

Tecnologia trasversale a tutte le filiere
Strategie di difesa

Innovazione matura:

Sequenziamento ad alta prestazione per la diagnosi di patogeni delle piante: dal laboratorio al pieno campo

Luisa Rubino, Beatriz Navarro, Francesco Di Serio
*Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Via Amendola
165/A, 70126 Bari*

Parole chiave: diagnosi, sequenziamento ad alta prestazione

La diagnosi precoce dei patogeni delle piante è un elemento essenziale per contenerne la diffusione, e assume particolare importanza quando ci si trova a fronteggiare nuove epidemie. I sintomi di una malattia spesso compaiono in uno stadio avanzato dell'infezione e sono ben visibili solo sulla parte aerea della pianta. Inoltre, le infezioni simultanee di più agenti patogeni possono portare a sintomatologie complesse che rendono difficile una diagnosi certa basata sulla esclusiva osservazione dei sintomi. Per aumentare l'affidabilità della diagnosi spesso si ricorre a metodi sierologici o molecolari che identificano rispettivamente una proteina o un acido nucleico del patogeno. Se però la malattia è causata da un agente patogeno ancora sconosciuto neppure questi metodi diagnostici possono risolvere il problema. Infatti, nel caso dei metodi sierologici e molecolari è necessario possedere preventivamente una conoscenza della natura del possibile agente infettivo per poter scegliere i reagenti (anticorpi, sonde molecolari o oligonucleotidi) più adatti a identificarlo. In tempi molto recenti il sequenziamento ad alta prestazione (*high throughput sequencing, HTS, o next-generation sequencing, NGS*) si è dimostrato estremamente efficace per l'identificazione di patogeni conosciuti, anche senza avere alcuna idea pregressa della loro presenza nel campione, o addirittura sconosciuti, mai identificati prima e quindi totalmente nuovi. Il sequenziamento ad alta prestazione ha finora avuto come limiti l'ingombro della macchina, e la necessità di svolgere alcune operazioni in laboratori specializzati e di possedere conoscenze di bioinformatica per l'elaborazione dei dati. I tempi di risposta non sono rapidi e questo può portare a ritardi nella messa in opera di strategie di intervento.

Più recentemente, è stato sviluppato un dispositivo che permette l'analisi di campioni direttamente in campo o comunque nei pressi del luogo di raccolta, riducendo drasticamente la necessità di infrastrutture di laboratorio o di personale esperto, ma soprattutto abbattendo i tempi e i costi delle analisi. Si tratta del MinION (Oxford Nanopore Technologies), che è stato già applicato con successo per la rilevazione di virus dell'uomo come Ebola e Zika. È un piccolo

apparecchio delle dimensioni di uno smartphone, alimentato a pile, che pesa meno di 100 grammi e si collega a un qualunque computer, fisso o portatile, mediante un cavo USB (Fig. 1). La tecnologia si basa appunto sui nanopori, ovvero dei pori di dimensioni infinitesime, attraverso i quali viene fatto passare un flusso di corrente di cui vengono misurate le variazioni indotte dal campione. Il MinION è stato già impiegato per l'identificazione di patogeni fungini e batterici di conifere, della patata e del grano, e soprattutto per la diagnosi di virus delle piante, quale per esempio il virus della sharka delle drupacee. Può essere utilizzato in qualsiasi ambiente al di fuori di un laboratorio, ed è stato provato nella giungla, in montagna, nell'Artide e perfino nella Stazione Spaziale Internazionale.

Ad oggi, l'applicazione in campo più eclatante è stata lo studio dei virus che attaccano la cassava (*Manihot esculenta* Crantz), che rappresenta un'importantissima fonte di nutrimento e reddito per gli abitanti dell'Africa Sub-Sahariana. I ricercatori, armati semplicemente di un MinION, di un piccolo computer e di un sistema di estrazione del DNA portatile messo a punto per l'operazione, sono stati in grado di sequenziare tutti i virus presenti nella cassava, indicando agli agricoltori le varietà resistenti da piantare. Grazie alla facilità d'uso dell'attrezzatura, l'intervento ha permesso di portare un livello di conoscenza avanzato dai laboratori direttamente agli agricoltori, e ha avuto un forte impatto sull'economia locale in tempi brevi. Infatti, la delocalizzazione nei campi delle analisi che vengono normalmente svolte in laboratorio permette di prendere assai rapidamente decisioni che con altri metodi avrebbero richiesto mesi e comportato perdite ingenti.

I vantaggi offerti dal MinION sono notevoli. I risultati vengono ottenuti nel giro di 2-3 ore e possono essere analizzati *in loco*. Infatti, sono stati sviluppati database che possono essere scaricati su un computer portatile e quindi il sistema può operare anche in assenza di collegamento internet. Il costo dell'apparecchio (circa 1000 euro) è molto contenuto, sono invece più costosi i kit per l'analisi dei campioni e la sostituzione periodica della "flow cell", che contiene i nanopori. Per questo motivo, il MinION risulta sostenibile da servizi pubblici, quali i Servizi Fitosanitari, enti di ricerca, e imprese e aziende vivaistiche di grandi dimensioni. I miglioramenti attesi riguardano soprattutto i sistemi di estrazione dei campioni, che possono essere resi più semplici e rapidi, soprattutto per alcuni virus, la standardizzazione dei metodi per aumentare la riproducibilità e la diminuzione dei costi per i reagenti. Questo sistema può trovare applicazione in tutte le filiere.

Bibliografia

Boykin LM, Sseruwagi P, Alicai T, Ateka E, et al (2019) Tree Lab: Portable Genomics for Early Detection of plant Viruses and Pests in Sub-Saharan Africa. *Genes* **10**: 632. doi:10.3390/genes10090632

Bronzato Badial A, Sherman D, Stone A, Gopakumar A, Wilson V, Schneider W, King J (2018) Nanopore Sequencing as a Surveillance Tool for Plant Pathogens in Plant and Insect Tissues. *Plant Disease* **102**: 1648-1652

Hu Y, Green GS, Milgate AW, Stone EA, Rathjen JP, Schwessiger B (2019) Pathogen Detection and Microbiome Analysis of Infected Wheat Using a Portable DNA Sequencer. *Phytobiomes Journal* **3**: 92-101

Shaffer L (2019) Portable DNA sequencer helps farmers stymie devastating viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **116**: 3351-3353



Fig. 1. MinION (Oxford Nanopore Technologies)