Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

Progetto di Ricerca e Sviluppo

Rigenerazione Sostenibile dell'agricoltura nei territori colpiti da xylella fastidiosa

CUP: J89J21013750001

Partner CNR - IPSP

Task 1.4.3 – Risultato n. 6

Focus sistemi diagnostici disponibili e da sviluppare per la tutela di colture innovative

WP1:	**Analisi di Contesto**
Area tematica:	**NUOVI SCENARI PRODUTTIVI POST XYLELLA**
Attività:	**Task 1.4: olivo e oltre. Impatti della xylella sui sistemi produttivi e scenari di convivenza con il batterio.**
Partecipanti:	**Task leader Pierfederico La Notte CNR** **Dr.ssa Loredana Barbarossa, Dr. Hysen Kokici**

Task 1.4.3 R6 Focus sistemi diagnostici disponibili e da sviluppare per la tutela di colture innovative.

Le malattie delle piante causate da agenti fitopatogeni (funghi, batteri, virus, viroidi e fitoplasmi) sono responsabili di gravi perdite economiche nel settore agricolo in tutto il mondo. Il monitoraggio della salute delle piante e il rilevamento precoce degli agenti patogeni sono essenziali per ridurre la diffusione delle malattie e facilitare pratiche di gestione efficaci, è necessario quindi avere a disposizione tecniche diagnostiche innovative e ad elevata sensibilità.

I metodi tradizionali di diagnosi delle malattie solitamente iniziano con l'osservazione e l'interpretazione dei sintomi presenti sui tessuti malati, proseguono con lo studio delle caratteristiche morfologiche dei patogeni attraverso la loro crescita su specifici terreni di coltura (se coltivabili), oppure attraverso l'osservazione al microscopio ottico ed elettronico (se non coltivabili *in vitro*). In alcuni casi, i metodi tradizionali rimangono ancora i più rapidi, appropriati ed economici, tuttavia bisogna considerare che la semplice osservazione della pianta non consente di rilevare le infezioni latenti, quando non ci sono sintomi evidenti e, in ogni caso, l'identificazione del patogeno dipende dall'esperienza e dall'abilità dell'osservatore.

Idealmente, una tecnica di rilevamento dei patogeni vegetali deve essere specifica, sensibile, accurata, affidabile, veloce, facile da usare, economica e in grado di rilevare patogeni in matrici complesse, come campioni di terreno o estratti vegetali. Oltre ai metodi sierologici e molecolari già ampiamente utilizzati, trovano sempre maggiore applicazione i biosensori e le tecniche di sequenziamento ad altro rendimento e, considerando le diverse opzioni disponibili oggigiorno, è opportuno selezionare il metodo più adatto all'uso specifico da trattare.

1. Metodi diagnostici non invasivi

Con l'avvento della digitalizzazione, il rilevamento delle malattie delle piante mediante l'uso dell'"imaging" e delle tecniche ottiche o dell'analisi spettrale ha registrato un aumento costante. È stato infatti dimostrato che piante stressate

o malate producono una firma spettrale diversa rispetto a quella delle piante sane. Ad esempio, agli stress biotici, le piante rispondono con cambiamenti relativi al contenuto di clorofilla e alla radiazione termica, e persino al loro movimento. Questi cambiamenti sono rilevabili attraverso l'analisi spettrale prima che siano visibili sintomi della malattia come l'avvizzimento o le lesioni fogliari.

Sono attualmente disponibili diversi metodi spettrali avanzati per misurare tali cambiamenti nella radiazione elettromagnetica emessa o riflessa dalle piante, metodi applicati su scale diverse, che vanno dall'acquisizione di immagini ad alta risoluzione da una singola foglia, all'utilizzo di droni che effettuano analisi spettrali di interi campi. Inoltre, considerando la continua riduzione in dimensioni, peso e costo di questi sensori, il loro impiego può diffondersi nel settore agricolo, con un grande potenziale di automazione per scopi di monitoraggio di routine. L'uso di droni facilita il monitoraggio di routine di vaste aree di coltivazione, consentendo di rilevare la presenza di piante sottoposte a forte stress biotico. Su scala più ampia, l'"imaging" satellitare ad alta risoluzione ha già dimostrato il suo potenziale per rilevare lo stress biotico in diversi casi, con una precisione superiore al 75%.

