

26 luglio 2022

BIOPESTICIDI: METODI INNOVATIVI E
SOSTENIBILI PER LA DIFESA DELLE COLTURE



**L'innovazione nella difesa sostenibile delle
colture tra immissione di antagonisti alloctoni
e sperimentazione di *RNA* interferente in
Emilia Romagna**

Contesto attuale

Criticità:

- ✗ Cambiamenti climatici
- ✗ Nuove avversità
- ✗ Riduzione mezzi tecnici



Obiettivi sfidanti:

- ✓ Green Deal Biodiversità
Farm to Fork
 - ↓ **Fitofarmaci:** riduzione del 50%
 - ↓ **Fertilizzanti:** riduzione del 20%
 - ↑ **Agr BIO:** incremento del 30%
- ✓ Direttiva 128/09
- ✓ PAN

DOVE SIAMO:

- Agr. di precisione, attrezzature innovative
- Rinnovata attenzione alle tecniche agron.
- Modelli epidemiologici
- Tecniche di biocontrollo
- Biostimolazione delle difese naturali



POSSIBILI SOLUZIONI da SVILUPPARE

Applicazione di **biotecnologie** innovative funzionali allo sviluppo di fitofarmaci innovativi ed al miglioramento genetico

Criticità: avversità di nuova introduzione

700 specie di insetti negli ultimi 30 anni

Quasi 20 specie per anno (in gran parte da America ed Asia).
Fino all'immediato dopoguerra lo stesso numero di specie
arrivava in 15 anni





Grandi sfide nella difesa fitosanitaria

Cimice asiatica
Halyomorpha halys



Moscerino della frutta
Drosophyla suzukii



Maculatura bruna
Stenphylium vesicarium



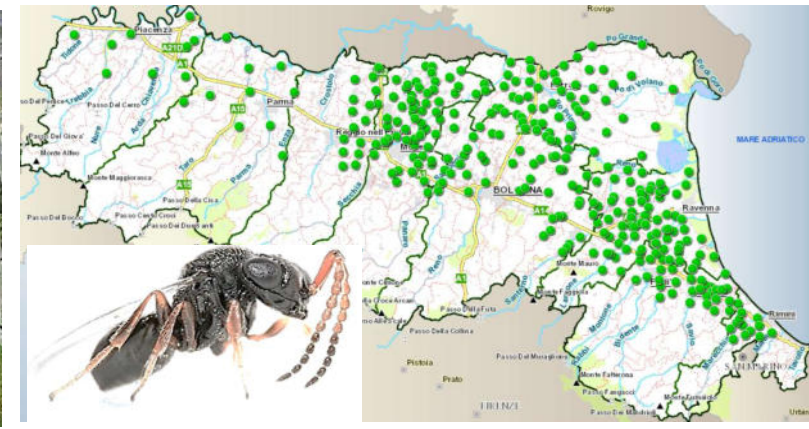
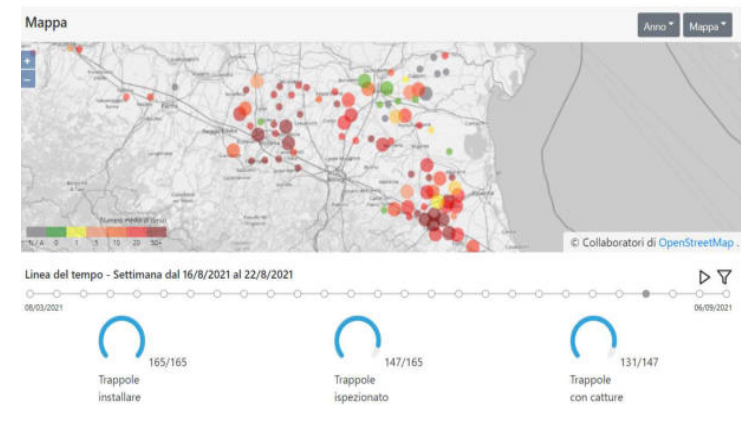
Cimice asiatica

Situazione 2012 - 2022

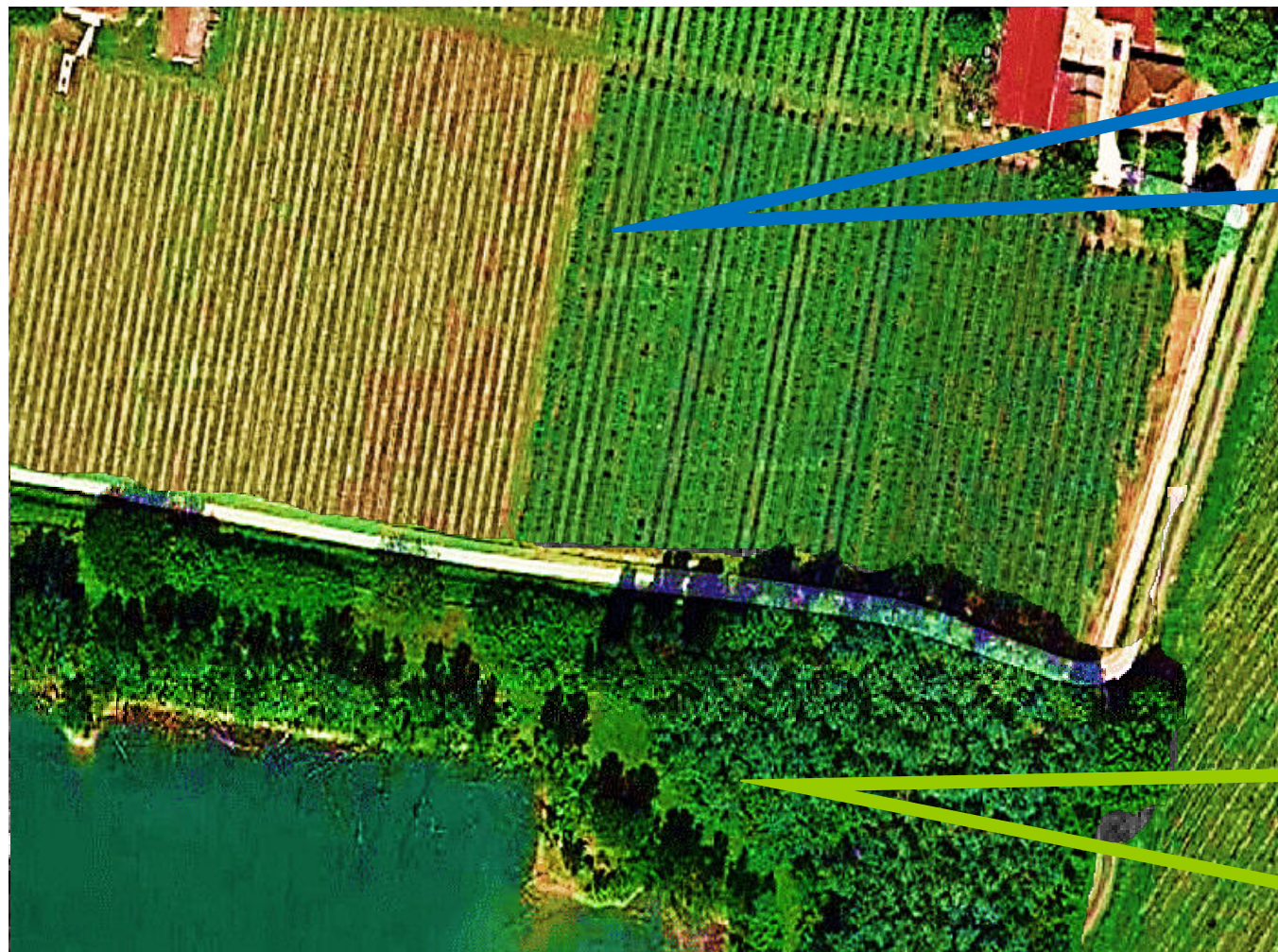
- Popolazioni inizialmente contenute in incremento dal 2015 divenendo **specie di TERRITORIO**
- Specie estremamente **polifaga**: ingenti danni sulla maggior parte delle colture

