

Network di micro-laboratori per la gestione fitosanitaria della filiera delle ortive (Net micro-Lab)

Net micro-Lab: micro-laboratories network for phytosanitary management of the horticultural crops

Salvatore Davino¹ e Stefano Panno¹

¹ Department of Agricultural, Food and Forest Sciences, University of Palermo, Palermo (PA), Italy

Abstract: The Net micro-Lab project aims at setting up a network of remotely managed micro-laboratories in order to minimise the impact of vegetable plant diseases and to reduce the environmental impact through early diagnosis according to the following main objectives: constitution of a production chain, with particular regard to tomato cultivation, composed of Nurseries, Farms and Producer Organisations (POs); *ex-ante* analysis on tomato seeds coming from foreign countries; creation of micro-laboratories interconnected to an accredited central laboratory; design of specific, sensitive and rapid diagnostic tools based on isothermal amplification (LAMP) or real-time PCR technique; and finally, development of a mobile app for continuous data management by the accredited laboratory.

Nell'ambito del comparto agroalimentare italiano ed europeo si fa sempre più pressante la necessità di dotare le filiere e gli operatori agricoli di strumenti in grado di garantire da un lato la riduzione dei rischi connessi ad avversità biotiche e abiotiche, dall'altro il miglioramento della qualità delle produzioni agricole e delle derrate alimentari, unitamente all'aumento della sostenibilità ambientale dei processi produttivi in termini di minor impatto ambientale, salvaguardia della salubrità del prodotto e risparmio economico per l'operatore del settore (Mensah *et al.*, 2019). Tale necessità si fa ancora più evidente a livello regionale, dove la mancanza di infrastrutture e di rete, e la scarsa preparazione e propensione degli agricoltori nei confronti dei mercati esteri rende il settore primario della Sicilia meno competitivo rispetto al contesto nazionale e internazionale. .

Il progetto Net micro Lab ha lo scopo di accrescere la sostenibilità ambientale e la redditività delle aziende agricole attraverso i seguenti obiettivi principali

- istituzione di una filiera (Vivai, Aziende agricole e OP) con particolare riguardo al pomodoro;
- analisi *ex ante* sulle sementi di pomodoro in entrata;
- creazione di mini-laboratori interconnessi ad un laboratorio centrale accreditato;
- impostazione e progettazione di strumenti diagnostici specifici, sensibili e rapidi basati sul test di amplificazione isotermica o su amplificazioni in tempo reale del genoma dei principali patogeni;
- sviluppo di un'app mobile per la gestione in continuo dei dati da parte del laboratorio accreditato.

Il progetto è stato finanziato dal PSR Sicilia 2014/2020, sottomisura 16.2 data di pubblicazione del bando 21/02/2019 approvato con D.D.G. n. 149 del 20/02/2019.

Le moderne tecniche agronomiche proprie dei sistemi agricoli intensivi e la elevata riduzione della biodiversità sono tra le principali cause dell'esplosione di nuove epidemie che difficilmente possono essere contenute se non si attuano in tempi molto brevi tutte le pratiche atte all'eliminazione dei primi focolai. Per questo motivo, vi è la necessità di un approccio integrato e multidisciplinare, in cui la diagnosi precoce e la gestione in remoto della filiera possano interagire stabilendo una rete in grado di raccogliere tutte le informazioni necessarie per fornire una risposta tempestiva e impostare strategie di gestione del problema quanto più possibili eco-sostenibili. L'obiettivo principale del progetto è

l'integrazione delle conoscenze nell'ambito della patologia vegetale con particolare riferimento a virus e batteri che interessano le solanacee, con pratiche di gestione integrata e diagnosi precoce, congiuntamente all'approccio informatico. La connessione di tutti questi elementi porterà allo sviluppo di un protocollo diagnostico per il contenimento delle malattie di interesse economico più rilevanti. Il progetto mira, quindi, a facilitare l'accesso ai sistemi di diagnosi e gestione, sviluppando applicazioni mobili e kit facili da usare e a basso costo per le aziende della filiera. Tutte le informazioni raccolte verranno raccolte e archiviate in un server cloud per ulteriori elaborazioni da parte degli operatori di ricerca o delle parti interessate (gruppi target). Il progetto vuole dare un contributo rilevante nel settore climatico/ambientale puntando alla riduzione dei rischi attraverso soluzioni applicative volte al monitoraggio, alla gestione e all'ottimizzazione di diversi processi relativi alle produzioni agricole con il fine di migliorare la qualità dei prodotti e ridurre le risorse utilizzate e l'impatto ambientale.