Le tecniche ottiche o spettrali presentano numerosi vantaggi: (i) il rilevamento può essere effettuato in tempo reale mediante monitoraggio continuo delle colture; (ii) può rilevare lo stress biotico; e (iii) è un metodo di rilevamento non invasivo, che non richiede alcuna manipolazione del campione. Tuttavia, mentre l'acquisizione dei dati mediante sensori ottici è diventata relativamente semplice, l'interpretazione dei dati per rilevare lo stress biotico nella pianta può essere molto complessa e richiede lo sviluppo di algoritmi specifici, che di solito coinvolgono l'apprendimento automatico o le reti neurali. Inoltre, le tecniche di "imaging possono rilevare lo stress biotico nella pianta prima della comparsa di sintomi visibili, però mancano della capacità di identificare specifici agenti patogeni, quindi è necessario anche eseguire un campionamento mirato e rapido nelle aree di interesse.

2. Test immunologici o sierologici

Molti agenti patogeni possono essere rilevati utilizzando antisieri policlonali e monoclonali e tecniche quali: test ELISA, western blot, test immunostrip, test

di legame immunitario dot-blot e microscopia elettronica sierologicamente specifica (SSEM). Tra queste, l'ELISA, impiegata per la prima volta negli anni '70, è di gran lunga la tecnica immunodiagnostica più utilizzata grazie al suo potenziale ad alto rendimento. La sensibilità dell'ELISA varia a seconda dell'agente patogeno, della freschezza del campione e del titolo.

Antisieri policlonali per molti virus e batteri sono stati sviluppati per uso commerciale o laboratori di ricerca e sono stati utilizzati in numerosi protocolli, ma la loro frequente reattività crociata ha portato allo sviluppo di antisieri monoclonali. Ad oggi sono disponibili procedure ELISA che utilizzano anticorpi sia poli- che monoclonali per numerosi taxa di batteri fitopatogeni.

I metodi basati sull'uso di anticorpi sono poco utilizzabili in campo, soprattutto per l'impiego di reagenti che necessitano di condizioni refrigeranti e possono degradarsi durante i saggi.

Anche il saggio "a flusso laterale" (Lateral flow immunoassays-LFIA) si basa su una reazione antigene-anticorpo, è facile da usare, portatile, economico, con una lunga durata di conservazione (stabilità per 12-24 mesi a temperatura ambiente) e può fornire risultati in breve tempo. La velocità dell'analisi e la facilità d'uso sul campo hanno portato allo sviluppo di diversi LFIA per rilevare i patogeni delle piante.

Un'alternativa all'utilizzo degli anticorpi consiste nell'utilizzo degli aptameri, cioè acidi nucleici a singolo filamento (DNA o RNA, di dimensioni pari a 10-100 nucleotidi) caratterizzati da una specifica struttura tridimensionale che si lega direttamente alla proteina target. L'uso degli aptameri mostra un elevato potenziale per sostituire gli anticorpi nello sviluppo di test ELISA e LFIA, grazie alla facilità di produzione, il basso costo, la resistenza alla degradazione, le dimensioni ridotte e recenti studi ne hanno dimostrato l'utilità per il rilevamento di alcuni fitopatogeni.

3. Test diagnostici molecolari

I metodi basati sugli acidi nucleici permettono la diagnosi dei fitopatogeni in maniera rapida, precoce ed affidabile e presentano molti vantaggi: l'analisi di un elevato numero di campioni, rappresentati da tessuti vegetali di varia sintomatologia, origine e stadio di sviluppo; il rilevamento contemporaneo di

più microorganismi, con conseguente riduzione del costo delle analisi; non necessaria competenza nella morfologia delle specie patogene da identificare.

