

I GEORGOFILI

Quaderni
2010-X



DIFESA DELLE COLTURE DA PATOGENI
E PARASSITI TRASMESSI PER SEME

Firenze, 1 dicembre 2010



EDIZIONI POLISTAMPA

Con il contributo di



ENTE CASSA DI RISPARMIO DI FIRENZE

Copyright © 2011
Accademia dei Georgofili
Firenze
<http://www.georgofili.it>

Proprietà letteraria riservata

Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili»
Anno 2010 - Serie VIII - Vol. 7 (186° dall'inizio)

Direttore responsabile: Paolo Nanni

Edizioni Polistampa
Via Livorno, 8/32 - 50142 Firenze
Tel. 055 737871 (15 linee)
info@polistampa.com - www.polistampa.com
Sede legale: Via Santa Maria, 27/r - 50125 Firenze

ISBN 978-88-596-0979-7

Servizi redazionali, grafica e impaginazione
SOCIETÀ EDITRICE FIORENTINA

INDICE

ERCOLE BORASIO <i>L'attività sementiera in Italia</i>	7
GIUSEPPE MERISIO <i>Qualità delle sementi e aspetti fitosanitari</i>	23
GIOVANNI VANNACCI, SABRINA SARROCCO, ANGELO PORTA-PUGLIA <i>La difesa da funghi patogeni trasmessi per seme</i>	27
DONATO GALLITELLI, TIZIANA MASCIA, MAURIZIO CONTI <i>Trasmissione dei fitovirus e possibile trasmissibilità dei fitoplasmi attraverso il seme: fatti, fattori e meccanismi</i>	73
NICOLA VOVLAS, ALBERTO TROCCOLI <i>Nematodi fitoparassiti trasmessi per seme</i>	99

ERCOLE BORASIO*

L'attività sementiera in Italia

L'INNOVAZIONE È NEL SEME

Il seme ha avuto storicamente un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'agricoltura a partire dalla domesticazione delle specie coltivate in quanto costituisce un naturale veicolo di diffusione nello spazio e nel tempo dei genotipi migliorati. Il seme delle piante coltivate racchiude, infatti, nel DNA l'innovazione genetica frutto dell'attività di miglioramento genetico ed è, quindi, un potente e veloce mezzo di trasferimento dell'innovazione, dalla ricerca al mondo della produzione. Purtroppo il seme può essere anche vettore di patogeni e parassiti. È quindi necessaria una gestione integrata di tutta l'attività sementiera che comporti la fornitura agli agricoltori di semente certificata di qualità, anche dal punto di vista igienico-sanitario. Questo processo passa attraverso diverse fasi, dal miglioramento genetico, alla gestione delle colture di produzione del seme, alla selezione delle partite di seme, alla selezione meccanica, alla concia fino allo stoccaggio e alla distribuzione.

IL MIGLIORAMENTO GENETICO (FUSARIOSI DELLA SPIGA)

Il miglioramento genetico ha un notevole impatto su molti aspetti della produzione cerealicola non ultimo quello della resistenza ai patogeni. Tra questi particolare interesse rivestono quelli trasmissibili per seme che, nel caso del frumento, sono in grado di condizionare sensibilmente le prime fasi di sviluppo delle piante in campo. La resistenza genetica ai patogeni è dunque un

* *Società Produttori Sementi SpA*

fattore importante nella produzione di seme di alta qualità igienico-sanitaria. Per il frumento potrebbe avere un impatto molto importante la resistenza alla Fusariosi della spiga (Fusarium Head Blight – FHB) che, infettando le cariossidi, diventa un importante fonte di inoculo per la generazione successiva determinando la sintomatologia del Mal del piede. Le specie fungine coinvolte sono prevalentemente: *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae* e *Microdochium nivale*. La Fusariosi della spiga inoltre è una patologia che ha notevole importanza per la sicurezza del frumento. Infatti, i contaminanti che ne derivano non si limitano ai residui dei fungicidi impiegati per la difesa, ma soprattutto alla produzione di micotossine che nella catena alimentare sono in grado di dare luogo a gravi patologie acute o croniche nell'uomo. L'ottenimento di varietà resistenti e con ridotto accumulo di micotossine è quindi l'opzione migliore per risolvere il problema. Purtroppo, considerata la scarsità di fonti di resistenza e la complessità della valutazione del carattere, questo obiettivo è molto difficile da raggiungere. La genomica ha fornito strumenti molto efficaci, in particolare per il frumento tenero. Sono, infatti, state identificate diverse regioni del genoma (Quantitative Traits Loci – QTL) che determinano la resistenza alla fusariosi della spiga di alcune varietà cinesi. Nel frumento duro, considerata la ridotta variabilità per resistenza a FHB, si sono cercate fonti di resistenza nei progenitori tetraploidi ma a oggi i risultati pronti per l'applicazione della MAS sono alquanto limitati. È quindi necessario uno sforzo importante di caratterizzazione di collezioni di genotipi e di mappatura per individuare QTL interessanti e validi ai fini selettivi. Parallelamente è necessario applicare un'efficiente selezione su base fenotipica che richiede l'allestimento di campi sperimentali specifici dotati di sistemi di irrigazione al fine di mantenere le condizioni ideali allo sviluppo del patogeno. Inoltre è opportuno assicurare una costante pressione selettiva utilizzando inoculi artificiali con ceppi del patogeno fortemente tossigeni opportunamente selezionati. È inoltre necessario disporre di strumenti analitici rapidi e precisi per la determinazione del contenuto in micotossine che permettano di analizzare gli elevati numeri di campioni necessari per la selezione. L'approccio combinato di MAS e selezione sul fenotipo ha consentito di ottenere alcuni risultati interessanti.

LA GESTIONE DELLE COLTURE DA SEME

Nelle coltivazioni da seme la qualità del prodotto viene spesso fatta coincidere con il suo livello di purezza genetica tuttavia anche lo stato fitosanitario

concorre a definire il valore qualitativo del prodotto. La gestione agronomica, infatti, gioca un ruolo molto importante nel controllo dei patogeni trasmissibili per seme.

Una corretta impostazione delle coltivazioni da seme comincia dalla scelta della semente che deve essere controllata da un punto vista fitopatologico e conciata al fine di escludere eventuali contaminazioni. Tale approccio si è rivelato nel tempo molto efficace nel controllo di alcuni patogeni potenzialmente distruttivi quali carboni (*Ustilago* spp.) e carie (*Tilletia* spp.) che avendo una sola generazione all'anno possono essere facilmente contenuti con la concia utilizzando efficaci principi attivi. Anche la scelta di un'opportuna precessione contribuisce in modo determinante al successo produttivo della coltura ed è un fattore chiave nel controllo di numerose patologie, in particolare per la fusariosi della spiga. Infatti, la presenza di residui colturali di graminacee aumenta in modo molto significativo l'inoculo primario di varie specie di *Fusaria* e rende difficilmente controllabile in seguito l'infezione sulla spiga e sul seme. Nel caso del frumento, tenero e duro, è quindi fondamentale escludere coltivazioni da seme in successione ad altre graminacee, mais e sorgo, preferendo successioni a soia, colza o barbabietola. Inoltre nella preparazione dei letti di semina è comunque opportuno procedere all'interramento dei residui colturali per ridurre ulteriormente la quantità di conidi nel terreno, che costituiscono la fonte principale d'infezione.

Le colture finalizzate alla produzione delle sementi sono per loro natura di tipo specializzato e, in virtù del maggiore valore aggiunto, giustificano l'adozione di tecniche di coltivazione e di programmi di difesa specifici. Densità di semina e fertilizzazione sono generalmente ridotti rispetto a una coltivazione tradizionale per limitare l'insorgere di patologie legate all'eccesso di biomassa e all'allettamento quali mal del piede (*Rhizoctonia* spp. *Fusarium* spp), alternariosi (*Alternaria* spp.), oidio (*Erisiphe graminis*) e ruggini (*Puccinia* spp.).

In ogni caso è indispensabile attuare un piano di protezione della coltura che preveda almeno due applicazioni di fungicidi. Il trattamento all'antesi è di fondamentale importanza ai fini del controllo della fusariosi e deve dunque essere realizzato in modo tempestivo e utilizzando principi attivi di provata efficacia (prochloraz, tebuconazolo, protioconazolo, ecc.) in grado di svolgere un'azione protettiva durante la fase di fioritura e di inizio allegagione. Malgrado ciò il trattamento non garantisce una protezione completa dalla fusariosi e deve quindi essere integrato con le pratiche di gestione agronomica sopra descritte.

Le operazioni di trebbiatura infine devono essere seguite con particolare attenzione evitando di raccogliere il prodotto in condizioni di elevata umidità

Legge 25 novembre 1971, n. 1096 Disciplina dell'attività sementiera

Decreto del Presidente della Repubblica 8 ottobre 1973, n. 1065 - Regolamento di esecuzione della legge 25 novembre 1971, n. 1096, concernente la disciplina della produzione e del commercio delle sementi

Legge 20 aprile 1976, n. 195 - Modifiche e integrazioni alla legge 25 novembre 1971, n. 1096, sulla disciplina dell'attività sementiera

Tab. 1

e limitando al massimo i danneggiamenti meccanici alle cariossidi causati da trebbiature troppo aggressive, fattori che possono contribuire allo sviluppo dei patogeni nelle fasi di post raccolta e stoccaggio.

L'importanza del controllo fitosanitario delle sementi è evidente anche nell'impianto legislativo di riferimento (tab. 1) che impone controlli da parte dell'Ente certificatore in relazione alla presenza dei più comuni patogeni.

Infatti, durante la visita in campo per la certificazione è necessario monitorare lo stato sanitario della coltura. Le patologie devono essere identificate e descritte sia come diffusione sia come intensità con particolare riferimento a quelle trasmissibili per seme. Le altre patologie devono essere comunque valutate perché lo stato sanitario generale della coltura è indispensabile per la stima della produzione e per l'osservazione dei caratteri morfo-fisiologici.

La normativa sementiera (DPR n°1065 del 08.10.1973) indica che «La presenza di organismi nocivi che riducano il valore di utilizzazione delle sementi è tollerata nella misura più limitata possibile» tale affermazione viene ripetuta per tutte le specie. Questa indicazione generica viene poi meglio specificata nelle «Disposizioni tecniche applicative» (Min. Agr. 23.03.1973) che fissano limiti più precisi secondo la specie considerata; ad esempio per i cereali a paglia vi è una ridotta tolleranza per la presenza in campo di spighe infette da *Claviceps purpurea* (segale cornuta), *Fusarium*, *Helminthosporium*; mentre non vi è tolleranza per *Tilletia* (agente della carie), *Ustilago* (*U. tritici*, *U. nuda*, *U. hordei*, *U. avenae*) (agenti dei carboni); queste ultime patologie sono considerate più pericolose in quanto ogni singolo seme infetto darà origine con altissima probabilità a una pianta infetta. In alcune regioni quali Lombardia ed Emilia Romagna i servizi fitosanitari hanno avviato programmi di collaborazione con l'ente di certificazione (ex-ENSE) allo scopo di monitorare il maggior numero di aziende in particolare per il controllo dei patogeni da quarantena.

La norma fissa limiti per la presenza di patogeni anche in sede di analisi di germinabilità in particolare per cereali e oleaginose.

Cereali: Contenuto massimo di sclerozi di *Claviceps purpurea* (Segale cornuta) in un campione di 500 g Sementi di base 1; sementi di 1R e 2R 3. Tale verifica di tipo visivo è effettuata contestualmente alla ricerca dei semi estra-

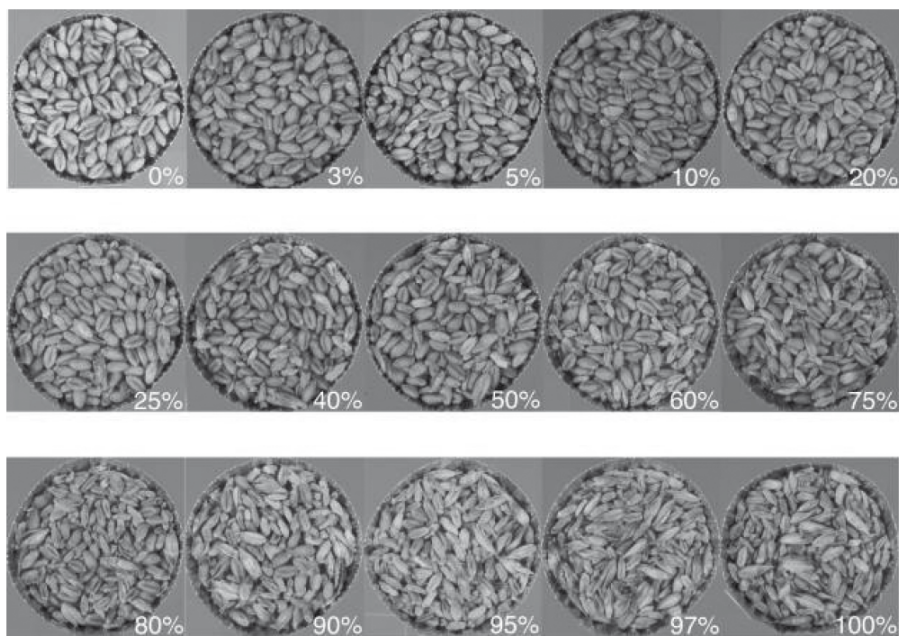


Fig. 1 Livelli di contaminazione da *Fusarium* su seme

nei, qualora i limiti siano superati non viene concessa la certificazione.

Girasole: % massima di semi contaminati da *Botrytis spp.* 5%.

Ortive-Leguminose: non devono essere presenti insetti vivi di alcune specie (analisi visiva).

LA SELEZIONE DEL SEME IN INGRESSO

Una fase decisiva ai fini della qualità fitopatologia delle sementi è quella di accettazione del prodotto presso i centri di stoccaggio e selezione. In questo momento, infatti, è indispensabile caratterizzare la semente sotto il profilo qualitativo e sanitario al fine di costituire lotti omogenei da destinare alla lavorazione, ma, soprattutto, di segregare partite di prodotto non rispondenti ai requisiti qualitativi minimi. Tali operazioni, apparentemente semplici, sono in realtà piuttosto complesse in quanto richiedono la messa in opera di un piano sistematico di campionamento e analisi durante le fasi spesso concitate della raccolta.

La caratterizzazione del prodotto ha inizio già nelle fasi antecedenti la raccolta sulla base dei rilievi sulle colture effettuati dai tecnici di campo. Se le evi-

denze raccolte suggeriscono livelli di infezione critici per alcuni patogeni fungini, quali *Fusarium* Spa. o *Claviceps purpurea* nel caso del frumento, possono essere prelevati campioni pre-raccolta al fine di determinare in modo preciso il livello di contaminazione e al limite escludere il ritiro del prodotto (fig. 1).

In accettazione viene poi attuato un piano di campionamento sistematico che prevede il prelievo di un campione complesso, rappresentativo di ciascuna unità di consegna prima di procedere allo scarico della semente. Il campione viene analizzato per determinare umidità relativa e peso specifico ed esaminato visivamente per verificarne lo stato sanitario complessivo. Alcuni semplici parametri merceologici costituiscono un valido strumento per discriminare lotti fortemente compromessi che vengono esclusi dal ritiro e per costituire unità di stoccaggio omogenee. Lo stoccaggio differenziato, infatti, è alla base della corretta gestione dell'attività sementiera e presuppone la disponibilità di strutture idonee, impianti di movimentazione e silos, che richiedono importanti investimenti.

Successivamente allo scarico, i campioni vengono sottoposti a un esame più approfondito che comprende oltre all'analisi di germinabilità anche la determinazione completa dei parametri merceologici. Tale analisi ha come scopo quello di indirizzare la scelta del più opportuno processo di lavorazione dei lotti di semente che deve essere differenziato in base alle loro caratteristiche.

LA LAVORAZIONE DEL SEME

La selezione meccanica della semente ha un ruolo determinante nel controllo dei patogeni e dei parassiti trasmessi con il seme in quanto consente di eliminare in modo diretto i semi contaminati da alcuni patogeni come ad esempio *Fusarium* e segale cornuta, nel caso del frumento. In altri casi la lavorazione consente di abbattere la carica di alcuni patogeni attraverso processi di abrasione controllata del tegumento esterno del seme (levigatura) come nel caso del *Phoma betae* per la barbabietola da zucchero. Più in generale la selezione a favore dei semi più vigorosi migliora la capacità competitiva della giovane plantula rispetto ai patogeni nelle prime fasi di sviluppo in campo.

La selezione delle sementi può essere distinta in diverse fasi.

Essiccazione

Per prevenire lo sviluppo di funghi e muffe durante la conservazione è indispensabile che il prodotto sia stoccato in condizioni di bassa umidità. Tuttavia le condizioni

climatiche alla raccolta obbligano a volte al ritiro del prodotto non perfettamente essiccato. L'essicazione è un processo attraverso cui il seme viene rapidamente portato a un valore di umidità compatibile con lo stoccaggio ventilando il seme con aria riscaldata. Tale delicata operazione presuppone la disponibilità di impianti specializzati in grado di controllare perfettamente le condizioni di essicazione al fine escludere danneggiamenti agli embrioni e di assicurare la massima uniformità di essicazione.

Prepulitura

È il passaggio iniziale della lavorazione attraverso il quale viene effettuata una prima grossolana selezione, finalizzata soprattutto all'eliminazione delle impurità come materiali inerti (terra e piccoli sassi) e residui di foglie o steli. Risulta fondamentale per ridurre il valore di umidità e abbattere la carica di patogeni attraverso l'eliminazione dei semi più piccoli e striminziati spesso veicolo di infezioni (ad es. conidi di *Fusaria*). Spesso questa operazione viene effettuata in linea al ricevimento, in particolare se è previsto un lungo periodo di stoccaggio prima della completa lavorazione. La prepulitura viene realizzata sulla base delle dimensioni del prodotto utilizzando in genere macchine selezionatrici ad aria dotate di crivelli (stacci) con fori di sezione e forma differente, disposti secondo livelli di caduta successivi. Le prepulitrici sono dotate in genere di elevate capacità di lavoro orarie tali da poter operare, se necessario, in linea con le strutture di ricevimento e scarico.

Selezione con tarare a piani

La tarara è una macchina che seleziona le semente sia in base al calibro che al peso, combinando l'utilizzo di crivelli (stacci) con fori di varia forma e sezione con la ventilazione. Il seme il cui calibro ricade nell'intervallo richiesto viene successivamente fatto cadere in un canale a vento che opera un'ulteriore selezione eliminando i semi più leggeri e striminziati. In questa fase vengono eliminati eventuali semi contaminati da sclerozi (es. *Claviceps purpurea*) che risultano di forma irregolare e di calibro superiore al seme.

Selezione con cilindri alveolati

Parte del seme che è stata danneggiata durante la raccolta assume forme fortemente isodiametriche ed è quindi difficilmente eliminabile solo con selezio-

natrici a piani. In questo caso, dopo il passaggio in tarara, vengono utilizzati gruppi di cilindri alveolati in grado di rimuovere i frammenti danneggiati di forma tondeggiante. Il seme viene fatto avanzare all'interno di un cilindro allungato, in rotazione sul suo asse maggiore, la cui superficie interna è alveolata in modo da trattenere le particelle di forma sferoidale. Ai fini della sanità della semente, infatti, è molto importante rimuovere i semi danneggiati che nello stoccaggio possono essere substrato per lo sviluppo di muffe e funghi.

Selezione con tavola densimetrica

La tavola densimetrica consente una selezione fine in quanto è in grado di separare in modo preciso i semi di pari volume in base al loro peso specifico. In questo modo è possibile migliorare sensibilmente l'energia germinativa complessiva, eliminando gli individui meno vigorosi. La tavola densimetrica consente anche di eliminare in modo pressoché totale eventuali semi infetti da nematodi come *Anguina tritici* più leggeri a causa delle galle prodotte dal parassita durante la fase di formazione del seme.

Selezionatrici ottiche

La selezione può essere completata se necessario con l'ausilio di moderne selezionatrici ottiche in grado di realizzare una valutazione puntuale di ciascun seme sulla base di parametri predefiniti relativi alla riflessione nel campo del visibile e del vicino infrarosso.

LA CONCIA

La concia consiste nel trattamento superficiale del seme con fungicidi e/o insetticidi al fine di controllare i patogeni e parassiti presenti sul seme e nel terreno. Tale trattamento al seme risulta fondamentale per favorire un rapido affrancamento della coltura nei primi stadi di sviluppo e per il controllo di molti patogeni tra cui carie, carboni e agenti del mal del piede (fig. 2).

Tilletia caries, *T. foetida* e *T. controversa*, agenti della carie del grano, sono trasmesse attraverso spore (clamidospore) presenti sulla superficie esterna delle cariossidi che infettano la plantula nelle prime fasi di germinazione.

Ustilago tritici o carbone del grano si propaga attraverso parti di micelio

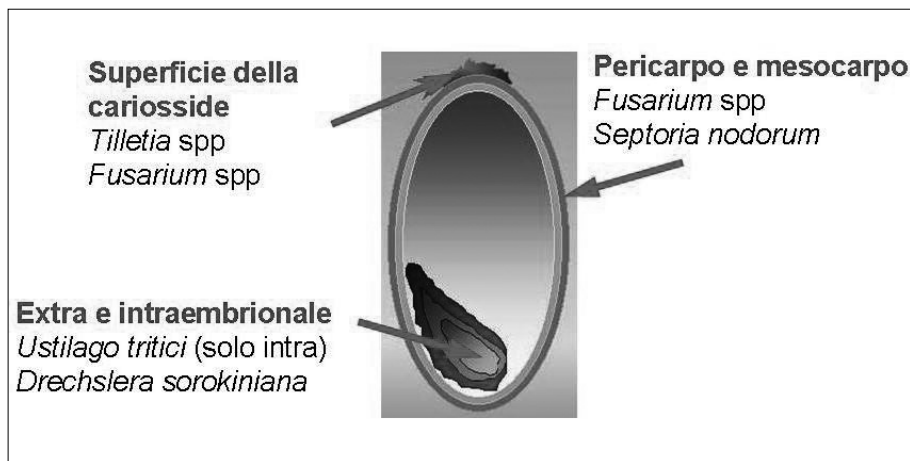


Fig. 2 Principali patogeni del frumento trasmissibili per seme

localizzate all'interno del seme in prossimità del giovane embrione. In assenza di protezione il fungo infetta la plantula all'atto della germinazione.

Carie e carboni sviluppano una sola generazione all'anno e possono essere controllate agevolmente con la concia.

Il mal del piede è causato da un ampio gruppo di patogeni fungini tra cui i più diffusi sono *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti* e *Microdochium nivale*. L'inoculo può avvenire sia attraverso il seme, sia attraverso i residui colturali presenti nel terreno e porta all'infezione delle radichette e dell'apparato vascolare della pianta, determinandone la morte. Anche le infezioni sub letali sono in ogni caso molto dannose in quanto possono ridurre sensibilmente la resa ed evolvere nell'infezione della spiga (Fusariosi della spiga) con conseguente produzione di micotossine nel seme (Deossinivalenolo, T2 e HT2). In alcuni casi la contaminazione da micotossine è tale da pregiudicare completamente l'utilizzo del seme a usi alimentari.

Nel caso della fusariosi il trattamento al seme non assicura un totale controllo del patogeno ma integra una più ampia strategia di contenimento che comprende un'opportuna scelta della rotazione, per ridurre l'inoculo nel terreno, e tempestivi trattamenti alla spiga in prossimità dell'antesi.

Il trattamento al seme consente di controllare efficacemente anche *Drechslera sorokiniana*, elmintosporiosi dei cereali, che può portare gravi danni alle plantule nelle prime fasi dopo l'emergenza, specie in primavera con decorso caldo e piovoso.

PRINCIPIO ATTIVO	SPECIE	PATOLOGIA
Iprodione	Frumento e altri cereali a paglia	Carie, Elmintosporiosi
	Barbabietola da zucchero	Phoma betae
Captano	Mais, sorgo, orticole	Pythium, Phytophthora
Carbossina + Thiram	Frumento, altri cereali a paglia, mais, sorgo	Fusarium, carie, carboni
	Barbabietola da zucchero	Phoma betae
Carbossina + Maneb	Frumento, altri cereali a paglia, mais, sorgo	Carboni, Elmintosporiosi
Dodina	Bulbose	Fusarium
Fludioxinil	Frumento e altri cereali a paglia, mais	Fusarium, carie
Fludioxinil + metalaxil m	Frumento e altri cereali a paglia, mais	Fusarium, carie, pythium
Guazatina	Frumento e altri cereali a paglia	Carie, fusariosi, septoriosi
Guazatina + Triticonazolo	Frumento e altri cereali a paglia	Carie, carboni, fusariosi, septoriosi, ruggini, oidio
Iprodione + Triticonazolo	Frumento e altri cereali a paglia	Carie, carboni, fusariosi, septoriosi
Mancozeb	Frumento e altri cereali a paglia	Carie, fusariosi, rizoctonia
	Barbabietola da zucchero	Rizoctonia
Metalaxil m	Girasole, sorgo, soia, orticole	Pythium, Phytophthora
Procloraz	Frumento e altri cereali a paglia	Fusariosi, septoria, elmintosporiosi
Tebuconazolo	Frumento e altri cereali a paglia	Carie, carbone, septoria, fusarium

Tab. 2 *Principi attivi e miscele utilizzate nella concia delle sementi*

L'importanza della protezione delle colture nella fase del primo insediamento ha stimolato il miglioramento delle tecnologie di applicazione e la messa punto di principi attivi e di miscele a largo spettro, come riportato in tabella 2.

La protezione del seme può essere realizzata secondo tecnologie differenti in ragione del tipo, della dimensione e del valore commerciale del seme:

- concia (dressing): il seme viene trattato con prodotti polverulenti o con miscele a base di acqua contenenti il principio attivo desiderato;
- pellicolatura (coating): il trattamento al seme è integrato con un film di polimero adesivante che ricopre la superficie del seme, migliorandone conservabilità e scorrevolezza;
- confettatura (pelleting): il seme dopo il trattamento viene ricoperto con un materiale inerte (argille o polveri legnose) che conferisce forma sferica e consente l'applicazione di promotori della crescita e di molecole ad azione insetticida, altrimenti fitotossiche se a diretto contatto con il seme (fig. 3).

