

Giornata di studio:

No Pest: nuovi pesticidi a base di peptidi
per un'agricoltura sostenibile

25 novembre 2024

Relatori

Paolo Pesaresi (*coordinatore*), Silvia Laura Toffolatti, Vaibhav Srivastava,
Simona Masiero, Sandrine Onger, Hanoach Senderowitz, Javier Tardáguila,
Maria Isabella Pozzi

Sintesi

NoPEST, Novel PESTicides for a sustainable agriculture, è un progetto di sei anni sviluppato nell'ambito del programma FET-OPEN CHALLENGING CURRENT THINKING. L'obiettivo del progetto è quello di esplorare nuovi approcci per identificare molecole a basso rischio e rispettose dell'ambiente, da utilizzare per la protezione delle specie di rilevanza agronomica. In particolare, NoPEST mira a contrastare le infezioni da oomiceti nelle colture. Gli oomiceti, microrganismi eucarioti simili a funghi, sono gravi patogeni delle colture, estremamente dannosi per diverse specie di interesse agricolo come la patata, il pomodoro e la vite, e rappresentano una minaccia per la produzione alimentare e la biodiversità vegetale globale. Per controllare le infezioni da oomiceti vengono attualmente utilizzati composti altamente inquinanti a base di rame e NoPEST ha l'ambizione di identificare valide alternative ai pesticidi convenzionali basate su piccoli peptidi antimicrobici. Di seguito sono elencati gli interventi dei partner del progetto che descrivono gli obiettivi e i principali risultati ottenuti.

NoPEST, Novel PESTicides for a sustainable agriculture, is a six-years project undertaken under the framework of FET-OPEN CHALLENGING CURRENT THINKING program. It is aimed to explore new approaches to identify low-risk, environmentally friendly molecules to be used for crop protection. Specifically, NoPEST aims to counteract crop oomycete infections. Oomycetes, i.e. fungus-like eukaryotic microorganisms, are severe crop pathogens, extremely harmful to various crops of agricultural interest such as potato, tomato and grapevine, and they pose a threat to food production and global plant biodiversity. Highly polluting copper-based compounds are currently used to control oomycete infections, and

NoPEST has the ambition to identify valid alternatives to conventional pesticides based on small antimicrobial peptides. Listed below are the talks of project partners describing the project's objectives and main achievements.

PAOLO PESARESI¹

Introduction on the No PEST Project

¹ Università degli Studi di Milano, Italia

L'agricoltura moderna si affida ai pesticidi per evitare perdite e produrre alimenti di alta qualità. Negli ultimi decenni è stato registrato un aumento nella quantità di pesticidi utilizzati a livello globale pari a 15-20 volte. Tuttavia, l'uso eccessivo di pesticidi è dannoso per l'ambiente e ha ricadute negative sulla salute dell'uomo. L'Unione Europea (Direttive 1107/2009/CE e 473/2002) ha avviato cambiamenti normativi molto restrittivi sui pesticidi basati su dati tossicologici, sulla tracciabilità e sull'impatto ambientale. La ricerca e l'identificazione di alternative che siano affidabili e a basso rischio è quindi obbligatoria.

L'innovazione del progetto NoPEST parte da un nuovo approccio biotecnologico basato su aptameri peptidici, con lo scopo di contrastare le infezioni di oomiceti delle colture commerciali, quali vite, patata e pomodoro. Gli aptameri peptidici sono piccole molecole ad alta affinità che inibiscono specificamente l'attività di un enzima bersaglio e rappresentano una alternativa a basso rischio ai pesticidi convenzionali. Inoltre, il progetto NoPEST sviluppa strumenti di agricoltura di precisione, per ottimizzare i siti e i tempi di applicazione, riducendo i costi e l'impatto ambientale dei trattamenti. I vantaggi principali includono un impatto basso o nullo sull'ambiente, sulla salute degli animali e dell'uomo, poiché i peptidi sono costituiti da amminoacidi naturali, inoltre questa strategia può essere applicata potenzialmente a qualsiasi patogeno.

In occasione dell'incontro conclusivo del progetto NoPEST, presso l'Accademia dei Georgofili a Firenze, i principali risultati sono presentati alla comunità scientifica e ai principali attori del settore degli agrofarmaci:

Modern agriculture relies on pesticides to avoid losses and produce high-quality foods. A 15 to 20-fold increase in the amount of pesticides used globally has been reported over the past decades. However, the overuse of pesticides is harmful to the environment and has led to pollution, greenhouse gas emissions, and potential

impact on human health. The European Union (Directives 1107/2009/EC and 473/2002) has initiated very restrictive regulatory changes in pesticide registration based on toxicology, traceability and environmental impact. The discovery of low-risk and reliable alternatives is, therefore, mandatory.