Programma di gestione territoriale

- Molteplici **attività sperimentali** in tutti i campi: studio della biologia e etologia, difesa diretta e indiretta, tecniche attract & kill – push & pull, sistema territoriale di monitoraggio
- Sostegno** diretto e indiretto alle aziende
- Attuazione del **programma territoriale di lotta biologica**



Strategia territoriale integrata



Aree **COLTIVATE**

Applicazione di sistemi di controllo e difesa **ATTIVA**:

- Monitoraggio territoriale/ aziendale
- Interventi insetticidi mirati

Difesa **PASSIVA**:

- Reti Monifila
- Reti Monoblocco

Contesto **AGRO AMBIENTALE**

Obiettivo: raggiungimento di un equilibrio della specie nell'ambiente:

- Verifica e studio della **RESILIENZA**
- Valorizzazione **ANTAGONISTI AUTOCTONI**
- Introduzione **ANTAGONISTI ESOTICI**

Trissolcus japonicus: programma di LOTTA BIOLOGICA (2020 - 2022)



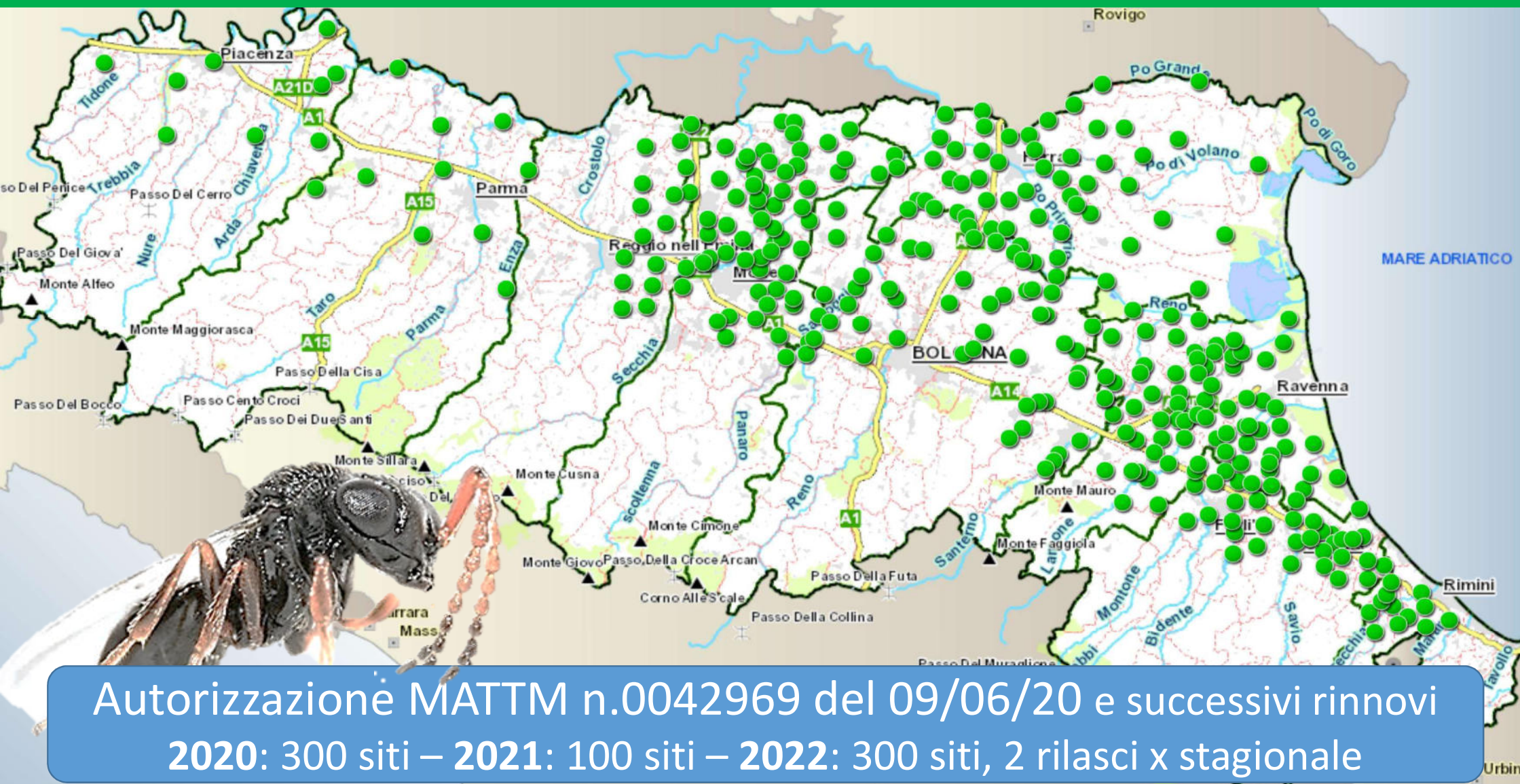
- ✓ Raccolta e conservazione invernale cimici
- ✓ Allevamento cimici
- ✓ Conservazione uova
- ✓ Moltiplicazione *Trissolcus japonicus*
- ✓ Rilascio in ambiente
- ✓ Controlli pre e post rilascio, indagini di dettaglio
- ✓ Monitoraggio agro eco sistemico