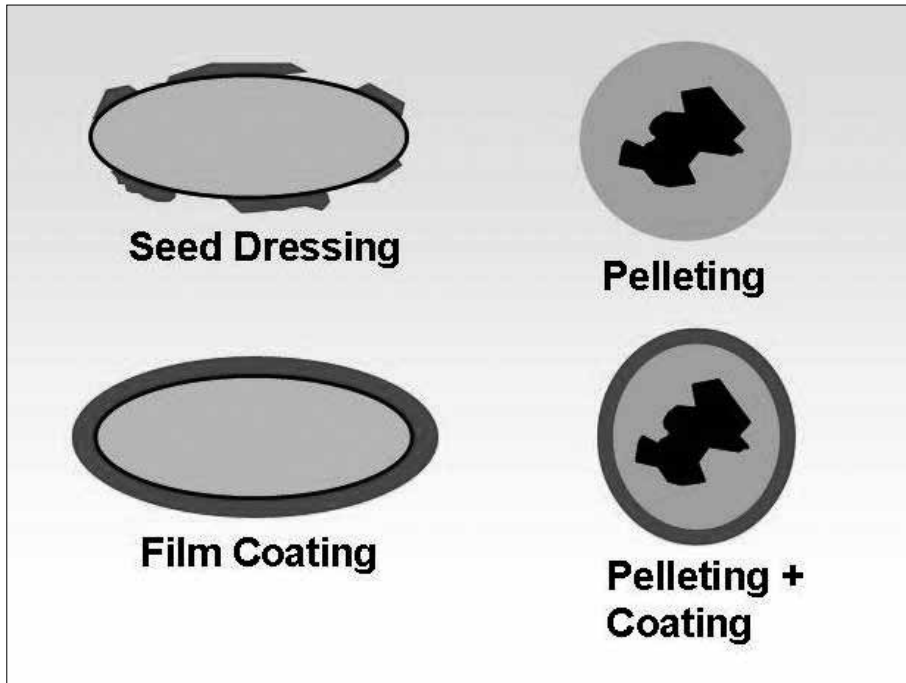


Fig. 3 *Tipologie di trattamento del seme*

Nel caso dei cereali a paglia la concia corrisponde alla tipologia di trattamento più utilizzata.

La concia può essere realizzata secondo due principali tipologie di applicazione:

- a secco: il conciante sotto forma di polvere secca viene distribuito direttamente nella tramoggia della seminatrice e mescolato manualmente; è un metodo economico e occasionalmente impiegato direttamente presso l'azienda agricola, ma è poco efficace perché molti semi sfuggono al trattamento;
- a umido (*slurry*): consiste nell'addizionare al seme un'idonea sospensione acquosa ottenuta stemperando in acqua i presidi sanitari disponibili sotto forma di polveri bagnabili o di paste fluide; tale trattamento può essere realizzato solo attraverso l'uso di impianti specializzati presso gli stabilimenti di selezione delle sementi

La concia realizzata presso gli impianti industriali prevede l'utilizzo di miscele specifiche in grado di migliorare le caratteristiche complessive del prodotto sia durante la conservazione che durante le operazioni di semina, riducendo la pol-

COMPONENTE	FUNZIONE NELLA MISCELA
Principio attivo	Svolge l'attività biologica nei confronti dei patogeni
Bagnante	Assicura che il principio attivo risulti idrofilo
Disperdente	Previene la flocculazione dei prodotti in soluzione
Addensante	Previene la sedimentazione dei prodotti in soluzione
Antigelo	Indice stabilità della miscela anche a basse temperature
Antischiuma	Limita la schiumosità nella fase di applicazione
Colorante	Colora il prodotto finale rendendolo facilmente identificabile nel terreno
Conservante	Previene la formazione di batteri e muffe
Adesivante	Consente la perfetta adesione del principio attivo ed elimina la polverosità

Tab. 3 *Principali componenti delle miscele utilizzate nella concia*

verosità e aumentando la scorrevolezza del seme. Le soluzioni utilizzate, infatti, comprendono diverse componenti come riassunto in tabella 3.

La tecnica della concia si è evoluta per ottimizzare l'efficacia dei principi attivi utilizzati, riducendone il quantitativo applicato e migliorando complessivamente l'impatto ambientale. A questo scopo la distribuzione della miscela deve essere realizzata con attrezzature specifiche, idonee per poter lavorare in linea con gli impianti di insaccatura del prodotto e in grado di assicurare la necessaria precisione di distribuzione. Nel caso del frumento, ad esempio, si stima che 100 kg. di semente abbiano uno sviluppo superficiale variabile tra 80 mq. e 100 mq., in base alla forma e alle dimensioni medie dei singoli semi. Tale superficie deve essere trattata con 200-400 ml. di soluzione conciante a seconda del prodotto utilizzato. Ciò testimonia il livello tecnologico e la complessità delle attrezzature utilizzate che assicurano la distribuzione di $2-5 \cdot 10^{-5}$ ml di principio attivo per singolo seme. Risulta inoltre evidente il vantaggio di questa tecnica sia in termini di efficacia che di impatto ambientale, in particolare se paragonata con trattamenti localizzati alla semina o a pieno campo.

Da un punto di vista operativo le attrezzature per la concia possono essere (fig. 4):

- a flusso continuo: tali attrezzature sono in genere composte da un disco in rotazione ad alta velocità su cui è possibile dosare il quantitativo desiderato di miscela conciante posto in prossimità di un piano di caduta su cui il seme viene fatto scorrere in strato sottile;
- a batch: in questo caso un quantitativo predefinito di seme viene inserito all'interno di un contenitore in rotazione; al centro del contenitore è posto un disco

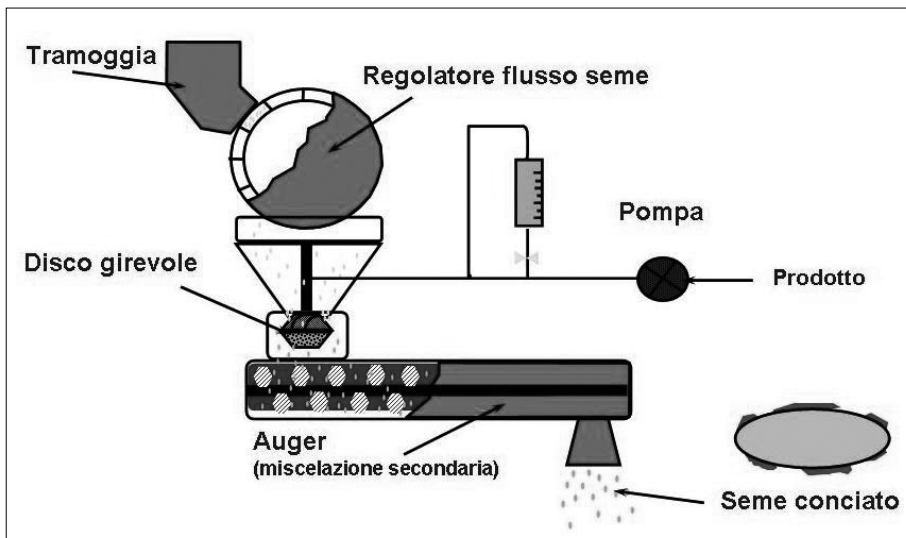


Fig. 4 Rappresentazione schematica di impianto per la concia industriale



Fig. 5 Campioni per controllo qualità della concia

in rotazione ad alta velocità che distribuisce la miscela conciante sul seme per un periodo di tempo variabile fino al completamento dell'operazione.

Al pari delle altre fasi della selezione anche il processo di concia industriale deve essere attentamente monitorato per assicurare il migliore standard qualitativo. Infatti, è fondamentale verificare che la distribuzione del principio attivo sia uniforme su tutta la massa del seme ed escludere casi di sovradosaggio sul singolo seme che potrebbero comprometterne la germinabilità (fig. 5).

La diffusione delle colture biologiche ha stimolato la messa a punto di concianti alternativi che escludono l'utilizzo di sostanze chimiche. Tali prodotti sono basati sull'utilizzo di funghi (*Trichoderma spp.*) o batteri (*Pseudomonas spp.*) antagonisti dei principali patogeni o in grado di favorire lo sviluppo del sistema radicale. Le spore di questi microorganismi vengono applicate al seme con idonei adesivanti con risultati variabili anche in base alle caratteristiche del terreno.

CRITICITÀ NELL'ARMONIZZAZIONE INTERNAZIONALE DELLA NORMATIVA

Il controllo di molti patogeni vegetali è legato anche alla possibilità di monitorare lo stato fitosanitario dei materiali vegetali oggetto di scambi commerciali internazionali al fine di ridurre la diffusione di specie o razze particolarmente pericolose. Possono essere ricordati molti casi eclatanti, da ultimo il colpo di fuoco batterico (*Erwinia amylovora*), che testimoniano l'impatto economico dei patogeni in molte aree del mondo. L'importanza del controllo è stata recepita a livello legislativo sia a livello comunitario che nazionale (Direttiva 2000/29/CE dell'8 maggio 2000, Decreto Legislativo 19 agosto 2005 n. 214) e sono state predisposte misure di profilassi di diversa intensità che impongono, in taluni casi, anche periodi di quarantena e al limite il divieto all'importazione da determinati areali.

La globalizzazione dei mercati, tuttavia, ha messo in evidenza la necessità di armonizzare le legislazioni nazionali per compendiare le esigenze commerciali con la necessità di tutelare coltivatori e consumatori.

In taluni casi, poi, gli squilibri normativi si prestano a un uso strumentale per ostacolare l'accesso ai mercati da parte di potenziali concorrenti. Un esempio in questo senso è dato dalle norme di profilassi relative a *Tilletia indica* (karnal bunt), agente della carie del frumento, che può attaccare indifferentemente il grano duro e tenero le cui prime significative infezioni hanno avuto inizio nei primi anni '30. Epidemie ricorrenti hanno portato alcuni stati a proibire l'importazione diretta di sementi di frumento provenienti da aree potenzialmente infette, ma in seguito tali restrizioni sono rimaste in essere per limitare le importazioni da paesi concorrenti.

RIASSUNTO

Il seme ha avuto storicamente un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'agricoltura a partire dalla domesticazione delle specie coltivate, in quanto costituisce un naturale veico-

lo di diffusione dei genotipi migliorati. Il seme, infatti, racchiude in sé il frutto dell'attività di miglioramento genetico ed è, quindi, un efficiente mezzo di trasferimento dell'innovazione, dal mondo della ricerca fino alla produzione. Purtroppo esso può essere anche vettore di patogeni e parassiti ed è, quindi, necessaria una gestione integrata di tutta l'attività sementiera finalizzata alla produzione di sementi di elevata qualità, sia genetica che igienico-sanitaria. Questo processo passa attraverso diverse fasi, dal miglioramento genetico, alla gestione delle colture di produzione in campo, alla selezione delle partite di seme, alla selezione meccanica, alla concia fino allo stoccaggio e alla distribuzione.

L'esito finale di questo processo è la creazione di valore nel prodotto seme e, più generalmente, nelle filiere agroalimentari che ne dipendono. Tale valore deve, però, poter trovare un'adeguata remunerazione sul mercato ed è, quindi, necessario realizzare politiche finalizzate a mantenere le condizioni economiche utili a sostenere gli investimenti necessari, sia nella ricerca che nella tecnologia di prodotto. L'obbligo di utilizzo di sementi certificate, oggi in discussione, ha certamente costituito un efficiente volano economico che ha storicamente contribuito al trasferimento dell'innovazione al settore agricolo e che andrebbe tutelato nell'interesse di tutta la filiera.

La competitività del settore sementiero, inoltre, dipende oggi anche dalla disponibilità di regolamenti in grado di tutelare gli accessi ai diversi mercati a livello internazionale, sempre più frequenti in un contesto fortemente globalizzato. La globalizzazione dei mercati, infatti, ha messo in evidenza la necessità di armonizzare le diverse legislazioni nazionali per compendiare le esigenze commerciali con la necessità di tutelare coltivatori e consumatori. A volte, infatti, gli squilibri normativi si prestano ad un uso strumentale per ostacolare l'accesso ai mercati da parte di potenziali concorrenti.

ABSTRACT

Protection of crops against seed-borne pathogens. From the time of domestication of crop species, the seed has historically played a major role in agriculture development, since it is the natural vehicle for the dissemination of improved genotypes. The seed, in fact, embodies the fruit of genetic improvement and it is, therefore, an efficient means of transfer of innovation, from research to production. Unfortunately, it can also be a vector of pathogens and parasites and, therefore, it is required an integrated management system throughout all the seed industry, aimed at the production of high quality seeds, both from the genetic and sanitary point of view. This process goes through several stages, from genetic improvement by means of breeding to crop management, seed treatment and processing up to storage and distribution.

The final outcome of this process is the creation of value in the seed produced and, generally, in the food chain depending on it. However, this value should be paid back by the market and, therefore, it is necessary to implement policies aimed at maintaining the economic conditions required to sustain the necessary investments in both research and production technology.

The commitment to use certified seed, currently under discussion, has certainly been an efficient economic driver that has historically contributed to the transfer of innovation in the agricultural sector and should be protected in the interest of the whole sector.

The competitiveness of the seed sector is also strongly dependent on the availability

of regulations, frequently increasing in a highly globalized context, in order to protect the access to different markets worldwide.

Market globalization, indeed, has highlighted the need to harmonize the different national laws in order to assemble the business requirements with the need to protect farmers and consumers. Sometimes, in fact, regulatory imbalances are instrumentally used to prevent access to the market by potential competitors.

Qualità delle sementi e aspetti fitosanitari

(Sintesi)

Come noto, la qualità e la quantità di qualsiasi produzione agricola sono fortemente condizionate, oltre che dai fattori agronomici e climatici, dalla presenza di malattie nelle diverse fasi colturali. Tra i vari vettori che possono indurre lo sviluppo di fitopatie, grande importanza è rivestita dalle sementi impiegate per l'istituzione della coltura e dai patogeni e parassiti che vengono trasmessi proprio dal seme.

È evidente quindi la grande importanza per l'agricoltore di disporre di sementi con ineccepibili requisiti fitosanitari. Questa considerazione acquisisce maggior importanza nel caso delle sementi destinate a coltivazioni biologiche, dove la lotta ai parassiti non può essere condotta con metodi convenzionali e con l'impiego di massicce dosi di pesticidi.

Nella relazione sono illustrate le norme e le procedure che vengono utilizzate a livello nazionale e comunitario per consentire la commercializzazione del seme con particolare riguardo ai requisiti fitosanitari. Sono anche forniti elementi di conoscenza sul settore sementiero nazionale e sulle modalità di certificazione delle sementi.

ESIGENZE E PROPOSTE

Allo scopo di promuovere una migliore difesa delle colture dalle malattie trasmissibili per seme si propone di:

- favorire l'armonizzazione fra le normative europee e internazionali e i sistemi di certificazione in uso; in questo caso dovrebbero essere prese in con-

* *Ente Nazionale delle Sementi Elette*



siderazione le normative per la commercializzazione delle sementi, delle derrate alimentari e quelle di carattere fitopatologico, prendendo esempio da alcune organizzazioni internazionali (Ece/Onu) che suppliscono alle carenze normative introducendo nuovi standard e armonizzandoli a livello mondiale;

- ricordare l'attività di certificazione con quella degli osservatori fitosanitari, sulla scorta di quanto già avviene nelle regioni Lombardia ed Emilia Romagna. In questi casi i tecnici preposti alla certificazione delle sementi, qualora rilevassero determinati organismi nocivi, precedentemente segnalati dagli osservatori, provvedono a informare i funzionari degli osservatori per gli approfondimenti di competenza;
- qualificare il produttore già nella fase di rilascio della licenza: infatti da uno studio commissionato all'organismo di certificazione, è emerso un quadro nazionale che evidenzia una notevole disomogeneità nei criteri e nelle modalità seguite per il rilascio delle licenze. Esistono infatti licenze rilasciate senza indicazione delle specie e licenze rilasciate non solo per singole specie e per determinati quantitativi massimi consentiti, ma anche con l'indicazione delle varietà per le quali è permessa la produzione e la commercializzazione.

Inoltre non tutte le Commissioni Regionali preposte al rilascio di un parere sull'idoneità tecnica della Ditta sementiera richiedente la licenza



utilizzano, nell'ambito delle proprie procedure, un elenco di macchinari specifici obbligatori o consigliati per la produzione delle diverse specie di sementi;

- estendere l'accertamento della presenza di malattie trasmissibili per seme anche alla fase di post-controllo prevista nella certificazione delle sementi;
- raccordare le norme che presiedono alla commercializzazione delle sementi ortive e delle piantine da vivaio che da esse derivano. Sarebbe quanto meno opportuno effettuare controlli sulle sementi per verificare l'assenza di organismi nocivi trasmissibili per seme. Allo scopo sarebbe necessario prevedere misure che consentano gli accertamenti del caso.

La difesa da funghi patogeni trasmessi per seme

I. INTRODUZIONE

I.1. *Cenni storici*

La trasmissione per seme delle malattie causate da funghi fu intuita intorno alla seconda metà del secolo XVIII e scientificamente provata nel secolo seguente. Mathieu Tillet, nella *Dissertation sur la cause qui corrompt et noircit les grains de bled dans les épies; et sur les moyens pour prevenir ces accidents*, del 1755, prendendo spunto da pratiche agricole di concia delle sementi (con calce e altre sostanze) che gli agricoltori, in Francia e in altri paesi, applicavano con risultati contrastanti, e ricorrendo all'osservazione sperimentale, giunse alla conclusione che le Carie del frumento erano causate dalla speciale *polvere* che caratterizzava i grani infetti. Questa polvere, che oggi sappiamo essere costituita da teleutospore del genere *Tilletia*, diffondendosi e aderendo alla superficie del seme sano, costituiva un *veleno contagioso* capace di indurre una *malattia ereditaria*, cioè trasmessa per seme, alle generazioni successive del frumento (Gilles, 2001). Tra i diversi autori dell'epoca che si cimentarono con Carie e Carboni, Targioni Tozzetti (1767) nell'opera *Alimurgia*, attribuì ai componenti della polvere la natura di *piancicella parasitica simile alla specie ottava di ruggine*. All'inizio del secolo seguente il Prévost (1807), con una serie di acute osservazioni e di magistrali esperimenti, dimostrò che la polvere bruna che si formava nei chicchi malati era la *semence de la carie*. Egli chiarì anche alcuni meccanismi epidemiologici, indicando che le teleutospore causavano la

* Dipartimento di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose "G. Scaramuzzi", Università di Pisa

** Già Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale (CRA-PAV), Roma

malattia quando contaminavano il seme sano o raggiungevano il terreno in prossimità dei semi germinanti, ma solo in presenza di condizioni ambientali *predisponenti*. Nel suo pionieristico lavoro accertò, dopo aver accuratamente esaminato le pratiche degli agricoltori e i risultati di altri ricercatori, che diverse sostanze chimiche, quali i derivati dell'arsenico e del mercurio, erano efficaci contro le Carie ma che le più affidabili erano i sali rameici, di facile impiego e meno pericolosi. Erano così poste le basi per il trattamento razionale delle sementi, che tanto contribuirà all'incremento delle produzioni agricole.

Lo studio delle malattie trasmissibili per seme in generale, e di quelle causate da funghi, pur rientrando del vasto ambito della Patologia vegetale, è andato assumendo una propria peculiare fisionomia in tempi relativamente recenti (Agarwal e Sinclair, 1997). Paul Neergaard e Mary Noble negli anni '40 del secolo scorso definirono la nuova disciplina come Patologia del seme (Munkvold, 2009). La nascente branca del sapere si limitava a ricercare i microrganismi presenti sul o nel seme, integrando le analisi delle sementi condotte per altri parametri (purezza, germinabilità, vigore, ecc.). Il primo laboratorio di analisi sanitaria delle sementi fu inaugurato in Olanda nel 1918 presso la Stazione governativa di analisi delle sementi di Wageningen e Lucie C. Doyer ne fu il primo responsabile, con la qualifica di patologo del seme. Ella fu anche il primo presidente del Comitato per la sanità del seme nell'ambito dell'ISTA (International Seed Testing Association), che diresse sino al 1949, seguita da W.F. Croiser (presidente sino al 1953), A.J. Skolko (1953-1956) e P. Neergaard (1956-1974). Quest'ultimo fondò nel 1967, a Copenaghen, con il sostegno del Ministero degli Affari Esteri danese, il Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, che contribuì a formare specialisti e a diffondere le conoscenze sulla patologia del seme in molti paesi. Le prime Norme ISTA sull'analisi delle sementi, pubblicate nel 1928, contenevano già un capitolo sull'individuazione dei patogeni, inclusi diversi funghi, cui seguì la pubblicazione di un dettagliato manuale (Doyer, 1938), largamente usato per decenni nei laboratori. Il citato Comitato ISTA pubblicò manuali e organizzò workshop e saggi comparativi tra diversi laboratori, favorendo la formazione di analisti e permettendo la standardizzazione dei metodi di analisi. Mentre lo sviluppo del settore analitico continuava e continua a svilupparsi, con l'opera di Kenneth Baker, dagli anni '70 del secolo scorso il campo della Patologia del seme iniziò ad allargarsi all'epidemiologia e alla difesa; il nuovo assetto è riscontrabile nel fondamentale testo di Paul Neergaard (Neergaard, 1979), nell'opera di Denis McGee (Munkvold, 2009) e in numerosi contributi da molti paesi, Italia compresa. Lo stesso Munkvold (2009) definisce la Patologia del seme come lo *studio e la gestione delle malattie*

che influiscono negativamente sulla produzione e sull'uso del seme, nonché delle pratiche di difesa applicate al seme stesso. Egli include quindi, in questo ampio concetto della disciplina, tutte le malattie che influiscono sulla produzione del seme (ma che non sono necessariamente trasmesse per seme), riconoscendo al tempo stesso che i trattamenti delle sementi possono essere comunemente utilizzati anche contro malattie e organismi nocivi non necessariamente associati al seme stesso (ad esempio, per proteggere le plantule dagli attacchi dei funghi terricoli). A differenza di quanto avveniva in altri paesi avanzati, in Italia, ove scarse erano le risorse pubbliche disponibili e debole l'interesse e il sostegno privato, anche per la mancanza di una solida industria di produzione sementiera, lo sviluppo della Patologia del seme in generale e dello studio dei patogeni fungini delle sementi fu alquanto lento, ma alcuni centri, quali la Regia Stazione di Patologia Vegetale, poi Istituto Sperimentale per La Patologia Vegetale, e allora Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Pisa (attualmente Dipartimento di Coltivazione e difesa delle specie legnose "G. Scaramuzzi", Sez. Patologia vegetale), mantennero vivo l'interesse per la ricerca e le applicazioni analitiche sui patogeni fungini associati al seme. Un contributo significativo venne anche dall'insegnamento della Patologia del seme in diverse Facoltà di Agraria, ad es. quelle di Pisa e Perugia.

1.2. Importanza economica e sociale delle malattie trasmesse per seme

Si ritiene che circa il 90% delle colture alimentari del mondo siano riprodotte per seme (Neergaard, 1979) e per seme si riproducono, in parte o totalmente, anche altri gruppi di colture di rilievo. Numerose malattie causate da funghi e trasmissibili per seme (Richardson, 1990) possono compromettere la produzione o la qualità di frumento, riso, mais, sorgo, orzo, soia, leguminose da granella, orticole, lino, cotone, juta, girasole e molte altre, e possono avere impatto sull'ambiente o sul patrimonio culturale quando, ad esempio, colpiscono alberi di interesse forestale (Mittal e Mathur, 2003) o di rilevanza paesaggistica e storica. I danni diretti conseguenti a tali malattie sono ingenti e possono manifestarsi sul seme in germinazione, sui semenzali e sulle piante in campo o in foresta, compromettendo la quantità e la qualità del raccolto o la vitalità delle piante. Al danno diretto si devono aggiungere le maggiori spese sostenute per la difesa, incluse quelle relative alle misure di quarantena e alla certificazione delle sementi, nonché i possibili effetti negativi dei trattamenti chimici sull'uomo (come operatore agricolo e consumatore), sull'ambiente e su processi di trasformazione industriale. Pertanto, la sanità delle sementi

rappresenta un imprescindibile fattore che può contribuire significativamente alla qualità delle sementi stesse nonché dei prodotti finali che ne derivano.

I paesi in via di sviluppo, nei quali gli schemi di certificazione delle sementi non sono ancora sufficientemente applicati, dove le tecniche colturali sono arretrate e le condizioni ambientali sono in genere favorevoli allo sviluppo di malattie fungine, subiscono perdite elevate e costanti dovute a funghi portati da seme. Ad esempio, Nkalubo et al. (2007) hanno osservato che, in Uganda, l'antracnosi del fagiolo, malattia prevalentemente trasmessa per seme causata da *Colletotrichum lindemuthianum*, causa perdite di prodotto totale del 39-44% in varietà suscettibili e dell'1-6% in quelle resistenti. Le perdite di prodotto commerciabile (scartati cioè anche i semi commestibili ma inadatti al mercato locale) sono state, rispettivamente, del 71-73% e del 9-22%. In Asia, considerando l'insieme delle aree di coltivazione del riso, in molte delle quali sono coltivate varietà resistenti, *Bipolaris oryzae* (agente dell'Elmintosporiosi o Macchia bruna) causa perdite di prodotto del 6% e *Magnaporthe grisea* (causa del Brusone) del 3% (Mew e Gonzales, 2002). Anche i paesi a economia più avanzata subiscono rilevanti danni dai funghi trasmissibili per seme e sostengono elevate spese per la difesa. Basti ricordare che nel Nord Dakota vengono tuttora rilevate perdite da Segale cornuta che, su frumento e segale, possono raggiungere rispettivamente il 10% e il 5%, e la Fusariosi della spiga causa annualmente danni per un miliardo di dollari USA (Bruins, 2009).

1.3. *Funghi patogeni di quarantena e di qualità*

I funghi patogeni presenti sul o nel seme possono potenzialmente causare danni anche molto severi alle colture, siano esse destinate a produrre altro seme o a fornire prodotti agricoli o forestali. L'intenso e crescente scambio internazionale di sementi per scopi soprattutto commerciali, ma anche di ricerca e sperimentazione, ha destato e desta preoccupazioni di ordine fitosanitario, che hanno portato all'adozione di norme di quarantena per impedire l'introduzione e la diffusione di patogeni non presenti nei singoli stati, o presenti in aree limitate di questi e oggetto di misure ufficiali.

La complessa materia è regolata dalla Convenzione Internazionale per la Protezione delle Piante (IPPC) del 1951 e dal Trattato dell'Organizzazione per il Commercio Internazionale (*WTO Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement*) entrato in vigore nel 1995. La nuova situazione ha determinato importanti cambiamenti dovuti al fatto che la sovranità nazionale in materia di protezione fitosanitaria, pur essendo

riconosciuta dall'Accordo SPS, trova limitazione nella necessità che le misure restrittive del commercio siano basate su criteri scientifici e di trasparenza tali da evitare ogni discriminazione negli scambi internazionali. Di conseguenza, un nuovo testo dell'IPPC fu approvato all'unanimità durante la 29^a Conferenza FAO ed entrò in vigore nel 2005. Strumenti operativi sviluppati nell'ambito della IPPC sono gli standard internazionali per le misure fitosanitarie (*International standards for phytosanitary measures, ISPMs*) (IPPC, 2009), attualmente oltre trenta. La loro corretta applicazione garantisce il raggiungimento dei nuovi obiettivi internazionali e, nello stesso tempo, tutela da controversie legali gli stati che adottino misure di protezione fitosanitaria conformi agli standard. L'IPPC prevede che, prima di applicare misure di quarantena, si proceda all'analisi del rischio derivante dall'organismo nocivo (*pest risk analysis*, PRA). La procedura di PRA si avvale principalmente degli standard ISPM 2 (*Guidelines for pest risk analysis*) e ISPM 11 (*Pest risk analysis for quarantine pests*) e prevede la valutazione: 1) dell'effettiva necessità di applicare norme fitosanitarie (*pest risk assessment*), 2) delle opzioni disponibili contro l'introduzione e la diffusione (*managing options*).

