UNIONE EUROPEA

FONDO EUROPEO AGRICOLO
PER LO SVILUPPO RURALE:
L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI

REPUBBLICA ITALIANA

REGIONE SICILIANA
ASSESSORATO REGIONALE DELL'AGRICOLTURA,
DELLO SVILUPPO RURALE E DELLA
PESCA MEDITERRANEA

PSR SICILIA 2014 2022
PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE

«Innovazioni tecnologiche (genetiche, fitosanitarie e agronomiche) per la valorizzazione e la tracciabilità dell'Arancia rossa di Sicilia»

NovArancia

Implementazione del processo di certificazione fitosanitaria delle piante madri

Giuseppe Scuderi, PhD

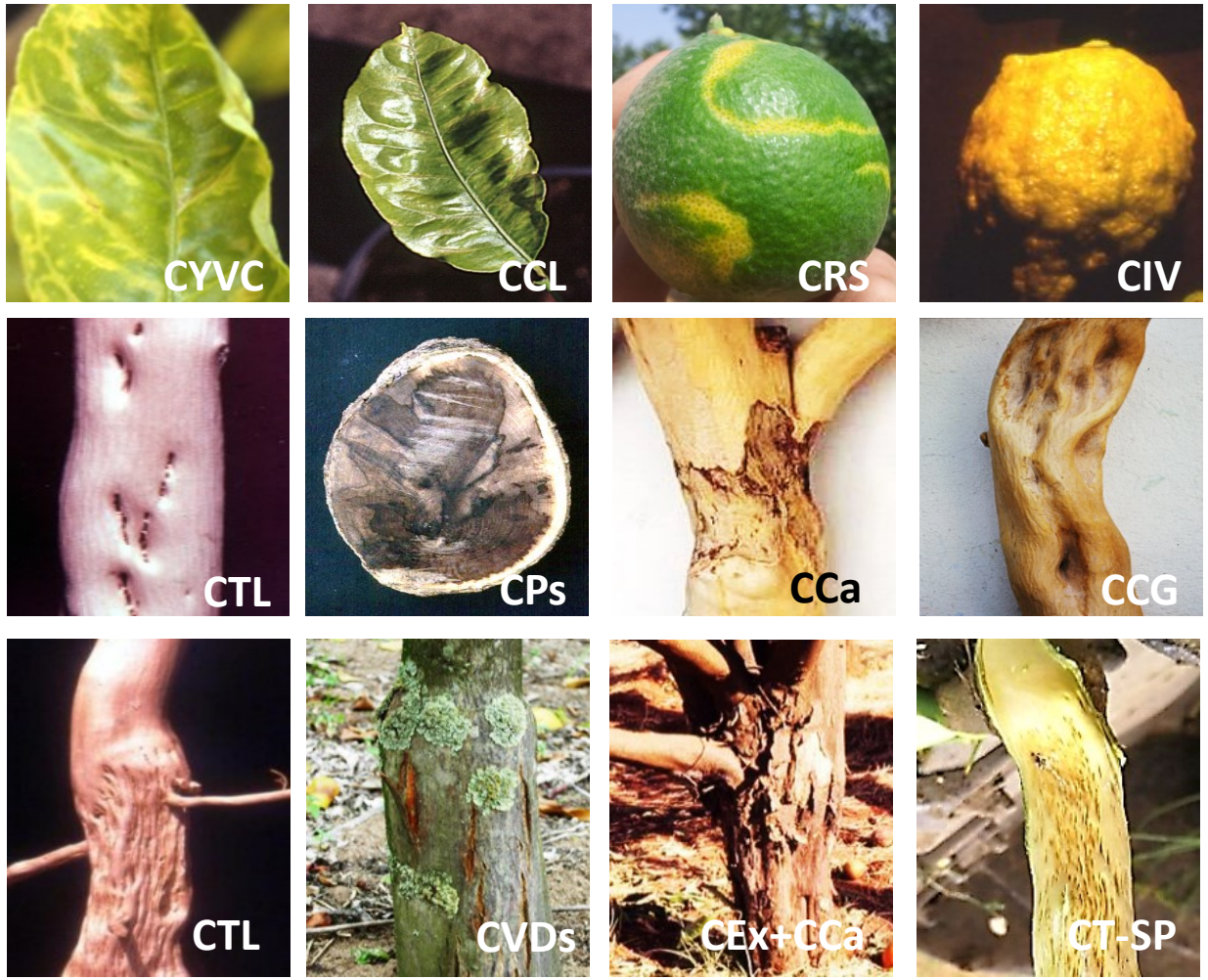
AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