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

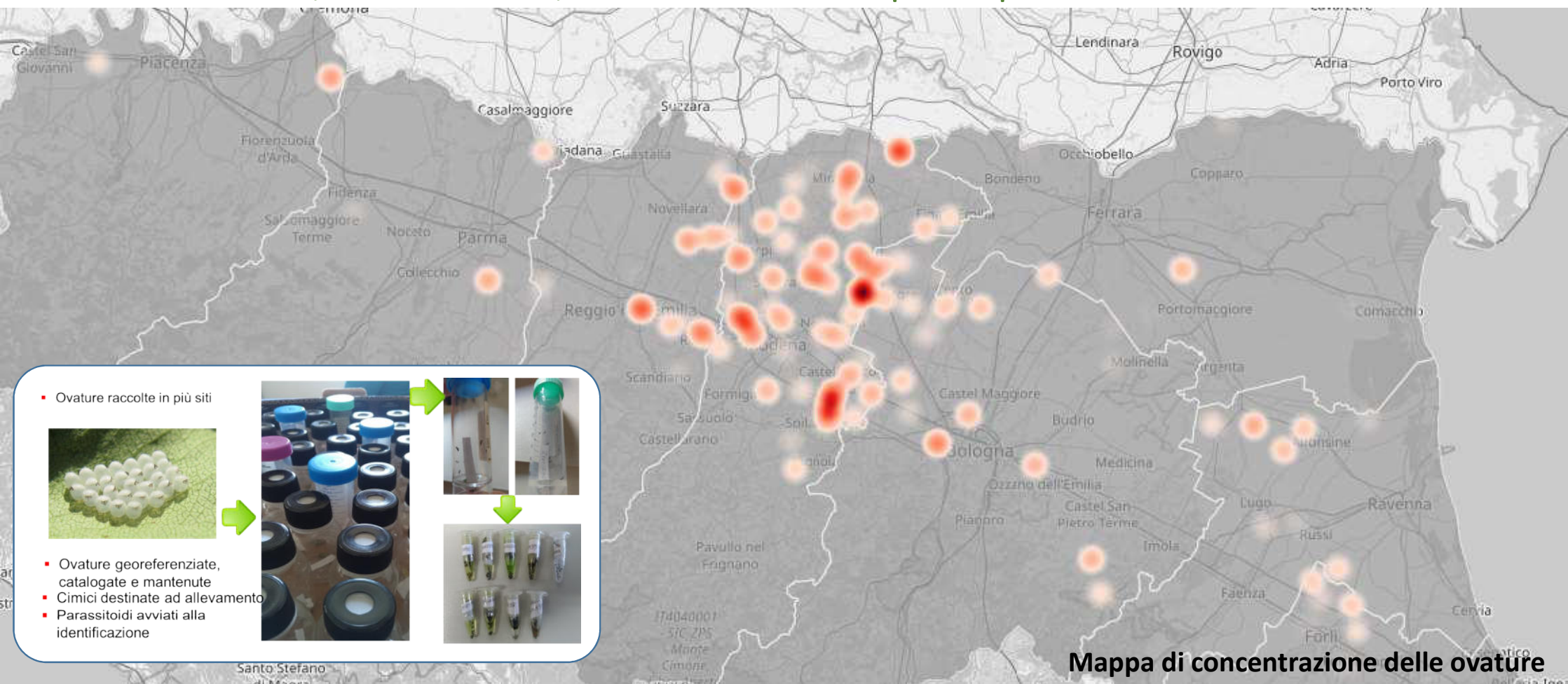


Trissolcus japonicus: Programma territoriale di LOTTA BIOLOGICA



Lotta biologica con *T. japonicus*: indagine agro-sistemica

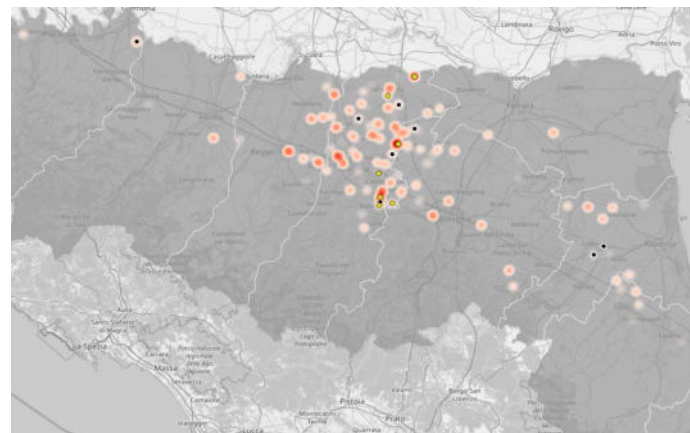
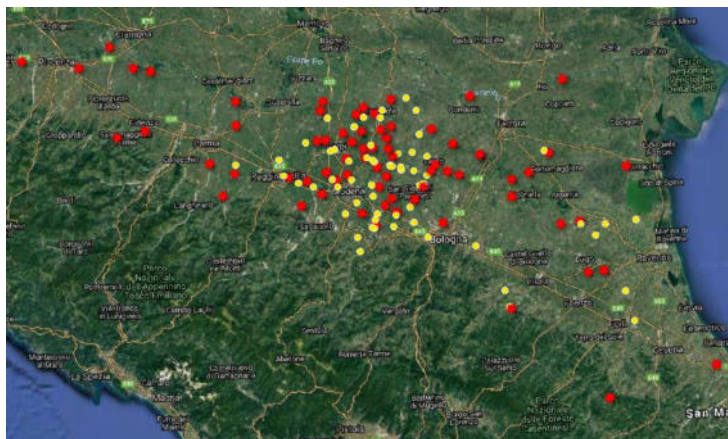
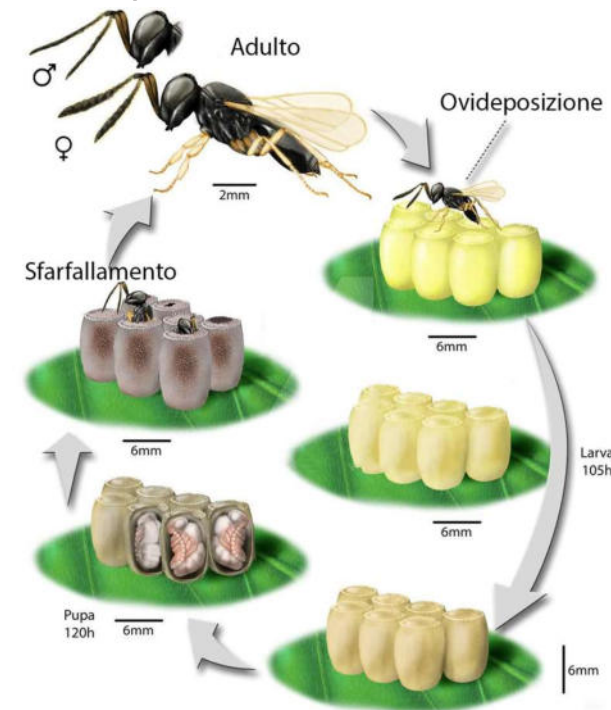
Raccolta ovature, allevamento, determinazione specie parassitoidi



Mapa di concentrazione delle ovature

Programma di lotta biologica Tj: considerazioni preliminari (2020 – 21)

- T. japonicus ritrovato nell'intero territorio
- Elevata % di ovature parassitizzate :
 - 38,7% complesso dei parassitoidi (dato da prog. nazionale)
 - 8,1% *Trissolcus japonicus* (dato da progr. nazionale)
- Coesistenza con altre specie di parassitoidi oofagi
- Sono state rilevate percentuali trascurabili di off-target



Moscerino della frutta

Situazione 2011 - 2022

- Popolazioni in costante incremento divenendo **specie di TERRITORIO**
- **Specie polifaga**: ingenti danni su ciliegio, fragola, piccoli frutti, occasionalmente su altre produzioni e rischio per produzioni viticole. Le esigenze in termini di difesa divengono stringenti in **fase di preraccolta**

Programma di gestione territoriale

- Costante **monitoraggio** del territorio e comunicati settimanali ai produttori
- Molteplici **attività sperimentali** volte all'individuazione di tecniche complementari alla difesa chimica: realizzazione area sperimentale sistemi di copertura
- Organizzazione e attuazione di un **programma territoriale di lotta biologica**



Ganaspis brasiliensis: programma di LOTTA BIOLOGICA (2021 - 2022)

