

RELAZIONE DI PROGETTO
(A cura del coordinatore di progetto)

1. Tematica e Filiera	ERANET-ARIMNET2 - Bando Internazionale 2014		
2. Titolo	Emergent viruses and virus vectors in Mediterranean Basin crops - Virus emergenti e vettori delle colture agrarie nel Bacino Mediterraneo		
3. Acronimo	EMERAMB		
4. Progetto	Bando	Affidamento diretto	Sportello
	¹ D.M. 28678/7303/15 del 28/12/2015	²	³
5. Durata (mesi)	36	Report⁴ Finale	Nota⁵
6. Dati finanziari	Finanziamento concesso totale (€)	Finanziamento ricevuto (€)	Importo rendicontato (€)⁶
	52.000,00	51.480,00	51.722,80
7. Responsabile del Progetto	Nome e COGNOME	Laura Tomassoli	
	Qualifica	Ricercatore II livello	
	Istituzione di appartenenza	CREA-DC: Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Difesa e Certificazione	
	Indirizzo	Via Carlo Giuseppe Bertero, 22 - 00156 Roma	
	Tel/fax	+39 0682070292 / +39 0682070246	
	e-mail	laura.tomassoli@crea.gov.it	
8. Ente coordinatore	<p>Denominazione: Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di ricerca Difesa e Certificazione Indirizzo: Via Carlo Giuseppe Bertero, 22 - 00156 Roma Tel.: +3906820701, Fax: +39 0682070246, e-mail: dc@crea.gov.it</p> <p>Si confermano gli estremi bancari o di tesoreria già forniti per la concessione del contributo X SI no, indicare IBAN ABI CAB BIC</p> <p>Responsabile amministrativo della rendicontazione finanziaria: Nome : Sig.ra Letizia Sanetti Tel/fax 06/82070 215 Email: letizia.sanetti@crea.gov.it</p>		

<p>9. Sintesi del progetto (max 20 righe) <i>(può essere oggetto di pubblicazione)</i></p>	<p>Le fitopatie emergenti causate da virus rappresentano una minaccia rilevante per le produzioni agrarie del Bacino Mediterraneo, in particolare per le colture ortive che rappresentano uno dei settori produttivi più competitivi e dinamici. La comparsa di malattie emergenti è dovuta a complesse interazioni tra fattori ecologici, climatici e genetici che coinvolgono le piante, i patogeni e i loro vettori, nonché alle attività che l'uomo gestisce nell'ambito della catena produttiva, degli scambi commerciali e della costituzione di nuove varietà. CREA-DC ha preso parte al <i>Consortium EMERAMB</i> a cui afferiscono 12 gruppi di ricerca appartenenti a 9 diversi Paesi affacciati sul Bacino Mediterraneo. Insieme agli altri partners, CREA-DC si è occupato di studiare i fattori biologici ed ecologici che determinano l'emergenza di virosi nuove per l'orticoltura mediterranea e di definirne le misure di controllo e gestione. In particolare, CREA-DC ha condotto attività di ricerca su alcuni dei più importanti binomi pianta-patogeno, includendo, se presente, anche l'insetto vettore: virus del pomodoro e delle cucurbitacee trasmessi da aleurodidi (TYLCV, TYLCSV, ToLCNDV); virus delle cucurbitacee trasmessi da afidi (ZYMV, WMV, PRSV, CABYV).</p>
<p>Parole chiave</p>	<p>Virus emergenti, pomodoro, cucurbitacee, aleurodidi, afidi</p>

10. Relazione del progetto (totale max. 10 pagine)**10.1 Descrizione dei risultati in relazione agli obiettivi generali e specifici previsti nel periodo di riferimento (max. 2 pagine)**

Il progetto aveva come obiettivo generale: l'individuazione dei fattori biologici ed ecologici che contribuiscono alla comparsa di nuove malattie virali nell'orticoltura del Bacino Mediterraneo; la definizione delle misure di gestione e controllo delle malattie stesse; la conoscenza delle dinamiche che determinano l'insorgere di una malattia emergente.

In tale contesto, il CREA-DC ha attivamente contribuito al conseguimento dei seguenti **obiettivi specifici scientifici** del progetto:

WP2 - Mapping viruses and vectors in crops and reservoirs / Campionamenti e collezione di virus e vettori nelle colture ospiti primari e secondari

Obiettivo scientifico – Individuare i virus emergenti e i loro vettori nelle colture orticole (pomodoro e cucurbitacee) e in ospiti secondari.

Con l'obiettivo di creare una collezione comune di virus e di insetti vettori rappresentativi del Bacino Mediterraneo, le attività di monitoraggio del CREA-DC si sono concentrate nel primo biennio del progetto controllando coltivazioni di melone in piano campo e in serra per la ricerca di zucchini yellow mosaic virus (ZYMV), Watermelon mosaic virus (WMV), Cucurbit mosaic virus (CMV) e Cucurbit aphid-borne yellow virus (CABYV). Campioni sintomatici sono stati raccolti in Lombardia, Toscana, Sicilia, Sardegna e Lazio. In queste ultime due regioni, le attività di raccolta sono state capillari e hanno riguardato tutte le zone produttive del territorio. La diagnosi molecolare ha rivelato la presenza di WMV e CABYV nella maggior parte dei campioni sintomatici raccolti in Italia, mentre CMV e ZYMV è stato rilevato solo in pochi campioni provenienti dalla Sardegna. Inoltre, i monitoraggi condotti in Sardegna hanno portato alla prima segnalazione in Italia di cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV) in cucurbitacee (zucchino e melone).