Il progetto si concentra principalmente sulla coltivazione delle solanacee utilizzando la pianta di pomodoro come specie modello. Questa coltura è sottoposta a numerosi pericoli dovuti principalmente alla globalizzazione degli scambi commerciali, all'interesse per l'implementazione dell'area di libero scambio tra i Paesi del Bacino del Mediterraneo e ai cambiamenti climatici (Panno *et al.*, 2019), con il rischio crescente di introduzione di nuovi patogeni emergenti o della recrudescenza di vecchi patogeni con un forte impatto negativo sull'orticoltura e sulla sostenibilità ambientale. Attualmente tra le problematiche più difficili da affrontare rientrano le malattie trasmissibili per seme (Davino *et al.*, 2020).

La prima innovazione che si intende trasferire nell'ambito del sistema pomodoro-vivaio-azienda agricola sarà l'analisi delle sementi *ex ante* attraverso un approccio metagenomico (Next Generation Sequencing – NGS) (Behjati e Tarpey, 2013). Tale metodologia permetterà di identificare in tempi brevi, a basso costo e direttamente in vivaio eventuali problematiche fitosanitarie connesse al movimento delle sementi ed eventualmente di stilare un piano di contenimento o di eradicazione dei patogeni rilevati prima che le piantine escano dall'azienda.

La seconda innovazione consiste nella formazione di una rete integrata di mini-laboratori dislocati sul territorio, all'interno delle aziende stesse, connessi con il laboratorio Centrale accreditato dalla Regione Sicilia, presso il Dipartimento SAAF dell'Università degli Studi di Palermo, e gestita in remoto dagli esperti fitopatologi dell'Università degli Studi di Palermo e del CORISSIA. Tutte le aziende presenti nel partenariato verranno seguite contemporaneamente, minimizzando i tempi di esecuzione dei processi e l'impatto economico delle analisi sui bilanci aziendali. La metodologia del "Blockchain" (Bermeo-Almeida *et al.*, 2018) permetterà l'intervento correttivo in ogni nodo della catena stessa in modo da individuare esattamente il problema, il livello in cui si trova (semi-plantula-pianta-post raccolta) ed intervenire tempestivamente.

Il progetto si basa su due approcci innovativi:

- 1) Metagenomica: darà la possibilità di conoscere con esattezza quali patogeni possono essere veicolati attraverso i semi di pomodoro nel territorio regionale e nazionale.
- 2) Analisi dei principali fattori di rischio fitopatologico nel territorio siciliano: saranno oggetto di studio attraverso l'analisi mediante kit diagnostici rapidi i seguenti patogeni: tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), la cui trasmissione per seme appare oggi controversa, ma probabile, tomato leaf curl disease (TYLCD), tomato spotted wilt virus (TSWV), pepino mosaic virus (PepMV), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xantomonas vesicatoria*.

Grazie alla tecnologia delle amplificazioni isoterme (Notomi *et al.*, 2000) e PCR in tempo reale (Heid *et al.*, 1996), attraverso appositi kit e mini amplificatori si potranno ottenere i risultati delle

piante analizzate in solo 120 minuti dall'ingresso del campione in laboratorio, riducendo notevolmente i tempi di risposta e quindi di reazione per il contenimento del problema.