COSTANTI MINACCE…

- VIRUS
- VIROIDI
- FITOPLASMI
- AGENTI VIRUS-SIMILI

Mortificano resa produttiva e qualità dei frutti, morte piante

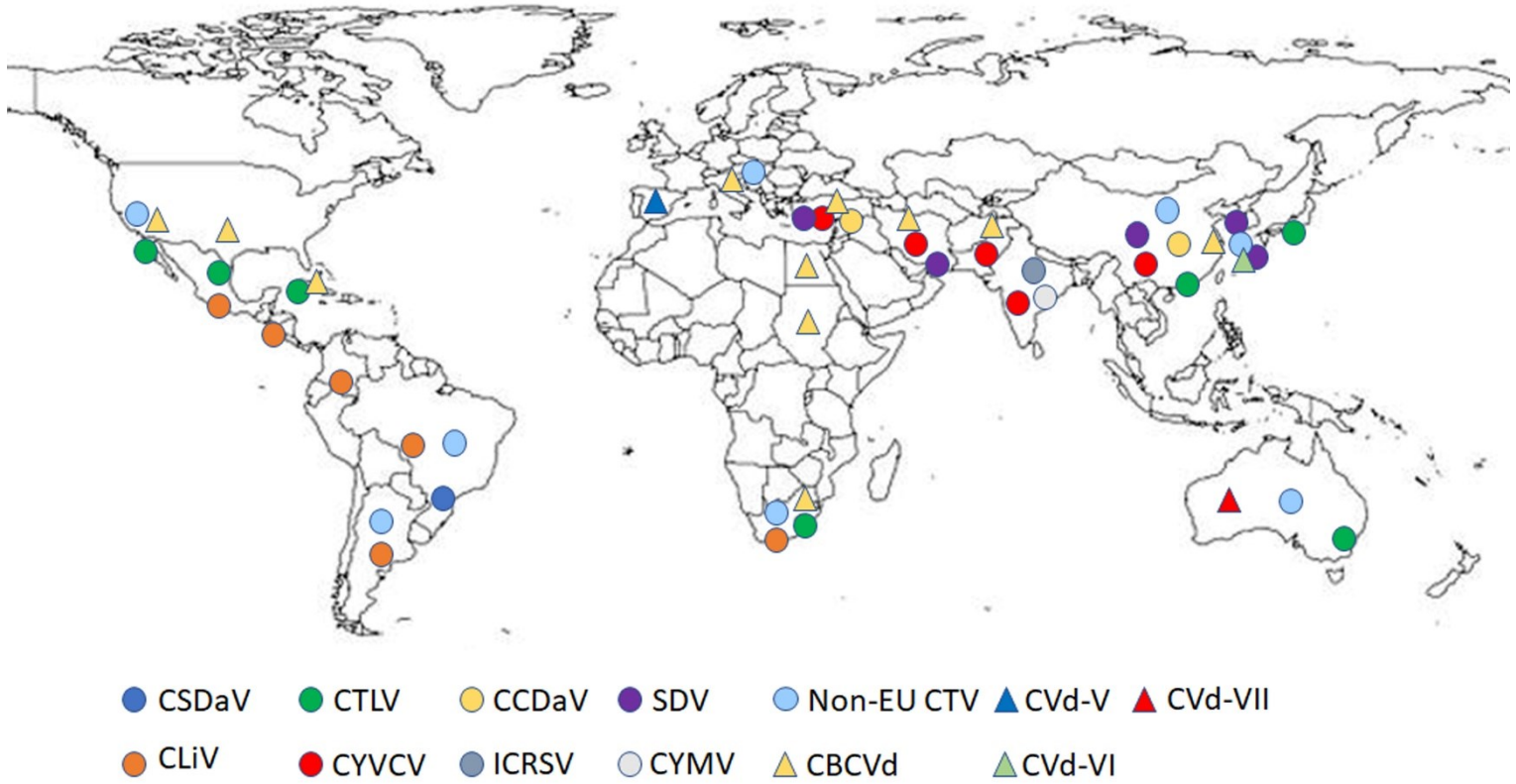
Impiego di materiale di propagazione esente da questi patogeni sistemici!!



AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

L'EVOLUZIONE NELLA DIAGNOSI

- Molteplici problematiche rendono complicata gestione fitosanitaria
- La globalizzazione, i cambiamenti climatici, l'introduzione di nuove specie e varietà hanno accresciuto i rischi
- Le tecnologie sono in continuo aggiornamento e danno un grosso aiuto nella sorveglianza del territorio
- Vanno impiegate con discrezione e in maniera condivisa



Licciardello et al, 2021. Agriculture (11) 400

AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

"Novarancia", PSR Sicilia 2014-2020

LA CERTIFICAZIONE FITOSANITARIA IN ITALIA

Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale„ n. 47 del 25 febbraio 2021 - Serie generale

Spediz. abb. post. - art. 1, comma 1 Legge 27-02-2004, n. 46 - Filiale di Roma

GAZZETTA UFFICIALE

DELLA REPUBBLICA ITALIANA

PARTE PRIMA Roma - Giovedì, 25 febbraio 2021 SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DELLA GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA, 70 - 00186 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - VIA SALARIA, 691 - 00138 ROMA - CENTRALINO 06-85081 - LIBRERIA DELLO STATO PIAZZA G. VERDI, 1 - 00198 ROMA

D.L. 2 febbraio 2021, n. 18

N. 14/L

DECRETO LEGISLATIVO 2 febbraio 2021, n. 18.

Norme per la produzione e la commercializzazione dei materiali di moltiplicazione e delle piante da frutto e delle ortive in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625.

Prevede diverse categorie di certificazione:

• Conformità Agricola Comunitaria (CAC)	Obbligatoria
• Certificazione Europea (UE)	Volontaria
• Qualità Vivaistica Italia (QVI)	Volontaria (+ livello di garanzia extra)

Regolamenta piante madri di categoria:

«base»
«Pre-base»
«certificato»

AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

SCREENING FITOSANITARIO DELLE PIANTE CAPOSTIPITI

Accertamenti fitosanitari effettuati sui principali cloni di arancio a polpa rossa

a) Analisi immunoenzimatiche e molecolari

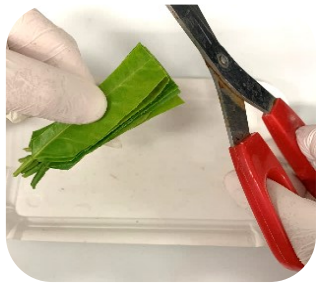
b) Test biologici in serra su piante indicatrici

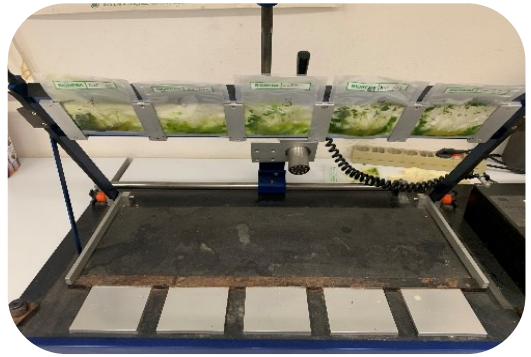
c) Sequenziamento NGS e analisi bioinformatica degli small RNA di virus e viroidi

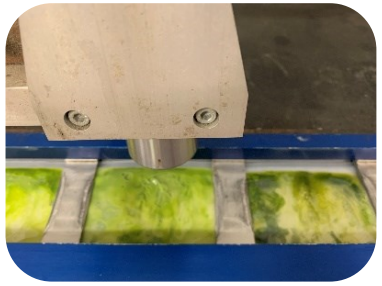
ANALISI DI LABORATORIO

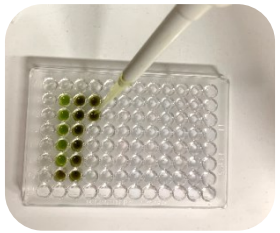
SAGGI IMMUNOENZIMATICI

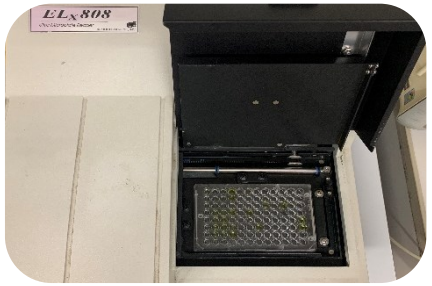
- Rapidi…1-2 gg
- Utilizzano anticorpi specifici per ciascun patogeno
- Effettuati singolarmente per ciascuna malattia, per ciascuna pianta

