

PIANO DI FORMAZIONE

Agricoltura di Precisione, diagnosi precoce e controllo dei patogeni vegetali: un caso di studio su *E. amylovora* and *S. vesicarium* sp. in melo e pero

L'assegno di ricerca è finanziato dal progetto Europeo WIDERABIOME HEALTH.

Kiwi [*Actinidia chinensis* Planch. var. *chinensis* e *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* (A. Chev.)] è una delle colture da frutto temperate di maggior pregio ed è un settore strategico per diverse Regioni italiane.

La produzione di kiwi, concentrata per lo più in Cina, Italia e Nuova Zelanda, genera un valore agricolo significativo di oltre tre miliardi di euro annui, con un valore di mercato al dettaglio di oltre dieci miliardi di euro (dati FAO, 2017).

La Moria del Kiwi (sindrome da declino del kiwi o KVDS) colpisce sia *Actinidia chinensis* var. *chinensis*, sia *A. chinensis* var. *deliciosa* ed è prevalente nei suoli affetti da ristagno idrico o scarsa aerazione, suggerendo un'origine fisiologica di questo disturbo. Evidenze recenti hanno suggerito un ruolo della comunità microbica della rizosfera, poiché le piante sane e affette da KVDS mostrano comunità batteriche e fungine distinte. Questi cambiamenti creano una condizione disbiotica che porta alla KVDS su piante con un apparato radicale cronicamente stressato. Diversi microrganismi patogeni, come *Phytophthora* spp., *Phytophthora vexans* e *P. chamaeophyphos* spp., *Desarmillaria tabescens* e *Clostridium bifermentans* e *C. subterminale*, sono stati trovati associati a questi cambiamenti nel microbioma della rizosfera. Nonostante ciascuno degli agenti patogeni sia in grado di indurre, in condizioni artificiali, sintomi gravi simili alla KVDS, la complessa interazione tra i cambiamenti nell'ambiente radicale e l'insorgenza della KVDS necessita ancora di ulteriori studi per essere chiarita.

OBIETTIVI:

Testare strumenti di rilevamento precoce e informatici/SA per gestire meglio la dispersione e le epidemie di agenti patogeni – La ricerca si baserà su campioni provenienti da frutteti in pieno campo (o frutteti pilota italiani) e dai mesocosmi RCP8.5. Verrà eseguita principalmente la diagnosi basata sui VOCs per il rilevamento precoce dei patogeni in diverse condizioni ambientali. Le informazioni raccolte dei dati climatici e del rilevamento in laboratorio/mesocosmi/campo saranno integrate considerando la cultivar, la regione, il patogeno, il microbioma, RCP 8.5

Sviluppare strumenti di controllo di precisione nell'ambito dell'RCP8.5. Questo compito si baserà su due approcci paralleli: la selezione di agenti di biocontrollo (BCA) e l'inserimento di comunità sintetiche SynComs

Isolamento e caratterizzazione dei BCA – Parallelamente alla caratterizzazione del microbiota mediante NGS, isoleremo ceppi batterici e fungini (inclusi i patogeni) dai frutteti pilota/di campo e dai pato/microbiomi dei mesocosmi RCP8.5 utilizzando metodi di coltura. Gli isolati caratterizzati per l'idoneità saranno testati a temperatura normale e fino a 48°C (utilizzati anche nel mesocosmo RCP8.5). Taxa/ceppi resistenti alla temperatura e alla siccità, tra cui *E. amylovora*, *S. vesicarium* e ceppi BCA candidati come *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. verrà selezionato. L'effetto della temperatura sarà valutato sulla sopravvivenza e sulla biologia di *E. amylovora* (ad esempio crescita, determinanti della virulenza, motilità, rilevamento del quorum)

e sulla sopravvivenza e biologia di **S. vesicarium** (ad esempio crescita, fattori di virulenza, sporulazione, hsp, ecc.)). I BCA candidati resistenti verranno sequenziati e verranno identificati i geni chiave che consentono la crescita a RCP8.5. La maggior parte dei BCA resistenti e bioattivi a RCP8.5 saranno caratterizzati per tratti di compatibilità e composti bioattivi (ad esempio, AMP).