Figura 1 - Strumento portatile per la diagnosi rapida



Figura 2 - Schema di funzionamento dello strumento che permette di connettersi alla rete dei micro laboratori e al laboratorio centrale

L'approccio proposto per prevenire e controllare le malattie delle piante si basa sull'integrazione di un nuovo strumento diagnostico di facile utilizzo e portatile (Figura 1), in grado di identificare i

patogeni direttamente in azienda (Ditta produttrice di sementi, Vivaio, Azienda agricola, GDO) e un'applicazione mobile in cui caricare i dati ottenuti (Davino *et al.*, 2017). I mini laboratori realizzati presso le aziende partner del progetto permetteranno alle aziende stesse di poter analizzare i patogeni più importanti dal punto di vista fitosanitario ed economico. I laboratori saranno dotati di un mini apparato per la diagnosi rapida e di appositi kit diagnostici in grado di effettuare il saggio in maniera semplice. Inoltre, tutti gli apparati saranno gestiti tramite un software che in remoto invierà i dati al centro di ricerca per la raccolta ed elaborazione dei dati. Questa attività permetterà da un lato di identificare quali sono i patogeni che potrebbero influenzare le coltivazioni e dall'altro, soprattutto per i vivai, di capire se durante il ciclo produttivo esistono delle falle fitosanitarie su cui porre maggiore attenzione. Le interpretazioni statistiche ottenute saranno di rilevante importanza al fine di conoscere e studiare quali patogeni effettivamente insistono nel nostro territorio ed eventualmente stilare un piano di difesa adeguato.

Tale approccio consentirà alle aziende di avere in tempi estremamente rapidi risposte da remoto su come gestire le problematiche individuate. Questo è uno strumento fondamentale, che contribuirà ad eliminare il tempo di spostamento dei tecnici con un conseguente risparmio nei costi della gestione aziendale, e renderà possibile monitorare continuamente le produzioni e fornire le adeguate soluzioni in tempo reale. Inoltre, permetterà di capire rapidamente se una malattia si sta sviluppando all'interno dell'azienda o se si sta diffondendo a livello regionale.

Attualmente non esiste un sistema integrato che metta in connessione micro-laboratori con un laboratorio di riferimento accreditato. Il progetto offre importanti vantaggi socio-economici attraverso la versatilità di utilizzo e consentirà agli attori della filiera orticola di essere più competitivi. Questo approccio di rete rappresenta una piattaforma metodologica per la prevenzione e il controllo delle malattie delle piante che potrà essere utilizzata come caso studio e successivamente adottata da altre realtà regionali, nazionali, europee o extra UE (Figura 2). Il progetto nel complesso offre un contributo alle seguenti priorità della politica di sviluppo rurale: miglioramento della produttività, della qualità del prodotto e della commercializzazione, incremento dei margini di redditività aziendali, riduzione dei costi; miglioramento della biodiversità; e diversificazione dei prodotti.

Riferimenti bibliografici

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 98(6), 236-238.

Bermeo-Almeida, O., Cardenas-Rodriguez, M., Samaniego-Cobo, T., Ferruzola-Gómez, E., Cabezas-Cabezas, R., & Bazán-Vera, W. (2018, November). Blockchain in agriculture: A systematic literature review. In *International Conference on Technologies and Innovation* (pp. 44-56). Springer, Cham.

Davino, S., Panno, S., Arrigo, M., La Rocca, M., Caruso, A. G., & Bosco, G. L. (2017). Planthology: an application system for plant diseases management. *Chemical Engineering Transactions*, 58, 619-624.

Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Barone, S., & Panno, S. (2020). Tomato Brown Rugose Fruit Virus: Seed Transmission Rate and Efficacy of Different Seed Disinfection Treatments. *Plants*, 9(11), 1615.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.

Mensah, J., & Casadevall, S. R. (2019). Sustainable development: Meaning, history, principles, pillars, and implications for human action: Literature review. *Cogent Social Sciences*, 5(1), 1653531.

Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28, e63.

Panno, S., Ruiz-Ruiz, S., Caruso, A. G., Alfaro-Fernandez, A., San Ambrosio, M. I. F., & Davino, S. (2019). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction development for rapid detection of Tomato brown rugose fruit virus and comparison with other techniques. *PeerJ*, 7, e7928.