The innovative nature of NoPEST relies on a novel biotechnological approach based on peptide aptamers, to solve disease issues in commercial crops. Peptide aptamers are high-affinity short molecules that specifically inhibit the activity of a target enzyme, and represent a remarkable green, low-risk, alternative to pesticides. In addition, NoPEST will develop precision farming tools to optimise application sites and timing, reducing the cost and environmental impact of field treatments. Key benefits include low or no impact on the environment, on animal and human health, as peptides consist of natural amino-acids, and the fact that this strategy can be applied to potentially any pathogen.

At the final meeting of the NoPEST project that will take place at the Accademia dei Georgofili, in Florence on November 25th, we will present to the scientific community and stakeholders our mains findings, as reported below.

SILVIA LAURA TOFFOLATTI¹

Challenges in screening for fungicide efficacy: a path to innovative plant protection

¹ Università degli Studi di Milano, Italia

Le minacce biotiche rappresentano un rischio significativo per la sicurezza alimentare globale, in quanto comportano una riduzione della resa dei raccolti (20-40%), della qualità, del valore nutrizionale e dell'accessibilità economica, oltre a sconvolgere la stabilità delle catene di approvvigionamento. I prodotti fitosanitari sono fondamentali per mitigare queste perdite, ma lo sviluppo di strategie efficaci sta diventando sempre più complesso. Ciò è dovuto a diversi fattori, tra cui la riduzione dei prodotti fitosanitari sintetici tradizionali disponibili, dovuta anche a normative UE più severe, e la crescente resistenza dei patogeni ai trattamenti esistenti.

L'urgente necessità di soluzioni innovative ed economicamente vantaggiose per il controllo dei patogeni delle piante richiede un processo affidabile per la valutazione dell'efficacia dei nuovi prodotti. Tuttavia, determinare l'efficacia dei pesticidi non è semplice: ogni patogeno presenta sfide uniche e trovare i metodi appropriati per valutare i livelli di controllo è fondamentale. Lo screening dell'efficacia comprende diverse fasi, dai test di laboratorio alle prove in campo, passando dagli ambienti controllati alle condizioni reali.

Questo intervento illustrerà le principali linee guida e le migliori pratiche per condurre un robusto screening dell'efficacia dei fungicidi, fornendo approfondimenti sulle sfide e le opportunità nello sviluppo di fungicidi di nuova generazione.

Biotic threats from pests pose significant risks to global food security, leading to reductions in crop yield (20-40%), quality, nutritional value, and economic accessibility, while disrupting the stability of supply chains. Plant protection products (PPPs) are crucial in mitigating these losses, yet developing effective strategies is becoming increasingly complex. This is due to several factors, including the reduction in available traditional synthetic PPPs, driven by stricter EU regulations, and the growing resistance of pests to existing treatments.

The urgent need for innovative, cost-effective solutions for controlling plant pathogens requires a reliable process for evaluating the efficacy of new products. However, determining fungicide efficacy is not straightforward: each pathogen presents unique challenges, and finding the appropriate methods to assess control levels is critical. Efficacy screening spans multiple stages, from laboratory testing to field trials, transitioning from controlled environments to real-world conditions.

This talk will outline key guidelines and best practices for conducting robust efficacy screening, providing insights into the challenges and opportunities in developing next-generation fungicides.

VAIBHAV SRIVASTAVA¹

Targeting the Cell Wall: A novel Approach to Disease Control

¹ Royal Institute of Tecnology, Svezia

Gli oomiceti sono tra i patogeni eucarioti più devastanti per le colture, come la peronospora del pomodoro e della patata e la peronospora delle vite. La parete cellulare degli oomiceti svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'integrità cellulare, nella crescita e nei meccanismi di infezione. Abbiamo valutato la composizione della parete cellulare degli oomiceti come bersaglio interessante per il controllo delle infezioni. La parete cellulare è composta principalmente da cellulosa e β -glucani. L'interruzione della biosintesi di questi polisaccaridi può compromettere la capacità del patogeno di invadere i tessuti dell'ospite e portare alla morte cellulare. Gli enzimi specifici coinvolti nella biosintesi della parete cellulare sono stati identificati e analizzati come potenziali bersagli per lo sviluppo di nuove strategie di biocontrollo, tra cui gli aptameri peptidici.