L'IPPC prevede, nelle diverse aree geografiche, il supporto di Organizzazioni Regionali per la Protezione delle Piante. I paesi dell'UE, altri paesi europei (Russia inclusa) e non europei dell'area mediterranea (attualmente 51 stati) afferiscono all'Organizzazione Europea e Mediterranea per la Protezione delle Piante (OEPP/EPPPO), che partecipa ai dibattiti per l'elaborazione di strategie globali sulla difesa delle piante indetti dalla FAO e dal Segretariato IPPC, produce standard (es.: metodi analitici per i patogeni) e altri documenti (PRA, ecc.), conserva e sviluppa banche dati ecc. Tra gli standard OEPP citiamo le liste A1 e A2, che elencano gli organismi nocivi (*pests*) rispettivamente assenti o presenti ma non diffusi (e oggetto di misure fitosanitarie ufficiali) nella regione e per i quali l'OEPP raccomanda l'adozione di misure di quarantena da parte dei governi membri dell'Organizzazione stessa.

Per l'UE, le misure fitosanitarie ufficiali sono definite nella Direttiva 2000/29 (CE, 2000) e successive modificazioni. In essa sono inclusi alcuni funghi patogeni trasmissibili per seme e, per impedirne l'introduzione e la diffusione, sono previste diverse misure di protezione, quali il bando totale dell'organismo, il divieto d'importazione di sementi o derrate da determinati paesi, il divieto di introduzione e diffusione in specifiche aree protette. Per l'Italia, la direttiva è stata recepita dal D. Legs. 19 agosto 2005, n. 214 (G. U. n. 248 del 24 ottobre 2005 – Suppl. Ord. n. 169) e successive modificazioni. Per quanto riguarda i patogeni di qualità, alcune norme settoriali, quali il D. M. 14 aprile 1997 (G. U. n. 126 del 2 giugno 1997 – Suppl. Ord.

n. 112) sulla commercializzazione delle piantine orticole, pur escludendo il seme, hanno influito positivamente sul settore, responsabilizzando i produttori e i Servizi Fitosanitari attraverso procedure di accreditamento e controlli, introducendo il concetto di *punti critici* della produzione, che coinvolgono indirettamente lo stato sanitario della semente (Vannacci, 2001).

Il settore è caratterizzato da notevole dinamicità in relazione al citato contesto normativo, all'accrescersi delle conoscenze epidemiologiche, alle pressioni dei paesi esportatori che sempre più frequentemente propongono misure alternative meno limitative degli scambi, al variare di situazioni interne all'UE, comprese le misure d'integrazione di territori periferici (dipartimenti francesi d'oltremare, Canarie, Azzorre, ecc.) nelle normative comunitarie. Per completare questo cenno al quadro di riferimento scientifico e normativo della quarantena nell'UE occorre citare l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), costituita nel 2002, con sede attuale a Parma. L'EFSA costituisce il riferimento dell'UE nella valutazione del rischio riguardante la sicurezza degli alimenti e dei mangimi. L'Autorità, finanziata dal bilancio dell'UE, è indipendente e opera, in ottemperanza alle norme comunitarie, in collaborazione e consultazione con le varie parti interessate: gestori del rischio nella Commissione Europea, Parlamento Europeo, Stati Membri dell'UE (SM). Per quanto qui ci concerne elabora – nell'ambito dell'Unità e del Gruppo di Esperti per la Sanità delle Piante (*Plant Health*, PLH) – opinioni scientifiche e altri documenti su vari aspetti di rischio relativi alla sanità delle piante.

Le conoscenze generate dallo studio della patologia del seme sono un indispensabile supporto decisionale nella gestione del rischio in campo fitosanitario ed è sentita l'esigenza, ai vari livelli e tra i vari organismi che operano nel settore, di presupposti scientifici affidabili onde basare le misure di prevenzione e difesa su criteri di rischio accettabile.

I funghi patogeni trasmessi per seme che non presentino le caratteristiche richieste dalla sempre più rigorosa normativa internazionale per entrare, o per essere mantenuti, tra quelli di quarantena, possono tuttavia, per i loro potenziali effetti negativi sulla qualità delle sementi e sulla resa o la qualità dei prodotti che da queste derivano, essere regolati nell'ambito di schemi di certificazione fitosanitaria delle sementi.

Per le specie fungine capaci di causare danni rilevanti, è importante conoscere la correlazione tra il livello di infezione seminale e l'impatto della malattia in campo onde stabilire l'eventuale soglia "di rifiuto" che li renda senz'altro inadatti all'uso come semente e, possibilmente, una seconda soglia che, previa applicazione di idoneo trattamento, renda la semente idonea all'uso come se

si trattasse di seme sano. La conoscenza di tali “doppie soglie”, teoricamente ideale, non è molto comune. Citiamo, come esempio, quanto è stato elaborato per la coppia *Pyrenophora graminea*-orzo, per la quale, in seguito a risultati sperimentali ottenuti nell'Italia settentrionale e centrale, si è consigliato di trattare le sementi destinate alla produzione quando il seme infetto è compreso tra il 14 e il 30% e di inviare al consumo i lotti con infezione superiore al 30% (Porta-Puglia et al., 1986; Vannacci et al., 1996). Per specie patogene particolarmente virulente e in determinati ambienti o condizioni colturali, anche bassissime percentuali di seme infetto o contaminato possono condurre a gravi danni. Kaiser (1987) osservò che, in Idaho, USA, in presenza di condizioni fresche e umide, infezioni di sementi di cece da *Ascochyta rabiei* comprese tra 0,001% e 0,1% causano epidemie in campo.

È evidente che la presenza di patogeni non inclusi tra quelli di quarantena su un lotto di seme dovrebbe essere considerata un parametro che, al pari di altri (germinabilità, purezza, energia germinativa, ecc.) concorre a definire la “qualità” del lotto. Ma per un corretto apprezzamento del significato da attribuire alla presenza di un patogeno sul seme è necessario approfondire l'argomento.

2. LA TRASMISSIONE PER SEME DEI FUNGHI PATOGENI NELLE PIANTE

Nella presente trattazione, per seme si deve intendere la struttura che viene utilizzata per la semina e che deriva da un processo di riproduzione gamica. Include, perciò, anche quelle strutture che botanicamente non sono semi veri e propri, ma anche frutti, come, ad es., le cariossidi. Un organismo patogeno si definisce “trasmesso per seme” quando, grazie alla sua presenza sul/nel/col seme è in grado di riprodurre la malattia sulla coltura che da quei semi ha origine o, ad esempio infeudandosi nel terreno, è in grado di causare una malattia sulla stessa specie ospite o anche su altre specie ospiti. Il concetto è più restrittivo di quello di patogeni “portati dal seme”, in quanto questi includono quegli organismi, ad esempio ruggini, che possono ritrovarsi come contaminanti sulla superficie del seme, ma non sono in grado di causare la malattia. In effetti, sarebbe più corretto parlare di semi infetti quando l'inoculo del patogeno è all'interno del seme (ad es. il micelio di *Ustilago nuda* è presente nell'embrione della cariosside di orzo) e di semi contaminati quando l'inoculo è aderente alla superficie del seme (ad es. teleutospore di *Tilletia caries* su cariossidi di grano) o è distribuito all'interno della massa del seme (ad es. sclerozi di *Sclerotinia sclerotiorum* in numerose colture) anche sotto forma di

terreno o residui colturali infetti. Infine uno stesso patogeno può avere diversa localizzazione, ad es. le teleutospore di *T. caries* possono ritrovarsi aderenti al seme, in particolare all'estremità villosa della cariosside opposta a quella embrionale, e libere all'interno della massa delle cariossidi. I semi infetti rappresentano, perciò, l'inoculo primario da cui può avere origine un'epidemia.

Un seme infetto può ospitare l'inoculo del patogeno in strutture diverse del seme stesso (embrione, endosperma, tegumenti, pericarpo) e questo dipenderà da diversi fattori quali l'anatomia del seme stesso, la biologia del patogeno e il momento dell'infezione, inteso sia in rapporto al clima che al momento della fertilizzazione dell'ovulo. Volendo generalizzare, con tutti i rischi che si corrono generalizzando troppo, si può ritenere che per molti funghi a localizzazione non obbligata, si avrà una maggior presenza dell'inoculo all'interno del seme con infezioni precoci (pre-fertilizzazione) e/o avvenute con andamento climatico caldo-umido mentre la localizzazione embrionale si avrà più facilmente con semi in cui l'embrione occupa gran parte del seme stesso (ad es. buona parte delle leguminose). Per alcuni patogeni si ha una localizzazione obbligata, *U. nuda* può essere presente esclusivamente nell'embrione, mentre in altri casi la localizzazione è fortemente dipendente dagli altri fattori in gioco. La localizzazione dell'inoculo ha conseguenze dirette sulla trasmissione seme/pianta, sulla difesa e sulla diagnostica. Ancora generalizzando, si può stilare una graduatoria di "pericolosità", dove la localizzazione embrionale occupa il primo posto, seguita da quella interna e non embrionale e, quindi da quella esterna. Una volta che un lotto di semi infetti è seminato, il patogeno è in grado di passare dal seme alla pianta e di svilupparsi ulteriormente a spese di questa, causando uno stato di malattia. La colonizzazione dell'ospite può avvenire per via sistemica, come nel caso di *T. caries* su frumento, o attraverso la produzione di inoculo sugli organi attaccati e la sua diffusione per via esterna sugli organi ancora sani, come nel caso di *Ascochyta pisi* su pisello. Neergaard (1979), nel suo estensivo trattato "Seed Pathology", cui si può far riferimento per un organico, seppur datato, inquadramento del problema, combinando i diversi tipi di localizzazione con le modalità di infezione e di successivo sviluppo del patogeno a carico della pianta, elenca 8 tipi di ciclo sottolineando che, anche in questo caso, non esiste una netta linea di demarcazione tra di essi in quanto uno stesso patogeno può mostrare più di una tipologia di ciclo.

Le conseguenze della presenza di un patogeno su un seme, e quindi l'insorgenza di uno stato di malattia, sono ovviamente funzione dei due organismi, patogeno e ospite, coinvolti. L'ospite, inteso come specie, è in effetti un insieme di cultivar o varietà che possono differire nella suscettibilità/resisten-

za a quel determinato patogeno, mentre il patogeno, dal canto suo, è una popolazione di individui talvolta assai variabile nella patogenicità/virulenza nei confronti di quella determinata pianta ospite. È dall'interazione tra i diversi genotipi presenti che si originerà la malattia. È, tuttavia, opportuno sottolineare che la probabilità di trovare su un seme un biotipo del patogeno già particolarmente adattato a quel particolare genotipo dell'ospite è decisamente più elevata (in fin dei conti se si trova lì ci sono buone probabilità che si sia sviluppato sulla pianta portaseme) di quanto non lo sia per un propagulo del patogeno trasportato dal vento di essere depositato sullo stesso genotipo dell'ospite, e questo è uno dei motivi che rendono la trasmissione per seme dei patogeni particolarmente efficiente dal punto di vista del patogeno.

Ma le conseguenze della presenza di un patogeno su un seme sono, anche, fortemente modulate dall'ambiente, nelle sue componenti sia biotiche che abiotiche, in cui i due attori principali si trovano ad agire. In questo, le malattie trasmesse per seme non differiscono dalle altre malattie delle piante, e gli effetti di fattori quali umidità, temperatura e pH sono stati studiati e, in alcuni casi, chiariti. Ben diverso è il discorso se prendiamo in considerazione la componente biotica. Anche in questo caso è oramai assodato che la presenza di altri organismi, micro ma anche insetti, può modificare l'attività di patogeni, sia in senso favorevole che sfavorevole. Su questo principio si basa la lotta biologica, o, meglio, microbiologica. I semi sono microcosmi che ospitano organismi patogeni, e su questi si è da tempo concentrata l'attenzione dell'uomo, ma anche saprotrofi. Microcosmo è anche quel piccolo volume di terreno ("spermosfera") interessato dagli essudati del seme e, quindi la complessità delle interazioni tra microrganismi è decisamente elevata. Questo significa che la sola determinazione quantitativa di un patogeno in un lotto di seme è condizione necessaria ma non sufficiente per prevedere, per qualunque sistema ospite/patogeno, la "quantità" di malattia che si manifesterà sulla coltura dopo la semina. È conoscenza comune che la semina di seme infetto in terreno sterilizzato porta, molto spesso, a una "quantità" di malattia decisamente superiore di quando lo stesso seme viene seminato in terreno naturale, e questo è particolarmente vero quando l'inoculo del patogeno è portato esternamente al seme stesso. Ai nostri fini, di maggior interesse è il ruolo dei microrganismi saprotrofi presenti sul seme, in quanto essi potrebbero essere determinati mediante indagini di tipo diagnostico, e una volta effettuata la determinazione essa è valida per quel lotto di seme, ma potrebbero anche essere volutamente aggiunti al seme con strategie di lotta biologica. Da un semplice esame in banche dati si può rilevare come esistano centinaia di lavori relativi alla lotta biologica ai patogeni trasmessi per seme, anche se da un

punto di vista commerciale ben pochi prodotti hanno raggiunto il mercato. Ma questo è un problema comune ai prodotti fitosanitari a base biologica di cui si è discusso in altra occasione (Vannacci et al., 2009).

3. IDENTIFICAZIONE DEI FUNGHI PATOGENI PORTATI DA SEME

I metodi per il reperimento di organismi patogeni su seme, compresi i funghi, sono stati oggetto di diversi lavori pubblicati recentemente (Hutchins e Reev, 1997; Mathur e Kongsdal, 2003; Taylor et al., 2006, Munkvold, 2009) e a essi si può fare riferimento per approfondimenti tecnici. Nostro compito, in questa sede, sarà quello di riassumere quanto attualmente disponibile e discutere quanto, prevedibilmente, la ricerca renderà disponibile nel prossimo futuro.

Essendo condizione necessaria, ancorché non sufficiente, l'identificazione, e la quantificazione di un patogeno in un lotto di seme per poter definire la qualità dello stesso lotto, è indispensabile disporre di saggi diagnostici semplici, rapidi, poco costosi, specifici, sensibili e che diano risultati ripetibili e riproducibili. Le caratteristiche che deve avere un metodo di diagnosi variano alquanto se si tratta di un patogeno di quarantena o di un patogeno che influisce sulla qualità. Nel caso di patogeni da quarantena l'informazione che ci si aspetta è di tipo qualitativo (presenza/assenza) e non dovrebbe essere accettato nessun rischio di errore. In teoria, l'introduzione di una partita di semi proveniente da un'area dove è endemico un patogeno da quarantena per il paese importatore, non dovrebbe basarsi sulle risultanze di un'analisi fitosanitaria condotta su un campione dello stesso seme. Non potendosi esaminare l'intero lotto oggetto di indagine e dovendosi ricorrere a un campionamento, l'assenza del patogeno cercato nel campione esaminato non dà la certezza dell'assenza nell'intero lotto, essendo il risultato soggetto a un errore insito nel campionamento stesso e nel metodo adottato. Altre sarebbero le misure di protezione da adottare in questi casi, ma questioni di politica commerciale rendono la problematica estremamente complessa e in continua evoluzione, come ben esemplificato dal caso di *Tilletia indica*. In ogni caso, i metodi utilizzabili in queste situazioni devono massimizzare la probabilità di intercettare lotti infetti, anche assumendosi un maggior rischio di considerare infetto un lotto che effettivamente è sano. In altre parole, dovrebbe prevalere l'interesse della comunità (evitare l'ingresso di un patogeno in un'area esente) rispetto all'interesse del singolo (importazione di una partita di seme).

Nel caso dei patogeni che influiscono sulla qualità, il rischio di commettere un errore, sovrastimando o sottostimando la reale presenza di un patogeno

sul/nel seme, è accettabile e la messa a punto di un metodo tenderà a minimizzare questo rischio.

Storicamente, la diagnosi di funghi fitopatogeni trasmessi per seme si è basata sul riconoscimento delle loro strutture riproduttive, sessuate o asessuate, differenziate a seguito di incubazione su adatti substrati o recuperate dai semi a seguito di specifici metodi di separazione, e sulla manifestazione di sintomi specifici sui semi (o frutti) e sulle piantine che dai semi hanno origine. Su questa base i metodi possono essere suddivisi tra quelli che non richiedono un periodo di incubazione del seme e quelli che lo richiedono. Tra i primi si possono includere l'esame del materiale inerte che si trova associato al seme stesso (valido, ad es. per il reperimento di sclerozi di *Sclerotinia* spp. o di *Claviceps* spp.), l'esame al microscopio dell'acqua di lavaggio del seme, che consente di identificare quelle strutture fungine aderenti alla superficie del seme e che l'acqua di lavaggio asporta (valido per quei patogeni che hanno localizzazione esclusivamente esterna, ad es. *Tilletia* spp.), ed esami particolari, quali l'*embryo test*, che consente, mediante la rilevazione della presenza di micelio nell'embrione, il riconoscimento di *U. nuda* o *U. tritici* in seme di orzo o frumento. Molto più numerosi sono i metodi che prevedono l'incubazione del seme in condizioni particolari per un periodo di tempo variabile, usualmente, tra i 7 e i 10 giorni. L'incubazione può avvenire in camera umida, e quindi l'esame verterà sul riconoscimento dei sintomi sulle plantule e sul riconoscimento diretto del patogeno allo stereomicroscopio, o in camera umida refrigerata, nella quale il seme, dopo un primo periodo di incubazione a temperatura ottimale per indurre la germinazione, viene sottoposto a congelamento in modo da uccidere il seme stesso. In quest'ultimo metodo il seme morto non offre più alcun tipo di resistenza allo sviluppo dei funghi presenti su di esso che si potranno sviluppare più facilmente. Evidentemente in quest'ultimo caso il riconoscimento sarà diretto. Infine si può ricorrere all'incubazione del seme su mezzo agarizzato (ad es. agar patate e destrosio, PDA). Partendo dal seme, i funghi, e i batteri, presenti possono svilupparsi sul mezzo e competere per esso dando luogo a una o più colonie che circondano il seme stesso. Il riconoscimento sarà diretto, sulla base delle fruttificazioni e dell'aspetto della colonia. Poiché sul mezzo agarizzato si sviluppano molto bene anche i funghi saprotrofi che possono giungere a mascherare lo sviluppo di quelli patogeni, è possibile far precedere la deposizione in piastra dei semi da un loro pretrattamento con una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% di Cl attivo, in modo da effettuare una sterilizzazione della superficie del seme. Questo consente l'eliminazione della microflora superficiale, più frequentemente saprotrofa, ma anche di quella frazione dell'inoculo del patogeno che si trova, per i fun-

ghi che non hanno localizzazione obbligata, all'esterno. In altre parole il metodo consente di rilevare la sola frazione interna dell'inoculo del patogeno e per tale motivo viene affiancato da un'indagine in camera umida o su mezzo agarizzato senza pretrattamento. Il metodo su mezzo agarizzato ben si presta a essere modificato, mediante l'aggiunta di antibiotici, sostanze che riducono la velocità di crescita dei funghi o fungicidi, al fine di rendere il mezzo stesso parzialmente selettivo. Al fine di migliorare la selettività si possono impiegare mezzi agarizzati disegnati *ad hoc*, ad esempio il mezzo di Komada (Komada, 1975) è utilizzato per l'individuazione di *Fusarium oxysporum* da matrici diverse. Per una sintetica descrizione dei metodi cosiddetti "classici" si può fare riferimento a Vannacci (1988), mentre per un loro approfondimento si può fare riferimento a Neergaard (1979).

Questi metodi sono quelli maggiormente adottati nella normativa nazionale e internazionale, ma soffrono di due gravi difetti. Richiedono tempi lunghi per fornire i risultati, usualmente 7-10 giorni, e competenze di tassonomia fungina che, quantomeno in Italia, sono sempre più difficili da trovare. La necessità di superare questi scogli ha indirizzato la ricerca verso possibili alternative. L'immunologia, e le sue applicazioni quali l'ELISA, ha fornito eccellenti metodi di saggio, per l'individuazione di batteri e virus, che forniscono in tempi brevi informazioni affidabili e quantitative. I funghi, data la loro complessità antigenica, mal si prestano all'impiego di metodi immunologici, e difatti ben pochi di questi metodi sono entrati nel novero dei metodi ufficiali (ad es. per il reperimento di *Neotyphodium coenophialum* e *Neotyphodium lolii* in *Festuca* spp. e *Lolium* spp.; ISTA, 2003). Ma è con la diffusione, a partire dalla fine degli anni '80 (Saiki et al., 1985), delle tecniche basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) che la fitodiagnostica ha fatto un salto di qualità essendo necessarie semplici nozioni di biochimica e apparecchiature via via sempre meno costose per poter effettuare saggi altamente sensibili, rapidi e con la possibilità di analizzare più campioni contemporaneamente. La fitodiagnostica è, quindi, uscita dai laboratori di ricerca fitopatologici per acquisire una logica mercantile con la diffusione di laboratori privati, in grado di offrire servizi accurati e a costo limitato, cui possono rivolgersi direttamente gli agricoltori. Le competenze richieste in questo tipo di laboratori non sono più quelle fitopatologiche ma quelle biomolecolari e/o biochimiche e desta, quindi, un po' di preoccupazione la capacità di contestualizzare i risultati di questi test diagnostici nella complessa realtà agronomica e fitopatologica. Munkvold (2009), nella sua eccellente review, ricorda che tra 75 metodi approvati dall'ISTA, dall'ISHI (International Seed Health Initiative) e dalla NSHS (National Seed Health System,

USA), solo 3 sono basati sulla PCR e nessuno di questi riguarda i funghi. Ancora numerosi sono i limiti oggettivi che questi metodi presentano, quali le difficoltà insite nell'estrazione del DNA dai semi, a causa della presenza di inibitori della PCR negli estratti, o il rischio di ottenere falsi positivi, a causa dell'amplificazione di acidi nucleici liberati da cellule morte del patogeno. Anche la variabilità imputabile alla diversità dei reagenti e delle apparecchiature impiegate in laboratori diversi, può costituire un problema. Ricordiamo, infatti, che per poter essere validato, un saggio deve superare una fase di valutazione condotta in laboratori diversi e a tempi diversi (vedi anche Vannacci, 2008) fornendo risultati statisticamente non differenti. La stessa ricerca può fornire rimedi ad alcuni dei problemi rilevati. L'utilizzo di metodi di estrazione che prevedono l'adsorbimento degli acidi nucleici su polimeri (Mumford et al., 2006) o l'impiego di separatori magnetici accoppiati con sonde a DNA (Walcott et al., 2004) consentono una miglior purificazione dell'estratto e una sua concentrazione aumentando la sensibilità del saggio. La rapida evoluzione delle tecniche ha portato allo sviluppo di metodi diagnostici dai nomi, talvolta, fantasiosi (PCR-ELISA, Immunocapture-PCR, TaqMan, beacons, skorpions; Vannacci e Firrao, 2008). Altre tecniche (Vannacci, 2008), quali l'impiego del naso elettronico o dei MIP (molecularly imprinted polymers), o i nanobiotrasduttori (Firrao et al., 2005), o anche l'impiego di biosensori in grado di riconoscere acidi nucleici (Minunni et al., 2001) potranno trovare valida applicazione, ma la fase di messa a punto è ancora piuttosto lunga.

D'altra parte, è con l'avvento della diagnostica molecolare che si può immaginare una evoluzione qualitativa della diagnostica verso obiettivi più ambiziosi, quali la possibilità di individuare più patogeni in un singolo saggio (multiplexing), o la possibilità di sottoporre ad analisi molti campioni contemporaneamente. La tecnica più studiata è la multiplex real time PCR, ma la limitata disponibilità di fluorofori e la necessità di impiegare un limitato numero di inneschi in ogni singola reazione di amplificazione limitano, di fatto, la possibilità di diagnosi a pochi patogeni per volta, tuttavia fornendo risultati quantitativi. Molto più versatili, anche se in grado di fornire risultati scarsamente quantificabili, risultano essere i DNA arrays, con i quali è possibile diagnosticare diverse decine di organismi contemporaneamente. Se a tutto questo si aggiunge il prepotente sviluppo della robotica applicata alla fitodiagnostica, ben si comprende come non molto lontano è il giorno in cui nel giro di poche ore potremo definire la presenza di tutti i patogeni di interesse per una coltura su un elevato numero di lotti di seme.

Infine, ma non di secondaria importanza, un pesante impatto sul settore della diagnostica lo ha l'evoluzione del concetto di specie legato alla fi-

logenesi molecolare (Vannacci e Firrao, 2008). La scoperta che organismi fungini morfologicamente identici possono appartenere a specie molecolari diverse mette definitivamente in crisi i metodi diagnostici “classici” in quanto potrebbe non esistere più una corrispondenza biunivoca tra forma e specie. L'esempio, più sotto discusso, di *Fusarium graminearum*, è illuminante. Quello che fino a pochi anni fa era considerata una singola specie è oggi suddivisa, seppure la discussione sia ancora aperta, in più di 10 specie diverse. Ma anche in questo caso la ricerca va avanti affrontando il problema non più soltanto mediante l'approntamento di strumenti tecnici sempre più sofisticati, ma spostando il problema sul piano concettuale, cercando di addivenire a un sistema di identificazione degli organismi viventi mediante un sistema di “codici a barre” dove, mediante una corta (500-700 basi) sequenza di DNA si possa essere in grado di assegnare un individuo a una singola specie (<http://www.boldsystems.org>). L'abbinamento dell'impiego di queste corte sequenze e di strumenti quali i DNA arrays e la robotica applicata alla diagnostica (Vannacci e Firrao, 2008) aprono possibilità attualmente impraticabili, quali l'identificazione di tutti i componenti il microbioma di un singolo seme, con ricadute facilmente immaginabili sull'epidemiologia e la difesa.

4. MISURE DI DIFESA

Poiché, per numerosi funghi patogeni delle piante, il seme è un efficace mezzo di sopravvivenza nel tempo e di diffusione nello spazio, opportuni interventi sulle sementi possono essere molto efficaci nella prevenzione delle malattie. Le misure a disposizione per eliminare o limitare i danni sono numerose. Innanzitutto disponiamo di normative di quarantena, miranti a impedire l'introduzione e la diffusione di patogeni assenti (o presenti solo in aree limitate) in un determinato territorio. Abbiamo poi norme e procedure atte a garantire la produzione e diffusione di sementi sane (o con soglie di infezione o contaminazione tali da non compromettere quantità e qualità dei raccolti). Inoltre, possiamo ricorrere all'uso di varietà resistenti e all'adozione di tutte quelle buone pratiche colturali atte a garantire idonee condizioni fisiologiche dell'ospite o a favorire l'instaurarsi di condizioni micro-ambientali sfavorevoli alla diffusione delle malattie. Accanto a queste misure preventive, esiste tutto un arsenale di mezzi di lotta chimica, fisica o biologica capaci di ridurre o, più raramente, eradicare i funghi patogeni mediante l'applicazione diretta al seme stesso. Ognuna di queste misure può avere, a seconda dei casi specifici, maggiore o minore efficacia. In generale, l'uso concomitante di più misure di

lotta in un approccio integrato permette l'ottimizzazione dei risultati con il minimo impatto sull'uomo e sull'ambiente.