Regione Emilia-Romagna

Settore
fitosanitario e
difesa delle produzioni
Emilia-Romagna

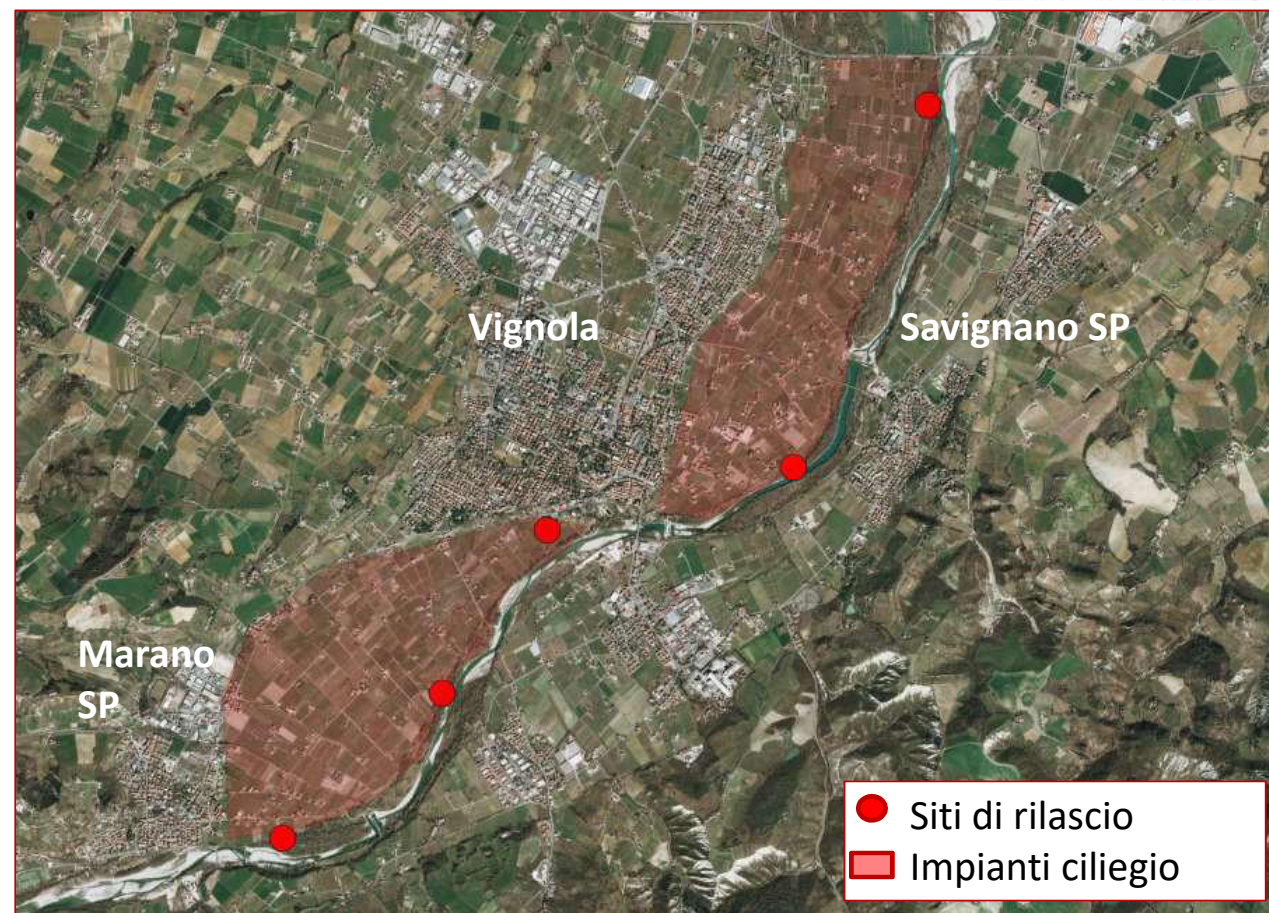
Consorzio Fitosanitario



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



FONDAZIONE
EDMUND
MACH



- ✓ 2021: 5 siti Vignola (MO), principale areale di coltivazione del ciliegio
- ✓ Siti distanti tra loro 1,5-2,5 km
- ✓ Rilasci effettuati nella vegetazione che costeggia il fiume Panaro al margine di ceraseti
- ✓ Rilasci a partire da settembre 2021 in seguito all'autorizzazione ministeriale



- ✓ 2022: 15 siti in Emilia Romagna

Ganaspis brasiliensis: considerazioni preliminari (2021)

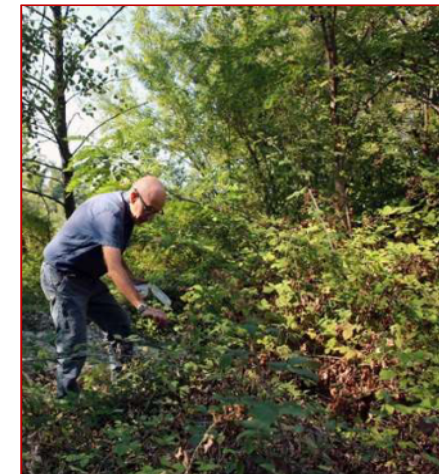


✓ *Ganaspis brasiliensis* è stata ritrovata in 2 dei 5 siti di rilascio. Poiché questa specie non era mai stata segnalata in precedenza e non è stata rilevata nei campioni pre-rilascio, possiamo ipotizzare che si tratti della progenie degli individui rilasciati



✓ *Leptopilina japonica* parassitoide esotico che attacca le larve di drosofila su frutta ancora sulle piante, è stato rilevato per la prima volta in Emilia-Romagna (segnalato in Trentino dal 2019)

Species of Parasitoids	N°	%
<i>Leptopilina japonica</i>	17	13,6
<i>Ganapsis brasiliensis</i>	2	1,6
<i>Asobara</i> spp.	1	0,8
<i>Spalangia</i> spp.	1	0,8
<i>Pachicrepoides vindemmiae</i>	18	14,4



Maculatura bruna

Situazione territoriale

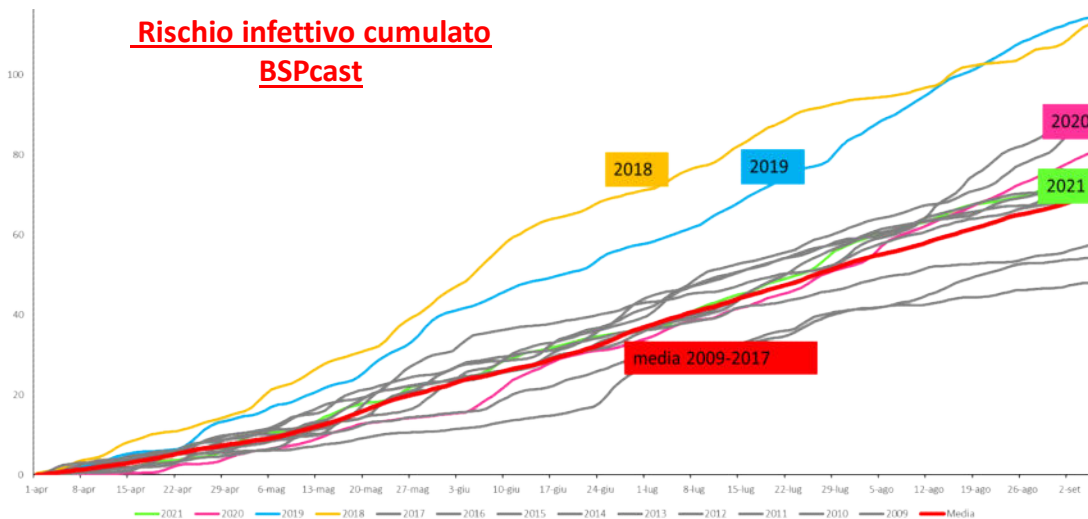
- Dal 2018 si assiste ad una grave **recrudescenza territoriale**
- Molteplici **attività sperimentali** in vari campi: epidemiologia e biologia, strategie di difesa, prevenzione agronomica (lavorazioni, sanizzazione, inoculi microbiologici)

Fattori critici

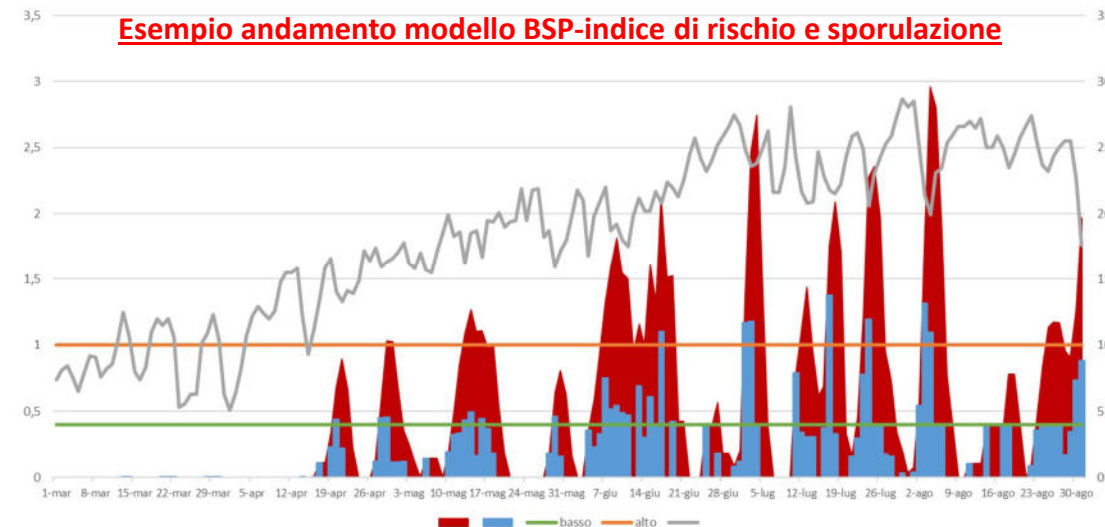
- Forte **incremento dell'inoculo** negli anni
- Numerose **revoche di formulati** e calo di efficacia delle sostanze attive
- **Maggior suscettibilità** delle piante causa situazioni di indebolimento
- ??? Sospetto variazione del **profilo tossigeno** in funzione di mutate condizioni meteo