3.1 Tecniche basate sulla PCR

La PCR ("Polymerase Chain Reaction") rappresenta un metodo essenziale nella diagnostica molecolare dei patogeni vegetali, consiste nell'amplificazione enzimatica esponenziale di una regione specifica del genoma del patogeno ottenuta innescando la reazione attraverso due brevi sequenze oligonucleotidiche ("primers"). La porzione genomica selezionata con i due primers viene amplificata così da ottenere un amplificato visibile su gel di agarosio. La PCR tradizionale è esclusivamente qualitativa e permette l'identificazione e la caratterizzazione di fitopatogeni senza necessità del loro isolamento. Oltre ad avere un'elevata sensibilità e specificità, la PCR è anche notevolmente più veloce rispetto ai metodi convenzionali basati sulla coltura; i risultati possono essere ottenuti nel giro di poche ore.

Bisogna sottolineare che, soprattutto per le tecniche basate sulla PCR, il DNA (o l'RNA) estratto del patogeno nel campione deve essere di elevata purezza, poiché la maggior parte dei test basati sugli acidi nucleici sono sensibili a eventuali inibitori presenti. La presenza di polisaccaridi, composti fenolici o metalli pesanti in tali campioni riduce le prestazioni dei test basati sugli acidi nucleici. Per questo esiste un'ampia varietà di protocolli di estrazione diversi per ottenere DNA puro, protocolli molto semplici sotto forma di kit disponibili in commercio ma anche protocolli complessi, come procedure di estrazione del DNA specificatamente sviluppate per matrici difficili che includono anche pretrattamenti e passaggi enzimatici aggiuntivi e quindi non adatti per le applicazioni al di fuori del laboratorio.

3.1.1 Real-time PCR

La PCR quantitativa 'in tempo reale' (qPCR) consente l'identificazione e la quantificazione accurata di patogeni vegetali che non possono essere coltivati o estratti facilmente dal tessuto ospite. In effetti, la quantificazione dei batteri e dei funghi basata su tecniche di coltura è considerata meno sensibile e più

variabile, mentre la quantificazione utilizzando la qPCR presenta maggiore specificità, affidabilità e velocità.

I prodotti di PCR possono essere monitorati mediante coloranti intercalanti del DNA come SYBRGreen ad alta affinità con il DNA a doppio filamento o sonde TaqMan con sequenze oligonucleotidiche specifiche marcate con un fluoroforo. La curva di calibrazione della PCR in tempo reale è basata su diluizioni seriali del DNA bersaglio. Questa tecnica permette un'elevata efficienza utilizzando sistemi automatizzati basati su micropiastre che possono analizzare da 48 a 384 campioni contemporaneamente.

Diverse qPCR sono state sviluppate nella diagnosi singola o multipla dei patogeni vegetali, inclusi alcuni economicamente importanti e da quarantena.

3.1.2 Digital PCR

Recentemente sono state sviluppate diverse piattaforme digitali di PCR (dPCR), la cui peculiarità consiste nella separazione della miscela di reazione in migliaia o milioni di partizioni, seguita da una rilevazione in tempo reale o end-point dell'amplificazione. La distribuzione delle sequenze bersaglio nelle partizioni è definita dalla distribuzione di Poisson e permette in questo modo una quantificazione accurata e assoluta del DNA bersaglio. In questo modo non è necessario utilizzare materiali di riferimento con le concentrazioni di bersaglio note. In alcuni casi, la tecnica può raggiungere livelli di sensibilità più elevati rispetto alla qPCR.

4. Sequenziamento di nuova generazione

Il Next Generation Sequencing (NGS), nato come tecnica di sequenziamento ad alto rendimento, è stato ben presto utilizzato anche per la diagnostica. Le piattaforme NGS permettono il sequenziamento di milioni di piccoli frammenti di DNA o di RNA, generando, in pochi giorni genomi o trascrittomi completi.