4.1. *La quarantena*

Per quanto concerne l'UE, la Direttiva 2000/29/CE (che qui consideriamo nelle disposizioni relative ai semi botanici e altre sementi "tecniche" ma escludendo quanto concerne i materiali di moltiplicazione quali bulbi e tuberi), nell'Allegato I, concernente organismi nocivi di cui è vietata l'introduzione e la diffusione, in tutti gli SM, indipendentemente dai vegetali o prodotti su cui si trovano, Parte A, Sezione I (organismi di cui non è nota la presenza nel territorio comunitario) e che rivestono importanza per tutta la Comunità, elenca sedici specie di funghi, incluso la specie trasmissibile per seme *T. indica*.

Nella stessa direttiva, nell'Allegato II, Parte A, Sezione II, che riguarda misure relative a organismi nocivi di cui sia nota la presenza sul territorio comunitario e che rivestono importanza per tutta la Comunità, limitatamente a *determinati vegetali o prodotti vegetali*, una misura riguarda *Plasmopara halstedii*, su sementi di *Helianthus annuus*; nella Parte B dello stesso Allegato, relativa a zone protette, è inclusa *Glomerella gossypii* su sementi e frutti (capsule) di *Gossypium* spp., limitatamente alla Grecia. Nell'Allegato IV, Parte A, che stabilisce *requisiti particolari* che devono essere richiesti da tutti gli SM per l'introduzione e il movimento di *vegetali, prodotti vegetali e altre voci*, nella Sezione I, sono menzionate le cariossidi di *Triticum secale* e \times *Triticosecale* da paesi in cui sia nota la presenza di *T. indica*, e nella Sezione II (vegetali, prodotti vegetali e altre voci, di origine comunitaria) le sementi di *H. annuus*, per le quali è richiesto che le sementi siano originarie di zone notoriamente indenni da *P. halstedii*, oppure che queste, a eccezione di quelle di varietà resistenti a tutte le razze del patogeno presenti nella zona di produzione, siano state sottoposte a idoneo trattamento. Infine, nella Parte B dell'Allegato IV (introduzione e movimento in zone protette) vengono indicati requisiti particolari, per le sementi di *Gossypium* spp. relativamente ad alcune regioni della Spagna e per la Grecia. Questi sono: la constatazione ufficiale che la lanugine del seme sia stata rimossa e, per la sola Grecia, che nessun sintomo di *G. gossypii* sia stato osservato nel luogo di produzione dall'inizio dell'ultimo ciclo vegetativo completo e che un campione rappresentativo sia stato analizzato e trovato esente dal patogeno.

Oltre alle misure definite dalla direttiva, nell'UE, come in qualsiasi altro paese che segua gli standard internazionali, possono venire adottate misure provvisorie per casi di emergenza, basate su un'analisi sommaria del rischio condotta sui limitati dati scientifici disponibili. Contemporaneamente, o comunque entro tempi brevi, inizia il monitoraggio del territorio per verificare la situazione e delimitare le eventuali zone in cui l'organismo nocivo sia già presente e viene elaborato un PRA completo. Valga qui l'esempio di *Gibberella circinata* (anamorfo *Fusarium circinatum*), agente del Cancro resinoso di numerose specie di *Pinus* e di *Pseudotsuga menziesii* (abete di Douglas), trasmissibile anche per seme. La Commissione, sulla scorta di un PRA preliminare prodotto dai servizi fitosanitari francesi, adottò la Decisione 2007/433/EC (CE 2007) nella quale sono state previste misure per prevenire l'introduzione o la diffusione dell'organismo specificato, per delimitare le aree infette nella Comunità e per la lotta contro l'organismo in tali aree (eradicazione), regolando l'importazione, la produzione e gli spostamenti nella Comunità stessa dei vegetali specificati, comprese le sementi. Con la stessa decisione è stata avviata un'indagine per rilevare la presenza o l'assenza dell'organismo negli SM.

Al fine di raccogliere maggiori informazioni per le decisioni future, relative alla gestione del rischio da *G. circinata*, compreso l'eventuale inserimento del patogeno nella Direttiva 2000/29/EC, la Commissione ha incaricato l'EFSA di condurre una nuova e più estesa valutazione del rischio e di identificare e valutare le misure fitosanitarie adottabili. Questa ha recentemente pubblicato un'Opinione in merito (EFSA, 2010a) giungendo alla conclusione che, in alcune parti dell'UE, c'è il rischio che il Cancro resinoso possa colpire le specie ospiti. Secondo lo studio, l'ingresso e la diffusione del patogeno nell'UE appaiono molto probabili ed esso ha un alto potenziale di stabilirsi in alcune aree. Sono state identificate diverse vie d'ingresso (*pathway*), tra le quali riveste un ruolo primario il seme, e definite le aree potenzialmente a rischio, considerando la distribuzione degli ospiti e le condizioni climatiche. Queste aree comprendono Portogallo (nord e centro), Spagna (nord ed est), Francia (sud e aree costiere) e aree costiere dell'Italia e della Grecia. In alcune di queste sono già stati osservati attacchi. Misure di lotta integrata, con le appropriate pratiche vivaistiche e in foresta, possono limitare l'impatto della malattia. Le misure previste dalla legislazione in vigore, che oltre a quelle specifiche per *G. circinata* definite nella Decisione 2007/433/EC, comprendono anche misure rivolte ad altri patogeni (ad esempio quelle relative all'importazione di legname) ma che possono in qualche misura mitigare il rischio di introduzione di *G. circinata*, sono ritenute di effetto limitato nei riguardi del fungo. Avvalen-

dosi di questa Opinione dell'EFSA, e tenendo conto di molti altri fattori, i gestori del rischio definiranno le eventuali misure da adottare per conseguire un livello di rischio accettabile secondo gli attuali standard internazionali.

Se da un lato si deve riconoscere l'utilità delle misure di quarantena in vigore nell'UE nell'impedire, o almeno ritardare, l'ingresso di alcune specie di funghi patogeni trasmessi per seme, dall'altro il confronto tra il grande numero di queste (Richardson, 1990) e il ridottissimo numero di specie oggetto di normativa, suggerisce alcune considerazioni. In particolare, come sottolineato da Neergaard (1981), occorrerebbe una rivalutazione critica del concetto stesso di "distribuzione geografica" delle specie fungine, che tenga in maggior conto l'incidenza di importanti patogeni non inclusi nelle liste di quarantena perché "largamente diffusi". In realtà alcuni di questi, considerati a distribuzione "mondiale", hanno sul territorio una diffusione discontinua e possono raggiungere, mediante il seme, aree indenni o a limitata incidenza. Il caso di *S. sclerotiorum*, che infetta numerosi ospiti ed è diffusa in tutto il mondo, può essere emblematico. Il patogeno può accompagnare il seme e raggiungere un determinato campo in una località precedentemente indenne, da cui potrà diffondersi mediante ascospore alle colture successive dello stesso e di altri ospiti. Gray e Noble (1965) hanno descritto un caso, in Scozia, in cui l'inoculo del fungo, presente in sementi di pisello, ha successivamente raggiunto anche colture di patata e carota. Altro aspetto non sufficientemente considerato nelle normative di quarantena riguarda la variabilità genetica della patogenicità. Neergaard (1981) cita il potenziale pericolo rappresentato da razze di *Magnaporthe grisea* nuove per l'Italia o per altri paesi produttori di riso nella zona OEPP, nelle quali la specie patogena è presente, ma in cui l'introduzione di varianti sino a ora assenti potrebbe causare conseguenze altrettanto nefaste quanto quelle osservate in Alto Volta, Nigeria o Corea del Sud quando furono introdotte, con cultivar di riso importate, nuove razze del fungo.

A questo proposito occorre menzionare il ruolo bivalente del germoplasma, utilissimo per costituire nuove varietà più produttive e con caratteri desiderabili, ma assai pericoloso per le specie patogene, o le loro varianti, che può veicolare e che, con gli scambi tra genetisti, possono diffondersi su scala mondiale. Le nuove accessioni, infatti, vengono soprattutto raccolte nei centri di origine delle specie vegetali coltivate o dei loro affini selvatici, e queste generalmente coincidono con i centri di origine di molti loro patogeni. Inoltre, le cure dedicate alla conservazione del seme raccolto (in particolare le basse temperature e la bassa umidità relativa) aumentano la longevità anche

dei funghi patogeni che infettano o contaminano i semi. È quindi fondamentale che le istituzioni che raccolgono e scambiano il germoplasma e i paesi importatori mettano in atto adeguate precauzioni affinché i movimenti si verifichino con il massimo di sicurezza (Neergaard, 1984; Kaiser et al., 2000). Si veda anche, in proposito, la serie FAO/IPGRI *Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm*, di cui ci limitiamo a citare i fascicoli dedicati, rispettivamente, ai cereali a cariosside piccola e alle leguminose da granella: Frison et al. (1990); Diekmann e Putter (1995).

4.2. *La certificazione e le buone pratiche colturali nei campi di produzione delle sementi*

Uno strumento fondamentale, capace di permettere a una determinata coltura di esprimere in coltura il massimo della capacità in termini di produzione e qualità, è rappresentato da opportuni schemi di certificazione che garantiscano il valore agronomico e sanitario delle sementi. Senza ripetere qui i concetti espressi in altri contributi in questo stesso Quaderno (Borasio; Merisio), ci limitiamo a sottolineare alcuni aspetti della prevenzione di malattie da funghi nei campi di produzione delle sementi.

Al fine di poter adottare le misure più idonee a minimizzare il rischio di infezioni nei campi di produzione, è necessario conoscere l'epidemiologia dei principali funghi patogeni trasmissibili per seme di ogni singola coltura. Seguendo i concetti epidemiologici generali sviluppati dal Welzien, che coniò il termine "geofitopatologia" negli anni '60, e successivamente applicati ad alcune malattie portate da seme da Diekmann (1993), possiamo distinguere l'area geografica in cui una determinata malattia può presentarsi, in funzione della presenza degli ospiti e dei fattori ambientali, in tre sub-aree a seconda della frequenza con cui ricorrono epidemie con perdite economiche rilevanti:

- 1) aree di maggiore danno, con epidemie frequenti;
- 2) aree di danno marginale, con epidemie occasionali;
- 3) aree di attacco sporadico, nelle quali la malattia normalmente non causa danni significanti.

Alla luce dei concetti esposti, sarà importante, quindi, la scelta di zone idonee, per caratteristiche pedoclimatiche, a sfavorire le epidemie e l'insediamento dei principali patogeni fungini sul o nel seme di una determinata specie. Tuttavia, le zone più vocate climaticamente per prevenire malattie fogliari

da specie di *Drechslera*, *Rhizosporium* e altre, nonché infezioni da *Fusarium* spp. sulle cariossidi dei cereali, quali ad esempio potrebbero essere le aree a clima più secco del sud Italia, sono, talvolta, carenti dal punto di vista delle infrastrutture, e meriterebbero maggior attenzione da parte delle Autorità locali e nazionali affinché le loro potenzialità per la produzione sementiera potessero essere maggiormente valorizzate.

L'infezione seminale in campo può avere luogo in diverse fasi fisiologiche: all'antesi, durante lo sviluppo del seme che si conclude con la maturità fisiologica di questo, durante la maturazione, che inizia dalla maturità fisiologica e, attraverso un processo di cambiamenti fisiologici e strutturali legati soprattutto alla riduzione del contenuto idrico, si conclude al momento del raccolto. Nei riguardi di ogni singolo patogeno, ogni fase fisiologica di una data specie ha caratteristiche sue proprie che si riflettono sull'epidemiologia e, di conseguenza, sulle misure da adottare per prevenire le infezioni. Così, se una certa specie patogena ha come fonte d'inoculo i residui della coltura precedente, sarà opportuno ricorrere a rotazioni con colture non-ospiti, oppure all'allontanamento o all'interramento profondo dei residui stessi. Garzonio e McGee (1983), ad esempio, dimostrarono l'efficacia del mais come precedente colturale idoneo a ridurre il livello di infezione seminale da *Diaporthe/Phomopsis* in soia. Un accorgimento, raccomandabile per diverse combinazioni ospite-patogeno al fine di ridurre il rischio di infezioni tardive (e, nello stesso tempo, limitare l'insediamento di funghi a debole patogenicità ma che potrebbero ridurre il vigore del seme), consiste nel raccogliere il seme appena abbia raggiunto l'idoneo stadio di maturità, onde evitarne il rischio di esposizione alle piogge e all'umidità. Anche la scelta del metodo d'irrigazione, delle quantità d'acqua e del momento di distribuzione, nonché la tempestiva eliminazione delle malerbe nel campo e intorno a esso, possono avere un ruolo decisivo nella riduzione dell'inoculo fungino sul seme.

Lo stato sanitario dei campi portaseme dovrà essere verificato con opportune ispezioni e integrato dall'analisi dello stato fitosanitario delle sementi prodotte, le quali, a seconda dei risultati dei controlli di campo e di laboratorio, potranno essere certificate (come tali o dopo opportuni trattamenti) o rifiutate.

Saranno inoltre adottate tutte quelle misure colturali idonee a favorire il buono stato fisiologico delle piante portaseme, al fine di esaltarne le resistenze o la sfuggenza ai patogeni. A proposito di quest'ultimo aspetto, ad esempio, esperienze condotte in Italia hanno confermato che l'indice di trasmissione di *P. graminea* in orzo è correlato all'intervallo semina-emergenza (Delogu et al., 1989), quindi, nel caso specifico, per ridurre l'infezione la data di semina

dovrà essere scelta in modo tale da avere la massima probabilità di una rapida emergenza. Menzioniamo, oltre alla scelta delle epoche di semina, le concimazioni più opportune e le distanze di semina che favoriscano l'aerazione della coltura.

4.3. *La resistenza varietale*

La scelta di varietà resistenti rappresenta un cardine della difesa delle colture a tutti i livelli della produzione. Data l'esistenza di numerose varianti patogenetiche in alcuni importanti funghi portati da seme, si dovranno costituire e riprodurre varietà resistenti alle varianti più diffuse e virulente. Trattare qui a fondo questi aspetti esulerebbe dal tema assegnatoci. Ci limiteremo ad accennare a un filone della ricerca e dell'applicazione sinora un po' trascurato ma che, in mancanza di idonei geni di resistenza, potrebbe apportare miglioramenti significativi, o comunque contribuire a prolungare la durabilità delle resistenze disponibili. Si tratta degli interventi genetici sull'architettura della pianta o sulla morfologia di alcuni suoi organi. Alcuni di questi sono allo studio particolarmente per malattie fungine fogliari, trasmissibili anche o soprattutto per seme, di leguminose da granella, per le quali mancano adeguate fonti di resistenza e per situazioni colturali ove il ricorso intensivo alla lotta chimica sarebbe sconsigliabile per ragioni economiche o ambientali. L'approccio, difficile per le complesse relazioni tra forma, fisiologia e ambiente, oggi si avvale dell'appoggio di modelli computerizzati e appare capace di futuri interessanti sviluppi (Porta-Puglia et al., 2000).

4.4. *Trattamenti chimici fisici e biologici*

I trattamenti al seme hanno rappresentato e rappresentano tuttora un mezzo fondamentale per garantire produzione e qualità. La storia della Patologia vegetale è andata di pari passo con lo sviluppo di metodi di lotta. All'inizio del secolo XX i metodi disponibili per la lotta contro i funghi trasmessi per seme erano essenzialmente tre: le soluzioni rameiche, la formaldeide e l'acqua calda. Quest'ultimo metodo, messo a punto dal danese Jenssen nel 1888, consisteva nell'immergere le sementi per 110 minuti in acqua mantenuta a 48 °C, oppure per 95 minuti a 49 °C (Mathre et al., 2001). Intanto, la popolarità dei trattamenti cuprici, che era andata calando a causa della tossicità nei confronti del seme e della necessità di applicarli in liquido e di dover quindi

asciugare il seme, riprendeva vigore, intorno al 1917, con l'introduzione del carbonato di rame, meno fitotossico e applicabile a secco. Nel frattempo, iniziavano ad affermarsi i derivati organici del mercurio che diventeranno il principale mezzo per la concia del seme in molti paesi per l'elevata efficacia verso molti patogeni. Ma la loro alta tossicità anche per l'uomo e gli animali, che portò a drammatici casi di avvelenamento e a danni ambientali, ne determinò severe limitazioni d'impiego e il progressivo abbandono. Un'altra molecola, l'esaclorobenzene, fu usata per diversi anni per l'efficacia contro le teleutospore di agenti di Carie sulle sementi e al suolo. Nei primi anni '50, con la scoperta di nuove famiglie di principi attivi, altri fungicidi, quali tiram (ditiocarbammati) e captan (ftalimidici), trovarono largo impiego nella concia delle sementi per l'ampio spettro d'azione e la comodità d'impiego. L'avvento della carbossina, attiva verso agenti di Carie, Carboni, Elmintosporiosi, Rizottoniosi e Ruggini, dotata di sistemicità, bassa tossicità per uomo e animali e fitotossicità trascurabile, sostituì progressivamente i precedenti fungicidi, soprattutto nella concia di cereali a cariosside piccola. Negli ultimi due decenni la messa a punto di nuove molecole ad azione fungicida applicabili alle sementi si è andato arricchendo dei triazoli (difenoconazolo, tebuconazolo, triticonazolo), fungicidi sistemici ad ampio spettro per i cereali, del fludioxonil (impiegato a basse concentrazioni e considerato a basso rischio) che, su mais e altre specie, ha sostituito il captan. Dal 1996 iniziò l'uso di molecole della famiglia delle strobilurine, a spettro assai vasto e con nuovo modo d'azione, capaci anche di apportare benefici fisiologici alle piante derivate dal seme trattato (Munkvold, 2009).

La lotta con mezzi fisici si avvale di metodi passivi o attivi. I primi comprendono i sistemi di "pulitura", da tempo di impiego corrente da parte dell'industria sementiera, capaci di separare meccanicamente i propaguli fungini, ad esempio gli sclerozi (*Claviceps*, *Sclerotinia*, ecc.), che possono accompagnare le sementi, oppure i semi alterati nella forma o nel peso (ad esempio cariossidi colpite da *Fusarium* spp.) che possono costituire fonte d'inoculo. Tra i secondi, troviamo soprattutto quelli che impiegano l'energia termica, e rappresentano quindi l'evoluzione del metodo di Jenssen. Tali trattamenti trovano ostacolo nel limitatissimo differenziale termico tra temperature efficaci contro i patogeni e temperature tollerate dal seme senza che la germinabilità ne sia compromessa. Inoltre, quelli applicati in liquido, richiedono una fase di essiccamento delle sementi. D'altra parte il calore secco, efficace nei confronti di alcuni insetti, non lo è altrettanto nei confronti dei funghi. L'impiego di vapore aerato può ridurre o eliminare i citati inconvenienti (For-

sberg, 2004); ne è stata sviluppata una tecnica, già commercializzata in Svezia per il trattamento dei cereali, che fornisce risultati migliori o uguali rispetto ai convenzionali trattamenti chimici verso diversi funghi (Tinivella et al., 2005). Infine, l'effetto termico può essere ottenuto con una tecnica innovativa che sfrutta selettivamente l'effetto biocida di fasci di elettroni a bassa energia, limitato agli strati più superficiali del seme con rispetto dell'embrione. Il metodo risulta efficace verso malattie portate da seme in cereali (Tinivella et al., 2005; Jahn et al., 2006). I metodi basati sull'energia termica, di interesse per il seme destinato a colture biologiche, non sembrano ancora poggiare su basi sperimentali sufficientemente ampie da permetterne, in tempi brevi, una più vasta estensione all'agricoltura convenzionale.

I metodi di lotta biologica si avvalgono di microrganismi, sfruttando uno o più dei meccanismi con cui questi possono interagire con il patogeno o con l'ospite (iperparassitismo, antibiosi, competizione per lo spazio e i principi nutritivi, induzione di resistenza nell'ospite). Teoricamente molto promettente, la lotta biologica trova il principale limite applicativo nella forte dipendenza del sistema ospite-parassita-agente biologico dalle condizioni ambientali, che causa risultati variabili nel tempo e nello spazio. Tuttavia i trattamenti al seme (sia contro patogeni trasmessi per seme sia per la protezione delle plantule verso alcuni agenti di marciume radicale e di morie dei semenzali presenti nel terreno) ne rappresentano l'impiego di maggior successo. Alcuni preparati hanno dimostrato una buona efficacia nei riguardi di patogeni di grano, riso, mais, barbabietola da zucchero e cotone (Heidary e Pessaraki, 2010). Gli agenti più studiati comprendono alcuni batteri (*Pseudomonas* fluorescenti e *Bacillus* spp.) e specie di funghi quali *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., nonché isolati di *Fusarium* spp. antagonisti.

Accenniamo, a completamento dei principali mezzi in uso o in sperimentazione per la concia del seme, alle sostanze naturali, di origine vegetale o animale.

I prodotti di origine vegetale hanno notevoli potenzialità di sviluppo applicativo in agricoltura per la loro ricchezza in molecole bioattive quali alcaloidi, tannini, chinoni, cumarine, composti fenolici e fitoalessine. Gli estratti vegetali e gli oli essenziali, in particolare, sono facilmente ottenibili, attivi verso specie fungine, biodegradabili e impiegabili anche in agricoltura biologica e in programmi di lotta integrata (Vannacci et al., 2009). Alcuni risultati sperimentali indicano la potenziale applicabilità, nel trattamento contro patogeni fungini delle sementi, di alcuni estratti, quali quelli di chiodo di

garofano (*Syzygium aromaticum*) e curcuma (*Curcuma longa*), risultati efficaci contro *Alternaria brassicicola* e *Fusarium oxysporum* patogeni di crucifere (Suwitchayanon e Kunasakdacul 2009), estratti di aglio contro diversi funghi associati al seme di cetriolo (Ruhul Amin et al., 2009) e molti altri, tra cui l'olio di timo (Tinivella et al., 2005). Sono tuttavia necessari ulteriori studi per meglio comprendere quali singole sostanze attive o loro combinazioni siano più efficaci verso le singole specie patogene (Christian e Goggi, 2008). Tra le sostanze di origine animale di potenziale applicabilità citiamo il latte e il suo siero.

5. STUDIO DI CASI

5.1. *Tilletia indica*, agente della Carie parziale di frumento e triticale

5.1.1. Il patogeno, la malattia, i danni

T. indica, agente della Carie parziale (o Carbone parziale) del frumento, fu osservata per la prima volta nel 1930 in India (Hariana) nella Stazione Botanica di Karnal (Mitra, 1931), da cui la denominazione inglese di *Karnal bunt* dato alla malattia. In Asia, è presente in diversi stati del nord dell'India, in Afghanistan, Iraq, Nepal, Pakistan (Warham, 1986) e Iran (Torabi et al., 1996). Nel 1972 fu osservata nello stato messicano di Sonora (Durán, 1972), nel 1966 fu rinvenuta in un campione di semente negli Stati Uniti d'America (Ykema et al., 1996) in Arizona, e successivamente cariossidi sintomatiche furono reperite in alcune aree della stessa Arizona, della California e del Texas (Rush et al., 2005). Risulta segnalata anche in Brasile (*Rio Grande do Sul*) dove ne è stata tentata l'eradicazione (Da Luz et al., 1993), ma non sembrano disponibili notizie recenti in merito ai risultati ottenuti (Sansford et al., 2007). Successivamente è stata segnalata anche in Sud Africa nella Provincia di *Northern Cape* (Crous et al., 2001) e in aree limitrofe (Naudé, 2002). Gli ospiti "naturali" sono: grano tenero (*Triticum aestivum*), grano duro (*Triticum durum*) e triticale (\times *Triticosecale*); la gamma di ospiti, in condizioni di infezione artificiale, si estende ad alcune altre specie di Poaceae.

T. indica non causa infezioni sistemiche. La malattia può riguardare solo alcune spighe della stessa pianta e solo alcune cariossidi della stessa infiorescenza (Rattan e Aujla, 1991; Cunfer et al., 1997; Fuentes-Dávila, 1997). Queste possono essere colpite con diversa severità e su di esse si formano sori pieni di teleutospore e di cellule sterili del fungo: si va da uno o pochi

sori puntiformi (localizzati maggiormente nel solco ventrale, in prossimità del polo embrionale) sino, seppur raramente, alla completa trasformazione dell'intera cariosside in soro. I sintomi della malattia, anche a causa dell'incidenza comunemente poco elevata, dell'aggregazione delle piante infette in campo e della distribuzione irregolare delle cariossidi infette nella spiga, sono difficilmente osservabili in campo e le cariossidi malate vengono per lo più individuate con gli esami condotti dopo la trebbiatura (Forster e Goates, 1997).

Generalmente, almeno quando le buone pratiche colturali siano applicate e non venga riutilizzato il seme prodotto in aree affette da Carbone parziale, l'incidenza della malattia, e conseguentemente le perdite di raccolto, sono molto basse, mediamente meno dell'1%, anche se variabili da località a località e da anno ad anno, con perdite occasionalmente elevate (Murray e Brennan, 1998; Rush et al., 2005). Tuttavia, le partite di granella con infezione superiore al 3% sono inadatte al consumo umano, e quelle con oltre il 10% anche all'uso mangimistico, a causa del colore scuro e dell'odore sgradevole (trimetilammina) impartito dal patogeno ai prodotti (farina, pasta, ecc.). Secondo i risultati sperimentali di Peña et al. (1992) il lavaggio prima della molitura permette di ottenere farine e pane con caratteristiche organolettiche accettabili anche da partite con infezione sino al 6%, ma il procedimento implica complicazioni del ciclo produttivo con incremento dei costi. Per le aree colpite da *T. indica*, al danno diretto si aggiunge quello derivante dalle barriere all'esportazione di sementi e derrate contaminate, in seguito alle misure di quarantena messe in atto da numerosi paesi importatori.