Durante le indagini di campo condotte nel 2016 è stato rilevato per la prima volta il Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) in piante di zucchino raccolte in Lazio e Sardegna. In queste due regioni sono stati eseguiti campionamenti anche nel 2017 e nel 2018 per monitorare la diffusione di ToLCNDV. Successivamente, i campionamenti hanno mostrato la presenza di infezione anche su altre cucurbitacee (zucca) e peperone coltivato in basso Lazio. Il ritrovamento di ToLCNDV ha indotto il CREA-DC a monitorare la presenza e la densità delle popolazioni dell'aleurodide vettore *Bemisia tabaci* nelle aree di Lazio e Sardegna, e altre regioni del centro Italia (Molise, Marche e Toscana) a rischio di introduzione. In particolare, in Lazio, dove infezioni da begomovirus trasmessi da *B. tabaci* non erano mai state segnalate prima e dove la presenza del vettore si pensava fosse solo occasionale, si sono raccolte popolazioni nella maggior parte dei siti ispezionati, suggerendo una recente diffusione di *B. tabaci* dal Sud al Centro Italia.

Nell'ambito dello studio dell'evoluzione dei virus, il CREA-DC ha svolto analisi retrospettive relative alla variabilità genetica delle popolazioni di WMV presenti nelle proprie collezioni storiche riguardanti campioni di zucchino e melone infetti raccolti negli ultimi 20 anni in diversi siti del territorio nazionale. Studi di filogenesi e di analisi di variabilità genetica sono stati condotti in collaborazione con l'Universidad Politécnica de Madrid (Spagna), partner di EMERAMB. I dati ottenuti hanno mostrato come la distribuzione dei ceppi classico ed emergente di WMV in Italia non sia correlata all'origine geografica dei campioni e/o alle piante ospiti, ma a una progressiva sostituzione temporale del ceppo classico da parte di quello emergente.

Tutto il materiale campionato è stato inviato ai responsabili delle collezioni: INRA e CEBAS-CSIC

18

WP3 – Virus discovery and detection – Intercettazione e diagnosi di virus

Obiettivo scientifico – Sviluppo di azioni e strumenti per un'ampia e rapida intercettazione e diagnosi dei virus in materiale vegetale e nei vettori.

Per il virus di nuova intercettazione ToLCNDV è stato svolto un approfondito studio di messa a punto e valutazione di metodi diagnostici su materiale vegetale. Sono stati valutati test sierologici (ELISA) commercializzati da diverse ditte produttrici e sono stati testati, modificati o creati *ex-novo* dei protocolli di PCR convenzionale, Real Time PCR, Rolling Circle Amplification (RCA) e Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Test di PCR e Real Time PCR sono stati messi a punto anche per la diagnosi del virus nell'insetto vettore. I risultati ottenuti in questa fase di valutazione e validazione dei protocolli consentiranno al CREA-DC di coordinare un inter-laboratory test nell'ambito delle attività che il laboratorio stesso conduce come Laboratorio Europeo di Riferimento (EURL) designato dall'Unione Europea.

Nel 2019, il CREA-DC ha partecipato all'inter-laboratory test organizzato dal partner EMERAMB Volcani Center (Israele) per la validazione e armonizzazione dei protocolli di diagnosi delle specie virali Tomato

yellow leaf curl Sardinia virus - TYLCSV) e Tomato yellow leaf curl virus - TYLCV (inclusi ceppi virali, beta-satellite e loro ricombinanti), responsabili della malattia di accartocciamento fogliare giallo nel pomodoro (Tomato yellow leaf curl disease). Tale attività ha è anche stata oggetto di svolgimento di una tesi di Laurea dell'Università della sapienza presso il CREA-DC.

WP4 – Virus ecology and evolution – Ecologia ed evoluzione virale

Obiettivo scientifico – Studio dell'ecologia e evoluzione dei virus.

I campioni di zucchini infetti da ToLCNDV raccolti dal CREA-DC in Lazio e Sardegna sono stati oggetto di studio per la caratterizzazione degli isolati e la loro variabilità genetica. Lo studio ha permesso di evidenziare una sostanziale similarità genetica con gli isolati provenienti dalle aree affette da ToLCNDV in Campania e Sicilia e con il ceppo caratterizzato precedentemente in Spagna (denominato ToLCNDV-ES).