**Rischio infettivo cumulato
BSPcast**



Esempio andamento modello BSP-indice di rischio e sporulazione



Programma di studio
volto al
contenimento di
Maculatura bruna
mediante tecniche di
silenziamento genico





Regione Emilia-Romagna



Settore
fitosanitario e
difesa delle produzioni
Emilia-Romagna



Organizzazione
Interprofessionale
PERA



Consorzio Fitosanitario

**SVILUPPO DI PROTOCOLLI PER L'INDUZIONE DI RESISTENZA/TOLLERANZA A
STEMPHYLIUM VESICARIUM
IN PERO TRAMITE STRATEGIE DI SILENZIAMENTO GENICO**



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Elena Baraldi
Marina Collina
Francesca Negrini
Zeraye Mehari Haile
Massimiliano Menghini**



**Bruno Mezzetti
Silvia Sabbadini
Angela Ricci
Luca Capriotti**



**Giuseppe Zuccherelli
Oriano Navacchi
Katiuscia Zuccherelli
Massimo Bastianelli**

Linee di lavoro



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

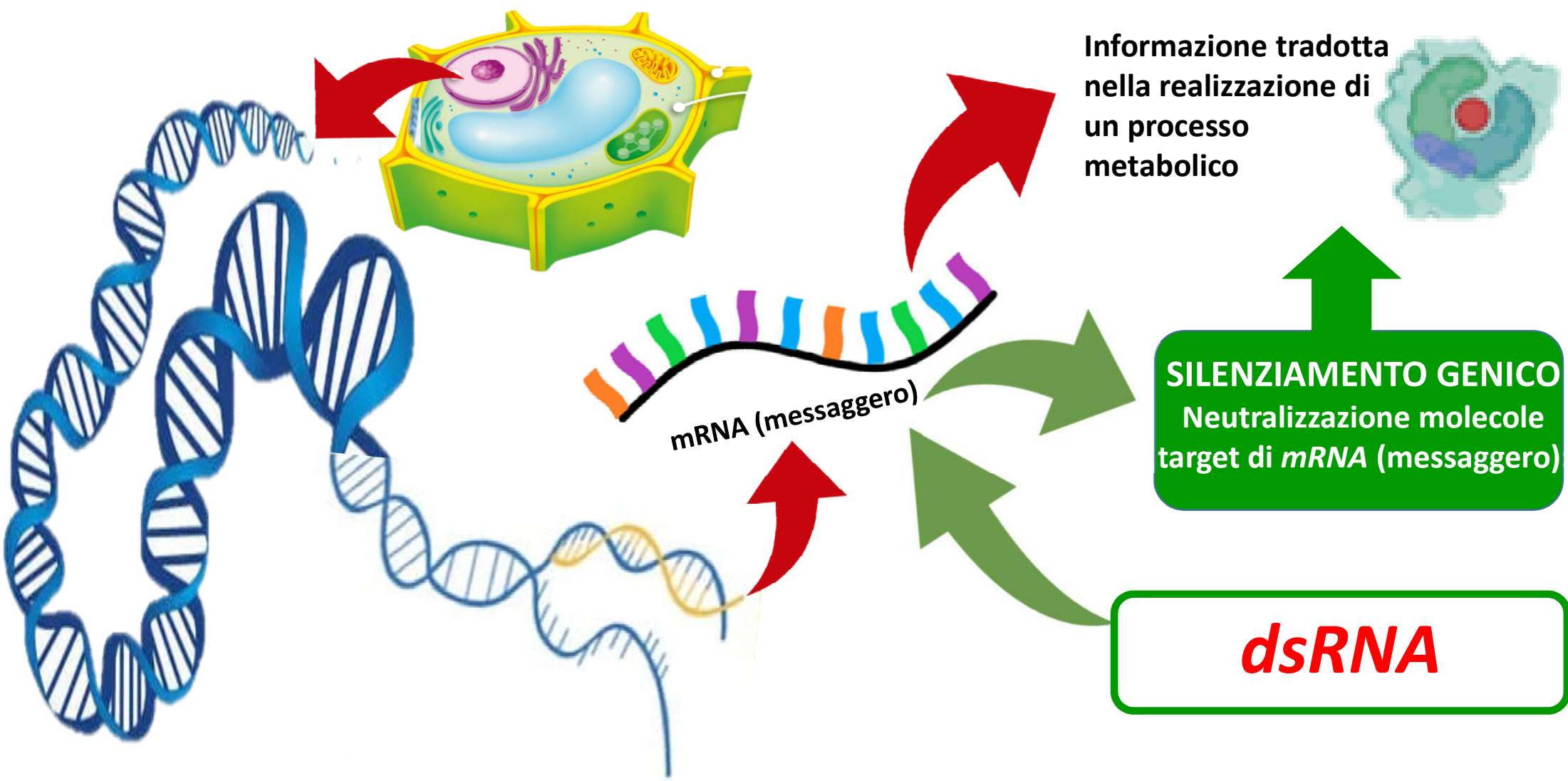
Messa a punto e produzione di molecole di *dsRNA* contro *Stemphylium vesicarium* per l'**applicazione esogena** su tessuti vegetali di pero (tecnica **SIGS**)



VITRO **plant**
Technologies for Agricultural Plants

Messa a punto di tecniche di silenziamento genico volte all'**espressione stabile in pianta** di molecole *dsRNA* contro geni target del patogeno e verifica della loro efficacia nel controllo di *S. vesicarium* (tecnica **HIGS**)