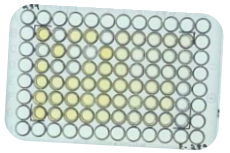












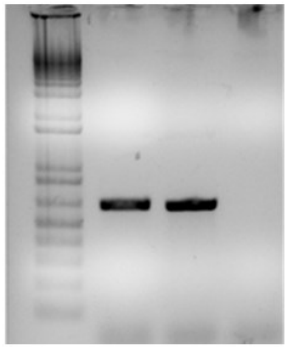
AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

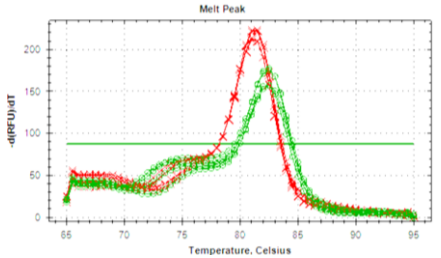
"Novarancia", PSR Sicilia 2014-2020

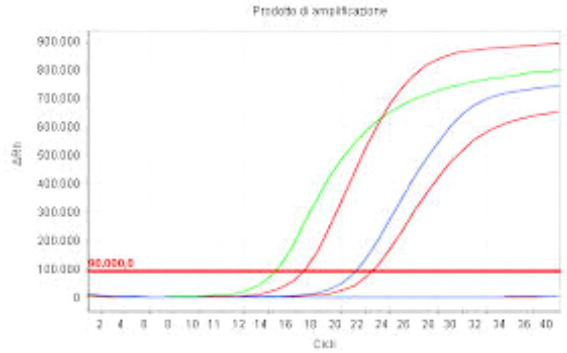
ANALISI DI LABORATORIO

SAGGI MOLECOLARI

- Rapidi (RT-PCR…1 g; real time RT-PCR…2-3h)
- Non perseguibili per malattie di cui non si conosce la sequenza dell'agente patogeno (Cristacortis, Impietratura) ⟶ Bioindexing
- Richiedono numerosi test/pianta da saggiare (primer e sonde specifici/patogeno)





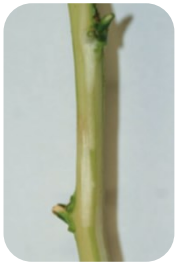


AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

"Novarancia", PSR Sicilia 2014-2020

SAGGI BIOLOGICI

- Affidabili (manifestano il sintomo caratteristico)
- Richiedono tempo…..(10-12 mesi)
- Impegnativi (oltre 100 piante indicatrici)
- Serre termo-condizionate a regime h24