5.1.2. Aspetti epidemiologici

Le teleutospore di *T. indica* sono soggette a un periodo di dormienza variabile prima di poter germinare. Esse sono molto resistenti alle condizioni avverse e possono sopravvivere nel terreno per diversi anni (Chib et al., 1990; Smiley, 1997). La loro distribuzione nel suolo dei campi infestati può variare da livelli di notevole aggregazione spaziale sino a distribuzioni casuali (Allen et al., 2008). Studi condotti nell'ambito del progetto *Risks associated with Tilletia indica, the newly-listed EU quarantine pathogen, the cause of Karnal bunt of wheat* (V Progetto Quadro CE) in Gran Bretagna, Italia e Norvegia, hanno dimostrato che il patogeno può sopravvivere per almeno tre anni a profondità di 5-20 cm nel suolo (Inman et al., 2008). Le teleutospore vitali

che si vengano a trovare alla superficie del suolo o a profondità di alcuni millimetri, germinano producendo un promicelio, all'apice del quale si formano numerosi sporidi primari (basidiospore), anche più di cento (Mitra, 1931; Warham, 1986). Questi germinano producendo sporidi secondari, i quali a loro volta producono altri sporidi. L'evento può ripetersi più volte. Se gli sporidi secondari raggiungono un ospite suscettibile nelle fasi fenologiche adatte all'infezione, e le condizioni ambientali sono favorevoli a questa e al successivo evolversi della malattia, le infiorescenze vengono infettate dando luogo a cariossidi cariate. Goates e Jackson (2006) hanno riscontrato che, a differenza di quanto considerato precedentemente, il periodo di suscettibilità in normali condizioni di campo si estende a oltre un mese, dalla fase di inizio spigatura sino a maturazione cerosa soffice, mentre il periodo di maggior rischio per una singola spiga è di circa 12 giorni (dall'emergenza al completamento dell'antesi).

L'alta umidità relativa o le piogge durante le fasi critiche dell'ospite costituiscono un fondamentale requisito ambientale per la comparsa della malattia (Auja et al., 1977; Singh e Prasad, 1978; Warham e Flores, 1988). Le temperature ottimali per la germinazione delle teleutospore sono di 20-25 °C. La malattia si diffonde principalmente con le cariossidi infette, ma l'inoculo può conservarsi anche nel terreno e diffondersi nell'aria mediante teleutospore o sporidi. Teleutospore (di cui il 50% era vitale) sono state reperite sino a 3000 m di altitudine su campi infetti ove era in corso la bruciatura delle stoppie (Bonde et al., 1987).

Non sono disponibili informazioni sulla concentrazione di teleutospore nel suolo o di sporidi nell'aria o sulle piante necessari perché abbia luogo la malattia in campo. Secondo Rush et al. (2005), la correlazione tra la densità d'inoculo e l'incidenza del Carbone parziale non è ancora sufficientemente conosciuta e i tentativi condotti in Arizona per definire l'eventuale soglia minima di teleutospore necessaria perché avvenga l'infezione non hanno avuto successo.

I risultati degli studi sulla capacità potenziale di *T. indica* di stabilirsi nell'UE, condotti nell'ambito del menzionato progetto europeo combinando la modellistica epidemiologica del patogeno e i modelli fenologici dell'ospite, hanno mostrato che nell'UE il rischio di infezione è sostanziale sia per il grano duro sia per il grano tenero e che le scelte colturali, quali la data di semina o la classe di maturazione delle cultivar, lo influenzano poco. L'analisi dei dati meteorologici storici nei diversi anni ha mostrato che in Europa ci sono sempre stati anni/località favorevoli all'infezione e al decorso della malattia (Sansford et al., 2006).

5.1.3. Identificazione di *T. indica*

Le specie di *Tilletia* sono circa 140 e la loro classificazione, nata su base morfologica e di ospite, con l'ausilio delle nuove conoscenze biomolecolari ha recentemente risolto alcuni problemi controversi di attribuzione generica e chiarito rapporti evolutivi, aprendo interessanti prospettive per la classificazione naturale di questi funghi. I recenti studi filogenetici sulle specie di *Tilletia* e sui generi affini, parassiti della famiglia delle Poacee, portano a distinguere un gruppo ben definito, che comprende solo parassiti della sub famiglia delle Pooideae, e un raggruppamento, assai eterogeneo, che include parassiti delle Panicoideae, Chloridoideae, Arundinoideae ed Ehrhartoideae. Nel primo troviamo quasi tutte le specie di *Tilletia* con teleutospore reticolate, quali *T. caries* e *T. laevis*, che producono un piccolo numero di basidiospore le quali, germinando, vanno incontro a coniugazione, ma anche, seppure in un distinto sottogruppo, *T. indica* e *T. walkeri* (patogeno di *Lolium multiflorum* e *Lolium perenne*) con teleutospore tubercolate e produzione di basidiospore numerose e non coniugantesi. Il secondo raggruppamento comprende *T. horrida*, patogeno del riso, *T. barclayana*, patogeno di specie di *Paspalum* e *Panicum*, e *T. ehrhartae*, patogeno di *Ehrharta calicina* (Castlebury et al., 2005).

Su un campione di cariossidi di frumento possono essere presenti più specie di *Tilletia* patogene di questo ospite. Altre possono accidentalmente contaminare il raccolto se presenti su erbe infestanti del frumento stesso, su precedenti colturali, o anche su altre derrate, quali il riso, che possono precederlo o accompagnarlo nelle stive delle navi o in altri mezzi di trasporto. Anche se le diverse specie sono identificabili sulla base di caratteri morfologici distintivi (dimensioni, tipo di ornamentazione dell'episporio, colore ecc.), l'identificazione può dar luogo a perplessità anche da parte degli analisti più esperti, particolarmente quando, nei campioni da esaminare, sia presente una quantità molto limitata di teleutospore. Le teleutospore di *T. indica* sono di colore marrone scuro e di aspetto verrucoso, globose o subglobose, diametro 25-43 (media 34,6) μm (Waller e Mordue, 1983). Se le dimensioni minori e la struttura reticolata delle teleutospore di *T. caries*, *T. laevis* e altre rendono impossibile qualsiasi confusione con quelle di *T. indica*, lo stesso non si può dire per *T. walkeri*, *T. horrida*, *T. barclayana* e *T. ehrhartae* morfologicamente più simili a *T. indica*. *T. walkerii* e *T. ehrhartae* sono state rinvenute su campioni di frumento in Australia; *T. walkerii* e *T. horrida* sono state osservate negli USA e in Asia, in caso di successione del frumento, rispettivamente, con loglio o riso (Castlebury e Carris, 1999; Carris et al., 2006; Wright et al., 2003; Pascoe et al., 2005).

I metodi adottati nei laboratori ufficiali per reperire teleutospore di *T. indica* tengono conto delle menzionate difficoltà, nonché della necessità di disporre di strumenti affidabili e rapidi, adatti a laboratori di analisi delle sementi che operano ai fini di certificazione o quarantena.

Un metodo oggi largamente usato è stato messo a punto da Peterson et al. (2000): esso si avvale di membrane con pori di dimensioni selettive nei confronti di *T. indica*. In particolare, la sospensione ottenuta lavando il campione di cariossidi in esame viene filtrato attraverso una membrana di nylon con pori di 53 µm, che separa molte impurità ma lascia passare le teleutospore; queste vengono raccolte e concentrate su un'altra membrana con pori di 20-µm. Il materiale raccolto sulla membrana a maglie più fitte viene trasferito su vetrino e osservato al microscopio composto per l'identificazione morfologica, o piastrato su agar acqua per ottenere la germinazione delle teleutospore e poterle identificare mediante PCR, utilizzando due primer specifici per *T. indica*. Il metodo, in presenza di 5 teleutospore di *T. indica* su 50 g di cariossidi, è risultato affidabile al 100% sia con l'osservazione al microscopio sia con il ricorso alla PCR. Il metodo di Peterson et al. è applicato anche nel corrente standard OEPP/EPPO per *T. indica* (EPPO, 2007), che integra le osservazioni morfologiche con l'uso di strumenti molecolari attualmente disponibili (Pimentel et al., 1998; Frederich et al., 2000).

I diversi metodi biomolecolari per l'identificazione di *T. indica* richiedono che le teleutospore siano fatte germinare. Ciò richiede tempo, talvolta oltre ogni ragionevole limite pratico. Per ovviare a questi inconvenienti, Tan et al. (2009) hanno sviluppato un metodo molecolare, specifico e sensibile, che non richiede la germinazione. Il protocollo prevede la liberazione del DNA dalle teleutospore, la sua amplificazione (Tan e Murray, 2006) e un saggio multiplex (5-plex) capace di identificare e distinguere, in un campione di cariossidi di frumento, *T. indica* da altre singole specie (*T. walkeri*, *T. ehrhartae*, *T. horrida*, e da un gruppo comprendente *T. caries*, *T. laevis*, *T. controversa*, *T. bromi* e *T. fusca*). I diversi prodotti dell'amplificazione sono individuati simultaneamente mediante 5 diversi spettri fluorescenti. Il saggio è ancora in fase di validazione, ma appare promettente per la sua capacità di affrontare e potenzialmente risolvere le principali esigenze analitiche nel settore della certificazione, dei survey fitopatologici e della quarantena, permettendo di individuare *T. indica* anche in presenza di una singola teleutospora sospetta. Il metodo è in validazione anche in Italia (Bragaloni e Riccioni, 2010).

Nel tentativo di semplificare le procedure di analisi, particolarmente per il monitoraggio della presenza della Carie parziale negli Stati produttori di frumento degli USA, sono stati sviluppati anche metodi di individuazione basati

sul reperimento di cariossidi sintomatiche (*bunted kernel standard*) anziché sulla ricerca delle teleutospore. Ricordiamo qui due metodi di laboratorio impiegati su campioni di cariossidi al momento del raccolto (USDA APHIS, 2007). Il primo è in uso nel Texas e si avvale di un separatore ottico ad alta velocità (Dowell et al., 2002) che, opportunamente tarato, è in grado di separare le cariossidi sane da quelle “malate” con una affidabilità variabile, dipendente da diversi fattori (livello e tipo di infezione, caratteristiche varietali ecc.). Il secondo metodo, usato negli altri Stati, è basato sull’ispezione visiva da parte di personale appositamente addestrato, che può avvalersi di una macchina che regola il flusso delle cariossidi e le presenta, sotto una lente, all’analista. Entrambi i metodi sono soggetti a limiti derivanti dal tipo di sintomi presenti (ad esempio, i sori più piccoli possono più facilmente sfuggire), all’interferenza della concomitante presenza di altre malattie fungine del frumento causate da altri patogeni (*Alternaria alternata*, altre specie di *Tilletia*) ecc.

5.1.4. Normativa fitosanitaria

T. indica è oggetto di quarantena in numerosi paesi del mondo. Prima del 1982, solo quattro paesi avevano adottato misure di quarantena verso il patogeno. Il Messico, in seguito alla comparsa del Carbone parziale nelle valli dello Yaqui e del Mayo (Stato di Sonora) nei primi anni ’80, introdusse misure restrittive al movimento interno delle sementi. Successivamente, gli USA introdussero la quarantena, con tolleranza 0, verso tutte le sementi e le granaglie di origine messicana (Rush et al., 2005). Ma le misure si rivelarono insufficienti e il Carbone parziale raggiunse alcune aree di produzione nel sud degli USA. Furono quindi subito adottate misure interne molto rigorose, miranti al contenimento e all’eventuale eradicazione della malattia. In considerazione dell’importanza degli USA come esportatori mondiali di frumento, in breve tempo 37 paesi importatori adottarono misure di quarantena. Le negoziazioni avviate dagli USA in seguito alle conseguenze commerciali subite dal comparto cerealicolo, convinsero la maggior parte degli importatori ad accettare, con dichiarazione aggiuntiva da apporre sui certificati fitosanitari, le granaglie provenienti da zone libere dalla malattia all’interno degli Stati interessati dalla malattia (Arizona, California e Texas), ma anche questo passo richiese lunghe trattative e indusse altri 11 paesi, nei quali non vigeva alcuna misura restrittiva, a richiedere la dichiarazione aggiuntiva.

T. indica è inserita nell’elenco A1 dell’OEPP/EPPO. Per quanto concerne

l'UE, il fungo è menzionato nella Direttiva 2000/29/EC nei seguenti allegati: Allegato I, Parte A, Sezione I e Allegato IV Parte A Sezione I.

Nella fattispecie, per le *sementi* dei generi *Triticum*, *Secale* e \times *Triticosecale* originarie dell'Afghanistan, dell'India, dell'Iraq, del Messico, del Nepal, del Pakistan e degli USA, dove è nota la presenza di *T. indica*, è richiesta la constatazione ufficiale che le sementi siano originarie di una zona notoriamente indenne dal patogeno. Per la *granella* delle medesime specie botaniche e per gli stessi stati d'origine, è richiesta la constatazione ufficiale che la granella sia originaria di una zona notoriamente indenne da *T. indica*, oppure, che nessun sintomo di *T. indica* sia stato osservato sui vegetali nel luogo di produzione durante l'ultimo ciclo vegetativo completo e che campioni rappresentativi di granella siano stati prelevati al momento della raccolta e prima della spedizione e trovati esenti dal patogeno.

Tra gli SM, l'Italia, con la sua fiorente produzione di pasta, è il principale importatore di frumento duro e, in particolare, di DesertDurum^{*}, marca brevettata riservata al grano duro prodotto in aree irrigue dell'Arizona e della California, particolarmente apprezzato dall'industria per vari aspetti, tra i quali l'alta resa in semolino e la precoce disponibilità sul mercato (maggio-giugno). Considerata la presenza di *T. indica* in alcune aree di questi Stati, appare evidente il coinvolgimento diretto del nostro Paese in tutte le problematiche internazionali del *Karnal bunt*.

Il commercio mondiale del grano riguarda oltre 100 milioni di tonnellate per anno, e la questione delle restrizioni fitosanitarie all'importazione di frumento anima un dibattito molto vivo e aperto a diverse possibili evoluzioni. A livello scientifico non mancano gli studi che concludono a favore dell'attenuazione delle misure di quarantena. Citiamo il PRA sviluppato in India (Nagarajan, 2001), l'articolo sulla modellistica delle popolazioni del fungo (Garrett e Bowden, 2002) e i recenti contributi al dibattito di Babadoost (2000) e Jones (2007a, 2007b, 2009). A questa visione si oppongono i risultati ottenuti dal citato progetto UE, il PRA basato su di essi (Sansford et al., 2006; Sansford et al., 2008) e altri risultati scientifici (Murray e Sansford, 2005). Inoltre, un recentissimo studio, condotto con il modello previsionale MaxEnt, indica che zone cerealicole della Cina presentano un rischio alto o moderato di *Karnal bunt* e raccomanda misure di quarantena per il paese (Zhilong et al., 2010). Sul piano diplomatico, l'USDA-APHIS ha recentemente sottoposto all'attenzione della Commissione Europea (CE) un'analisi quantitativa sul rischio rappresentato all'importazione di granaglie USA

nell'UE e di *desert durum* in Italia, finalizzato a ottenere, sulla base del basso rischio risultante dal documento, l'attenuazione delle misure fitosanitarie in atto nell'UE. In particolare, il documento propone di limitare le analisi sui campioni di granella alla ricerca di cariossidi sintomatiche (applicando il cosiddetto *bunted kernel standard*) anziché di teleutospore e di campionare e saggiare le partite solo al momento del raccolto (eliminando quindi la seconda verifica prevista oggi al momento dell'imbarco). Il PLH dell'EFSA, richiesto dalla stessa CE, ha valutato il documento e ha pubblicato un'opinione scientifica in merito (EFSA, 2010b). In essa si conclude che le misure proposte dagli USA in alternativa a quelle dell'UE non offrono un livello di protezione comparabile a quello offerto dalla normativa in vigore. È verosimile che il dibattito tra le parti continuerà, con conseguenze pratiche oggi non prevedibili. Tuttavia, occorre qui ricordare che c'è un generale consenso, sia tra i paesi produttori che tra quelli esportatori, sulla necessità di mantenere comunque misure rigorose per le sementi, alle quali gli stessi USA applicano norme più restrittive, inclusa l'assenza di teleutospore nei campioni.

5.2. *Fusariosi della spiga dei cereali o Fusarium head blight*

5.2.1. Gli agenti causali, la malattia, i danni

Il *Fusarium head blight* (FHB), o Fusariosi della spiga, è una tra le più importanti malattie trasmesse per seme che colpisce i cereali. Si tratta di una malattia complessa, a diffusione mondiale, che può essere causata da numerosi patogeni appartenenti a diverse specie fungine (Liddell, 2003). Tra queste compaiono *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Microdochium nivale*, *Microdochium majus*, *Fusarium avenaceum* e *Fusarium poae* e altre specie di *Fusarium* tra cui *Fusarium equiseti*, *Fusarium tricinctum* e *Fusarium sporotrichioides* (Parry et al., 1995), per citarne alcune, con *F. graminearum* e *F. culmorum* riconosciute come le due specie predominanti associate alla malattia.

La distribuzione e la predominanza di un patogeno rispetto agli altri è fortemente determinata da fattori climatici. In generale, in Europa e in Italia la fusariosi della spiga è causata principalmente da *F. graminearum* a cui si trovano associate altre specie di *Fusarium* quali *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae* e in minor misura *F. acuminatum*, *F. crookwellense*, *F. equiseti*, *F. langsethiae*, *F. sporotrichioides* e *F. tricinctum* (Moretti et al., 2010). In Europa centrale e sudorientale predomina *F. graminearum* anche se, in anni recenti, *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *F. poae* sono stati registrati in graduale crescita (Bottalico e Per-

rone, 2002). Nelle aree marittime, più fredde, dell'Europa nord-occidentale le specie comunemente associate al FHB sono *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *Microdochium* spp. anche se, recentemente, *F. poae* è diventata, a spese di *F. culmorum*, più prevalente (Xu et al., 2005), così come *F. avenaceum*, insieme a *F. poae*, prevale al centro e al nord dell'Europa (Kosiak et al., 2004; Yli-Mattila et al., 2004). La prevalenza di *F. poae* è sorprendente, se si pensa che questa specie è considerata meno patogena e aggressiva delle altre coinvolte nel FHB (Brennan et al., 2003; Xu et al., 2007). Nelle regioni europee caratterizzate da un'estate più fredda, *F. graminearum* sembra aver recentemente incrementato la sua diffusione, probabilmente come risultato dell'aumento della produzione di mais in rotazione al frumento in Europa (Xu et al., 2008; Logrieco et al., 2002). In alternativa, questa specie si potrebbe essere adattata a climi più freddi oppure i cambiamenti climatici potrebbero aver portato alcune regioni a raggiungere un clima più temperato. *F. graminearum* sensu strictu (la specie dominante del *Fusarium graminearum* complex - FGC) è associata al FHB in Nord America mentre *F. asiaticum* (incluso nel FGC) è predominante nelle regioni del Sud e ha la maggior distribuzione in Asia (Suga et al., 2008; O'Donnell et al., 2004).

I sintomi iniziali del FHB compaiono sotto forma di macchie marrone chiaro sulle glume. Le lesioni aumentano di dimensione fino a quando ricoprono l'intera spiga e, in funzione delle condizioni ambientali, si diffondono alle spighe adiacenti. Le piante infette vanno incontro a prematura senescenza e le spighe assumono la tipica colorazione della maturità, in contrasto con il colore verde delle rimanenti piante. In alcuni casi, l'infezione del rachide causa appassimento o morte dell'intera spiga situata al di sopra del punto di infezione. La produzione di sporodochi alla base delle glume infette porta alla comparsa di una colorazione rosa su numerose spighe, così come la granella derivante dalle spighe affette da FHB può assumere una colorazione rosa in associazione con la crescita fungina (Xu e Nicholson, 2009).

L'insieme dei danni causati dalla malattia è piuttosto complesso e include: riduzione della produzione causata da una diminuzione del numero di cariossidi o da un decremento del peso unitario; diminuzione delle caratteristiche qualitative della granella a seguito di alterazioni del contenuto di lipidi, amido e proteine (Nightingale et al., 1999); diminuzione della germinabilità e del vigore germinativo dei semi che possono, inoltre, essere fonte di inoculo della malattia nelle colture successive (Winson et al., 2001); contaminazione, in determinate condizioni ambientali, della granella da parte di micotossine (Bottalico e Perrone, 2002) che la rendono non più utilizzabile nell'alimentazione umana e animale.

Le specie di *Fusarium* associate al FHB sono note per la capacità di produrre micotossine, tra cui i tricoteceni, potenti inibitori della sintesi proteica. I più comuni tricoteceni ritrovati nel frumento sono il deossinivalenolo (DON) che può essere presente, a seconda del chemiotipo produttore, anche nelle sue forme acetilate 3-acetil DON (3ADON) e 15-acetil DON (15ADON) e il nivalenolo (NIV). *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. langsethiae* sono noti produttori di tricoteceni, mentre le specie *F. avenaceum* e *F. tricinctum* sono note per la produzione di altre micotossine, moniliformina, beauvericina e enniantine, meno tossiche rispetto ai tricoteceni. Poiché non solo tra le diverse specie di *Fusarium*, ma anche all'interno della stessa specie si può assistere a una variazione della capacità tossigenica, è intuitiva l'importanza di individuare con la massima precisione gli organismi coinvolti nel FHB (Dejardins, 2006).

La normativa che riguarda la presenza di micotossine nel frumento attualmente in vigore è rappresentata dal regolamento Ce 1881/2006 (CE, 2006a), e relativa modifica Reg. Ce 1126/2007 (CE, 2007), in cui sono indicati i tenori massimi di alcune micotossine nelle derrate destinate all'alimentazione umana e animale, con particolare riferimento al DON e NIV. Per quanto riguarda la granella destinata all'alimentazione umana, ad esempio, i limiti massimi ammessi di DON nel frumento tenero non trasformato sono fissati a 1250 ppb mentre nel frumento duro il limite è innalzato a 1750 ppb. Per garantire un'efficiente tutela della salute pubblica, i prodotti il cui contenuto di contaminanti superi il tenore massimo non devono essere commercializzati come tali né dopo miscelazione con altri prodotti alimentari, né essere impiegati come ingredienti di altri alimenti. Nella Raccomandazione Ce del 17/08/2006 (CE, 2006b) la Comunità Europea ha stabilito i principi relativi alla prevenzione e riduzione della contaminazione da *Fusarium*-micotossine nei cereali indicando alcune misure per gli operatori del settore al fine di evitare o ridurre quanto più possibile la contaminazione.

5.2.2. Aspetti epidemiologici

La principale fonte d'inoculo iniziale della malattia, per gli ambienti dove non si sono ancora registrati attacchi, è rappresentata dai semi infetti (Gilbert et al., 2003). Più in generale, l'inoculo iniziale della malattia si origina dai residui colturali presenti nel terreno dove sopravvive, in funzione della specie, sia come micelio saprotrofo che sotto forma di clamidospore con cui infetta le giovani plantule. Successivamente, durante l'antesi e il primo periodo di

sviluppo dei semi, i conidi o le ascospore sono in grado di infettare le spighe portando allo sviluppo del FHB.

La maggior parte delle specie di *Fusarium* associate al FHB si diffonde attraverso conidi che vengono dispersi nell'aria o possono raggiungere i nuovi siti di infezione intrappolati in gocce d'acqua (Paul et al., 2004). *F. graminearum* ha un vantaggio epidemiologico poiché è in grado di differenziare periteci e, quindi, produrre anche ascospore.

La produzione di conidi e ascospore è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali quali temperatura e umidità. Ad esempio, temperature inferiori a 3 °C sembrano inibire la formazione dei periteci in *F. graminearum*, mentre la produzione di ascospore è favorita da elevati valori di umidità (Trail e Common, 2000).

Esistono alcune differenze nelle richieste ambientali, in termini di temperatura e umidità, per la germinazione e l'infezione sia tra che all'interno della stessa specie. Alcuni studi, *in vitro*, hanno mostrato che isolati appartenenti alla stessa specie, originari di varie regioni dell'Europa, tendono ad avere un optimum di temperatura che riflette le condizioni climatiche della zona di origine (Brennan et al., 2003). Su spighe isolate, quelle inoculate con *F. avenaceum* e *F. graminearum* mostrano la più alta incidenza di infezione a una temperatura ottimale approssimativamente di 28-29 °C (Rossi et al., 2001). In contrasto, le spighe inoculate con *M. nivale* e *F. culmorum* hanno una incidenza di infezione inferiore, con un optimum di temperatura di 18 °C e 26,5 °C. In condizione di inoculazioni controllate su frumento, *F. culmorum* e *F. graminearum* generalmente mostrano una maggior incidenza di infezione rispetto a *M. nivale*, *F. poae* e *F. avenaceum* (Xu et al., 2007).

Numerosi modelli previsionali del FHB sono stati sviluppati sulla base di osservazioni empiriche, al fine di correlare le condizioni ambientali con lo sviluppo della malattia. Recentemente, alcuni risultati hanno indicato che l'intensità della Fusariosi della spiga nelle diverse regioni dipende dalle condizioni ambientali che si verificano in brevi periodi critici per lo sviluppo epidemiologico (Kriss et al., 2010).

I processi di infezione e colonizzazione delle spighe di frumento sono essenzialmente gli stessi per *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* e *M. nivale* (Kang e Buchenauer, 2003; Kang et al., 2005 e 2008). I macroconidi germinano dopo 6-12 ore su tutte le superficie della pianta ospite con cui vengono a contatto. I tubetti germinativi non infettano immediatamente i tessuti ospiti ma sviluppano ife che crescono e si ramificano sulla superficie. Una fitta rete di micelio si forma, 24-36 ore dopo solitamente sulla superficie interna delle glume, lemma e palea e sull'ovario, mentre la crescita sulla

superficie esterna è scarsa. La penetrazione all'interno dell'ospite si verifica attraverso la superficie interna di lemma, glume e palea e sulla parte superiore dell'ovario. Il patogeno si diffonde verso il basso nella rachilla e fino al nodo del rachide attraverso una crescita inter- e intra-cellulare. Dal nodo del rachide le ife si estendono attraverso i fasci vascolari e il tessuto parenchimatico corticale.

Durante la colonizzazione delle spighe di frumento si possono osservare marcate alterazioni nel tessuto dell'ospite che includono degenerazione del citoplasma e degli organelli cellulari e disintegrazione delle cellule. La degradazione della cellulosa, degli xilani e della pectina delle cellule vegetali suggerisce che i patogeni coinvolti nel FHB possono rilasciare enzimi in grado di degradare la parete cellulare dell'ospite (Xu e Nicholson, 2009).

5.2.3. Identificazione

Sebbene le specie coinvolte nel FHB mostrino alcuni aspetti comuni, quali i sintomi e il ciclo biologico, queste differiscono sulla base delle caratteristiche morfologiche, dell'epidemiologia, delle esigenze ecologiche e della capacità di causare danni e, quindi, possono rispondere in maniera differente ai metodi di lotta.

Negli ultimi decenni dello scorso secolo la determinazione morfologica e la quantificazione attraverso i metodi in piastra su substrati agarizzati era l'unica tecnica a disposizione per l'identificazione e la quantificazione dei patogeni, in generale, e di quelli associati alla Fusariosi della spiga, in particolare. Questi metodi erano non solo elaborati e necessitavano di periodi di tempo abbastanza lunghi, ma le analisi dovevano essere svolte da personale altamente qualificato, in grado di discriminare tra isolati appartenenti a specie morfologicamente molto simili e non sempre i risultati ottenuti riflettevano la reale situazione biologica (Xu e Nicholson, 2009).

Colture di *F. graminearum* possono essere facilmente confuse con *Fusarium pseudograminearum*, *F. crookwellense* e *F. culmorum* e con alcune specie incluse nella Sezione *Sporotrichiella*, come *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium tricinctum*, *F. poae* e *Fusarium chlamydosporum*. Le differenze nella morfologia dei macroconidi consentono la distinzione di *F. graminearum* da *F. culmorum* e *F. crookwellense*. L'assenza di microconidi permette di distinguere gli isolati di *F. graminearum* dagli isolati appartenenti alla Sezione *Sporotrichiella* che, su mezzo agarizzato (PDA), sono simili a quelle di *F. graminearum* (Leslie e Summerell, 2006).