Oomycetes are among the most devastating eukaryotic pathogens in crop production, such as late blight and downy mildew. The cell wall of oomycetes plays a vital role in maintaining cellular integrity, growth, and infection mechanisms. We assessed the composition of the oomycete cell wall as an attractive target for disease control. It is primarily composed of cellulose and β -glucans. Disrupting biosynthesis of these cell wall polysaccharides may impair the pathogen's ability to invade host tissues, and lead to cell death. The specific enzymes involved in cell wall biosynthesis were identified and analysed as potential targets for the development of novel biocontrol strategies.

SIMONA MASIERO¹

NoPEST technology

¹ Università degli Studi di Milano, Italia

Le librerie combinatoriali di peptidi codificati geneticamente sono strumenti utili a identificare peptidi da utilizzare con scopi terapeutici, antimicrobici e nell'ambito della biologia sintetica. I peptidi ciclici, ovvero "peptidi organizzati ad anello che abbraccia più residui aminoacidici", sono preferibili alle loro controparti lineari per molte ragioni, tra cui una maggiore stabilità *in vivo*, una migliore resistenza alle eso- ed endo-peptidasi e una rigidità strutturale che favorisce un legame più stretto e più specifico con il bersaglio. Inoltre la ciclizzazione del peptide migliora la permeabilità cellulare, consentendo interazioni efficienti con bersagli intracellulari. Nell'ambito del progetto NoPEST, abbiamo utilizzato la strategia SICLOPPS per ottenere una libreria combinatoriale di peptidi ciclici adatta al saggio del doppio ibrido in lievito basato sul fattore di trascrizione GAL4. Il vantaggio dell'utilizzo del sistema del doppio ibrido in lievito consiste nella possibilità di poter effettuare lo screening *in vivo* di aptameri peptidici senza la necessità di esprimere e purificare la proteina bersaglio. Questa strategia ha permesso di isolare diversi peptidi antimicrobici, efficaci nel bloccare le infezioni da oomiceti in vite, patata e pomodoro.

Genetically-encoded combinatorial peptide libraries are convenient tools to identify peptides to be used as therapeutics, antimicrobials and functional synthetic biology modules.

Cyclic peptides – i.e. "peptidic structures bearing a ring that spans multiple amino acid residues – are preferable to their linear counterparts for many reasons,

as they display higher in vivo stability, improved resistance to exo- and endo-peptidases and structural rigidity, which favour tighter and more target binding, moreover, peptide cyclization might enhance cellular permeability, allowing efficient interactions with intracellular targets.

In the frame of NoPEST, we used the SICLOPPS lariat-generating cyclic peptide strategy to obtain a combinatorial cyclic peptide library suitable for the GAL4-based Y2H assay. The advantage of using the Y2H system relies on the fact that the screening can be performed in vivo with no need to express and purify the target protein. This strategy, allowed the isolation of different antimicrobial peptides effective for blocking oomycete infections in grapevine, potato and tomato.

SANDRINE ONGERI¹

Design and synthesis of proteolytically stable peptides and peptidomimetics to replace conventional pesticides for sustainable agriculture

¹ Université Paris Saclay, Francia

L'elevata selettività e la bassa persistenza ambientale rendono i peptidi composti attivi promettenti per lo sviluppo di prodotti fitosanitari di nuova generazione. Tuttavia, i peptidi di pochi aminoacidi soffrono di instabilità proteolitica, che può essere considerata uno dei principali svantaggi per l'adozione in campo su larga scala di questi composti. Nel settore farmaceutico sono state adottate diverse strategie, tra cui strategie di formulazione, ciclizzazione e modifiche degli stessi aminoacidi, per superare questo problema di stabilità.

Dai risultati dei test di stabilità alla proteolisi di due peptidi ciclici, sono state eseguite alcune modifiche agli aminoacidi al fine di:

- mantenere la buona attività antimicrobica dei peptidi ciclici;
- sviluppare una sintesi più semplice dei peptidi, ottenibile mediante sintesi in fase solida;
- aumentare la stabilità alla proteolisi degli analoghi lineari per evitare l'ultima fase di ciclizzazione e quindi aumentare le rese di sintesi;
- considerare la possibilità di sintesi su larga scala per la bioproduzione di peptidi o per sintesi in fase solida.

Tra le varie modifiche effettuate, la sostituzione nelle sequenze peptidiche di alcuni L-amminoacidi naturali con i loro analoghi D-amminoacidi o con idrazinoacidi sono le strategie più promettenti per aumentare la stabilità e mantenere un'ottima attività antimicrobica.

High selectivity and low environmental persistence make short peptides promising leads for the development of next-generation crop protection products. However, short peptides suffer from proteolytic instability, which can be considered as one of the major drawbacks for the large-scale adoption of these compounds in field conditions. Nevertheless, in the pharmaceutical sector, various strategies, including formulation strategies, cyclization and backbone modifications, have been adopted to overcome this stability issue.