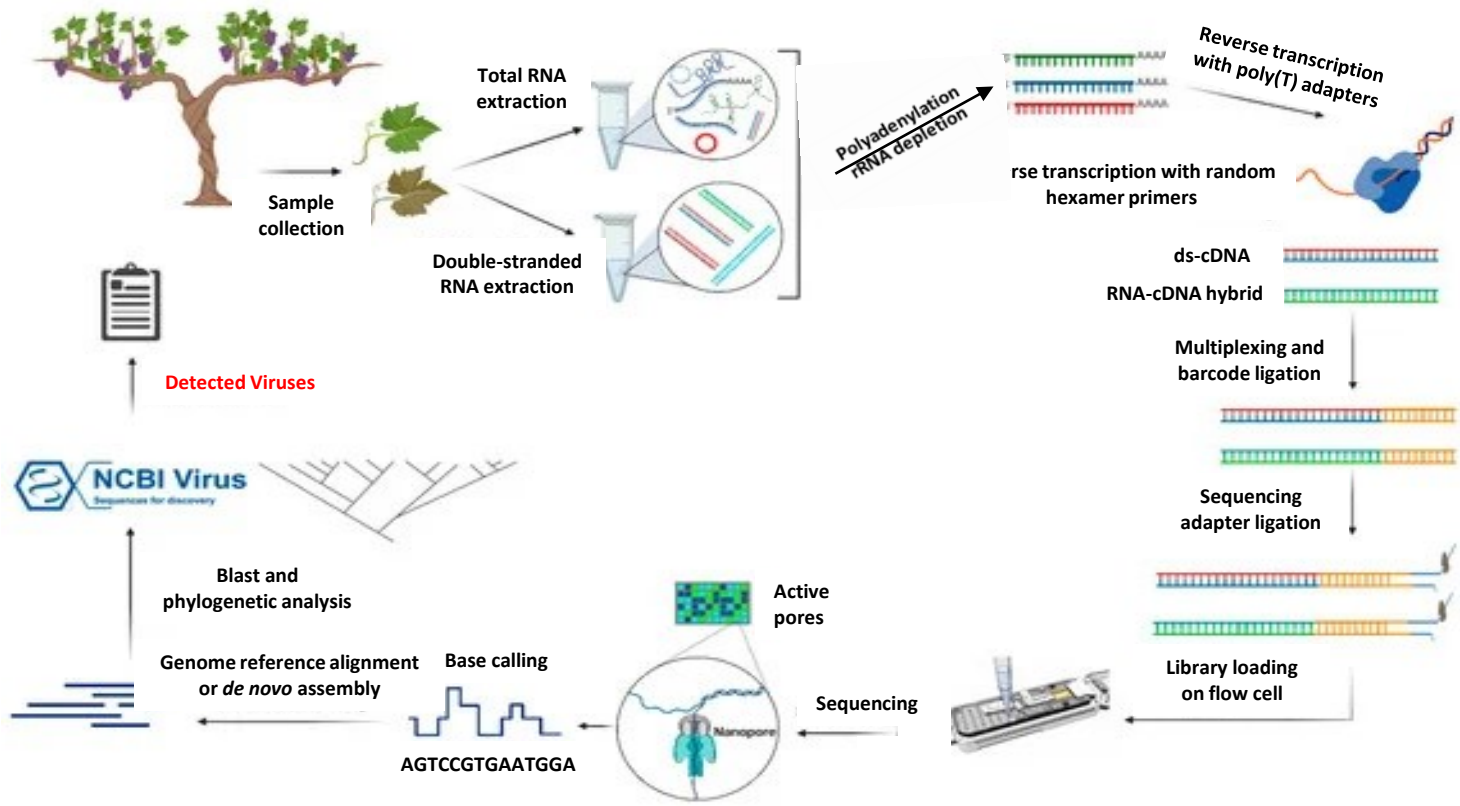


AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

"Novarancia", PSR Sicilia 2014-2020

ANALISI METAGENOMICA

- Sfrutta la tecnologia del sequenziamento NGS
- Consente rilevamento simultaneo (3 mesi) di TUTTI i virus e viroidi
- Analisi di frammenti di RNA – Sequenziamento NGS – Pipeline bioinformatica
- Omologia % tra sequenze ottenute e genomi ricercati
- Copertura >90% distinzione di genotipi specifici e ceppi virali