Lo studio dell'emergenza e evoluzione di nuovi virus interessa anche la struttura genetica e le proprietà biologiche delle popolazioni di insetti vettori. In questo ambito, il CREA-DC ha caratterizzato le popolazioni di *B.tabaci* raccolte in Italia e identificato le specie criptiche e gli aplotipi di appartenenza. La specie Med è risultata ampiamente diffusa in nelle regioni ispezionati, con una prevalenza dell'aplotipo MedQ2 in Molise e nella zona dell'Agropontino laziale, e la evidenziata la compresenza degli aplotipi MedQ1 e MedQ2 nell' Marche e in Toscana. In Sardegna invece è stata riscontrata la presenza del solo aplotipo Q1. Popolazioni miste o singole di MedQ1 e MEAM1 sono state ritrovate invece nell'alto e medio Lazio, suggerendo che le condizioni climatiche e colturali (temperature più fredde e condotta colturale meno intensiva) abbiano limitato la diffusione della specie Med, più termofila rispetto a MEAM1. Per gli individui di *B.tabaci* raccolti nelle zone del Lazio e della Sardegna ove erano presenti infezioni da ToLCNDV, si è indagata anche la loro infettività al virus, ottenendo nuove informazioni circa la capacità di trasmissione del virus da parte delle diverse specie/aplotipi.

Il ruolo delle infezioni miste come possibili modulatori dell'evoluzione dei virus in una pianta ospite è stato approfondito in condizioni sperimentali per il binomio WMV e ZYMV. A tale scopo, sono stati ottenuti cloni biologici di WMV e ZYMV poi inoculati per via meccanica in piante di zucchini in infezioni singole e mista per 13 generazioni successive. Prelievi ripetuti del materiale infetto sono stati eseguiti per ciascuna generazione per stimare la variabilità genetica accumulata dalle popolazioni virali in infezione singola e mista al passare delle generazioni. Lo studio è stato effettuato nella regione 3' del genoma del virus, che comprende le proteine 6K2, NIa (nuclear inclusion A), NIb (nuclear inclusion B) e parte 5' del CP (coat protein), come regione di possibili mutazioni o ricombinazioni genetiche. Sono stati messi a punto protocolli di amplificazione per i due virus (disegno primer specifici, verifica di amplificazione e specificità). Gli amplificati ottenuti sono stati clonati e sequenziati. Lo studio su eventuale evoluzione dei virus è stato effettuato analizzando e confrontando le sequenze ottenute per ciascun virus in infezione singola e mista in diverse generazioni. Non sono stati rilevati eventuali mutazioni o ricombinazioni rispettivamente in infezione singola e mista dopo 4 generazioni. Intanto il materiale prelevato nelle successive generazioni è stato estratto e conservato a -20 per ulteriori studi.

Inoltre, sono state effettuate prove sperimentali per lo studio di interazione dei due virus quantificando il titolo virale in infezione singola e mista di ZYMV e WMV, con 4 prelievi settimanali dopo l'inoculazione. La valutazione è stata effettuata con il metodo di quantificazione relativa $\Delta\Delta CT$. A questo scopo sono stati messi a punto due protocolli specifici RT-qPCR (TaqMan®) per ciascuno dei virus oggetto dello studio. Come gene di riferimento per la normalizzazione dei dati è stato utilizzato elongation factor *EF-1* reperibile in letteratura. L'efficienza dell'amplificazione dei primer-target, e quelli del gene di riferimento è stata determinata utilizzando diluizioni seriali 10^{-1} - 10^{-6} . I risultati preliminari hanno rilevato che ZYMV incide nella replicazione del VMV nelle prime fasi in infezione mista, in confronto all'infezione singola, come riportato anche in letteratura. Dopo un iniziale repressione, si ha un aumento progressivo della replicazione del WMV nel tempo nell'infezione mista rispetto all'infezione singola. Questo presume differenti tendenze di replicazione che possono influire l'epidemiologia dei due virus.

Nell'ambito dell'evoluzione delle specie virali, CREA-DC ha collaborato con CIRAD, partner di EMERAMB sullo studio di evoluzione di begomovirus in pomodoro. La collaborazione ha portato all'individuazione per la prima volta in Sardegna di TYLCV-IS141, un ricombinante di TYLCV in piante di pomodoro dotate del gene di resistenza Ty-1.

Il CREA-DC ha collaborato con gli altri partner del progetto per l'avanzamento degli **obiettivi specifici gestionali**:

WP1 - Project management and networking - Gestione e attuazione dell'attività di progetto

Obiettivo gestionale – Gestione delle attività intraprese e creazione della rete di collaborazione tra i partner.

Il CREA-DC ha partecipato al kick-off meeting (16-17 Maggio 2016 a Murcia, SP) durante il quale è stato costituito il comitato di gestione del progetto. In tale sede il CREA-DC ha illustrato le attività del proprio Istituto e ha proposto e discusso con gli altri partner le linee di ricerca da privilegiare nell'ambito di WP in cui è coinvolto. Il CREA-DC ha partecipato al mid-term meeting (20-21 Giugno 2017 a Lubiana, SL), durante il quale ha illustrato lo stato di avanzamento delle proprie attività di ricerca e ha discusso e condiviso con gli altri partner i primi risultati ottenuti. Il CREA-DC ha infine ospitato presso il proprio Centro in Roma il meeting di chiusura del progetto (31 ottobre 2019), organizzato a corollario del convegno internazionale "Advances in Plant Virology 2019". Durante il meeting di chiusura, il coordinatore del progetto e i referenti di ciascuna UO hanno riassunto i risultati ottenuti e le esperienze di collaborazione realizzati nell'ambito del progetto. Il meeting si è concluso rinnovando l'interesse delle UO per future collaborazioni e per la partecipazione a altre call per progetti europei (in particolare i progetti PRIMA), al fine di continuare le attività intraprese e finalizzare nuovi obiettivi comuni per lo studio di virus emergenti nel Mediterraneo.