From the results of stability towards proteolysis of two lead cyclic peptides, some modifications have been performed with the aim of retaining as many natural amino acids as possible in the sequence of the cyclic peptide and focussing mainly on their linear analogues, in order to:

- *retain the good antimicrobial activity of the cyclic peptides;*
- *develop an easier synthesis of the peptides, achievable by solid-phase synthesis;*
- *increase the stability towards proteolysis of the linear analogues to avoid the last step cyclisation and thus increase synthesis yields;*
- *consider the ability of large-scale synthesis for peptide bioproduction or by solid-phase synthesis.*

Among the various modifications carried out, the replacement in the peptide sequences of certain natural L-amino acids by their D-amino acid analogues or by hydrazino acids are the most promising strategies to both increase the stability and maintain very good antimicrobial activity.

HANOCH SENDEROWITZ¹

Virtual Screening for Non-Peptide Small Molecules

¹ Bar-Ilan University, Israele

Parte del lavoro del progetto NoPEST si concentra sulla progettazione di piccoli composti non peptidici per inibire le proteine essenziali degli oomiceti o le interazioni proteina-proteina. A tal fine, i nostri sforzi si sono concentrati su due proteine di *P. infestans*: la pectina metilesterasi (PME) e la proteina effettrice RxLR54. Quest'ultima si lega alla proteina ATG8 e interrompe l'autofagia selettiva dell'ospite. L'interruzione dell'interazione RxLR54-ATG8 può quindi aiutare a combattere l'infezione. Un modello della struttura proteica di PME di *P. infestans* è stato generato sulla base della struttura della proteina PME di *Aspergillus niger* (PDB: 5c1e), mentre per RxLR54-ATG8 abbiamo utilizzato la struttura cristallina di un peptide composto dai cinque residui al C-terminale di RxLR54 legati ad ATG8 (PDB: 5L83). Una volta costruito e validato, il modello/struttura risultante è stato utilizzato per lo screening

virtuale di piccole molecole inibitrici. I modelli farmacofori basati sul sito di legame sono stati utilizzati per esaminare rapidamente circa 30 milioni di piccole molecole disponibili in commercio. Abbiamo selezionato 20 ligandi per PME e 18 ligandi per RxLR54, che sono serviti come punto di partenza per un secondo ciclo di screening *in silico* in cui sono stati esaminati circa 40 milioni di composti contro il sito di legame della PME, culminato nella selezione di 20 molecole non-peptidiche virtuali che sono attualmente in fase di valutazione per le loro proprietà antimicrobiche.

*Part of the NoPEST work focuses on designing small compounds that could inhibit oomycetes-essential proteins or protein-protein interactions. To this end, our own efforts focused on two proteins, namely, Pectin methylesterase (PME) from *Phytophthora infestans* (Potato late blight fungus) which is expressed in multiple organisms and modify plant cell-wall pectins for various physiological roles and RxLR effector protein 54 from *P. infestans* which binds to the ATG8 protein through its ATG8 family-interacting motif and disrupts host-selective autophagy. Disrupting the PexRD54-ATG8 interaction may therefore help to combat infection. A model of PME from *Phytophthora infestans* was generated based on the structure of the PME from *Aspergillus niger* (PDB: 5c1e), while for PexRD54-ATG8, we used a crystal structure of a peptide composed of the five C-termini residues of PexRD54 bound to ATG8 (PDB: 5L83). Once constructed and validated, the resulting model/structure were subjected to virtual screening campaigns in search for small molecules inhibitors. Binding site-based pharmacophore models were used to rapidly screen ~30M commercially available small molecules. We selected 20 ligands for Pectin methylesterase and 18 ligands for RxLR effector protein 54, and they served as a starting point for a second round of *in silico* screening in which ~40M compounds were screened against the binding site of PME, culminating in the selection of 20 virtual hits which are currently under evaluation for their antimicrobial properties.*

JAVIER TARDÁGUILA¹

Downy mildew detection in vineyards using proximal sensing technologies and artificial intelligence