Engineering SynComs: i BCA tolleranti più compatibili verranno testati per creare SynCom. Per questo, i metadati dei tratti fisico-chimici/biologici dei ceppi candidati verranno analizzati *in silico* (ad esempio, Biolog, pH, produzione IAA, ACC-deaminasi) per selezionare le combinazioni più compatibili/stabili di SynCom (contro *E. amylovora* o *S. vesicarium*) ad alta T^a (UNIBO/ Requimte/UP). Gli algoritmi intelligenti di cui sopra impareranno con il crescente numero di ceppi e temperature. I metodi di ingegneria e di consegna (formulazioni) saranno ottimizzati per ciascuna combinazione SynCom e la loro stabilità sarà testata per ~20 generazioni in vitro e successivamente in planta (valutando la capacità di colonizzazione e la persistenza di SynCom mediante qPCR) in scenari normali rispetto a scenari RCP8.5. Verranno profilati gli effetti di SynComs sul patobioma (fisiologia, omics). I candidati devono avere conoscenze di biologia molecolare vegetale e/o fisiologia vegetale e/o patologia vegetale/interazioni pianta-microbo

La ricerca coinvolge aspetti di laboratorio e di pieno campo. Il candidato selezionato assisterà il responsabile della ricerca in tutti gli aspetti della pianificazione, implementazione e gestione del programma di ricerca. I compiti principali saranno la raccolta e l'analisi dei dati, la preparazione di presentazioni e pubblicazioni scientifiche e la supervisione degli studenti.

Compiti e descrizione del lavoro:

70% – Progettazione e gestione di sperimentazioni per valutare l'influenza del microbioma nella risposta delle piante alle malattie. Progettazione e gestione di studi per sviluppare e validare sistemi diagnostici precoci, efficacia di BCA o SynCom. Isola, identifica e caratterizza batteri provenienti da diversi organi vegetali. Studiare l'espressione genica in piante trattate con PGPB/BCA/patogeni selezionati. Analisi della risposta metabolica (es. emissione di COV, produzione di metaboliti secondari) e fisiologica (es. attività fotosintetica, conduttanza degli stomi) delle piante ai trattamenti microbici in diverse condizioni di stress (es. condizioni di siccità o ristagno idrico).

20% - Serra e lavoro sul campo. Raccogliere campioni di piante dal meleti e pereti affetto da colpo di fuoco o maculatura bruna. Raccogliere campioni in frutteti con diverse strategie di coltivazione, e aree geografiche. Applicazione di ceppi selezionati in serra o in campo. Valutare le prestazioni fisiologiche e produttive dell'albero (differenziazione delle gemme, allegagione, diametro del tronco, lunghezza dei germogli e sviluppo della chioma, resa, sviluppo delle radici, allocazione dell'amido nei diversi organi). Raccogliere e analizzare le condizioni ambientali (dati climatici) e gli input agricoli (irrigazione, fertilizzazione). Comunicare con coltivatori e tecnici per la corretta gestione degli appezzamenti sperimentali.

10% - Formare e supervisionare studenti e tirocinanti di laurea e master. La supervisione include la pianificazione, l'assegnazione e l'approvazione del lavoro. Assistere altri docenti e tecnici nella realizzazione di esperimenti collaborativi.

Precision Detection and Control of Plant Pathogens: the case study of *E. amylovora* and *S. vesicarium* sp. in apple/pear

The fellowship is funded by the European Project WIDERA: BIOMEHEALTH.

Italy is the second largest EU producer of apples (2.2 Mt/year). In 2021, Italy was the 4th EU largest pear producer (273,450 t/year), but lost its leadership due to the high losses caused by pathogens like *S. vesicarium* and climate change. The World Apple and Pear Association (WAPA) forecasts for 2024 that EU apples and pear will reach ~11.4 Mtons and ~1.7 Mtons respectively, below 3.3% and 12.8%, the values of 2022. This decrease is mainly due to prolonged heat/drought episodes and extreme out-season storms (e.g., Portugal/Spain had during 2023 a severe prolonged drought, and the northern/eastern EU had a drought period in June/July). Italy was mostly affected by extreme storms and heat/drought, which, according to WAPA. Climate change impacts are aggravated by the increasing number of hectares infected with pathogens, whose behavior under climate change remains unquantified. The main pathogens are:

E. amylovora causes sudden and severe disease in Rosaceae and may lead to the tree death. Primary infection occurs at blooming, when pathogen control is very challenging and the risk of phytotoxicity high. Furthermore, secondary infections may occur from May to late October posing serious difficulty for a seasonal-long control of this disease. In addition, no efficient treatments are available (only sanitary pruning and use of Cu-based compounds). Finally, no in-site, fast and reliable diagnostic methods exists to precisely tailor control inputs and minimize pesticide use.

