblico e adottare un piano d'azione per l'eradicazione di organismi nocivi già presenti sul territorio.

In relazione a questi obiettivi della UE, la tematica del progetto di dottorato sarà focalizzata sullo sviluppo di un sistema innovativo di diagnosi che combini tecniche di biologia molecolare e bioinformatica.

Questo si basa sull'amplificazione di geni chiave per l'identificazione di ceppi e la differenziazione di sottospecie o phylotypes batterici, abbinata all'analisi di sequenziamento con tecnologia Nanopore e a pipeline bioinformatica ad hoc che utilizzano dati depositati in banca dati on line. Questo approccio verrà applicato a diverse combinazioni di ospite/batterio fitopatogeno in condizioni controllate e su campioni naturalmente infetti, al fine di verificarne l'applicabilità trasversale a diversi sistemi. In particolare, la validazione nel corso del dottorato sarà effettuata su diverse matrici vegetali (es: semi, frutti, foglie, rami, terreno etc) in combinazione a diversi patogeni batterici prioritari per l'Italia e l'UE (*Pantoea stewartii*, *Xylella fastidiosa*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Xanthomonas citri*, *Ralstonia solanacearum*). Attraverso questa metodologia saranno migliorate sensibilmente le caratteristiche di sensibilità, specificità e precocità diagnostica, al fine di identificare tempestivamente nuovi microrganismi batterici e/o nuovi biotipi anche in condizioni di asintomaticità. La finalità ultima del progetto di dottorato è infatti lo sviluppo di una metodologia diagnostica che possa essere utilizzata presso i punti d'ingresso (porti, aeroporti e dogane) di semplice ed agevole utilizzo ad opera degli ispettori fitosanitari di tutto il territorio europeo.

A causa dell'allargamento dell'areale di distribuzione delle popolazioni fitopatogene, conseguentemente ai cambiamenti climatici e alla globalizzazione, con questo progetto si vuole essere preparati alle sfide del futuro con protocolli rapidi ed efficaci che siano robusti per verificare la variazione della biodiversità delle popolazioni patogeniche per fronteggiare la velocità di movimento del fronte di invasione di patogeni prioritari per la EU, indirizzare in modo più efficace interventi di prevenzione delle epidemie per la conservazione dell'ecosistema, la biodiversità e la riduzione dell'impatto dei cambiamenti climatici. Lo sviluppo di questa nuova tecnologia avverrà con il coinvolgimento di utilizzatori finali (i.e. Servizi Fitosanitari Regionali, Laboratori Nazionali di Riferimento per le malattie delle piante).

Le attività di RI & SS che vengono implementate nel progetto puntano a raggiungere importanti obiettivi industriali che valorizzano in termini di valore aggiunto le azioni prioritarie da compiere in Italia e negli stati membri della EU per la difesa delle piante dall'ingresso e lo sviluppo di patogeni prioritari, favorendo la sostenibilità e la biodiversità degli ecosistemi.

Titolo del progetto (inglese): Genome-barcoding (NGS) of quarantine bacterial microorganisms relevant to the European Union: development and application with Nanopore methodology

Progetto di ricerca (inglese):

Globalization and climate change are reshaping the landscape and the distribution of plant pests. This trend represents a threat to natural and cultivated environments, to agricultural and forestry production, to ecosystems and to biodiversity in the territory of the European Union. Over the past decade, the EU has faced several large-scale infectious outbreaks of new plant pests, which have a significant impact. A very explanatory case is represented by *Xylella fastidiosa* (Xf), which since 2013, starting from Italy, has been intercepted in several European countries. According to forecast models, the current distribution of Xf in Europe is very limited compared to the large extent of

the areas climatically suitable for the establishment of the bacterium. It emerged that the potential distribution of Xf seems to be conditioned by the minimum winter temperatures, being the cold the main deterrent of the multiplication of the bacterium in the plant host. Regarding areas with extremely high temperatures in the summer, the potential dynamics of Xf remain uncertain, as the impact of extreme heat on Xf is poorly understood. However, evidence reported in Puglia (Italy) on olive trees, highlighted the inadmissibility of the suspension of effective treatments in containing the bacterial population in planta during the summer period, as a resumption of bacterial multiplication and symptoms of the disease is observed. From these observations it emerges that climate change, with a consequent generalized increase in minimum winter temperatures and summer temperatures, could significantly alter the distribution of areas suitable for the settlement and spread of Xf.