Particolarmente complessa, soprattutto ai fini della identificazione degli isolati, risulta essere la tassonomia di *F. graminearum* [teleomorfo *Giberella zeae* (Schwein) Petch.]. Analisi filogenetiche molecolari, condotte su isolati provenienti da diverse aree geografiche, hanno portato a definire *F. graminearum* sensu lato come un complesso di specie (FGC) formato almeno da 11 specie filogenetiche (O'Donnell et al., 2004). Il lavoro di Starkey et al. (2007) ha permesso di arrivare a 13 specie biogeograficamente strutturate e filogeneticamente distinte all'interno del FGC, mentre, nel 2009, Yi-Mattila et al., hanno descritto una nuova specie all'interno del FGC associata al FHB in Russia. Tuttavia, secondo Leslie e Summerell (2006), sarebbe più opportuno parlare ancora di una singola specie biologica utilizzando *F. graminearum* per tutti le linee familiari o lineaggi (clade) associati con questo gruppo di funghi e riferendosi a questi come sottospecie.

Considerando le appena descritte limitazioni significative del riconoscimento morfologico a livello di specie all'interno di *Fusarium* in generale, e del FGC in particolare (O'Donnell et al., 2008), appare sempre più importante l'impiego di tecniche molecolari che permettano l'identificazione degli agenti causali del FHB e la discriminazione dei diversi lineaggi all'interno del FGC e dei diversi chemiotipi. Sono attualmente a disposizione numerosi metodi molecolari per l'identificazione e la quantificazione di specie di *Fusarium* (Demeke et al., 2005; Terzi et al., 2007), in particolare attraverso l'impiego della PCR quantitativa. La metodologia denominata TaqMan[®] real-time PCR è utilizzata per la quantificazione di specie di *Fusarium* (Waalwijk et al., 2004; Freudlund et al., 2008; Yli-Mattila et al., 2008). La variante SYBR Green della PCR quantitativa è utilizzata per la quantificazione della biomassa fungina (Burlakoti et al., 2007; Terzi et al., 2007; Nicolaisen et al., 2009) ed è stata dimostrata una correlazione positiva tra biomassa stimata attraverso l'impiego della real-time PCR e il contenuto di DON. Nel 2010 è stato messo a punto un protocollo mediante l'impiego della TaqMan real time PCR specifico per il clade 7 di *F. graminearum*. Nello stesso lavoro è stato possibile stabilire una correlazione tra biomassa totale e contenuto di DON nel frumento e orzo (Demeke et al., 2010). Inoltre, l'impiego della tecnica multiplex-PCR permette di individuare i diversi chemiotipi di *F. graminearum*, *Fusarium asiaticum*, *F. culmorum* e identificare isolati appartenenti alle specie *F. asiaticum* e *F. graminearum* s. str. (Quarta et al., 2006; Suzuki et al., 2010). È evidente come, in una situazione così complessa, ci si debba chiedere cosa sia più opportuno diagnosticare: la specie morfologica *F. graminearum*? Le singole specie molecolari? I singoli chemiotipi? La risposta risiede nei motivi che ci spingono alla diagnosi, commercio internazionale, qualità del seme, sicurezza

alimentare, ma la risposta più ovvia, verso cui ci si sta avviando, è la messa a punto di sistemi diagnostici a elevato multiplexing che ci consentiranno di determinare tutto in un singolo test della durata di poche ore.

RIASSUNTO

Circa il 90% delle colture alimentari del mondo sono riprodotte per seme e numerose malattie causate da funghi e trasmissibili per seme ne possono compromettere la produzione e qualità. Il crescente scambio internazionale di sementi crea preoccupazioni di ordine fitosanitario, che hanno portato all'adozione di norme di quarantena per impedire l'introduzione e la diffusione di patogeni non presenti, o presenti in aree limitate, nei singoli stati. La protezione delle colture dai patogeni trasmessi per seme si basa su due pilastri: la diagnostica e gli interventi di difesa.

Storicamente, la diagnosi di funghi fitopatogeni trasmessi per seme si è basata sul riconoscimento morfologico e sulla manifestazione di sintomi specifici. Con l'avvento della diagnostica molecolare è possibile definire saggi che consentono di individuare più patogeni in un singolo saggio (multiplexing), o di sottoporre ad analisi molti campioni contemporaneamente. Per proteggere una coltura sono disponibili strumenti molto diversi quali le misure di quarantena, le buone pratiche di coltivazione, la resistenza genetica, per finire con l'impiego di strumenti chimici, fisici o biologici.

Infine, particolare attenzione sarà rivolta allo studio di due casi: *Tilletia indica*, agente della carie parziale di frumento e triticale; Fusariosi della spiga di cereali.

ABSTRACT

It is estimated that about 90% of food crops are propagated by seeds and many seed-borne diseases caused by fungi can impair both production and quality. The increasing international seeds import/export generates concerns from a phytopathological point of view. Quarantine regulations have been passed in order to avoid the introduction and spreading of new pathogens, or pathogens present in confined areas, in different Countries. Crop protection rely on two pillars: diagnostics and protection tools. Historically, diagnosis of seed-borne pathogenic fungi is based on morphological identification and on the development of specific symptoms. Molecular diagnostic techniques will allow the detection of more pathogens by a single test (multiplexing) and/or the analysis of more samples at the same time. Protection tools include quarantine, Best Farming Practices, genetic resistance, and chemical, physical or biological treatments. Finally, two case studies will be discussed: *Tilletia indica* karnal bunts and Fusarium head blight of wheat.

BIBLIOGRAFIA

AGARWAL V.K., SINCLAIR J.B. (1997): *Principles of Seed Pathology*, CRC Press, Boca Raton, FL, 539 pp.

- ALLEN T.W., MAPLES H.W., WORKNEH F., STEIN J.M., RUSH, C.M. (2008): *Distribution and recovery of Tilletia indica teliospores from regulated wheat fields in Texas*, «Plant Disease», pp. 344-350.
- AUJLA S.S., SHARMA Y.R., CHAND K., SAWNEY S.S. (1977): *Influence of weather factors on the incidence and epidemiology of Karnal bunt disease of wheat in the Punjab*, «Indian Journal of Ecology», 4, pp. 71-74.
- BABADOOST M. (2000): *Comments on the zero-tolerance quarantine of Karnal bunt of wheat*, «Plant Disease», 84, pp. 711-712.
- BONDE M.R., PRESCOTT J.M., MATSUMOTO T.T., PETERSON G.L. (1987): *Possible dissemination of teliospores of Tilletia indica by the practice of burning wheat stubble*, «Phytopathology», 77, p. 639 (Abstract).
- BOTTALICO A., PERRONE G. (2002): *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe*, «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 611-624.
- BRAGALONI M., RICCIONI L. (2010): *Comparison of molecular diagnostic methods for the identification of the quarantine pathogen Tilletia indica Mitra*, Proceedings of the 13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union (MPU), «Petria», 20, pp. 195-196.
- BRENNAN J.M., FAGAN B., VAN MAANEN A., COOKE B.M., DOOHAN F.M. (2003): *Studies on in vitro growth and pathogenicity of European Fusarium fungi*, «European Journal of Plant Pathology», 109, pp. 577-587.
- BRUNS M. (2009): *The evolution and contribution of plant breeding to global agriculture*, Proceedings of the second world seed conference: *Responding to the challenges of a changing world: The role of new plant varieties and high quality seed in agriculture*, FAO, Rome, September 8-10, 2009, Publication No. 354(E), UPOV, Geneva, pp. 18-29.
- BURLAKOTI R.R., ESTRADA JR.R., RIVERA V.V., BODDEDA A., SECOR G.A., ADHIKARI T.B. (2007): *Real-time PCR quantification and mycotoxin production of Fusarium graminearum in wheat inoculated with isolates collected from potato, sugar beet and wheat*, «Phytopathology», 97, pp. 835-841.
- CARRIS L.M., CASTLEBURY L.A., GOATES B.J. (2006): *Nonsystemic bunt fungi – Tilletia indica and T. horrida: a review of history, systematics, and biology*, «Annual Review of Phytopathology», 44, 113-133.
- CASTLEBURY L.A., CARRIS L.M. (1999): *Tilletia walkerii, a new species on Lolium multiflorum and L. perenne*, «Mycologia», 91, pp. 121-131.
- CASTLEBURY, L.A., CARRIS, L.M., VÁNKY, K. (2005): *Phylogenetic analysis of Tilletia and allied genera in order Tilletiales (Ustilaginomycetes; Exobasidiomycetidae) based on large subunit nuclear rDNA sequences*, «Mycologia», 97, pp. 888-900.
- CE (2000): *Direttiva 2000/29/CE del Consiglio dell'8 maggio 2000 concernente le misure di protezione contro l'introduzione nella Comunità di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e contro la loro diffusione nella Comunità*. «Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee», L 169 del 10.7.2000, pp. 1-112, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32000L0029:IT:HTML>. Testo consolidato con le successive modificazioni: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2000L0029:20090303:IT:PDF>, visitati il 30 ottobre 2010.
- CE (2006a): *Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari*, [registrato col numero 1881/2006].
- CE (2006b): *Raccomandazione della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di*

- deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali, [registrato col numero 2006/576/CE].
- CE (2007): *Decisione della Commissione del 18 giugno 2007 che stabilisce misure d'emergenza provvisorie per impedire l'introduzione e la diffusione nella Comunità di Gibberella circinata Nirenberg & O'Donnell* [(2007/433/EC) notificata con il numero C(2007) 2496].
- CHIB H.S., KALHA C.S., GUPTA B.R., TIKOO M.L., GUPTA R.S. (1990): *Studies on the longevity of Neovossia indica (the incitant of Karnal bunt of wheat) in soil*, «Plant Disease Research», 5(Special), pp. 17-18.
- CHRISTIAN E.J., GOGGI A.S. (2008): *Aromatic plant oils as fungicide for organic corn production*, «Crop Science», 48, pp. 1941-1951.
- CROUS P.W., VAN JAARSVELD A.B., CASTLEBURY L.A., CARRIS L.M., FREDERICK R.D., PRETORIUS Z.A. (2001): *Karnal bunt of wheat newly reported from the African continent*, «Plant Disease», 85, p. 561.
- CUNFER B.M., DOUCE G.K., PADGETT G.B., MILLER A.E. (1997): *Karnal bunt, Tilletia (Neovossia) indica*, The University of Georgia, Cooperative Agricultural Pest Survey Program Publication, GACAPS0297, pp.1-4, <http://www.gainvasives.org/pubs/kb.pdf>, visitato il 30 ottobre 2010.
- DA LUZ W.C., MENDES M.A.S., FERREIRA M.A.S.V., URBEN A.F. (1993): *Tilletia indica em trigo no sul do Rio Grande do Sul e medidas para erradicação*, «Fitopatologia Brasileira», Brasília, DF, 18, p. 329 (Abstract).
- DEJARDINS A.E. (2006): *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology*, American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA, 260 pp.
- DELOGU G., PORTA-PUGLIA A., VANNACCI G. (1989): *Resistance of winter barley varieties subjected to natural inoculum of Pyrenophora graminea*, «Journal of Genetics and Breeding», 43, pp. 61-66.
- DEMEKE T., CLEAR R.M., PATRICK S.K., GABA D. (2005): *Species-specific PCR-based assays for the detection of Fusarium species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis*, «International Journal of Food Microbiology», 103, pp. 271-284.
- DEMEKE T., GRÄFENHAN T., CLEAR R.M., PHAN A., RATNAYAKA I., CHAPADOS J., PATRICK S.K., GABA D., LEVESQUE C.A., SEIFERT K.A. (2010): *Development of a specific TaqMan real-time PCR assay for quantification of Fusarium graminearum clade 7 and comparison of fungal biomass determined by PCR with deoxynivalenol content in wheat and barley*, «International Journal of Food Microbiology», 141, pp. 45-50.
- DIEKMANN M. (1993): *Epidemiology and geophytopathology of selected seed-borne diseases*, ICARDA, Aleppo, Syria, pp. VI + 77.
- DIEKMANN M., PUTTER C.A.J., a cura di (1995): *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm*, No. 14, *Small Grain Temperate Cereals*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 67 pp., [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUid\]=2278](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUid]=2278), visitato il 30 ottobre 2010.
- DOWELL F.E., BORATYNSKI T.N., YKEMA R.E., DOWDY A.K., STATEN R.T. (2002): *Use of optical sorting to detect wheat kernels infected with Tilletia indica*, «Plant Disease», 86, pp. 1011-1013.
- DOYER L.C. (1938): *Manual for the determination of seed-borne diseases*, ISTA, Wageningen, 59 pp., 33 tavole f.t.

- DURAN R. (1972): *Aspects of teliospore germination in North American smut fungi, II*, «Canadian Journal of Botany», 50, pp. 2569-2573.
- EFSA (2010a): *Panel on Plant Health (PLH): Risk assessment of Gibberella circinata for the EU territory and identification and evaluation of risk management options*, «EFSA Journal», 8(6), 1620. [93 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1620, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1620.htm>, visitato il 30 ottobre 2010.
- EFSA (2010b): *Panel on Plant Health (PLH): Scientific opinion on a quantitative pathway analysis of the likelihood of Tilletia indica M. introduction into EU with importation of US wheat*, «EFSA Journal», 8(6):1621. [88 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1621, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/1621.htm>, visitato il 30 ottobre 2010.
- EPPO (2007): *Diagnostic protocols for regulated pests*, PM7/29(2) Tilletia indica, «EPPO Bulletin», 37, pp. 503-520.
- FIRRAO G., GIBB K., STRETEN C. (2005): *Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus Phytoplasma*, «Journal of Plant Pathology», 87, pp. 249-263.
- FORSTER R.L., GOATES B.J. (1997): *Karnal bunt*, University of Idaho, CIS 1067, 6 pp., <http://www.cals.uidaho.edu/edComm/pdf/CIS/CIS1067.pdf>, visitato il 30 ottobre 2010.
- FORSBERG G. (2004): *Control of cereal seed-borne diseases by hot humid air seed treatment*, Doctoral diss. Plant Pathology and Biocontrol Unit, SLU, «Acta Universitatis agriculturae Sueciae Agraria», vol. 443.
- FREDERICK R.D., SNYDER K.E., TOOLEY P.W., BERTHIER-SCHAAD Y., PETERSON G.L., BONDE M.R., SCHAAD N.W., KNORR D.A. (2000): *Identification and differentiation of Tilletia indica and Tilletia walkeri using PCR*, «Phytopathology», 90, pp. 951-960.
- FREUDLUND E., GIDLING A., OLSEN M., BÖRIESSON T., SPLIID N.H.H., SIMMONSSON M. (2008): *Method evaluation of Fusarium DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels*, «Journal of Microbiological Methods», 73, pp. 33-40.
- FRISON, E.A., BOS, L., HAMILTON, R.I., MATHUR, S.B., TAYLOR, J.D., CURATORI (1990): *FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Legume Germplasm*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources, Rome, 88 pp., [http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1\[showUid\]=2177](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioversitypublications_pi1[showUid]=2177), visitato il 30 ottobre 2010.
- FUENTES-DÁVILA G. (1997): *Carbón parcial del trigo: situación actual y perspectivas*. Memorias del primer simposio internacional de trigo, 7-9 de Abril de 1997, Cd. Obregón, Sonora, México, pp. 105-118.
- GARRETT K.A., BOWDEN R.L. (2002): *An Allee effect reduces the invasive potential of Tilletia indica*, «Phytopathology», 92, pp. 1152-1159.
- GARZONIO D.M., MCGEE D.C. (1983): *A comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans*, «Plant Disease», 67, pp. 1374-1376.
- GILBERT J., CONNER R.L., FERNANDEZ M.R., MC LAREN D., WOODS S.M. (2003): *Role of spring wheat seed infested with Fusarium graminearum in spread and development of Fusarium head blight and effects on agronomic performance*, «Canadian Journal of Plant Pathology», 25, pp. 73-81.
- GILLES D. (2001): *Pratiques paysannes et théories savantes préagronomiques au XVIIIe siècle: Le cas des débats sur la transmission des maladies des grains de blé*, «Revue d'histoire des sciences», 54(4), pp. 451-494. doi: 10.3406/rhs.2001.2134; http://www.persee.fr/web/revues/home/prescript/article/rhs_0151-4105_2001_num_54_4_2134, visitato il 30 ottobre 2010.

- GOATES B.J., JACKSON E.W. (2006): *Susceptibility of wheat to Tilletia indica during stages of spike development*, «Phytopathology», 96, pp. 962-966.
- GRAY E.G., NOBLE M. (1965): *Sclerotinia diseases*, «Scottish Agriculture», 44, pp. 265-267.
- HEYDARI A., PESSARAKLI M. (2010): *A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists*, «Journal of Biological Science», 10, pp. 273-290.
- HUTCHINS J.D., REEVES J.C., CURATORI (1997): *Seed health testing, Progress towards the 21st century*, CAB International, Wallingford, 263 pp.
- INMAN A., MAGNUS H.A., RICCIONI L., HUGHES K., COATES M., BARNES A., BARTON V., SANSFORD C., VALVASSORI M., DI GIAMBATTISTA G., PORTA-PUGLIA A., RAZZAGHIAN J., PETERSON G. (2008): *Survival of Tilletia indica teliospores under European soil conditions*, «Plant Pathology», 57, pp. 290-300.
- IPPC (2009): *International standards for phytosanitary measures 1 to 32*. FAO, Rome. <https://www.ippc.int/id/13399>, visitato il 30 ottobre 2010.
- ISTA (2003): *Seed health methods 7-015: Immunoblot method for the detection of Neotyphodium spp. in Festuca and Lolium*, in *International rules for seed testing*, Annex to Chapter 7.
- JAHN M., NEGA E., KROMPHARDT C., FORSBERG G., WERNER S. (2006): *Optimisation of different physical methods for control of seed-borne pathogens in organic vegetable production*, in *Proceedings of the European Joint Organic Congress*, 30 and 31 May 2006 in Odense, Denmark.
- JONES D.R. (2007a): *Arguments for a low risk of establishment of Karnal bunt disease of wheat in Europe*, «European Journal of Plant Pathology», 118, pp. 93-104.
- JONES D.R. (2007b): *A reappraisal of the current status of Tilletia indica as an important quarantine pest for Europe*, «European Journal of Plant Pathology», 118, pp. 105-113.
- JONES D.R. (2009): *Towards a more reasoned assessment of the threat to wheat crops from Tilletia indica, the cause of Karnal bunt disease*, «European Journal of Plant Pathology», 123, pp. 247-259.
- KAISER W. (1987): *Testing and production of healthy plant germplasm*, «Technical Bulletin», No. 2, The Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Copenhagen, 30 pp.
- KAISER W.J., RAMSEY M.D., MAKKOUK K.M., BRETAG T.W., AÇIKGÖZ N., KUMAR J., NUTTER F.W. JR. (2000): *Foliar diseases of cool season food legumes and their control*, in: *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st Century*, a cura di R. Knight, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, the Netherlands, pp. 437-455.
- KANG Z., BUCHENAUER H. (2003): *Immunocytochemical localization of cell wall-bound thionins and hydroxyproline-rich glycoproteins in Fusarium culmorum-infected wheat spikes*, «Journal of Phytopathology», 151, pp. 120-129.
- KANG Z.S., BUCHENAUER H., HUANG L.L., HAN Q.M., ZHANG H.C. (2008): *Cytological and immunocytochemical studies on response of wheat spikes of the resistant Chinese cv. Sumai 3 and the susceptible cv. Xiaoyan 22 to infection by Fusarium graminearum*, «European Journal of Plant Pathology», 120, pp. 383-396.
- KANG Z.S., ZINGEN-SELL I., BUCHENAUER H. (2005): *Infection of wheat spikes by F. avenaceum and alterations of cell wall components in the infected tissue*, «European Journal of Plant Pathology», 111, pp. 19-28.
- KOMADA, H. (1975): *Development of a selective medium for quantitative isolation of Fusarium oxysporum from natural soil*, «Review of Plant Protection», 8, pp. 115-125.

- KOSIAK B., TORP M., SKJERVE E., ANDERSEN B. (2004): *Alternaria and Fusarium in Norwegian grain of reduced quality-a marche pair sample study*, «International Journal of Food Microbiology», 93, pp. 51-62.
- KRISS A.B., PAUL P.A., MADDEN L.V. (2010): *Relationship between yearly fluctuations in Fusarium head blight intensity and environmental variables: a window-pane analysis*, «Phytopathology», 100, pp. 784-797.
- LESLIE, J.F., SUMMERELL B. A. (2006): *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing: Iowa, USA, 388 pp.
- LIDDELL C. (2003): *Systematics of Fusarium head blight with emphasis on North America*, in *Fusarium head blight of wheat and barley*, ed. K. Leonard, W. Bushnell, St. Paul, MN: the American Phytopathological Society, pp. 35-43.
- LOGRIECO A., MULÈ G., MORETTI A., BOTTALICO A. (2002): *Toxigenic Fusarium species and mycotoxin associated with maize ear rot in Europe*, «European Journal of Plant Pathology», 108, pp. 597-609.
- MATHRE D.E., JOHNSTON R.H., GREY W.E. (2001): *Small grain cereal seed treatment*, «The Plant Health Instructor». DOI: 10.1094/PHI-I-2001-1008-01. Updated 2006, <http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/CerealSeedTreatment.aspx>, visitato il 30 ottobre 2010.
- MATHUR S.B., KONGSDAL O. (2003): *Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi*, 1st Edn., International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland CH., 425 pp.
- MEW T.W., GONZALES P. (2002): *A Handbook of Rice Seedborne Fungi*. Los Baños, Laguna, Philippines, IRRI, 82 pp.
- MINUNNI M., TOMBELLI S., MARIOTTI E., MASCINI M., MASCINI M. (2001): *Biosensors as new analytical tool for detection Genetically Modified Organisms (GMOs)*, «Fresenius' Journal of Analytical Chemistry», 369, pp. 589-593.
- MITTAL R.K., MATHUR S.B. (2003): *Pathology*, in *Tropical tree-seed manual*, a cura di A. Vozzo, United State Department of Agriculture, Forest Service, pp. 177-190.
- MITRA M. (1931): *A new bunt on wheat in India*, «Annals of Applied Biology», 18, pp. 178-179.
- MORETTI A., SOMMA S., MULÈ G., MORCIA C., SPINI M., STANCA M.A., TERZI V. (2010): *Biodiversità delle specie di Fusarium tossigeniche coinvolte nella fusariosi delle spiga di frumento duro: patogenicità, genetica, tossicità*, in *Genomica per la valorizzazione di frumento duro e pomodoro*, «I Georgofili. Quaderni», 2009, III, Firenze, 22 pp.
- MUMFORD R., BOONHAM N., TOMLINSON J., BARKER I. (2006): *Advances in molecular phytdiagnostics – new solutions for old problems*, «European Journal of Plant Pathology», 116, pp. 1-19.
- MUNKVOLD G.P. (2009): *Seed Pathology progress in academia and industry*, «Annual Review of Phytopathology», 47, pp. 285-311.
- MURRAY G.M., BRENNAN J.P. (1998): *The risk to Australia from Tilletia indica Mitra, the cause of Karnal Bunt of Wheat*, «Australasian Plant Pathology», 27, pp. 212-225.
- MURRAY G.M., SANSFORD C.E. (2005): *How Tilletia indica overcomes the Allee effect*, in *Proceedings of the 15th Biennial Australasian Plant Pathology Society Conference*, 2005. APPS, p. 256.
- NAGARAJAN S. (2001): *Pest risk analysis for shipping wheat from Karnal bunt (Tilletia indica) infected and disease free destinations*, A report of consultancy project extended to Dr. S. Nagarajan vide F. No. 2(30)/I.C.I. dt. 19.01.2001 of ICAR, New Delhi, 114 pp.
- NAUDÉ K. (2002): *Karnal bunt in South Africa*, Items from South Africa Small Grain

- Institute, «Annual Wheat Newsletter», 49, p. 137.
- NEERGAARD P. (1979): *Seed Pathology*, vol. I e II. MacMillan Press, London and Basingstoke, XXIV+839 pp.
- NEERGAARD P. (1981): *Risk for the EPPO region from seed-borne pathogens*, «EPPO Bulletin», 11, pp. 207-212.
- NEERGAARD P. (1984): *Seed health in relation to the exchange of germplasm*, Seed Management Techniques for Genebanks, Proc. Workshop held at the Royal Bot. Gardens, Kew, 6-9 July 1982, International Board for Plant Genetic Resources: pp. 1-18.
- NICOLAISEN M., SUPRONIENE S., NIELSEN L.K., LAZZARO I., SLIJD N.H., JUSTESEN A.F. (2009): *Real-time PCR for quantification of eleven individual Fusarium species in cereals*, «Journal of Microbiological Methods», 76, pp. 234-240.
- NIGHTINGALE M.J., MARCHYLO J.E., CLEAR R.M., DEXTER J.E., PRESTON K.R. (1999): *Fusarium head blight: effect of fungal proteases on wheat storage proteins*, «Cereal Chemistry», 76, pp. 150-158.
- NKALUBO S., MELIS R., LAING M.D., OPIO F. (2007): *Yield loss associated with anthracnose disease on Ugandan market-class bean cultivars*, African Crop Science Conference Proceedings, Vol. 8, pp. 869-874.
- O'DONNELL K., WARD T.J., ABERRA D., KISTLER H.C., AOKI T., ORWIG N., KIMURA M., BJORNSTAD Å., KENDALL S.S. (2008): *Multilocus genotyping and molecular phylogenetic resolve a novel head blight pathogen within the Fusarium graminearum species complex from Ethiopia*, «Fungal Genetics and Biology», 45, pp. 1514-1522.
- O'DONNELL K., WARD T.J., GEISER D.M., KISTLER H.C., AOKI T. (2004): *Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the Fusarium graminearum clade*, «Fungal Genetics and Biology», 41, pp. 600-623.
- PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L. (1995): *Fusarium head blight (scab) in small grain cereals – a review*, «Plant Pathology», 44, pp. 207-238.
- PASCOE I.G., PRIEST M.J., SHIVAS R.G., CUNNINGTON J.H. (2005): *Ustilospores of Tilletia ehrhartae, a smut of Ehrharta calycina, are common contaminants of Australian wheat grain, and a potential source of confusion with Tilletia indica, the cause of Karnal bunt of wheat*, «Plant Pathology», 54, pp. 161-168.
- PAUL P.A., EL-ALLAF S.M., LIPPS P.E., MADDEN L.V. (2004): *Rain splash dispersal of Gibberella zeae within wheat canopies in Ohio*, «Phytopathology», 97, pp. 1342-1349.
- PEÑA R.J., AMAYA A., DEL TORO E. (1992): *Effect of grain washing and storage of wheat samples (Cultivar Seri M82) with different infection levels of Karnal bunt (Tilletia indica) on quality parameters*, in *Update on Karnal bunt research in Mexico*, G. Fuentes-Davila, Hettel G.P., Curatori, Wheat Special Report No. 7, Mexico, DF, CIMMYT, 21-28.
- PETERSON G. L., BONDE M.R., PHILLIP J.G. (2000): *Size-selective sieving for detecting teliospores of Tilletia indica in wheat seed samples*, «Plant Disease», 84, pp. 999-1007.
- PIMENTEL G., CARRIS L.M., LEVY L., MEYER R. (1998): *Genetic variability among isolates of Tilletia barclayana, T. indica and allied species*, «Mycologia», 90, pp. 1017-1027.
- PORTA-PUGLIA A., BRETAG T.W., BROUWER J.B., HAWARE M.P., KHALIL S.A. (2000): *Direct and indirect influences of morphological variation on disease, yield and quality*, in *Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st Century* a cura di R. Knight, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, the Netherlands, pp. 199-220.
- PORTA-PUGLIA A., DELOGU G., VANNACCI G. (1986): *Pyrenophora graminea on winter barley seed: effect on disease incidence and yield losses*, «Journal of Phytopathology», 117, pp. 26-33.