Come si realizza la tecnica del silenziamento genico



Informazione tradotta
nella realizzazione di
un processo
metabolico

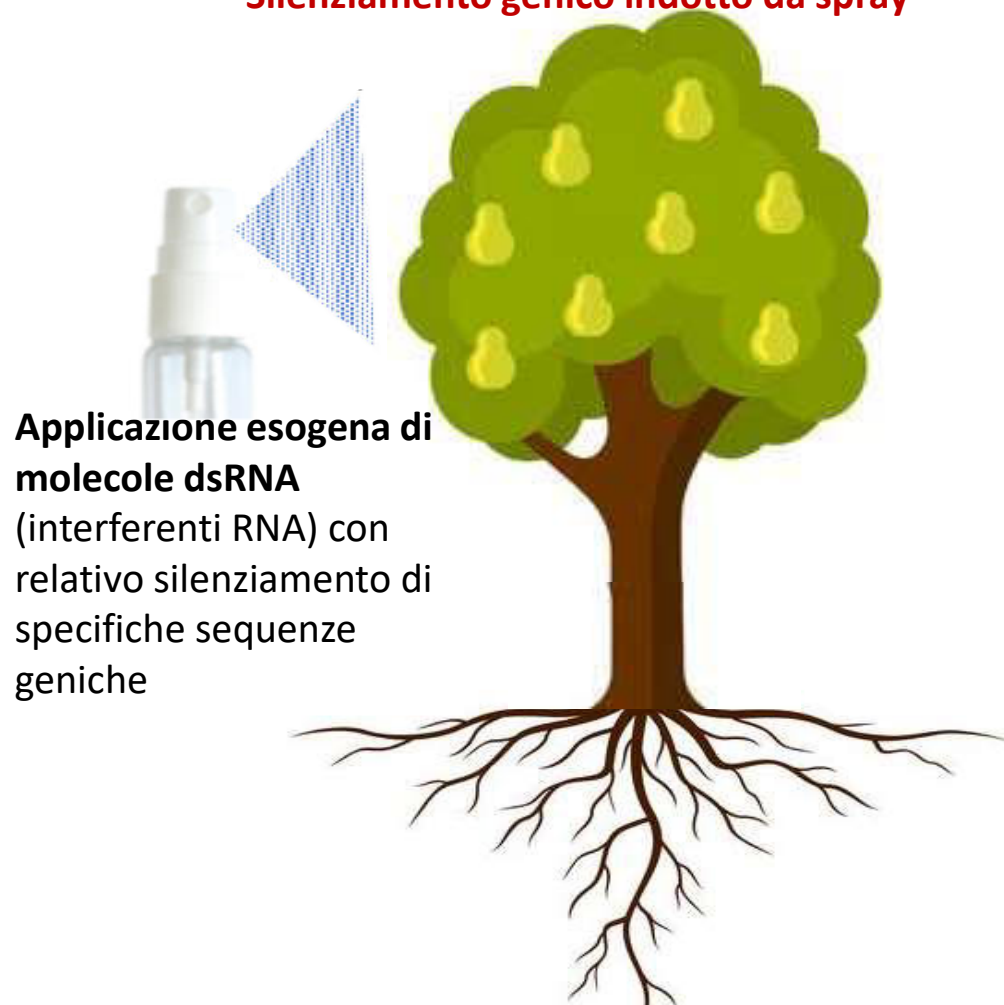
SILENZIAMENTO GENICO
Neutralizzazione molecole
target di mRNA (messaggero)

dsRNA

Silenziamento genico: come è possibile procedere?

SIGS

Silenziamento genico indotto da spray

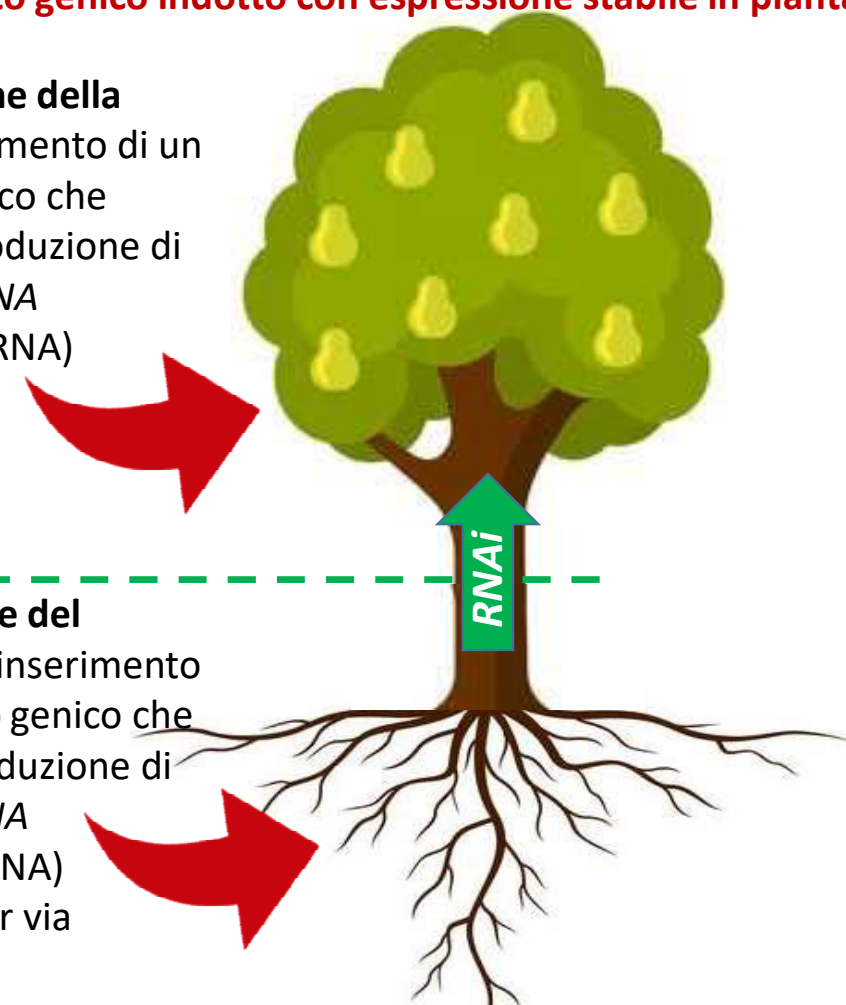


HIGS

Silenziamento genico indotto con espressione stabile in pianta

Trasformazione della varietà: inserimento di un costrutto genico che esprima la produzione di molecole dsRNA (interferente RNA)

Trasformazione del portainnesto: inserimento di un costrutto genico che esprima la produzione di molecole dsRNA (interferente RNA) traslocabile per via floematica



SIGS - Studio molecole dsRNA per applicazione spray



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA DI BOLOGNA

**Individuazione
sequenze target
del patogeno
(costitutivi o
epidemiologici)**



**Ingegnerizzazione
delle molecole
dsRNA in grado di
silenziare le
sequenze target**

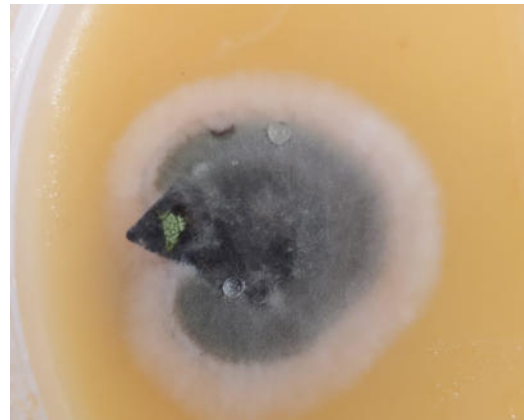
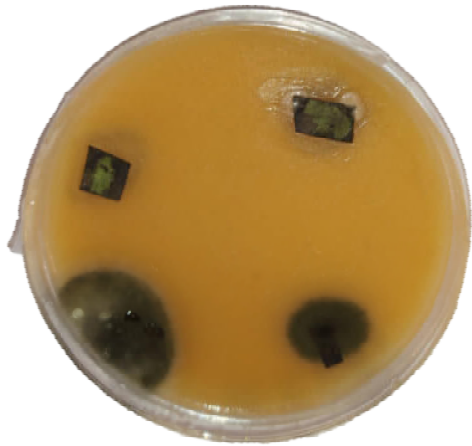
Targets	SOURCE
SvCYP51 (chimera 560 bp)	Cytochrome p 51. Fungicide target
SvsdhD (591 bp)	Succinate dehydrogenase subunit D /Complex II Fungicide target
SvTIM44 (400 bp)	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit. Sclerotinia sclerotiorum target gene analysis by Belmonte ,2017
SvTIF35 (419 bp)	Translation initiation factor eIF3. Database of essential genes DEG (Aspergillus fumigatus)
SvNOP4 (794 bp)	Database of essential genes DEG (Aspergillus fumigatus). Nucleolar protein required for ribosome biogenesis
SvCsn5_SvSec4 (637 bp chimera)	(Csn5) COP9 signalosome/Ubiquitin Proteasome mediated proteolysis. KO mutants silencing of multiple SM gene clusters in A. alternata. (SvSec4)GTPases involved in vesicle trafficking
SvLaeA (640 bp)	Methyltransferase/regulation of SM cluster expression by chromatin modification) A. alternata KO
AP-1-like protein- Transcription Factor (AP1)	Pathogen-Host interaction database Alternaria alternata KO mutant: loss of pathogenicity phenotype