L'impiego di NGS ha permesso un incremento notevole della disponibilità di genomi sequenziati e caratterizzati, con la possibilità di disegnare nuovi saggi

molecolari su regioni specie-specifiche. La genomica comparativa può servire come metodologia per scoprire nuove regioni, anche non codificanti, utili per disegnare nuovi test diagnostici, specialmente tra specie o formae speciales molto vicine filogeneticamente.

Le tecnologie NGS sono state ampliamente utilizzate per la diagnosi di fitovirus, portando alla scoperta di nuove popolazioni di virus presenti in diversi campioni e rivelandosi l'unico strumento che permette di effettuare filogenesi su tutta la popolazione virale presente in un tessuto vegetale.

Biosensori

Sono stati sviluppati sensori per l'identificazione dei patogeni vegetali. I microrganismi possono essere identificati utilizzando un sensore basato su segnali chimici, elettrici, elettrochimici, magnetici e ottici. Il limite di rilevamento può essere incrementato impiegando matrici di nano materiali come trasduttori e la specificità può essere migliorata mediante l'uso di elementi di riconoscimento biologico come DNA, anticorpi o enzimi. L'immobilizzazione dell'elemento di riconoscimento biologico, come il DNA, può essere ottenuta utilizzando vari approcci, tra cui l'adsorbimento della biomolecola, l'incapsulamento, il legame covalente o le loro combinazioni.

Conclusioni

La diagnosi precoce delle infezioni da fitopatogeni è fondamentale per la gestione delle malattie policicliche, causate da agenti capaci di diversi cicli di infezione ogni stagione. Diversi parametri ambientali, tra cui la radiazione solare, la temperatura e il coefficiente di deflusso, presentano variazioni significative all'interno dell'area mediterranea e potrebbero influenzare drasticamente le dinamiche epidemiologiche. Di solito, le infezioni primarie si verificano all'inizio della stagione di crescita, mentre le infezioni secondarie, diffuse da vettori, portano ad uno stadio irreversibile e sintomatico della malattia con conseguente perdita di produzione. Molti agenti patogeni rimangono in forma

latente all'interno delle piante durante l'inverno per poi esplodere nella stagione successiva.

I metodi diagnostici basati sui composti organici volatili si concentrano sull'ospite e potrebbero essere in grado di rilevare le infezioni precoci prima che le infezioni primarie siano manifeste. Quando l'agente patogeno infetta la pianta ospite, si verifica una risposta immediata allo stress indotto e le sostanze volatili indotte precocemente possono consentire l'individuazione della malattia prima che l'agente patogeno raggiunga livelli tali da essere rilevato mediante metodi molecolari o sierologici. Ciò è dovuto all'attivazione di meccanismi patogenetici precoci che, sebbene producano effetti visibili, possono essere rilevati dall'analisi di biomarcatori indotti dall'ospite come trascritti, proteine e sostanze volatili. Pertanto i metodi basati su biomarcatori specifici dell'ospite e del patogeno potrebbero rilevare infezioni nei siti primari, ancor prima dello sviluppo di infezioni secondarie.

Altri metodi innovativi come il telerilevamento ("Remote Sensing") e le tecnologie basate sulla spettroscopia possono accelerare la diagnosi rispetto ai tradizionali test sierologici e sugli acidi nucleici e consentire una migliore analisi della variabilità spaziale e temporale della malattia, soprattutto se calibrati e abbinati a informazioni di riferimento affidabili.

L'applicazione pratica di ciascun metodo, tradizionale o innovativo, dipende da parametri quali il costo e la disponibilità della strumentazione necessaria, l'ambiente di applicazione (pianta, campo, azienda agricola o distretto agricolo), la rapidità dell'analisi e lo stadio della malattia in cui è possibile il rilevamento.