WP7 – Technology transfer and dissemination – Trasferimento e divulgazione delle conoscenze

Obiettivo gestionale – Trasferimento e diffusione delle conoscenze.

Durante il mid-term meeting, si è proceduto alla stesura delle procedure comuni da adottare per la diffusione delle nuove conoscenze ottenute mediante le attività di ricerca previste dal progetto e per la protezione della proprietà intellettuale che ne deriva. Il CREA-DC ha intrapreso attività di divulgazione dei risultati ottenuti nell'ambito del progetto, mediante partecipazioni a congressi nazionali e internazionali e mediante pubblicazioni su riviste scientifiche a diffusione nazionale e internazionale. Il CREA-DC ha inoltre partecipato a diversi incontri divulgativi a carattere locale a cui erano presenti gli operatori coinvolti nelle zone agrarie di pertinenza. Infine, il personale afferente al CREA-DC è stato membro del comitato scientifico e organizzatore del convegno internazionale "Advances in Plant Virology 2019" che si è svolto presso la sede di Roma del CREA-DC dal 29 al 31 ottobre 2019. Il convegno è stato programmato nell'ambito dell'attività divulgativa del consorzio EMERAMB e i partner hanno rivestito un ruolo di rilievo per la presentazione dei propri risultati. Il convegno ha ospitato 135 delegati che rappresentavano i principali gruppi di studio della virologia vegetale attualmente presenti a livello mondiale. L'ampia diversità del background scientifico dei partecipanti ha permesso di coprire tutti i principali argomenti inerenti la virologia vegetale di base ed applicata, quali: Interazioni molecolari pianta-virus, Epidemiologia e evoluzione, Resistenze e controllo. Partecipavano al convegno anche alcune tra le principali aziende operanti nel settore sementiero e diagnostico (stakeholders), come Agdia, Agritest e Abiopep.

10.2 Attività svolte (max 7 pag)

Work Package	Titolo WP	Risultati	Indicatori di verifica	UO partecipa
WP 1	Gestione e attuazione delle attività di progetto	<p><u>Task 1.1. Pianificazione delle attività:</u> Il CREA-DC ha partecipato ai due incontri (iniziale e di medio termine) che si sono tenuti per garantire la gestione e corretta attuazione del progetto. Il CREA-DC ha ospitato il meeting di chiusura del progetto.</p> <p><u>Task 1.2. Gestione della parte amministrativa e controllo dello stato di avanzamento dei singoli task:</u> Il coordinatore, in collaborazione con il comitato di gestione, ha supervisionato l'andamento sia scientifico sia amministrativo del progetto.</p> <p><u>Task 1.3. Formazione e training per giovani ricercatori.</u> La ricercatrice Sabrina Bertin del CREA-DC è stata visiting scientist presso il Centro de Biotecnologia y Genomica de Plantas, Universidad Politecnica de Madrid</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Report del kick-off meeting - Report del mid-term meeting - Report del final meeting (a cura del coordinatore del progetto). - Rendicontazione dell'intero progetto con presentazione dell'attività svolta da parte del coordinatore. 	Tutte