SIGS - Studio molecole dsRNA per applicazione spray



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

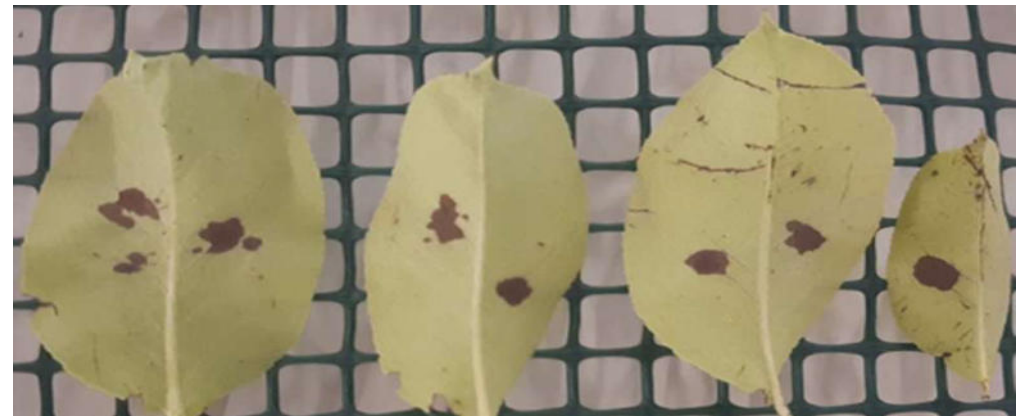
Isolamento e ottimizzazione dei protocolli di infezione artificiale



Drops $1 \cdot 10^5$ spores/mL



SPRAY $1 \cdot 10^5$ spores/mL

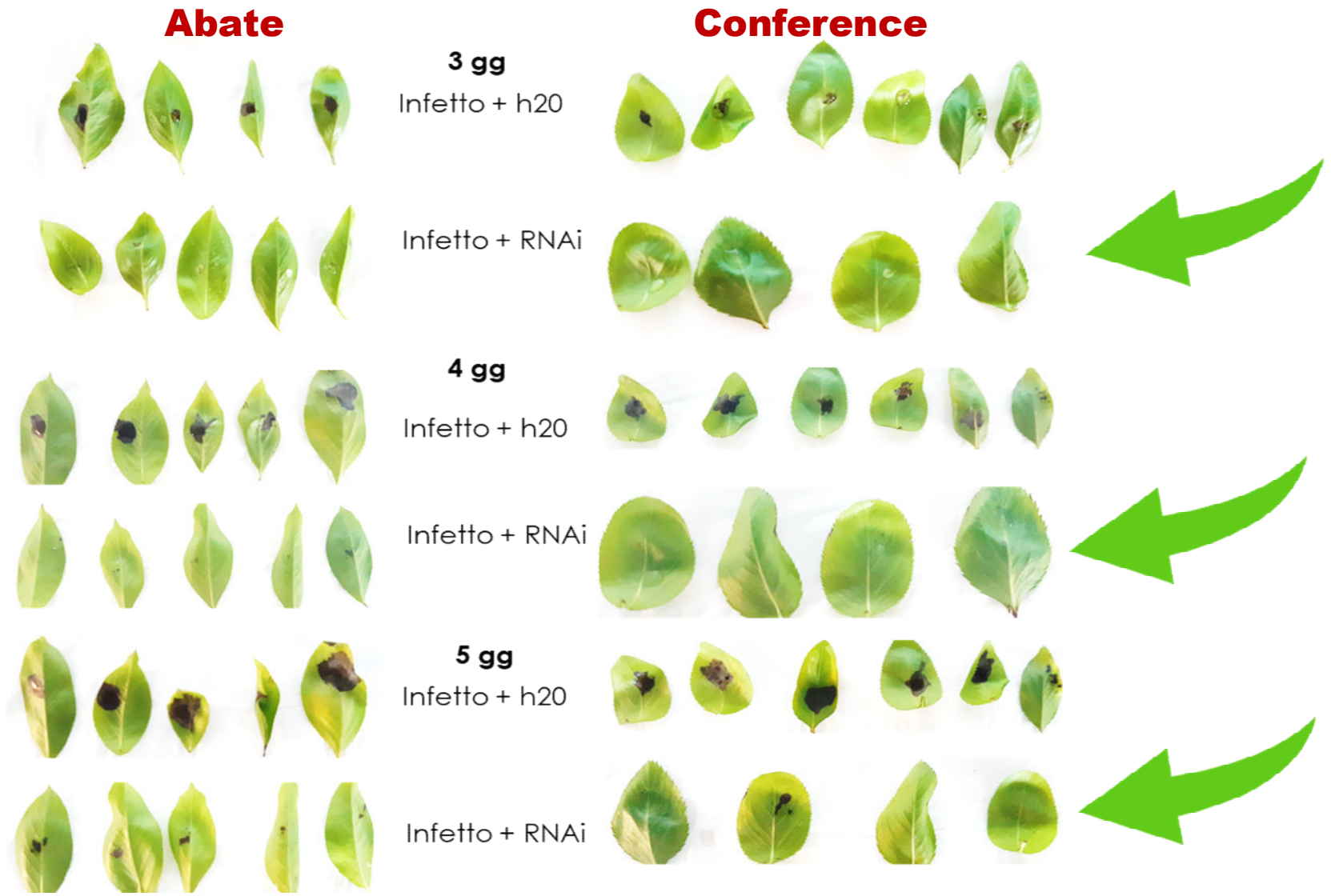




ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Saggio
dell'efficienza
delle molecole
dsRNA individuate**

SIGS - Studio molecole dsRNA per applicazione spray



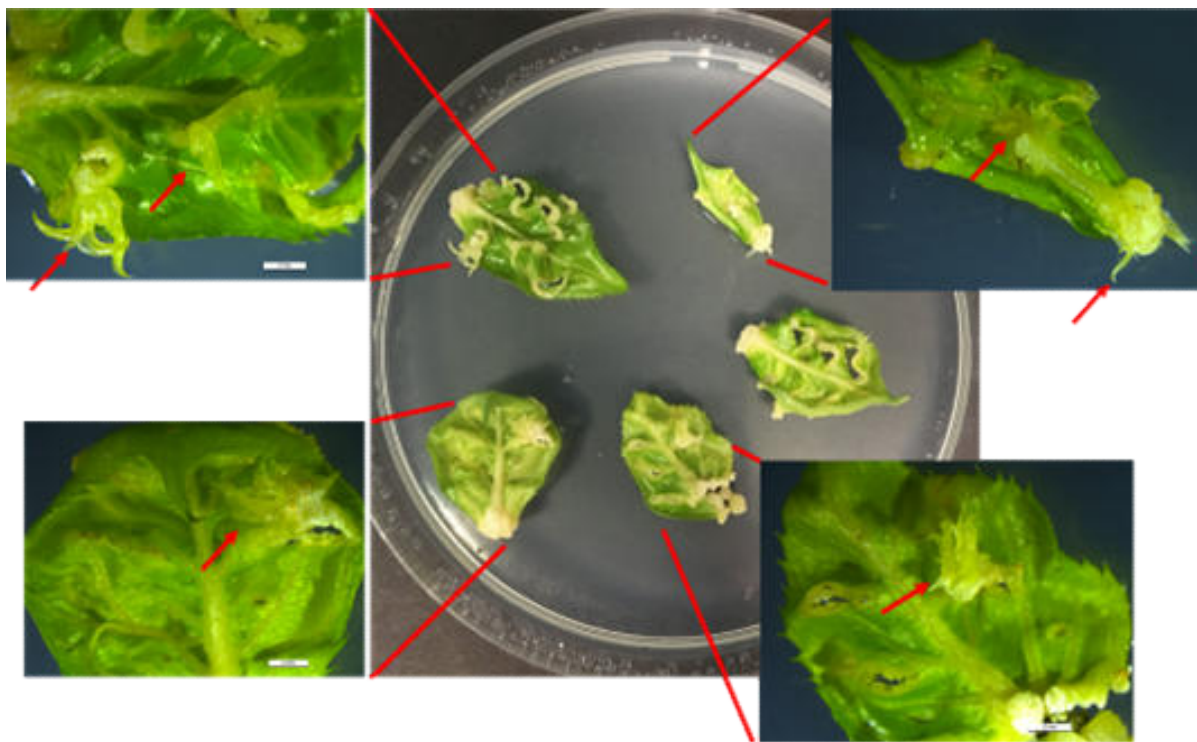


HIGS - espressione stabile in pianta di sequenze RNAi



VITROplant

Ottimizzazione del protocollo di rigenerazione da foglia in vitro di Abate Fétel, Conference, Farrold 87