- PRÉVOST B. (1807): *Mémoire sur la cause immédiate de la carie ou charbon des blés et de plusieurs autres maladies des plantes, et sur les préservatifs de la carie*, Bernard Imprimeur-Libraire, Paris, 80 pp. + 3 tavole f.t.
- QUARTA A., MITA G., HAIDUKOWSKI M., LOGRIECO A., MULÈ G., VISCONTI A. (2006): *Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in Fusarium*, «FEMS Microbiology Letters», 259, pp. 7-12.
- RATTAN G.S., AUJLA S.S. (1991): *Distribution of infection in Karnal bunt infected wheat spike*, «Annals of Biology», 6(2), pp. 179-180.
- RICHARDSON M.J. (1990): *An annotated list of seed-borne diseases*, 4th Edition, ISTA, Zurich, 320 pp.
- ROSSI V., RAVANETTI A., PATTORI E., GIOSUE S. (2001): *Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing Fusarium head blight*, «Journal of Plant Pathology», 83, pp. 198.
- RUHUL AMIN A.B.M., RASHID M.M., MEAH M.B. (2009): *Efficacy of garlic tablet to control seed-borne fungal pathogens of cucumber*, «Journal of Agriculture and Rural Development», 7 (1-2), pp. 135-138, <http://www.banglajol.info/index.php/JARD/article/view/4433/3649>, visitato il 30 ottobre 2010.
- RUSH C.M., STEIN J.M., BOWDEN R.L., RIEMENSCHNEIDER R., BORATYNSKI T., ROYER M.H. (2005): *Status of Karnal bunt of wheat in the United States 1996-2004*, «Plant Disease», 89, pp. 212-223.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., EHRLICH H.A. (1988): *Primer directed enzymic amplification of DNA with a thermostable polymerase*, «Science», 239, pp. 487-491.
- SANSFORD C., BAKER R., BRENNAN J., EWERT F., GIOLI B., INMAN A., KELLY P., KINSELLA A., LETH V., MAGNUS H., MIGLIETTA F., MURRAY G., PETERSON G., PORTA-PUGLIA A., PORTER J., RAFOSS T., RICCIONI L., THORNE F., VALVASSORI M. (2007): *Risks associated with Tilletia indica, the newly-listed EU quarantine pathogen, the cause of Karnal bunt of wheat*. EC Fifth Framework Project QLK5-1999-01554. Summary of Final Project Report, 14 pp., http://lmt.planteforsk.no/pfpntr/karnalpublic/publicsite_summary.pdf, visitato il 30 ottobre 2010.
- SANSFORD C., BAKER R., BRENNAN J., EWERT F., GIOLI B., INMAN A., KELLY P., KINSELLA A., LETH V., MAGNUS H., MIGLIETTA F., MURRAY G., PETERSON G., PORTA-PUGLIA A., PORTER J., RAFOSS T., RICCIONI L., THORNE F., VALVASSORI M. (2006): *Pest Risk Analysis for Tilletia indica for the European Union*, EU Karnal Bunt Risks Project, Deliverable Report 61 and 65. <http://karnalpublic.pestrisk.net/deliverables>, visitato il 30 ottobre 2010.
- SANSFORD C.E., BAKER R.H.A., BRENNAN J.P., EWERT F., GIOLI B., INMAN A., KINSELLA A., MAGNUS H. A., MIGLIETTA F., MURRAY G.M., PORTA-PUGLIA A., PORTER J.R., RAFOSS T., RICCIONI L., THORNE F. (2008): *The new Pest Risk Analysis for Tilletia indica, the cause of Karnal bunt of wheat, continues to support the quarantine status of the pathogen in Europe*, «Plant Pathology», 57, pp. 603-611.
- SINGH A., PRASAD R. (1978): *Date of sowing and meteorological factors in relation to occurrence of Karnal bunt of wheat in U. P. Tarai*, «Indian Journal of Mycology & Plant Pathology», 8, p. 2.
- SMILEY R.W. (1997): *Risk assessment for Karnal bunt occurrence in the Pacific Northwest*, «Plant Disease», 81, pp. 689-692.
- STARKEY D.E., WARD T.J., AOKI T., GALE L.R., KISTLER H.C., GEISER D.M., SUGA H., TÓTH B., VARGA J., O'DONNELL K. (2007): *Global molecular surveillance reveals novel*

- Fusarium head blight species and trichothecene toxin diversity*, «Fungal Genetics and Biology», 44, pp. 1191-1204.
- SUGA H., KARUGIA G.W., WARD T., GALE L.R., TOMIMURA K. ET AL. (2008): Molecular characterization of the *Fusarium graminearum species complex in Japan*, «Phytopathology», 98, pp. 159-166.
- SUWITCHAYANON P., KUNASAKDAKUL K. (2009): *In vitro effects of clove and turmeric extracts controlling crucifer pathogens*, «Journal of Agricultural Technology», 5 (1), pp. 193-199.
- SUZUKI F., KOBAYASHI A., NAKAJIMA T. (2010): *Simultaneous identification of species and trichothecene chemotypes of Fusarium asiaticum and F. graminearum sensu stricto by multiplex PCR*, «Journal of General Plant Pathology», 76, pp. 31-36.
- TAN M.K., GHALAYINI A., SHARMA I., YI J., SHIVAS R., PRIEST M., WRIGHT D. (2009): *A one-tube fluorescent assay for the quarantine detection and identification of Tilletia indica and other grass bunts in wheat*, «Australasian Plant Pathology», 38, pp. 101-109.
- TAN M.K., MURRAY G.M. (2006): *A molecular protocol using quenched FRET probes for the quarantine surveillance of Tilletia indica, the causal agent of Karnal bunt of wheat*, «Mycological Research», 110, pp. 203-210.
- TARGIONI TOZZETTI G. (1767): *Alimurgia*. Riprodotto, con presentazione, annotazioni e biografia dell'Autore a cura di G. Goidanich, in Reale Accademia d'Italia, Studi e documenti, n. 12, Roma (1943), pp. XXIV+161.
- TAYLOR, E.L., TAYLOR T. N., HERMSEN E. J. (2006): *The Mesozoic seed ferns: old paradigms, new discoveries*, «Journal of Torrey Botanical Society» 133, pp. 62-82.
- TERZI V., MORCIA C., FACCIOLI P., FACCHINI N., ROSSI V., CIGOLINI M., CORBELLINI M., SCUDELLARI D., DELOGU G. (2007): *Fusarium DNA traceability along the bread production chain*, «International Journal of Food Science and Technology», 42(12), pp. 1390-1396.
- TINIVELLA U., ACCAINO F., ROSSI G., NICOLICH R. (2005): *Petrophysical analysis of CROP-18 crustal seismic data*, «Bollettino della Società Geologica Italiana», Vol. Spec. 3, pp. 205-211.
- TORABI M., MARDOUKHI V., JALIANI N. (1996): *First report on the occurrence of partial bunt on wheat in the southern parts of Iran*, «Seed and Plant», 12, pp. 59-60.
- TRAIL F., COMMON R. (2000): *Perithecial development by Gibberella zeae: a light microscopy study*, «Mycologia», 92, pp. 130-138.
- USDA APHIS ECONOMIC RESEARCH SERVICE. (2007): *Karnal bunt manual*. http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/domestic/downloads/kb.pdf, visitato il 30 ottobre 2010.
- VANNACCI G. (1988): *Analisi sanitaria delle sementi: aspetti metodologici*, «Quaderno E.N.S.E.» 41, pp. 32.
- VANNACCI G. (2001): *Funghi trasmessi per seme nelle principali specie orticole*, in Atti Convegno Nazionale "Norme fitosanitarie e commercializzazione delle produzioni vivaistiche", Progetto POM A32, pp 1143-1153, Locorotonda (BA) 4-7 dicembre 2001, vol. II.
- VANNACCI G., FIRRAO G. (2008): *Oltre la forma: sistematica molecolare e diagnostica fitopatologica*, «Italian Journal of Agronomy», 1 (suppl.), pp. 63-71.
- VANNACCI G. (2008): *La diagnosi dei funghi patogeni trasmessi per seme: stato dell'arte e prospettive*, «Protezione delle colture», 2, pp. 13-16.
- VANNACCI G., ARAGONA M., FANTI S., PORTA-PUGLIA A. (1996): *Principali aspetti fitopatologici legati al seme*, «L'Informatore Agrario», 52 (32), pp. 57-63.

- VANNACCI G., SARROCCO S., PECCHIA S., VERGARA M. (2009): *Innovazioni nella difesa delle colture con mezzi a basso impatto ambientale: malattie da funghi*, Giornata di Studio dell'Accademia dei Georgofili, «I Georgofili. Quaderni», 2008, VII, Firenze, pp. 1-28.
- WAAIJWIJK C., VAN DER HEIDE R., DE VRIES I., VAN DER LEE T., SCHOEN C., COSTRELEDE CORAINVILLE G., HAUSER-HAHN I., KASTELEIN P., KÖHL, J. ET AL. (2004): *Quantitative detection of Fusarium species in wheat using TaqMan*, «European Journal of Plant Pathology», 110, pp. 481-494.
- WALCOTT R.R., FESSEHATE A., CASTRO A.C. (2004): *Differences in pathogenicity between two genetically distinct groups of Acidovorax avenae subsp. citrulli on cucurbit hos*, «Journal of Phytopathology», 152, pp. 2777-2285.
- WALLER J.M., MORDUE J.E.M. (1983): *Tilletia indica. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* No. 748. CAB International, Wallingford, UK.
- WARHAM E.J. (1986): *Karnal bunt disease of wheat: A literature review*, «Tropical Pest Management», 32, pp. 229-242.
- WARHAM E.J., FLORES D. (1988): *Farmer surveys on the relation of agronomic practices to Karnal bunt disease of wheat in the Yaqui Valley, Mexico*, «Tropical Pest Management», 34, pp. 373-381.
- WINSON S.J., HARE M.C., JENKINSON P. (2001): *The interaction between ear sprays and seed treatment for the control of Fusarium seedling blight in wheat*, in: *Seed treatment – challenges and opportunities*, British Crop Protection Council, Farnham, UK, pp. 251-256.
- WRIGHT D., MURRAY G., TAN M.K. (2003): *National Diagnostic Protocol for the Identification of Tilletia indica, the Cause of Karnal Bunt*. South Perth. WA, Australia: Department of Agriculture, Government of Western Australia.
- XU X.M., MONGER W., RITIENI A., NICHOLSON P. (2007): *Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combination of Fusarium species*, «Plant Pathology», 56, pp. 943-956.
- XU X.M., NICHOLSON P. (2009): *Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight*, «Annual Review of Phytopathology», 83, pp. 83-103.
- XU X.M., PARRY D.W., NICHOLSON P., THOMSETT M.A., SIMPSON D.R. (2005): *Predominance and association of pathogenic fungi causing Fusarium ear blight in wheat in four European countries*, «European Journal of Plant Pathology», 112, pp. 143-154.
- YKEMA R.E., FLOYD J.P., PALM M.E., PETERSON G.L. (1996): *First report of Karnal bunt of wheat in the United States*, «Plant Disease», 80, p. 1207.
- YLI-MATTILA T., GAGKAEVA T., WARD T.J., AOKI T., KISTLER H.C., O'DONNELL K. (2009): *A novel Asian clade within the Fusarium graminearum species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East*, «Mycologia», 101, pp. 841-852.
- YLI-MATTILA T., PAAVANEN-HUHTALA S., JESTOI M., PARIKKA P., HIETANIEMI V., GAGKAEVA T., SARLIN T., HAIKARA A., LAAKSONEN S., RIZZO, A. (2008): *Real-time PCR detection and quantification of Fusarium poae, F. graminearum, F. sporotrichioides and F. langsethiae in cereal grains in Finland and Russia*, «Archives of Phytopathology and Plant Protection», 41, pp. 243-260.
- YI-MATTILA T., PAAVANEM-HUHTALA S., PARIKKA P., KONSTANTINOVA P., GAGKAEVA T.Y. (2004): *Molecular and morphological diversity of Fusarium species in Finland and north-western Russia*, «European J. Plant Pathology», 110, pp. 573-585.

ZHILONG C., YILIN Z., ZUNTIAN Z., XIAYU D. (2010): *Suitability analysis of Karnal bunt in China based on MaxEnt model*, «Plant Protection [Cina]», 36 (3), pp. 110-112 (in cinese, *abstract* in inglese).

Trasmissione dei fitovirus e possibile trasmissibilità dei fitoplasmi attraverso il seme: fatti, fattori e meccanismi

La cosiddetta *trasmissione verticale* dei patogeni delle piante cioè il trasferimento dell'infezione da una pianta alla sua progenie si realizza essenzialmente attraverso il seme e il materiale di propagazione vegetativa. Tra le due, la prima è stata per lungo tempo considerata una conseguenza quasi ovvia del processo infettivo mentre oggi è rivisitata anche come risultato e mezzo di studio di complessi meccanismi biologici che sottendono le modalità attraverso le quali pianta e patogeno interagiscono. In questa nota sono trattate in dettaglio le modalità di trasmissione attraverso il seme dei fitovirus. Viene inoltre puntualizzato brevemente quanto noto finora sulla possibile trasmissione per seme dei fitoplasmi, agenti patogeni oggetto di studio della Virologia vegetale che presentano non poche affinità con i virus nelle interazioni con le piante ospiti e gli insetti vettori.

VIRUS

1. *Da fenomeno poco studiato a paradigma*

Si stima che circa il 20% dei virus che infettano le piante sia trasmesso anche attraverso il seme in almeno una delle specie della propria gamma d'ospiti e che siano non meno di 25 i generi in cui almeno una specie virale utilizzi anche il seme come via di trasmissione. A questo proposito sembra opportuna la

* Dipartimento di Biologia e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

** Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Torino

*** Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Sezione Operativa di Bari

distinzione puntualizzata da Jones (2000) fra virus trasportati dal seme (*seed-borne*, secondo gli autori anglosassoni) che non necessariamente producono infezione, anche se localizzati nell'embrione, e virus trasmessi attraverso il seme (*seed-transmitted*) che realmente infettano la pianta. In questa nota ci si limiterà ad affrontare gli aspetti principali della *seed-transmission*.

Originariamente considerata come conseguenza, quasi scontata, del processo infettivo virale (vedasi in Bennet, 1969), questa modalità di trasmissione è stata di recente rivisitata sotto un'ottica diversa e utilizzata come modello di studio delle interazioni virus-ospite. La trasmissibilità o meno attraverso il seme era, infatti, annoverata fra le "caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche" dei fitovirus che si reputava necessario determinare mano a mano che si procedeva con la descrizione delle varie specie virali: un argomento che ha rappresentato il *focus* degli studi di Virologia vegetale degli anni 60 e dei primi anni 70 del secolo appena trascorso. Si dovranno attendere i lavori che hanno chiarito gli aspetti fondamentali della riproduzione vegetale, raccolti nel numero speciale di «The Plant Cell» dell'ottobre del 1993, e quelli decisamente risolutivi di Wang e Maule (1992, 1994, 1997), Maule e Wang (1996) e di Roberts et al. (2003) sullo specifico argomento della trasmissione attraverso il seme, per iniziare a comprendere quale complessità biologica ne stesse alla base. È stata poi la disponibilità delle nuove tecniche molecolari applicate allo studio delle interazioni virus-ospite a stimolare anche lo studio di quelli che potevano essere i meccanismi che permettono o impediscono a un virus di essere trasmesso attraverso il seme. Non soltanto tali ricerche hanno chiarito i diversi aspetti del fenomeno ma è stato proprio grazie alle caratteristiche intrinseche dei fitovirus - quali la semplicità del genoma, le diverse modalità di movimento attraverso i plasmodesmi e il sistema conduttore della pianta, la capacità di colonizzare rapidamente tessuti differenziati e/o meristemi - che essi stessi sono divenuti indispensabili strumenti d'indagine di complesse funzioni vegetali. Gli stessi studi sull'anatomia vegetale hanno beneficiato degli strumenti d'indagine sui fitovirus così che il lavoro di Roberts et al. (2003) sulle vie di accesso di *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) all'embrione di semi di pisello ha contribuito a dimostrare indirettamente che vi sono connessioni tra tessuti tegumentali ed endosperma e tra endosperma, sospensore ed embrione. Da problema squisitamente eco-epidemiologico e fitosanitario, la trasmissione attraverso il seme è così divenuta uno strumento di analisi della complessa biologia delle piante come la regolazione della espressione genica attraverso la *RNA interference* (RNAi) e i meccanismi correlati come il silenziamento genico posttrascrizionale (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS). Recente è pure l'impiego di vettori virali per studiare,

attraverso il silenziamento, la regolazione genica nei semi di soia (Yamagishi and Yoshikawa, 2009).

Per una esaustiva rassegna bibliografica sulla *seed-transmission* dei fitovirus si rimanda anche al sito del Consorzio Resistvir (http://www.resistvir-db.org/docs/deliverables/WP2/WP2_D4_Seed_Transmission.pdf).

2. Caratteristiche biologiche

La trasmissibilità attraverso il seme è caratteristica frequente dei cucumovirus, ilarvirus, nepovirus, tobnavirus e potyvirus, mentre per gli endornavirus e i virus criptici (alphacryptovirus e betacryptovirus) essa è l'unica modalità di trasmissione conosciuta. In altre specie virali la trasmissibilità per seme non è stata ancora documentata, anche se non si può escludere che possa verificarsi in qualche ospite non ancora identificato. Recentissima, ad esempio, è la dimostrazione della trasmissione di un isolato israeliano di *Pelargonium zonate spot virus* (PZSV) attraverso i semi di pomodoro (Lapidot et al., 2010) e pure recenti sono quelle di *Pepino mosaic virus* (PepMV) nello stesso ospite (Cordoba-Sales et al., 2007) e di *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) in frumento (Jones et al., 2005).

In linea generale, si possono distinguere due modalità di trasmissione attraverso il seme. Nella prima, meno frequente, il virus si comporta da semplice contaminante dei tegumenti seminali o, più raramente, dell'endosperma. Il successivo passaggio alla pianta avviene attraverso microlesioni del giovane semenzale, spesso dell'apparato radicale, al momento della germinazione o del trapianto. Si tratta, in buona sostanza, di un meccanismo di trasmissione per contatto (o meccanico) ed è caratteristica di virus "stabili" come *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Cucumber green mottled mosaic virus* (CGMV) le cui particelle riescono ad accumularsi in gran quantità nei tessuti epidermici e nei tricomi delle piante infette da dove si disperdono nell'ambiente come aerosol a seguito di lesioni di tali tessuti. Nel seme, questi virus si accumulano in gran quantità nei tegumenti senza riuscire a penetrare l'embrione. Dimostrazione indiretta di questo fatto è che, dopo aver rimosso per via chimica le particelle che aderiscono esternamente ai tegumenti, si osserva un aumento dell'infettività presente nel suolo a causa delle particelle virali ivi rilasciate a seguito della decomposizione dei tegumenti seminali (Maury et al., 1998).

È documentata l'adesione ai tegumenti seminali anche di altri virus come, ad esempio, *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Bean*

common mosaic virus (BCMV), *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) e *Mai-ze dwarf mosaic virus* (MDMV) (si vedano Mink, 1993 e Johansen et al., 1994) ma, in questi casi, le particelle virali perdono l'infettività durante il processo di maturazione del seme. *Melon necrotic spot virus* (MNSV), invece, permane infettivo anche nei semi maturi, ma il passaggio dai tegumenti seminali alla pianta necessita dell'intervento delle zoospore del fungo *Olpidium bornovanus* che è anche responsabile della diffusione del virus al resto della coltura (Campbell et al., 1996; Genovés et al., 2006).

La seconda modalità, assai più frequente, prevede un meccanismo attivo del virus che utilizza diverse strategie per invadere i tessuti embrionali. Questi possono essere infettati sia al momento della fecondazione, attraverso i gameti, sia dopo la fecondazione, attraverso l'invasione diretta dell'embrione (Johansen et al., 1994; Maule and Wang, 1996), nel quale il virus rimane poi quiescente fino al momento della germinazione del seme, quando anche la replicazione virale viene riattivata. Poiché presenza e movimento dei virus nella pianta sono ristretti al comparto endocellulare (simplasto) la via obbligata per invadere l'embrione dovrebbe passare attraverso i plasmodesmi che, però, sembra che vengano completamente interrotti durante la meiosi che precede la fecondazione. Fra le due strategie di invasione dell'embrione, quella diretta ha ricevuto maggiore attenzione così da pervenire alla proposta di un modello (Wang e Maule, 1994) secondo il quale il passaggio di PSbMV nell'embrione dei semi di pisello avverrebbe nella regione micropilare del sacco embrionale, attraverso il sospensore, così che il virus possa infettare l'apice radicale dell'embrione prima che il sospensore degeneri durante il processo di maturazione del seme. In pratica, la via proposta sarebbe la seguente:

tegumento seminale → endosperma → sospensore → apice radicale dell'embrione

Questo modello, sebbene logico, lasciava irrisolto l'interrogativo di quale fosse la via simplastica utilizzata dal virus dal momento che non erano state identificate connessioni (plasmodesmi, in particolare) fra i tessuti coinvolti. L'unico trasporto documentato tra tessuti materni ed embrione è quello di nutrienti a basso peso molecolare che avviene attraverso l'apoplasto e non il simplasto. Il punto di passaggio è in corrispondenza dell'interfaccia tra tessuti materni ed embrionali ed è mediato dalle cosiddette *transfer cells*, osservate tanto nell'epidermide dei cotiledoni di embrioni in via di sviluppo quanto nell'endosperma. Quindi, secondo il modello di Wang e Maule (1994) o esistono collegamenti di tipo simplastico, non ancora identificati, per il trasporto di macromolecole oppure il virus dovrebbe indurre la formazione *ex*

novo di plasmodesmi in quella regione. Usando la microscopia elettronica ad alta risoluzione e la marcatura con oro colloidale (*immuno-gold labeling*, IGL) Roberts et al. (2003) hanno dimostrato che l'infezione di PSbMV che, si ricorda, è un potyvirus, induce la formazione di corpi d'inclusione cilindrici (*pinwheels*) in gran parte delle cellule del tegumento seminale nell'area intorno al micropilo e che la parete dell'endosperma presenta numerose invaginazioni tipiche delle *transfer cells*, in stretto contatto con la membrana plasmatica. Sebbene non sia stato possibile identificare con certezza strutture assimilabili ai plasmodesmi, probabilmente a causa delle invaginazioni della parete cellulare, la presenza di corpi di inclusione cilindrici a ridosso dell'interfaccia tra tessuto materno ed endosperma embrionale ne suggerirebbe la presenza e li indicherebbe come possibili punti di passaggio del virus. L'IGL contro la proteina capsidica (CP) di PSbMV ha anche consentito di dimostrare che il virus supera, di fatto, l'interfaccia tra tessuto materno e tessuto embrionale e invade l'endosperma. Per quanto riguarda il successivo passaggio dall'endosperma al sospensore, Roberts et al. (2003) hanno ipotizzato la presenza di pori che metterebbero in comunicazione la base del sospensore con il citoplasma dell'endosperma nel punto in cui una matrice elettrondensa all'osservazione al microscopio elettronico, ricca di vescicole, risulta in stretto contatto con la guaina che circonda il sospensore. Con il procedere dello sviluppo embrionale, tale matrice diventa sempre più lassa, con tendenza a separarsi dall'apice del sospensore. Queste osservazioni confermerebbero la necessità che il virus raggiunga il micropilo nei primissimi stadi del processo garantendosi, così, la possibilità di invadere l'embrione. Questi dati hanno fornito sufficienti indicazioni sperimentali sulla via simplastica utilizzata da PSbMV per invadere l'embrione di semi di pisello, ma la domanda se tali connessioni siano presenti anche in assenza di infezione virale o ne siano una conseguenza, resta ancora senza risposta.

Roberts et al. (2003) hanno anche affrontato il problema relativo al fatto che ceppi diversi di PSbMV possano o no essere trasmessi attraverso il seme nella stessa cultivar di pisello. Secondo gli autori, questa caratteristica, più che dalla cultivar, dipenderebbe dalla capacità del virus di utilizzare più o meno efficacemente le connessioni vascolari tra frutto e seme per raggiungere elevate concentrazioni nella zona micropilare e passare nel sospensore prima che ne abbia inizio la degradazione. Nel caso di PSbMV, tale capacità sarebbe riconducibile all'attività della proteina HC-Pro codificata dal virus (Johansen et al., 1996; Roberts et al. 2003) e, probabilmente, della CP mentre nessun ruolo verrebbe svolto dalla proteina P1 che è un'altra delle proteasi codificate dal virus. Sebbene non specificatamente chiamata in causa dagli autori,

quest'attività potrebbe essere messa in relazione alla capacità dell'HC-Pro di sopprimere il PTGS: argomento su cui si tornerà più avanti.

La seconda via utilizzata dal virus per invadere l'embrione è quella "indiretta" che passa attraverso organi e/o strutture riproduttive (ovulo, cellula madre delle megaspore, cellule madri delle microspore) che sono infettati prima dell'inizio della fecondazione. Le due vie non si escludono reciprocamente tanto che alcuni virus come SMV e *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) le utilizzano entrambe. Anche in questo caso, il problema da risolvere riguarda la scomparsa delle connessioni simplastiche tra la cellula madre della megaspore e il tessuto nucellare e tra le cellule madri delle microspore e le cellule del tappeto. Durante la meiosi si forma uno strato di callosio intorno alle cellule madri delle mega e microspore che viene poi riassorbito e sostituito dalla intina e dalla esina nel caso del polline, e da uno spesso strato pectocellulosico nel caso del sacco embrionale. Durante l'impollinazione, lo sporofito e il gametofito rimangono separati perché anche la parete del tubetto pollinico sviluppa uno strato di callosio mentre attraversa i tessuti dello stilo; solo l'apice del tubetto pollinico ne è privo ed è quindi fruibile da parte del virus. Esistono anche differenze su quale dei due nuclei pollinici sia coinvolto nella trasmissione. Nel caso di AMV, sembra che sia coinvolto il nucleo spermatico mentre nel caso di *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), sembra che tale compito spetti al nucleo vegetativo, dal momento che il virus è stato trovato nel citoplasma della cellula vegetativa e non in quello della generativa (Aparicio et al., 1999).