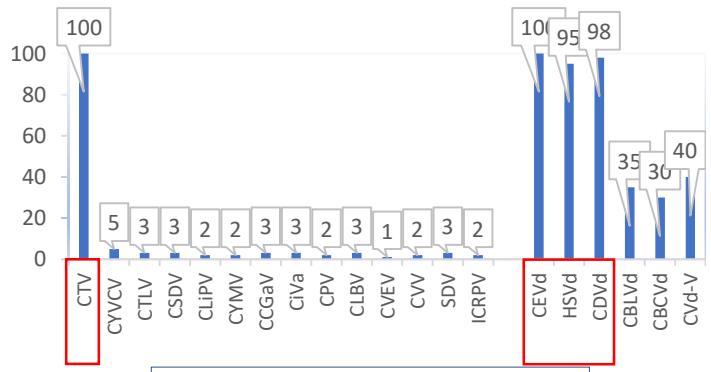


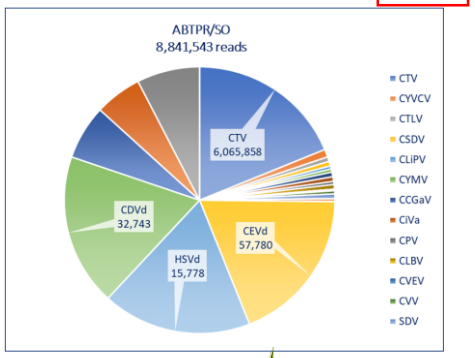
"Novarancia", PSR Sicilia 2014-2020

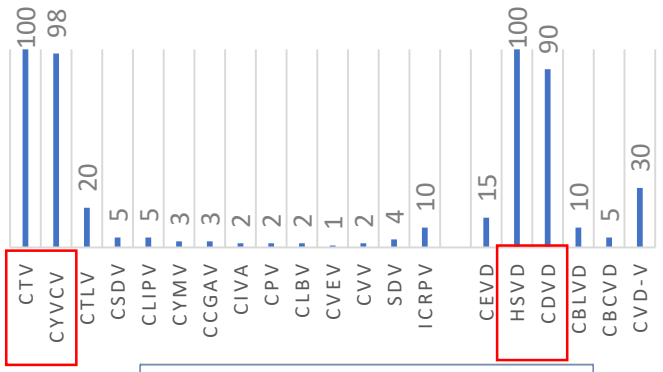
AgroBioTech biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

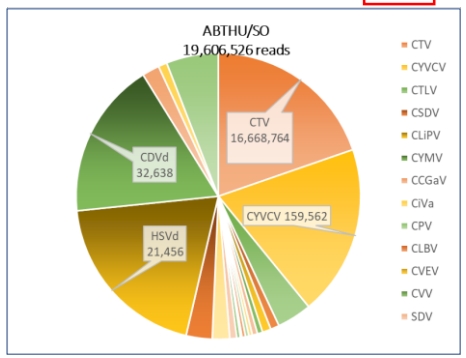
ANALISI METAGENOMICA

- Rilevamento simultaneo dei virus e viroidi presenti
- Numero elevato di reads associate
- Alert per organismi inattesi, sconosciuti/minacce







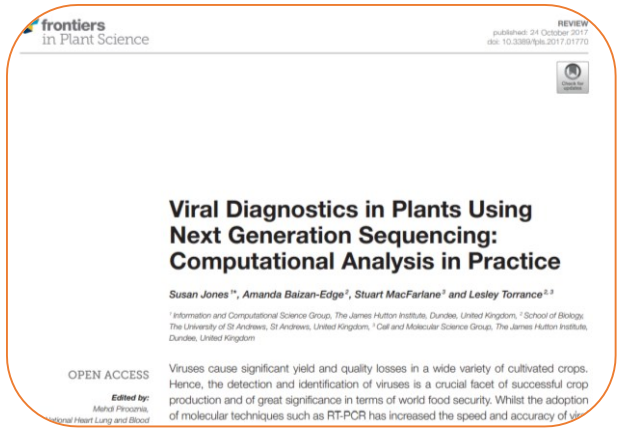


"Novarancia", PSR Sicilia 2014-2020

- *Citrus tristeza virus, CTV*
- *Citrus leaf blotch, CLBV*
- *Citrus concave gum virus, CCGaV*
- *Citrus psorosis virus, CPV*
- *Citrus tatter leaf virus, CTLV*
- *Citrus yellow vein clearing virus, CYVCV*
- *Indian citrus ringsport virus, ICRSV*
- *Citrus variegation virus, CVV*
- *Citrus sudden death virus, CSDV*
- *Citrus yellow mosaic virus, CYMV*
- *Citrus leprosis virus, CiLVC*
- *Citrus vein enation, CVEV*
- *Satsuma dwarf virus, SDV*
- *Citrus virus A, CiVA*
- *Citrus exocortis viroid, CEVd*
- *Hop stunt viroid, HSVd*
- *Citrus bent leaf viroid, CBLVd*
- *Citrus bark cracking viroid, CBCVd*
- *Citrus viroid V, CVd-V*
- *Citrus viroid VI, CVd-VI*