		(EMERAMB partner n° 5) per un training sui metodi di analisi filogenetica e di genetica di popolazione molecolare dei virus.		
WP 2	Campionamenti di virus e vettori negli ospiti vegetali primari e secondari	<p><u>Task 2.1. Definizione del piano di campionamento sul territorio:</u> Sono stati stabiliti i virus, gli ospiti vegetali e i vettori da sottoporre a monitoraggio e si sono definite le modalità di campionamento comuni per tutti i partner. I monitoraggi eseguiti dal CREA-DC tra il 2016 e il 2018 hanno riguardato coltivazioni in pieno campo e serra di melone per la ricerca di virus ZYMV, WMV, CMV e CABYV. I campioni sono stati raccolti in Lombardia, Toscana, Sicilia, Sardegna e Lazio. Per l'identificazione sono stati utilizzati metodi diagnostici molecolari messi a punto nella prima fase del progetto. Campioni di materiale vegetale infetto liofilizzato o campioni di DNA/RNA sono stati conservati e condivisi con gli altri partner del progetto.</p> <p><u>Task 2.2. Campionamento e caratterizzazione degli insetti vettori nelle località ispezionante per la presenza di virus:</u> Campioni di <i>B. tabaci</i> sono stati raccolti dal 2016 al 2018 in Lazio e in Sardegna contestualmente al monitoraggio della presenza di ToLCNDV. Ulteriori indagini sono state condotte nel 2018 in siti a produzione orticola e floricola di Molise, Marche e Toscana per una valutazione sulla diffusione dell'insetto vettore in Centro Italia. Le popolazioni raccolte sono state analizzate per la determinazione della specie (Med e MEAM1) e dell'aplotipo (MedQ1 e MedQ2) di appartenenza. Esemplari di <i>B. tabaci</i> conservati in etanolo sono stati inviati al partner NAGREF (Grecia) per la costituzione di un database comune di specie/aplotipi raccolti da tutti i partner.</p> <p><u>Task 2.3. Analisi retrospettiva dell'incidenza e variabilità genetica dei virus dalle collezioni di laboratorio:</u> Il CREA-DC ha analizzato le proprie collezioni di materiale vegetale (cucurbitacee) infetto da WMV. I campioni analizzati provengono da diverse parti del Paese e sono stati raccolti negli ultimi 20 anni. Regioni geniche informative dal punto di vista evolutivo sono state sequenziate e sulle sequenze sono stati compiuti studi di filogenesi, analisi di ricombinazione genica e valutazioni statistiche di variabilità genetica.</p>	<p>- Collezione e database di virus e vettori di origine italiana per la loro caratterizzazione</p> <p>- Database dei campionamenti di materiale vegetale eseguiti dai diversi partner dal 2016 al 2018(a cura del WP leader - INRA, Francia);</p> <p>- Database dei campionamenti di aleurodidi eseguiti in Francia, Italia e Grecia nel 2016 (a cura del partner NAGREF, Grecia).</p> <p><u>Pubblicazioni e comunicazioni a congresso:</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Manglli, M. Murenu, M.Sitzia, L. Tomassoli. First report of Cucurbit yellow stunting disorder virus infecting cucurbits in Italy. <i>New Disease Reports</i> (2016) vol. 34, 23; 2. Luigi M., A. Manglli, M. Valdes, M. Sitzia, S. Davino, L. Tomassoli, 2016. Occurrence of Tomato leaf curl New Delhi virus infecting zucchini in Sardinia (Italy). <i>Journal of Plant Pathology</i> 98 (3), 677-697; 3. Bertin S., A. Manglli, L. Tomassoli, 2016. Variability of the Watermelon mosaic virus genes involved in aphid transmission: preliminary data in Italy. <i>Journal of Plant Pathology</i>, 98(4sup), S39; 4. Davino S., Luigi M., Bertin S., Manglli A., Panno S., Caruso A., Troiano E., Otgianu L., Nannini M., Parrella G., Tomassoli L. (2017). Spread of <i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i> in Italy: a new challenge for the cultivation of zucchini squash. <i>Proceedings of 15th Congress of the</i> 	<p>CSIC Spagna; NAGREF Grecia; NIB Slovenia; ACPPRI Turchia; UPM Spagna NRC Egitto; UAS Egitto; UCDEJ Marocco; VC Israele; INRA Francia; CREA-DC Italia.</p>

			<p>Mediterranean Phytopathological Union; Córdoba, Spagna; 20-23 giugno 2017. Pubblicato in: <i>Phytopathologia Mediterranea</i> (2017), 56(2): 288-289;</p> <p>5. Luigi M., Bertin S., Manglli A., Troiano E., Davino S., Tomassoli L., Parrella G. (2019). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus causing yellow leaf curl on pepper in Europe. <i>Plant Disease</i> 103(11): 2970;</p> <p>6. Bertin S., Manglli A., McLeish M., Tomassoli L. (2019). Genetic variability of watermelon mosaic virus in Italy. <i>Proceedings of International Advances in Plant Virology 2019</i>; Roma; 29-31 ottobre 2019;</p> <p>7. Bertin S., A. Manglli, McLeish M., L. Tomassoli. Genetic variability of watermelon mosaic virus isolates infecting cucurbit crops in Italy. <i>Archives of Virology</i> (accepted: under revision)</p>	
WP 3	Individuazione e diagnosi di virus	<p><u>Task 3.1. Sviluppo di piattaforme diagnostiche mirate all'identificazione multipla per gruppi di virus e/o per pianta ospite (pomodoro o cucurbitacee):</u></p> <p>Il CREA-DC si è occupato della messa a punto e validazione di metodi (ELISA, PCR convenzionale, Real Time PCR, RCA e LAMP) per la diagnosi di ToLCNDV su matrici vegetali e su singoli individui dell'insetto vettore <i>B. tabaci</i>. Sulla base di tali metodi, il CREA-DC sta organizzando un inter-laboratory test che coinvolge i principali laboratori nazionali di riferimento dell'UE.</p> <p>Il CREA-DC ha inoltre partecipato all'inter-laboratory test organizzato dal partner Volcani Center (Israele) nell'ambito di EMERAMB per la validazione e armonizzazione dei protocolli di diagnosi del TYLCV.</p> <p>Propedeutico agli studi evolutivisti del WP4, è stato definito un protocollo di quantificazione relativa ($\Delta\Delta Ct$) in Real Time RT-PCR per ZYMV e WMV in presenza di gene endogeno.</p>	<p>– Protocollo per la quantificazione relativa mediante $\Delta\Delta Ct$ Rt-qPCR di ZYMV e WMV in cucurbitacee utilizzando il reference gene codificante per l'elongation factor <i>EF-1A</i>;</p> <p>– Dati validazione dei protocolli di diagnosi di ToLCNDV.</p> <p><u>Pubblicazioni e comunicazioni a congresso:</u></p> <p>1. Manglli A., Bertin S., Tomassoli L. (2019). Preliminary analysis of ZYMV and WMV interaction in mixed infection by $\Delta\Delta Ct$ Rt-qPCR. <i>International Advances in Plant Virology 2019</i>; Roma; 29-31 ottobre 2019.</p>	CSIC Spagna; NIB Slovenia; UPM Spagna VC Israele; INRA Francia; CREA-DC Italia.
WP 4	Ecologia ed	Task 4.2. Incidenza e composizione delle	Pubblicazioni e	Tutte