¹ University of La Rioja, Spagna

I sintomi riconoscibili della peronospora, causata da *Plasmopara viticola*, comprendono piccole decolorazioni fogliari che rendono difficile l'identificazione

e la gestione tempestiva della malattia. Gli attuali metodi di rilevamento, che si basano su ispezioni visive, sono soggettivi, inefficienti e richiedono molto tempo. È quindi urgente individuare un approccio affidabile e automatizzato per identificare i sintomi della peronospora. L'obiettivo principale di questo studio è quello di mettere a punto un metodo per individuare precocemente le piante di vite infettate, utilizzando immagini RGB raccolte in campo e tecniche di "machine learning". Le immagini sono state acquisite sia manualmente che in movimento utilizzando una piattaforma mobile, simulando così le condizioni che gli agricoltori potrebbero incontrare durante l'ispezione delle loro colture. Per analizzare queste immagini, è stata implementata una tecnica a finestre scorrevoli, dividendo le immagini più grandi in sotto-immagini più piccole. Successivamente, ogni sotto-immagine è stata classificata per valutare se presentava sintomi di peronospora. La natura automatizzata e interpretabile del metodo proposto non solo migliora l'efficienza del rilevamento delle malattie, ma fornisce agli agricoltori gli strumenti necessari per prendere decisioni informate sulla gestione delle colture.

Recognizable symptoms of downy mildew disease, caused by Plasmopara viticola, include small leaf discoloration making it difficult to promptly identify and manage the disease. Current detection methods, relying on visual inspections, are subjective, inefficient, and time-consuming. Hence, there is a pressing need for a reliable and automated approach to identify downy mildew disease symptoms. The primary goal of this study is to devise a method for detecting this key disease in grapevine plants using in-field RGB images and machine learning techniques. This work involved the capture of images of grapevine canopies from different commercial vineyard plots. RGB images were collected both manually and on-the-go using a mobile platform, thereby simulating the conditions that farmers might encounter while inspecting their crops. To analyse these images, a sliding window technique was implemented, dividing larger canopy images into smaller sub-images. Subsequently, each sub-image was classified to ascertain whether it displayed symptoms of downy mildew. The high level of precision in localisation is of critical importance for farmers who are seeking to implement targeted treatments and management practices in an effective manner. The automated and interpretable nature of the proposed method not only enhances the efficiency of disease detection but also empowers farmers with the tools they require to make informed decisions about crop management.

MARIA ISABELLA POZZI¹

Field tests: Preliminary efficacy trials data evaluation on Grapevine and Potato in open field conditions

¹ SIPCAM OXON, Italia

I peptidi LP20 e CP20 sono stati selezionati per la loro capacità di controllo di *Plasmopara viticola* e *Phytophthora infestans*. Sono state condotte sei prove di efficacia in diversi Paesi europei, tra cui Spagna nord-occidentale, Francia occidentale e Italia nord-occidentale. Per tutte le prove è stato applicato lo stesso disegno sperimentale: per ogni peptide sono stati usati 3 dosaggi, al fine di definire la migliore concentrazione, e una frequenza di trattamento settimanale, fino a un massimo di 6 trattamenti. La stagione 2024 è stata caratterizzata da un clima piovoso e caldo in quasi tutte le località in cui si sono svolte le prove, favorendo l'insorgenza naturale dei patogeni e raggiungendo in alcuni casi livelli d'infezione molto importanti. I risultati delle prove non hanno evidenziato differenze tra i peptidi in termini di efficacia. Inoltre, non è stata osservata una risposta statisticamente significativa alla dose per entrambi i peptidi, sebbene la dose più alta abbia ottenuto il miglior controllo della malattia. A fine stagione, il range di efficacia dei peptidi sulla peronospora della vite varia dal 50-80% sulle foglie al 50-85% sui grappoli, mentre sulla peronospora della patata raggiunge solo il 30-40%. In generale, entrambi i peptidi sono più efficaci contro *P. viticola*, peronospora della vite, che contro *P. infestans*, peronospora della patata.

Peptides LP20 and CP20 were selected for their Plasmopara viticola and Phytophthora infestans control capacity. A total of 6 efficacy trials were carried out in European countries, including Northwest Spain, West France and Northwest Italy. The same trial design was applied for all trials: for each candidate, 3 dose rates for each peptide and in field formulation test for one of the two peptides in order to highlight possible differences and define best performance. Experimental products had a weekly application frequency, up to a maximum of 6 applications. 2024 season was characterized by rainy and warm weather in almost all trials locations, conducive to pathogens natural onset, achieving in some cases strong and challenging pressure. All trials are considered valid due to significant and widespread infestation level. Trials results did not point out a difference between peptides in terms of efficacy. Furthermore, no statistical dose rate response for both peptides was observed, although the higher rate achieved the best disease control, always inferior to the reference standards. At the end of the season the efficacy range

of peptides highest rate on grape downy mildew varies from 50-80% on leaves to 50-85% on bunches, while on potato late blight it reached only the 30-40%. As a general statement both peptides are more effective against Plasmopara viticola, grape downy mildew, than Phytophthora infestans, potato late blight.