S. vesicarium causes a critical fungal disease in pear, with a devastating incidence in specific pear cultivars such as Abbé Fétel. The first symptoms of fruit are observed at the fruit set. Identification of *S. vesicarium* conidia and *P. allii* ascospores is normally accomplished through spore trap devices and optical microscope observations. Molecular markers and specific metabolites can also be used for distinguishing *S. vesicarium* isolates. Identification of risk factors (e.g., levels of inoculum, T^a, wetness, host cultivar) are being used to predict brown spots in pear (an advisory system to reduce fungicide inputs is BSPcast

AIMS:

Test Early detection and informatic/SA tools to better manage pathogen dispersal and outbreaks– The research will be based on samples from field-orchards (or Italian pilot orchards) and the RCP8.5-mesocosms. Primarily, VOC-based diagnosis for early pathogen detection under different environmental conditions will be performed. The compiled information of climatic data and of lab/mesocosms/field detection will be integrated considering the cultivar, region, pathogen, microbiome, RCP 8.5

Develop Precision Control tools under RCP8.5 This task will be based on two parallel approaches: the selection of biocontrol agents (BCAs) and the entering of synthetic communities SynComs

BCAs isolation and characterization – In parallel to the microbiota characterization by NGS, we will isolate bacterial and fungal strains (including pathogens) from the field/pilot orchards and the RCP8.5-mesocosms patho/microbiomes using culturing methods. Isolates characterized for fitness will be tested at normal temperature and at up to 48°C (also used in RCP8.5 mesocosm).

Temperature and drought resistant taxa/strains including *E. amylovora*, *S. vesicarium*, and candidate BCA strains like *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. will be selected. The effect of temperature will be assessed on *E. amylovora* survival and biology (e.g., growth, virulence-determinants, motility, quorum-sensing), and *S. vesicarium* survival and biology (e.g., growth, virulence factors, sporulation, hsp, etc.). Resistant candidate BCAs will be sequenced and key genes enabling growth at RCP8.5 identified. Most RCP8.5 resistant and bioactive BCAs will be characterized for compatibility traits, and bioactive compounds (e.g, AMPs).

Engineering SynComs – Most compatible tolerant BCAs will be tested to build SynComs. For that, candidate strains physicochemical/biological traits metadata will be *in silico* analyzed (e.g., Biolog, pH, IAA-production, ACC-deaminase) to sort the most compatible/stable combinations of SynCom (against *E. amylovora* or *S. vesicarium*) at high T^a. The above smart algorithms will learn with the increasing number of strains and temperatures. Engineering and delivery (formulations) methods will be optimized for each SynCom combination, and their stability tested for ~20 generations *in vitro* and later *in planta* (assessing colonization ability and persistence of SynCom by qPCR) at normal vs. an RCP8.5 scenarios. SynComs effects on pathobiome will be profiled (physiology, omics).

Applicants should have a background in plant molecular biology and/or plant physiology and/or plant pathology/plant-microbe interactions

Research involves laboratory and field trials. The selected candidate will assist the program leader with all aspects of the planning, implementation and management of the research program. The main duties will be collecting and analyzing data, preparing presentations and scientific publications, and supervision of students.

Position Duties:

70% – Laboratory analysis (in Bologna). Design and management of trials to assess the influence of microbiome in plant response to diseases. Design and management of trials to develop and validate early diagnostic systems, efficacy of BCA or SynCom. Isolates, identify and characterize bacteria from different plant organs. Study the gene expression in plants treated with selected PGPB/BCA/pathogens. Analysis plant metabolic (e.g. VOCs emission, secondary metabolite production) and physiological response (e.g. photosynthetic activity, stomata conductance) to microbial treatments in different stress conditions (e.g. drought or water logging conditions).

20% – Green house and field work. Collect plant samples from apple and pear affected orchard. Collect sampling from different growing conditions and geographical areas. Applying selected strains in green-house or field conditions. Assess physiological and productivity performances of tree (bud differentiation, fruit set, trunk diameter, shoot length and canopy development, yield, root development, starch allocation in different organs). Collect and analyses environmental conditions (climatic data) and agricultural inputs (irrigation, fertilisation). Communicate with growers and technicians for the correct management of the experimental plots.

10% – Train and supervise bachelor and master students and trainees. Supervision includes planning, assigning, and approving work. Assist other faculty and technicians in carrying out cooperative experiments.