<p>evoluzione dei virus</p>	<p><u>malattie virali nelle piante ospiti e analisi delle associazioni virali nei casi di infezione multipla:</u></p> <p>I campioni di zucchini infetti da ToLCNDV raccolti dal CREA-DC in Lazio e Sardegna sono stati oggetto di studio per la caratterizzazione degli isolati e la loro variabilità genetica rispetto alle altre popolazioni del virus presenti in Italia e nel resto del Mediterraneo. Lo studio è stato condotto in collaborazione con colleghi del CNR di Napoli e dell'Università di Palermo e ha permesso di evidenziare una sostanziale similarità genetica con gli isolati provenienti dalle aree affette da ToLCNDV in Campania e Sicilia. Lo studio di genetica di popolazione ha evidenziato come gli isolati italiani appartengano al ceppo virale caratterizzato precedentemente in Spagna (denominato ToLCNDV-ES) e siano invece geneticamente distinti dai ceppi presenti in Asia nell'areale di origine del virus.</p> <p>L'incidenza nella coltura di melone di WMV, ZYMV, CMV e CABYV è stata studiata in modo approfondito nelle regioni di Sardegna e Lazio, così come le loro associazioni in infezioni miste. WMV è il virus con la maggiore diffusione in Italia ed è stato trovato frequentemente in associazione con CMV e CABYV.</p> <p><u>Task 4.6. Analisi della struttura genetica e delle proprietà biologiche delle popolazioni di insetti vettori:</u></p> <p>Il CREA-DC ha eseguito le analisi molecolari (amplificazione della regione mitocondriale codificante per la citocromo ossidasi 1, COI) per la caratterizzazione delle specie e degli aplotipi di <i>B. tabaci</i> presenti nelle popolazioni raccolte in Lazio, Sardegna, Molise, Marche e Toscana. Per gli individui di <i>B. tabaci</i> raccolti nelle zone del Lazio e della Sardegna ove erano presenti infezioni da ToLCNDV, si è indagata l'eventuale associazione delle popolazioni raccolte con la loro infettività per ToLCNDV. I risultati della diagnosi eseguita sugli esemplari raccolti, ha permesso di ottenere nuove informazioni circa la capacità di trasmissione di ToLCNDV da parte di entrambi gli aplotipi MedQ1 e MedQ2.</p> <p><u>Task 4.7. Studio delle infezioni multiple come modulatori dell'evoluzione dei virus (applicato a co-infezioni di potyvirus in cucurbitacee):</u></p> <p>La variabilità genetica di popolazioni di WMV e ZYMV in infezione singola e mista è stata studiata in zucchini in condizioni sperimentali. A questo scopo, cloni biologici di WMV e</p>	<p>comunicazioni a congresso:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. S. Bertin, G. Parrella, M. Giorgini, M. Nannini, S. Davino, M. Luigi and L. Tomassoli. Range of expansion and genetic diversity of <i>Bemisia tabaci</i> populations in Italy, under the recent threat of Tomato leaf curl New Delhi virus spread. Proceedings of 15° Congresso dell'Unione di Fitopatologia Mediterranea; Cordoba, Spagna; 20-23 giugno 2017. Abstract esteso pubblicato in Phytopathologia Mediterranea (2017) vol. 56(2), pp.293-4; 2. Bertin S., Luigi M., Parrella G., Giorgini M., Davino S., Tomassoli L. (2018). Survey of the distribution of <i>Bemisia tabaci</i> (Hemiptera: Aleyrodidae) in Lazio region (Central Italy): a threat for the northward expansion of Tomato leaf curl New Delhi virus (Begomovirus: Geminiviridae) infection. Phytoparasitica 46(2): 171-182; 3. Bertin S., Tomassoli L. (2018). Mosca bianca degli orti: indagine sulla diffusione in Lazio. Colture Protette 6: 62-66; 4. Bertin S., Nannini M., Tomassoli L. Distribution of <i>Bemisia tabaci</i> cryptic species (Hemiptera: Aleyrodidae) in Italian horticultural areas endangered by the newly-introduced Tomato leaf curl New Delhi virus. 11th European Congress of Entomology; Napoli; 2-6 luglio 2018. 5. Panno S., Caruso A.G., Troiano E., Luigi M., Manglli A., Vatrano T., Iacono G., Marchione S., Bertin S., Tomassoli L., Parrella G., S. Davino (2019). Emergence of
-----------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		<p>ZYMV sono stati prodotti e inoculati per via meccanica in piante di zucchino in infezioni singole e miste. A partire dalla prima infezione (T_0) le infezioni sono poi state ripetute in maniera seriale per 13 generazioni successive con prelievi del materiale per ciascuna generazione e mantenuti come estratti RNA a -20°C per:</p> <p>i) Stimare e confrontare la variabilità genetica accumulata dalle popolazioni virali in infezione singola e mista al passare delle generazioni. Per questo scopo, regioni geniche virali rilevanti dal punto di vista evolutivo sono state amplificate, clonate, sequenziate sia delle popolazioni alla generazione T_0 che quarta generazione T_4</p> <p>ii) Per lo studio di interazione è stato effettuato un'analisi di quantificazione relativa con il metodo $\Delta\Delta\text{CT}$ per valutare il titolo virale in infezione singola e mista di ZYMV e WMV, progressivamente in tempo eseguendo 4 prelievi con scadenza settimanale dopo l'inoculazione.</p>	<p>Tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: estimation of incidence and genetic diversity. <i>Plant Pathology</i> 68(3): 601-608;</p> <p>6. Panno S., Caruso A.G., Bertin S., Troiano E., Parrella G., Tomassoli L., Davino S. First analysis of epidemiology assessment of Tomato leaf curl New Delhi virus in Italy: a serious risk for the cultivation of zucchini squash. 2° Congresso Nazionale della Società Italiana di Virologia (SIV); Roma, 28-30 novembre 2018.</p> <p>7. Manglli A., Bertin S., Tomassoli L. (2019). Preliminary analysis of ZYMV and WMV interaction in mixed infection by $\Delta\Delta\text{Ct}$ Rt-qPCR. <i>Proceedings of International Advances in Plant Virology 2019</i>; Roma; 29-31 ottobre 2019.</p> <p>8. Granier M., Tomassoli L., Manglli A., Nannini M., Peterschmidt M., Cica U. First Report of TYLCV-IS141, a Tomato Yellow Leaf Curl Virus Recombinant Infecting Tomato Plants Carrying the Ty-1 Resistance Gene in Sardinia (Italy). <i>Plant Disease</i> doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1558-PDN</p>	
WP 7	Trasferimento e diffusione delle conoscenze	<p><u>Task 7.1. Creazione e armonizzazione di procedure comuni per il trasferimento e la diffusione delle conoscenze:</u></p> <p>Durante il kick-off meeting, il WP leader ha condotto un'indagine informale per valutare l'esperienza dei diversi partner nella comunicazione e diffusione delle conoscenze. L'indagine ha rivelato che tutti i ricercatori possiedono un certo grado di esperienza, grazie anche a collaborazioni con aziende private del settore. Tali conoscenze sono state ulteriormente approfondite durante il mid-term meeting e sulla base di quanto emerso si sono redatte le linee guida riguardanti i diversi approcci di comunicazione con terze parti (aziende, cooperative e altre organizzazioni).</p>	<p>- Protocollo delle procedure comuni da tenere per il trasferimento e la diffusione delle conoscenze verso terzi;</p> <p>- Partecipazione della d.ssa Laura Tomassoli e della d.ssa Sabrina Bertin come relatori all'Incontro divulgativo sulla nuova emergenza dello zucchino: il virus "ToLCNDV" presso la Soc.</p>	Tutte