TDZ 1 mg/L

Dati su 75 espianti totali
(a due mesi dalla prova):

Percentuale di
rigenerazione: 56%

Numero medio di
germogli/espianto: 1,71

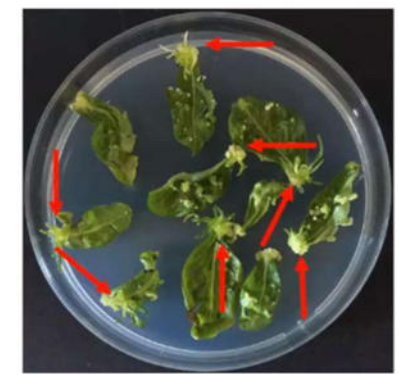


TDZ 2 mg/L

Dati su 75 espianti totali
(a due mesi dalla prova):

Percentuale di
rigenerazione: 45,3%

Numero medio di
germogli/espianto: 1,36





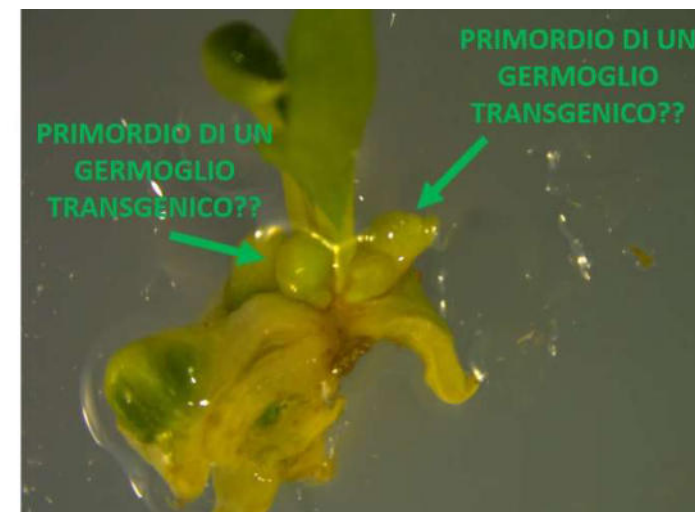
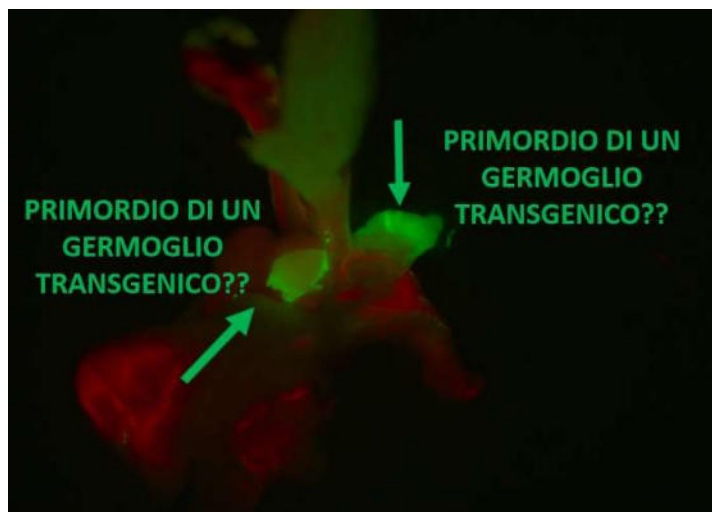
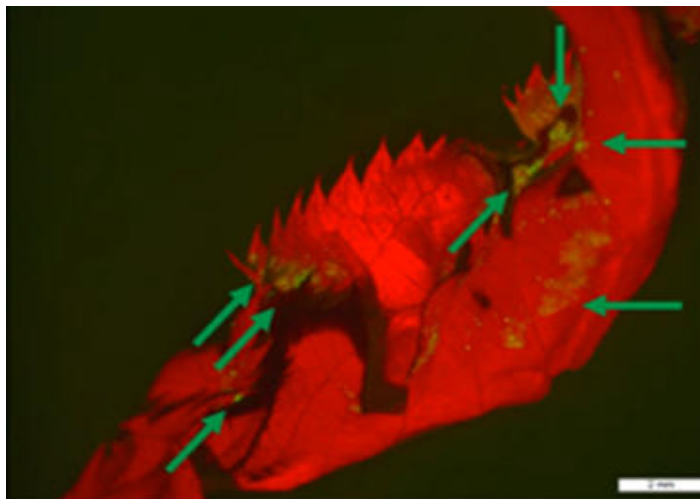
HIGS - espressione stabile in pianta di sequenze RNAi



VITRO **plant**


Ottimizzazione del protocollo di trasformazione genetica mediata da *Agroacterium tumefaciens* per l'inserimento di specifici costrutti:

- Verifica di differenti ceppi (ceppi EHA101, EHA105, GV3101)
- Verifica dell'efficienza mediante geni marcatori NPTII (resistente a kanamicina) e gene reporter eGFP (esprime Green Fluorescent Protein)




Stato di avanzamento e programma di lavoro

SIGS Silenziamento genico indotto da spray

- 
- Sono stati individuati più **geni target** sia costitutivi che alla base della produzione di tossine
 - Sono stati definiti ed ottimizzati i **protocolli di infezione** artificiale più consoni alla successiva verifica delle molecole *dsRNA*
 - Incoraggianti i primi risultati derivanti dal **saggio** delle molecole *dsRNA* verificate su tessuti vegetali in laboratorio

- 2022** - Predisposizione di un quantitativo funzionale di preparati *dsRNA* destinati alle prime verifiche in vivo attualmente realizzate su piante in serra
- Verifica assorbimento molecole *dsRNA* con differenti tecniche

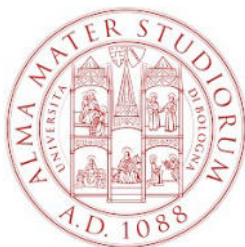
HIGS Silenziamento genico indotto con espressione stabile in pianta

- 
- Ottimi risultati relativi alla **rigenerazione** di Conference (88%), buon miglioramento per Abate Fetel (56%) e Farrold 87 (53%)
 - Sono stati individuati i ceppi di *A. tumefaciens* più adatti alla **trasformazione**

- 2022** Produzione di piante trasformate con inserimento di costrutti genici rispondenti agli interferenti ritenuti di maggior interesse

RNAi: Precision farming, sustainability and food safety.
Prospect for collaboration in the defense of agricultural production

Meeting bilaterale 15.6.2022 RER – GreenLight. Spring Place, New York
Meeting tecnico 16.6.2022 - sede di GreenLight a Durham (NC)



BIOPESTICIDI: METODI INNOVATIVI E SOSTENIBILI PER LA DIFESA DELLE COLTURE

 Regione Emilia-Romagna

Ciclo di webinar sulla Strategia europea Farm to Fork



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore



Università
degli Studi
di Ferrara



UNIMORE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA



UNIVERSITÀ
DI PARMA



*Grazie per
l'attenzione*