ANALISI METAGENOMICA

- Step successivi per confronto risultati
- Protocollo integrato…pochi mesi, max accuratezza, diagnosticare presenza tutti patogeni a RNA (noti e sconosciuti)
- Numerose pubblicazioni a supporto
- Diversi Paesi (Australia) impiego in diversi settori



frontiers in Plant Science

REVIEW

published: 24 October 2017

doi: 10.3389/fpls.2017.01770

Viral Diagnostics in Plants Using Next Generation Sequencing: Computational Analysis in Practice

Susan Jones[1]*, Amanda Baizan-Edge[2], Stuart MacFarlane[3] and Lesley Torrance[2,3]

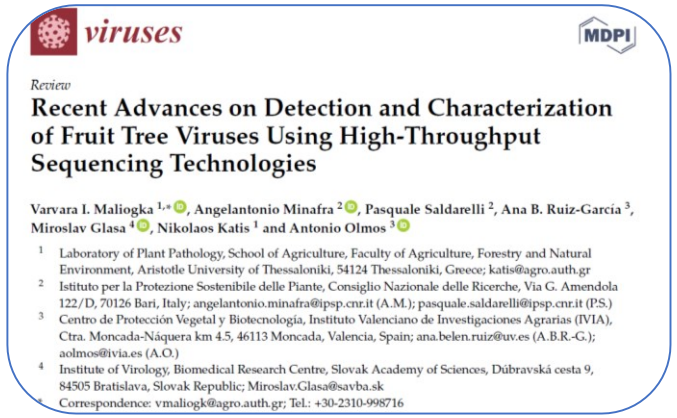
[1] Information and Computational Science Group, The James Hutton Institute, Dundee, United Kingdom, [2] School of Biology, The University of St Andrews, St Andrews, United Kingdom, [3] Cell and Molecular Science Group, The James Hutton Institute, Dundee, United Kingdom

OPEN ACCESS

Edited by:

Mehdi Pirooznia, National Heart Lung and Blood

Viruses cause significant yield and quality losses in a wide variety of cultivated crops. Hence, the detection and identification of viruses is a crucial facet of successful crop production and of great significance in terms of world food security. Whilst the adoption of molecular techniques such as RT-PCR has increased the speed and accuracy of vi



viruses

MDPI

Review

Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies

Varvara I. Maliogka [1,*], Angelantonio Minafra [2], Pasquale Saldarelli [2], Ana B. Ruiz-García [3], Miroslav Glasa [4], Nikolaos Katis [1] and Antonio Olmos [3]

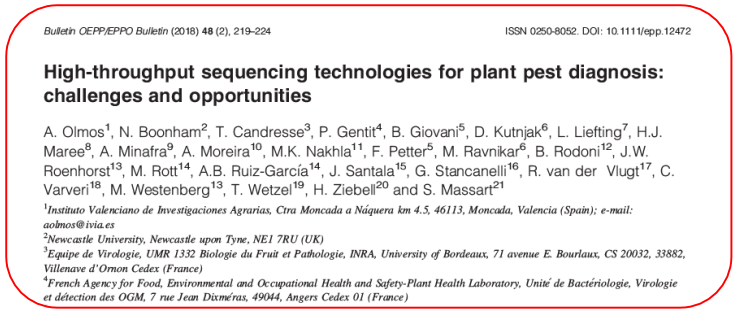
[1] Laboratory of Plant Pathology, School of Agriculture, Faculty of Agriculture, Forestry and Natural Environment, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece; katis@agro.auth.gr

[2] Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via G. Amendola 122/D, 70126 Bari, Italy; angelantonio.minafra@ipsp.cnr.it (A.M.); pasquale.saldarelli@ipsp.cnr.it (P.S.)

[3] Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, Spain; ana.belen.ruiz@uv.es (A.B.R.-G.); aolmos@ivia.es (A.O.)