		<p><u>Task 7.2. Azioni per incrementare la cooperazione tra pubblico e privato e per la protezione dei risultati della ricerca:</u> Durante il mid-term meeting, si è tenuto un workshop sulle strategie e i modelli di cooperazione tra pubblico e privato. In tale sede sono state illustrate e discusse le possibili vie per coinvolgere aziende e stakeholders e il ruolo delle diverse forme di protezione della proprietà intellettuale (brevetti, iscrizione di nuove varietà vegetali, etc...) nello sfruttamento dei risultati della ricerca. Durante il workshop, si è enfatizzata l'importanza di cooperare con le compagnie private e si è incoraggiata la commercializzazione dei risultati della ricerca e della proprietà intellettuale. Tale cooperazione è stata attuata durante lo svolgimento del convegno "Advances in Plant Virology 2019" che si è tenuto a chiusura progetto e che ha visto la partecipazione diretta degli stakeholders.</p> <p><u>Task 7.3. Messa a punto e mantenimento di un sito web dedicato al progetto:</u> Il sito web emeramb.eu è stato creato dal WP leader. Il sito è composto da una parte pubblica per la presentazione dei partner e loro istituzioni e team di lavoro, la pubblicazione delle novità riguardanti diversi aspetti della virologia vegetale e in particolare delle malattie emergenti, e da una parte privata accessibile solo ai partner del progetto, per la condivisione dei report sul progresso e sui risultati dei vari WP. Il sito web sarà attivo anche per un periodo oltre il termine effettivo del progetto, per permettere alle UO di proseguire nell'aggiornamento dei dati inerenti le proprie attività di ricerca sui virus emergenti.</p>	<p>Coop. Agr. MEDIANA, Terracina (LT); 2 febbraio 2017.</p> <p>- Partecipazione della d.ssa Laura Tomassoli come relatore all'incontro divulgativo sull'emergenza ToLCNDV in cucurbitacee in Sardegna; Cagliari e Oristano; 6-7 febbraio 2017.</p> <p>- Partecipazione della d.ssa Laura Tomassoli come relatore all'incontro divulgativo sui virus emergenti delle cucurbitacee in Italia; Caserta; 21 marzo 2017.</p> <p>- Partecipazione della d.ssa Sabrina Bertin come relatore al 15° Congresso dell'Unione di Fitopatologia Mediterranea (Cordoba, Spagna; 20-23 giugno 2017).</p> <p>- Partecipazione della d.ssa Sabrina Bertin all' 11° Congresso Europeo of Entomologia; Napoli; 2-6 luglio 2018.</p>	
--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

10.3 Descrizione delle interazioni tra le UUOO partecipanti, eventuali collaborazioni esterne ed imprese (inserire diagramma) max 1 pag

Il CREA-DC ha collaborato con tutte le altre unità operative partecipanti al progetto per la definizione di programmi di attività comuni per l'attuazione dei WPs; vi è stata la partecipazione a kick-off, mid-term e final meetings durante i quali si è pervenuti alla redazione delle procedure comuni da tenere per il trasferimento e la diffusione delle conoscenze verso terzi.