Un metodo può essere applicato con successo su larga scala se è facilmente disponibile.

I kit ELISA sono ampiamente disponibili grazie ai bassi costi delle apparecchiature rispetto ad altri metodi di rilevamento, dimostrano una buona affidabilità, sebbene siano possibili falsi negativi. Tuttavia, il test ELISA necessita di tempo e, preferibilmente, di un laboratorio per essere realizzato.

La PCR quantitativa è un metodo altamente disponibile ed efficace quando sono presenti sintomi sulla pianta, è ampiamente applicata per confermare la diagnosi eseguita sulla base della comparsa dei sintomi. I costi

progressivamente ridotti di kit, reagenti e attrezzature necessarie per l'esecuzione, lo rendono disponibile per l'uso da parte di grandi aziende o consorzi attrezzati con un laboratorio di biologia molecolare. Anche la PCR richiede tempo: sono necessari diversi giorni per estrarre l'RNA, eseguire l'analisi qualitativa dell'RNA, sintetizzare il cDNA, amplificarlo e analizzare i dati risultanti. Inoltre, questo metodo non è in grado di individuare precocemente le infezioni, infatti risulta del tutto inaffidabile prima che compaiano i sintomi. Nella fase asintomatica dell'infezione, i risultati possono presentare frequentemente sia falsi negativi sia falsi positivi, a causa della presenza negli estratti vegetali di inibitori dell'amplificazione, della distribuzione non uniforme dei patogeni e di errori nel campionamento. Essendo i termociclatori sempre più semplici e essenziali, è sempre più frequente la possibilità di realizzare i test senza la necessità di laboratori attrezzati.

Per quanto riguarda l'affidabilità dei metodi diagnostici, non è possibile fare una valutazione e redigere una scala comparativa di affidabilità tra le diverse tecniche considerando che specificità e sensibilità devono essere validate tenendo conto anche dell'agente patogeno e della pianta ospite.

In prospettiva futura, tra i metodi diagnostici da sviluppare e rendere disponibili sul mercato ci sono i sensori basati sulla biofotonica, che hanno tre punti di forza: (1) possono rilevare efficacemente le fasi iniziali dell'infezione, (2) forniscono risultati sono e presentati direttamente in campo e (3) potrebbero essere altamente integrati con altri sistemi e operando direttamente in ambiente naturale (ecosistema). Analogamente il monitoraggio attraverso il RS ha un grande potenziale per la gestione sostenibile dei fitopatogeni, rappresenta un valido strumento per rilevare infezioni precoci ed eradicare le piante infette evitando la diffusione dell'infezione. Una volta sviluppati nuovi metodi diagnostici non invasivi e i relativi protocolli, sono necessarie procedure standardizzate e imparziali per convalidare e certificare i protocolli per la diagnosi delle malattie.

Martinelli Federico, Scalenghe Riccardo, Davino Salvatore, Panno Stefano, Scuderi Giuseppe, et al., 2015. **Advanced methods of plant disease detection. A review.** Agronomy for Sustainable Development, 2015, 35 (1), pp.1-25. https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1

Fang Yi and Ramaraja P. Ramasamy, 2015. **Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection.** Biosensors 2015, 4, 537-561; https://doi:10.3390/bios5030537

Khakimov A, Salakhutdinov I, Omolikov A, Utaganov S, 2021. **Traditional and current-prospective methods of agricultural plant diseases detection: A review.** 3rd International Conference on Agriculture and Bio-industry (ICAGRI 2021). https://doi.org/10.1088/1755-1315/951/1/012002 (To cite this article: A Khakimov et al 2022 IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 951 012002)

Srividya Attaluri, Rathnaprabha Dharavath, 2023. **Novel plant disease detection techniques-a brief review.** Molecular Biology Reports (2023) 50:9677–9690. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08838-y

Venbrux M, Crauwels S and Rediers H, 2023. **Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection.** Frontiers in Plant Science (2023). https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968