[4] Institute of Virology, Biomedical Research Centre, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84505 Bratislava, Slovak Republic; Miroslav.Glasa@savba.sk

* Correspondence: vmaliogk@agro.auth.gr; Tel.: +30-2310-998716



Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2018) **48** (2), 219–224 ISSN 0250-8052. DOI: 10.1111/epp.12472

High-throughput sequencing technologies for plant pest diagnosis: challenges and opportunities

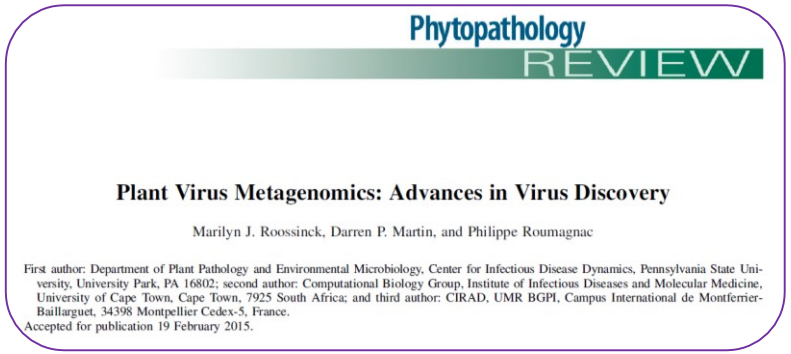
A. Olmos[1], N. Boonham[2], T. Candresse[3], P. Gentit[4], B. Giovani[5], D. Kutnjak[6], L. Liefting[7], H.J. Maree[8], A. Minafra[9], A. Moreira[10], M.K. Nakhla[11], F. Petter[5], M. Ravnikar[6], B. Rodoni[12], J.W. Roenhorst[13], M. Rott[14], A.B. Ruiz-García[14], J. Santala[15], G. Stancanelli[16], R. van der Vlugt[17], C. Varveri[18], M. Westenberg[13], T. Wetzel[19], H. Ziebell[20] and S. Massart[21]

[1]*Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Ctra Moncada a Náquera km 4.5, 46113, Moncada, Valencia (Spain); e-mail: aolmos@ivia.es*

[2]*Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE1 7RU (UK)*

[3]*Equipe de Virologie, UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, University of Bordeaux, 71 avenue E. Bourlaux, CS 20032, 33882, Villenave d'Ornon Cedex (France)*

[4]*French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety-Plant Health Laboratory, Unité de Bactériologie, Virologie et détection des OGM, 7 rue Jean Dixméras, 49044, Angers Cedex 01 (France)*



Phytopathology

REVIEW

Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery

Marilyn J. Roossinck, Darren P. Martin, and Philippe Roumagnac

First author: Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, Center for Infectious Disease Dynamics, Pennsylvania State University, University Park, PA 16802; second author: Computational Biology Group, Institute of Infectious Diseases and Molecular Medicine, University of Cape Town, Cape Town, 7925 South Africa; and third author: CIRAD, UMR BGPI, Campus International de Montferrier-Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex-5, France.

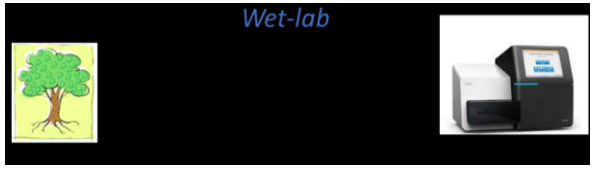
Accepted for publication 19 February 2015.

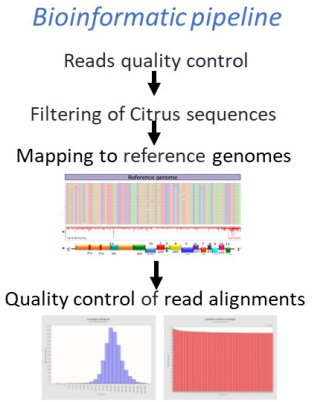
AgroBioTech biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

Risultati di nostre ricerche precedenti e studi noti su fruttiferi, confermano…

ANALISI METAGENOMICA

(NGS/BIOINFORMATICA)





- Strumento efficiente per diagnosi veloce di tutti virus e viroidi
- Pre-screening piante capostipiti
- Librerie sRNA…a lunga conservazione

AgroBioTech
biotecnologie per l'agricoltura e l'ambiente

"Novarancia", PSR Sicilia 2014-2020

www.novarancia.it
info@novarancia.it

Giuseppe Scuderi
Marcella Russo
Marina Bazzano

GRAZIE…