Inoltre, il CREA-DC ha collaborato con altre unità operative per l'avanzamento di alcune delle proprie attività scientifiche:

- Collaborazione con le U.O. coinvolte nel monitoraggio per definire le modalità di campionamento comuni per tutti i partner e la creazione di database e collezione dei virus e dei vettori;

- Invio dei dati relativi ai campioni vegetali raccolti nel periodo 2016 – 2018 (pianta ospite, sintomi osservati, coordinate GPS del luogo di raccolta, sistema colturale etc...) al partner INRA (Francia), incaricato di redigere il database dei campionamenti eseguiti dai diversi partner.
- Invio di campioni di melone raccolti nel 2016/2018 risultati virus-positivi ai partner INRA (Francia) e CSIC (Spagna), incaricati della costituzione di una collezione comune di campioni vegetali infetti da WMV, ZYMV, CMV e CABYV. Invio di campioni di pomodoro raccolti nel 2016 infetti da begomovirus al partner CIRAD (Francia), incaricato della costituzione di una collezione comune e caratterizzazione per gli isolati raccolti.
- Invio di campioni di pomodoro infetti da TYLCV provenienza Sardegna e Sicilia al partner CIRAD-INRA (Francia) per la caratterizzazione degli isolati e la ricerca di ricombinanti e betasatellite.
- Invio di esemplari di *B. tabaci* raccolti nel 2016 e dei relativi dati di campionamento (pianta ospite, coordinate GPS del luogo di raccolta, sistema colturale etc...) al partner NAGREF (Grecia), incaricato di redigere un database dei campioni raccolti in Francia, Italia e Grecia e di caratterizzarne le specie/aplotipi di appartenenza e le loro proprietà biologiche.
- Partecipazione insieme con le altre UO all'inter-laboratory test organizzato dal partner EMERAMB Volcani Center (Israele) per la validazione e armonizzazione dei protocolli di diagnosi del Tomato yellow leaf curl virus.
- La ricercatrice Sabrina Bertin del CREA-DC è stata visiting scientist presso il Centro de Biotecnologia y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid (EMERAMB partner n° 5) per un training sui metodi di analisi filogenetica e di genetica di popolazione basati sulle sequenze nucleotidiche dei virus.
- Le dott.sse Laura Tomassoli e Sabrina Bertin hanno fatto parte del Comitato organizzatore e Comitato scientifico del Convegno internazionale "Advances in Plant Virology 2019" svoltosi presso la sede di Roma del CREA-DC dal 29 al 31 ottobre 2019. Il convegno è stato programmato nell'ambito dell'attività divulgativa del consorzio EMERAMB.

10.4 Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto (max 1 pag)

Per tutta la durata del progetto, non si sono verificati eventi in grado di ostacolare significativamente il raggiungimento degli obiettivi scientifici e gestionali previsti nell'attività del CREA-DC.

Timbro Istituzione	Il responsabile di gestione (o delegato)	Il responsabile di progetto
	<p><i>nome e cognome:</i></p> <p><i>firma</i></p>	<p><i>Laura Tomassoli</i></p> <p><i>firma Laura Tomassoli</i></p>

2. Rendiconto complessivo di progetto

		Periodo complessivo							Totale
		Costo congruo ⁷	Finanziamento ricevuto ⁸	Importo rendicontato					
				CREA-DC	UO 2	UO 3	UO 4	UO 5	
Personale a tempo indeterminato	Ricercatori	110.700 €	0 €	0 €					0 €
	Tecnici	-							
	Pers. ausiliario	-							
Personale a tempo determinato	Ricercatori	33.600 €	33.264 €	33.605,88 €					33.605,88 €
	Tecnici	-							
	Pers. ausiliario	-							
Missioni nazionali ed estere		3.900 €	3.861 €	3.271,31 €					3.271,31 €
B) Subtotale Personale		148.200 €	37.125 €	36.877,19 €					36.877,19 €
C) Materiale di consumo		7.790 €	7.712 €	8.737,75 €					8.737,75 €
D) Attività esterne									
C1 – Consulenze									
C2 – Convenzioni									
C3 – Manutenzioni ecc.		2.000 €	1.980 €	1.761,86 €					1.761,86 €
D) Attrezzature									
E) Spese generali		4.710,00 €	4.663 €	4.710,00 €					4.710,00 €
F) Cordinamento									
TOTALE		162.700 €	51.480 €	51.722,80 €					51.722,80 €

Timbro Istituzione	Il responsabile di gestione o del delegato nome e cognome:	Il Coordinatore di progetto Laura Tomassoli
	firma	firma 