Another important aspect is the impact on the territory of harmful organisms such as Xf. In 2013, the year of the first report of the disease, an estimated 8,000 hectares of Apulian olive groves were affected by the bacterium. By December 2014, the known infected area had almost tripled; it has recently been calculated that the speed of the advancing front of the infection is about 10 km/year and that the invasion of Xf in Puglia probably did not start in 2013, but about five years earlier. The consequences of this settlement in the Apulian territory were devastating, severely affecting the local and national economy. Olive trees are symbolic trees for the region and olive groves are part of the local landscape and cultural heritage. The loss of ancient trees has affected the cultural heritage and attractiveness of the region. The landscape, characterized by expanses of olive trees such as those of the "Piana degli Ulivi monumentali", has been completely distorted and currently there are expanses of dried and mutilated plants. Many family farms have been hit, whose damages are difficult to monetize. In the affected areas, the production and handling of plants for planting was regulated, causing a decline in the income of nursery production. These situations are changing the socio-economic and landscape structure of the heel of Italy.

In this context, the EU has prepared a coordinated and harmonized preparatory strategy to protect agriculture, the environment and the economy from these dangerous harmful organisms.

In particular, the EU phytosanitary legislation was updated with the Regulation (EU) 2016/2031, which was adopted in December 2019. Among the measures included, a list of more dangerous organisms was established. For each of dangerous organism, Member States will have to carry out annual surveys, draw up and update an emergency plan, carry out simulations, dissemination to the citizen and adopt an action plan for the eradication of harmful organisms already present in the area.

In relation to these EU objectives, the PhD project will be focused on the development of an innovative diagnostic system that combines molecular biology and bioinformatics techniques that allows to combine sustainability, safety and technological innovation.

The innovative diagnostic system will be based on the amplification of key genes for the identification of strains and differentiation of bacterial subspecies or phylotypes, combined with sequencing analysis with Nanopore technology and ad hoc bioinformatics pipeline that use data stored in online databases. This approach will significantly improve the sensitivity and specificity for an early diagnosis in order to promptly identify new bacterial microorganisms and / or new biotypes even in asymptomatic conditions. The validation of this system during the PhD thesis will be carried out on different plant matrices (e.g. seeds, fruits, leaves, branches, soil, etc.) in controlled conditions and on the territory, in combination with several priority bacterial pathogens for Italy and the EU (*Pantoea stewartii*, *Xylella fastidiosa*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Xanthomonas citri*, *Ralstonia solanacearum*). The final objective of the PhD project is the development of a diagnostic methodology that can be used at the entry points (ports, airports and customs) that are simple and easy to use by phytosanitary inspectors from all over Europe.

Due to the enlargement of the distribution area of pathogenic population, resulting from climate change and global trade, the goal of this project is to be prepared for the future challenges with rapid, effective and robust protocols. This allow:

- to verify the variation of the biodiversity of the pathogenic populations;
- to face the invasion of priority pathogens in the EU;
- to guide the community policies to prevent epidemics for the conservation of ecosystem biodiversity reducing the impact of climate change.

The development of this new technology will take place with the involvement of end users (i.e. Regional Phytosanitary Services, National Reference Laboratories for plant diseases).

The activities of RI & SS that are implemented in the project aim to achieve important industrial objectives that enhance in terms of added value the priority actions to be taken in Italy and in the EU member states for the protection of plants from the entry and development of priority pathogens, promoting the sustainability and biodiversity of ecosystems.