In considerazione di quanto esposto, l'infezione indiretta dell'embrione da parte di un virus sembra dipendere dalla sua attitudine a diffondersi nei tessuti meristematici fiorali in uno stadio di sviluppo precoce (qualche settimana antecedente la fioritura), prima che si differenzino il gametofito femminile e quello maschile e, comunque, prima che scompaiano i plasmodesmi e si sviluppi lo strato protettivo di callosio. Per esempio, *Tobacco rattle virus* (TRV) è stato trovato nello stato premeiotico delle cellule madri delle microspore e successivamente nel polline.

L'elevata trasmissibilità attraverso il seme di *Tobacco ringspot virus* (TRSV) è stata messa in relazione con la sua capacità di invadere i tessuti meristematici e, quindi, la cellula madre della megaspore. Il ceppo MI-1 di BSMV è stato trovato nelle cellule madri delle mega e microspore mentre non è stata rilevata la presenza del ceppo NSP, non trasmissibile attraverso il seme. Qualunque sia la via utilizzata dal virus per raggiungere l'embrione, una condizione appare assolutamente necessaria e cioè che si tratti di infezioni precoci: infezioni (anche meccaniche) in uno stadio di sviluppo vegetativo avanzato o durante la fioritura risultano in una bassa o nulla trasmissione attraverso il seme. Non

vi sono, invece, dimostrazioni della infezione della pianta madre a partire da embrioni infettati via polline. La teoria originaria che un virus possa trasferirsi dal sacco embrionale ai tessuti della pianta madre è stata dimostrata essere priva di fondamento anche nei recenti studi di TYMV in *A. thaliana* (de Assis Filho and Sherwood, 2000) e di PZSV in pomodoro (Lapidot et al., 2010).

Tra gli altri fattori che influenzano la trasmissione attraverso il seme vi sono i cosiddetti “determinanti”: sequenze nucleotidiche virali, il cui ruolo si manifesta quando alcuni ceppi dello stesso virus si trasmettono attraverso il seme e altri no. Ciò ha originariamente suggerito l’uso di pseudoricombinanti per identificare sequenze del genoma virale putativamente coinvolte nella trasmissibilità. Un grosso passo in avanti è stato compiuto con la disponibilità di cloni infettivi che hanno permesso di sintetizzare *in vitro* virus chimerici o indurre mutazioni mirate. Tuttavia i dati in proposito sono ancora limitati a pochi esempi come nel caso di *Pea early browning virus* (PEBV) per il quale un determinate è stato identificato nel gene per la proteina 12K codificata dall’RNA-1 ed è singolare che il suo probabile corrispettivo, la proteina 16K di TRV, sia un soppressore di PTGS. La rimozione della proteina 12K abolisce completamente la trasmissibilità di PEBV attraverso il seme. Wang et al. (1997) hanno suggerito che questa proteina svolga un ruolo specifico nell’infezione dei gameti. La proteina gb di 17 kDa codificata dall’RNA g di BSMV è implicata nella trasmissione attraverso il seme e nella soppressione di PTGS. Queste informazioni, peraltro recenti, suggeriscono che geni virali specializzati nel movimento o nella protezione dell’RNA virale dal PTGS sono coinvolti anche nella trasmissione attraverso il seme.

Infine, meritano un cenno gli studi relativi alla resistenza genetica espressa da alcuni ospiti nei confronti della trasmissione dei virus attraverso il seme. Sebbene, al proposito, vi siano esempi di differenze varietali, pochissimi sono i casi in cui sono stati indagati i caratteri genetici coinvolti. Nel caso di BSMV, la resistenza è controllata da un unico gene recessivo (Carrol et al., 1979) mentre per PSbMV e AMV il carattere sarebbe controllato da più geni, in maniera quantitativa (Wang and Maule, 1997; Pathipanawat et al., 1997). Nel caso di *Lettuce mosaic virus* (LMV) sono stati identificati due possibili alleli recessivi denominati *moI*¹ e *moI*² che conferiscono differenze comportamentali che vanno dalla tolleranza (assenza di sintomi ma invasione sistemica dell’ospite) alla resistenza (assenza di sintomi e inibizione della diffusione sistemica del virus). Nelle cultivar di lattuga che possiedono questi geni, anche la trasmissibilità attraverso il seme è ridotta o assente. Conferma del fatto che i due caratteri sono correlati è venuta dalla identificazione di alcuni isolati di LMV - definiti *resistance-breaking* - che combinano la capacità di superare la

resistenza con quella di essere la trasmissibili attraverso il seme (Krause-Sakate et al., 2002).

3. *Aspetti eco-epidemiologici*

Rispetto ad altre modalità di trasmissione, quella attraverso il seme è un sistema biologico complesso ma assai efficiente attraverso il quale il virus può passare da un ciclo vegetativo a un altro, stabilire *foci* di infezione primaria sin dall'impianto della coltura localizzandoli, inoltre, al suo interno e spostarsi sulle lunghe distanze attraverso gli scambi commerciali. Questi aspetti assumono particolare rilevanza epidemiologica quando non sembrano esserci ospiti alternativi come per SMV oppure non siano note altre modalità di trasmissione naturale come per BSMV, così che le epifizie di questi patogeni hanno origine esclusivamente dall'inoculo primario portato dal seme. In altri casi, il ruolo epidemiologico della trasmissione attraverso il seme assume importanza diversa in relazione al tipo di ospite, se annuale o poliennale, alla capacità del virus di colonizzarlo più o meno omogeneamente e alla disponibilità ed efficienza di altre vie di trasmissione orizzontale. In altre situazioni ancora, la trasmissione verticale dei fitovirus può portare alla contaminazione di linee di germoplasma e/o di materiale di moltiplicazione virus-esente ottenuto con lunghi programmi di selezione e risanamento (vedasi in Maury et al., 1998) e a perdite economiche dirette e dovute alla scarsa produttività delle piante nate da seme infetto. I risvolti eco-epidemiologici della trasmissione attraverso il seme sono stati condensati da Hull (2002) in una esaustiva tabella in cui per ciascun genere, sono indicate le specie virali che utilizzano questa via di trasmissione e i tipi di danno potenziale attesi.

La frequenza della trasmissione dipende, invece, dalle diverse combinazioni virus-ospite, dalle condizioni di conservazione del seme e, come si è detto, da caratteristiche intrinseche del virus e può oscillare dallo 0 al 100%. Non sono necessarie elevate percentuali di trasmissione perché il danno sia elevato. Percentuali anche modeste, se unite a un efficiente sistema di diffusione secondaria (affidato agli afidi, per esempio) possono portare a danni economici assai rilevanti come dimostrato dall'introduzione di *Peanut stripe virus* (PStV) negli USA attraverso lotti di seme infetto provenienti dalla Cina. Basse percentuali di trasmissione in piante poliennali - teoricamente una sola pianta nata da seme infetto - sono sufficienti a trasferire in campo l'inoculo primario, a mantenerlo a lungo vitale e a renderlo disponibile per altri vettori anche se essi, come i nematodi, sono estremamente lenti nel diffondere l'infezione.

Fra le essenze poliennali, è recente la dimostrazione che *Artichoke Italian latent virus* (AILV), trasmesso da nematodi e *Artichoke latent virus* (ArLV), trasmesso da afidi, sono trasmessi anche nel seme di carciofo con una frequenza di circa il 5% (Bottalico et al., 2002). Poiché il carciofo è tradizionalmente propagato per via vegetativa, il significato epidemiologico del reperto riguarda tanto l'immissione di fonti d'inoculo primario nelle nuove coltivazioni di ibridi che utilizzano il seme per la propagazione quanto, dato forse più importante, la possibilità di utilizzare sementali di carciofo come portinnesto per la commercializzazione di piantine innestate delle vecchie varietà ed ecotipi locali (Gallitelli e Mascia, 2009; Papanice et al., 2009). Nel caso dell'olivo, in cui non era stata documentata la trasmissione di fitovirus attraverso il seme, è stato dimostrato che l'elevata frequenza di *Olive latent virus 1* (OLV-1) e CLRV nelle produzioni vivaistiche dei Paesi del Mediterraneo non era imputabile solo alla propagazione di materiale vegetale infetto ma anche alla presenza dei due virus nei semi di varietà di olivo impiegate come portinnesti. Le percentuali di seme infetto accertate sono state del 41% per OLV-1 e del 35% per CLRV (Saponari et al., 2002) e giustificano pienamente la elevata frequenza dei reperti. Nel caso degli agrumi, la comprovata trasmissibilità attraverso il seme riguarda *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) (Guerri et al., 2004) mentre è ancora controversa la trasmissibilità di *Citrus psorosis virus* (CPsV) e *Citrus variegation virus* (CVV). Particolarmente insidiosi sono i casi in cui piante poliennali sane producono semi infetti in quanto il virus è trasmesso all'embrione attraverso il polline. Fra i virus che possono giungere nel seme di piante arboree tramite il polline vanno menzionati *Prune dwarf virus* (PDV) e PNRSV in diverse drupacee. È stata, invece, dimostrata la trasmissione di *Tobacco streak virus* (TSV) e PZSV alla pianta, a partire da polline infetto trasportato da tripidi o da altri artropodi che infestano i fiori ma, in questo caso, si tratta di una forma di trasmissione "per contatto" e non di passaggio del virus dall'embrione infettato via polline alla pianta madre.

Così come per la produzione agricola, una elevata percentuale di semi infetti può anche avere conseguenze epidemiologiche negative per lo stesso patogeno. Nel caso delle infezioni di TRSV in semi di soia una incidenza prossima al 100% comporta la autoeliminazione del virus a causa del grave effetto negativo sullo sviluppo florale e sulla produzione e germinabilità del seme. Il caso estremo è forse rappresentato da *Tomato aspermy virus* (TAV) che non viene trasmesso attraverso il seme di pomodoro perché l'infezione interferisce con la fertilità del polline e dell'ovulo, impedendo la formazione dei semi, così come lo stesso nome del virus ricorda. D'altra parte, gli effetti deleteri sulla quantità e qualità del polline non sembrano sufficienti a dimi-

nuirne il significato epidemiologico nella trasmissione. È questo il caso di AMV, BCMV, BSMV, CLRV e diversi ilarvirus (Mandahar and Gill, 1984; Mink, 1993) dove sembra che la trasmissione attraverso polline sia comunque preferita rispetto a quella attraverso l'ovulo anche se la germinazione del polline e l'allungamento del tubetto pollinico sono compromessi dalla infezione virale. Ugualmente diversificata è la possibilità che il seme mostri sintomi di malattia più o meno gravi. Al di là del danno commerciale derivante da una poco attraente presentazione del prodotto e dalle sue impoverite qualità organolettiche e nutrizionali questa caratteristica non sembra interferire con la frequenza di trasmissione anzi, nel caso di PSbMV in pisello, è stato dimostrato che essa è più alta nei semi piccoli che in quelli di dimensioni normali.

Uno studio recente sulla decolorazione dei semi di soia come esito dell'infezione di SMV ha evidenziato il possibile coinvolgimento del soppressore di PTGS (HC-Pro) del virus nel parziale silenziamento dell'mRNA che codifica il *cluster* di geni della Calcone sintasi (CHS) che è coinvolto nella pigmentazione dei tegumenti seminali (Domier et al., 2007). In questo studio sono state individuate correlazioni tra la capacità del virus nell'indurre maculature sui tegumenti seminali e la trasmissibilità dello stesso attraverso i semi e gli afidi. Anche se è stato confermato che la presenza di sintomi sui tegumenti seminali non costituisce un indicatore certo della trasmissibilità del virus attraverso il seme si è però accertato che i due fenomeni sono correlati. Nel medesimo studio è anche fornita dimostrazione del coinvolgimento delle medesime sequenze virali - HC-Pro e CP - nella trasmissibilità attraverso il seme e attraverso afidi. Nella condizione naturale, tali sequenze devono essere oggetto di selezione positiva costante nella progenie virale, per essere mantenute integre nella loro funzione. Isolati di SMV, trasmessi meccanicamente per oltre 30 anni, hanno perso la capacità di essere trasmessi attraverso seme e mediante afidi. Il mantenimento della trasmissibilità attraverso il seme costituisce un elemento di così grande importanza eco-epidemiologica che nelle regioni genomiche virali coinvolte in questo carattere il numero di mutazioni è sempre fortemente limitato. Parimenti, la trasmissibilità attraverso il seme sembra funzionale alla selezione di ceppi di SMV che presentano caratteristiche di virulenza molto diverse da quelle degli isolati trasmessi solo meccanicamente (Domier et al., 2007).

Merita anche un cenno l'influenza di infezioni miste sulla trasmissibilità dei virus attraverso il seme. È noto che la contemporanea presenza di due virus, anche tassonomicamente distanti, nella stessa pianta può portare a fenomeni di sinergismo e/o complementazione e antagonismo per uno o entrambi. Tali effetti sono stati studiati approfonditamente in diverse com-

binazioni di virus/ospiti ma poca attenzione è stata sinora prestata all'effetto della infezione mista sulla trasmissibilità attraverso il seme. Vi sono prove dirette come quella della infezione mista di TYMV e TMV in *A. thaliana* dove entrambi i virus raggiungono una più elevata concentrazione nei tessuti infetti ed entrambi si localizzano nel seme, ancorché in parti diverse, ma solo TYMV risulta trasmissibile, in quanto, unico dei due, a essere localizzato nell'embrione. Nelle piante con infezione mista è stata osservata una maggiore frequenza di trasmissione di TYMV che è risultata correlata con una più alta concentrazione raggiunta da TYMV nei tessuti infetti (de Assis Filho and Sherwood, 2002) e con il numero maggiore di embrioni infettati dal virus. Analogamente, Kuhn e Dawson (1973) hanno documentato un incremento del 57% nella trasmissione di SBMV nei semi di vigna nei casi di infezione mista con CCMV.

4. *Possibilità d'intervento*

Il costante incremento degli scambi commerciali e la frequenza con cui alcuni virus particolarmente dannosi si trasmettono attraverso il seme impongono l'adozione di adeguate misure di controllo e contenimento. Lo strumento più valido è certamente la certificazione dei lotti di seme posti in commercio ma, se questo è un requisito imposto per legge per quanto ne riguarda l'identità varietale, la purezza e la germinabilità, è difficile trovare lotti di seme nei quali sia certificata l'assenza di patogeni e di virus, in particolare. I lotti di seme sono generalmente concitati con prodotti ad azione sistemica per garantire una certa protezione contro funghi e, in qualche caso, batteri nelle prime fasi della germinazione. La lotta chimica non ha alcun successo nel caso dei virus per cui si deve far ricorso ad altre strategie.

Ingenti sforzi sono stati dedicati agli aspetti tecnici coinvolti nell'accertamento della presenza di virus nel seme e, soprattutto al fatto che esso sia poi effettivamente trasmissibile alla pianta. Si è già detto che durante la maturazione e/o per effetto delle condizioni di conservazione del seme, alcuni virus perdono l'infettività pur lasciando in loco proteine virali che possono essere rilevate con approcci di tipo sierologico. Sotto questo profilo, il saggio biologico – far germinare un campione rappresentativo del seme e procedere con il rilevamento del virus - sarebbe il più tranquillizzante ma questa strada richiede tempi e disponibilità di spazio generalmente inconciliabili con il numero di campioni da saggiare e il ristretto arco temporale in cui i risultati dell'analisi devono essere resi disponibili. Il ricorso al saggio biologico

dovrebbe costituire l'estrema risorsa se le analisi di laboratorio producono risultati controversi.

Il saggio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) è sicuramente il più utilizzato con le sue tante varianti che includono anche l'impiego degli anticorpi monoclonali (*monoclonal antibodies*, Mabs). Uno dei rischi nell'uso dell'ELISA, specie se si utilizzano Mabs, è quello di mancare il rilevamento di varianti non riconosciute dagli anticorpi impiegati. Analogo rischio si corre utilizzando la *reverse-transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) sia in formato standard, sia in formato real-time in quanto il risultato dell'analisi è condizionato dalla specificità dei primer. Nel caso della PCR, un altro elemento da verificare è l'assenza di inibitori della reazione di cui il seme è generalmente molto ricco. Un valido compromesso potrebbe essere rappresentato dalla ibridazione di acidi nucleici utilizzando sonde a marcatura non radioattiva. Questo sistema, assai versatile e sensibile, non ha ancora raggiunto una fase applicativa per motivi di complessità, rispetto all'ELISA che, almeno nell'esperienza di chi scrive, non trovano giustificazione. Il recente suggerimento di utilizzare sonde nucleiche composte da frammenti di sequenza in grado di identificare virus diversi (*polyprobes*) in un unico saggio (Aparicio et al., 2009) risolve il problema di dover condurre reazioni di ibridazione singole anche se, per il vero, nessun problema era stato riscontrato nell'uso contemporaneo di sonde differenti in un'unica reazione (Saldarelli et al., 1996).

Ai fini certificativi, è necessario accertare la correlazione tra presenza del virus nell'embrione ed effettiva possibilità di trasmissione dell'infezione alla pianta. I modelli esaminati non sono stati molti e a titolo di esempio si possono ricordare SMV in soia, BSMV in orzo, LMV in lattuga, PSbMV in pisello e *Squash mosaic virus* (SqMV) in cucurbitacee (vedasi Maury et al., 1998). In tutti questi casi, gli accertamenti condotti con l'ELISA hanno evidenziato una grande variabilità nella concentrazione virale come pure nel tipo di tessuto embrionale in cui il virus è stato trovato. Più che nell'asse embrionale il virus è stato spesso rilevato nei cotiledoni ma secondo Johansen et al., (1994) il rilevamento in questi tessuti riguarda spesso virioni non integri, ipotizzando che in tali tessuti embrionali il virus venga inattivato. Se questo è il caso, embrioni positivi all'ELISA sarebbero, in realtà, falsi positivi se il virus non viene rilevato anche nell'asse embrionale (Johansen et al., 1994). Tuttavia mancano prove sperimentali certe che indichino che il virus presente nei cotiledoni non sia da considerarsi trasmissibile attraverso il seme o forse questo è il caso di alcune combinazioni virus-ospite ma non di altre.

Un altro aspetto da considerare è la possibile interferenza di tessuti non embrionali che potrebbero contaminare l'estratto al momento della prepara-

zione del campione e parimenti possibile è l'inadeguatezza di certi protocolli di laboratorio per estrarre il virus da particolari tessuti. Questo problema è stato sollevato osservando che nei tegumenti seminali non erano presenti PStV in semi di arachide, LMV in semi di lattuga, SMV in soia e PsbMV in pisello (vedasi Maury et al., 1998). Nell'ultimo caso era stato però osservato che il mancato rilevamento non era dovuto alla inadeguatezza del metodo di estrazione ma, piuttosto, al fatto che la proteina capsidica di PSbMV era stata degradata in corrispondenza dei termini N e C, evenienza peraltro frequente nei potyvirus (Hiebert et al., 1984; Allison et al., 1985). Infine, nel caso delle sementi di graminacee, l'embrione deve essere accuratamente separato non solo dai tegumenti ma anche dall'endosperma che in questa tipologia di semi è particolarmente abbondante.

Nel contesto dell'attuale mercato globale e in considerazione del rischio elevatissimo di importare virus economicamente rilevanti attraverso lotti di seme infetto, ciascun Paese dovrebbe fissare un limite di tolleranza alla percentuale di seme infetto presente nei lotti commerciali in base a un protocollo di *pest risk analysis* (PRA) definito dalla EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*). Per stabilire il limite tollerabile da un determinato sistema agricolo è necessario disporre di una serie di parametri relativi al significato epidemiologico della trasmissione attraverso il seme, al livello di suscettibilità delle varie cultivar, alla presenza e mobilità dei vettori in funzione delle condizioni climatiche, alla percentuale di piante infette con cui gli agricoltori sono abituati a convivere e alle perdite di produzione che gli stessi sono disposti a tollerare. La necessità di fissare tali limiti e i criteri secondo i quali determinarli sono stati richiamati in maniera esaustiva nel lavoro di Jones (2000). Nel caso del modello SMV-soia è stato determinato che in aree geografiche in cui la presenza dei vettori alati è bassa nei periodi che precedono la fioritura, il limite può essere fissato all'1% mentre nei casi in cui la presenza dei vettori è elevata, soprattutto nelle prime fasi di sviluppo della coltura, tale limite deve essere abbassato allo 0,01%.

Tra le possibili strategie per il controllo di virus trasmessi attraverso il seme assume primaria importanza la certificazione sanitaria dei lotti di seme con tutte le implicazioni di natura metodologica a cui si è accennato. Il ricorso a trattamenti chimici con fosfato trisodico o acidi (cloridrico o acetico) è utile contro i virus che contaminano esternamente i tegumenti seminali ma, come si è detto, questo problema riguarda pochi casi mentre la maggioranza dei virus trasmessi attraverso il seme infetta l'embrione. Una via certamente molto efficiente potrebbe essere il ricorso a varietà resistenti alla trasmissione. Maury et al. (1998) hanno stimato che solo per circa un terzo dei virus trasmessi

attraverso il seme sono stati identificati geni di resistenza anche se le informazioni disponibili si riferiscono a livelli di resistenza generale alla infezione e non specificatamente alla trasmissione attraverso il seme.

Il blocco della trasmissione attraverso il seme potrebbe, invece, essere realizzato utilizzando altre vie come la transgenesi. Come è noto, l'obiettivo è il trasferimento mirato di sequenze esogene nelle piante con lo scopo di interferire o bloccare specifiche funzioni virali. Tuttavia le conseguenze del trasferimento di alcuni geni potrebbero interferire con la corretta espressione di geni endogeni, con la conseguenza di portare a semi malformati o che presentano difficoltà di germinazione. Si è già accennato all'effetto dell'HC-Pro sulla pigmetazione dei semi di soia. Un esempio delle anomalie riscontrabili nella germinazione e nell'*habitus* di piante transgeniche a seguito della espressione di sequenze in grado di interferire con il silenziamento è fornito nel lavoro di Siddiqui et al., (2008). La transgenesi, ancorché percorribile, potrebbe essere realizzata impiegando costrutti che, una volta trascritti *in planta*, formano strutture bicatenarie (*hairpin* o *stem loop*) in grado di attivare il meccanismo di PTGS e di guidare, in maniera sequenza-specifica, la degradazione del virus prima che questo riesca a invadere l'embrione. Tuttavia, poiché il meccanismo del silenziamento è generale, anche questo approccio non garantirebbe *a priori* l'eliminazione di eventuali interferenze deleterie con l'espressione dei geni dell'ospite per cui la valutazione andrebbe fatta caso per caso.

5. *Acquisizioni recenti*

Lo studio di Johansen et al. (1996) è stato il primo a suggerire che geni virali coinvolti nella soppressione del PTGS - come si è scoperto a posteriori - fossero necessari per la trasmissione di PSbMV attraverso i semi di pisello. Studi successivi, fino agli attuali, hanno chiarito che tali geni possono essere funzionali a consentire l'ingresso delle particelle virali nei meristemi.

Il PTGS o silenziamento dell'RNA basato sulla omologia di sequenza è stato, per la prima volta, descritto nelle piante rilevando la soppressione contemporanea della espressione di un transgene e del suo omologo endogeno (Matzke et al., 1989; Napoli et al., 1990). Altri esempi simili di cosoppressione sono stati successivamente identificati in un gran numero di eucarioti e si è scoperto trattarsi di un fenomeno molto versatile attivato dalla presenza di RNA bicatenario (*double-stranded RNA*, dsRNA) che viene ridotto a frammenti di 21-24 nucleotidi denominati *small interfering RNA* (siRNA).

Questi frammenti, a loro volta, mediano diverse funzioni di regolazione e nel PTGS si legano a un complesso enzimatico con funzione di RNasi, denominato RISC (*RNA-induced silencing complex*), per indirizzarne l'attività ribonucleasica verso trascritti aventi omologia di sequenza con i siRNA. Il meccanismo è molto complesso e in genere prevede il movimento sistemico e l'amplificazione del segnale ben oltre la molecola inizialmente individuata come bersaglio. Questo passaggio fondamentale è mediato da una *RNA-dependent RNA polymerase* (RDR) di origine endogena che produce nuovi frammenti di dsRNA, amplificando il segnale di silenziamento. Nelle piante, l'attività della RDR estende il silenziamento a regioni della molecola bersaglio di RNA inizialmente rimaste intatte. In *A. thaliana* sono state individuate sei RDR ciascuna delle quali avrebbe la funzione di amplificare classi diverse di siRNA. Molti fattori di trascrizione sono regolati da questo meccanismo che garantisce anche il regolare ricambio degli mRNA cellulari e, pertanto, un malfunzionamento del processo può avere come conseguenza la comparsa di difetti gravi nello sviluppo vegetativo. Nelle piante infette da virus, il silenziamento può essere attivato contro lo stesso RNA virale anche dal dsRNA sintetizzato durante la replicazione o da sequenze omologhe a frammenti del genoma virale che, a seguito di trascrizione, assumono la conformazione di dsRNA. Le reazioni di silenziamento sono, pertanto, viste come un valido ancorché non sufficiente sistema di difesa delle piante nei confronti delle infezioni virali. Il sistema non è sufficiente perché molte specie virali – forse tutte – codificano proteine che hanno il compito di sopprimere il silenziamento attivato dall'ospite. Il grande significato biologico della difesa mediata dal silenziamento e delle contromisure adottate dai virus attraverso i soppressori del silenziamento è dimostrato dal fatto che, questi ultimi erano stati originariamente identificati come determinanti di patogenicità, assolutamente necessari per garantire il successo della infezione virale. È stato evidenziato che alcuni soppressori del silenziamento come la proteina 2b di CMV, sono tradotti a partire da una sequenza che si sovrappone a un componente della replicasi virale (la proteina 2a, nel caso di CMV) e che da un punto di vista evolutivo, il gene che codifica la proteina 2b è più recente di quello che codifica la 2a e, quindi rappresenta un adattamento del genoma virale per contrastare il silenziamento operato dall'ospite (Li and Ding, 2006). Così l'accoppiamento mediante sovrapposizione delle proteine 2a e 2b di CMV costituirebbe un blocco genico inscindibile dal momento che un'efficiente replicazione virale richiede una altrettanto efficiente soppressione del silenziamento genico. Come si è detto, della coppia di geni, quello che codifica la proteina 2a sarebbe più antico e diffuso mentre quello che codifica la 2b

sarebbe più recente e specifico, forse a livello di ceppo virale e di ospite. Dalla interferenza dei soppressori del silenziamento con il meccanismo necessario a garantire il *turnover* degli mRNA cellulari deriverebbero alterazioni metaboliche che porterebbero alla comparsa di quelli che noi chiamiamo sintomi della infezione virale. Non è noto se l'alterazione delle vie metaboliche che poi porta allo sviluppo dei sintomi sia funzionale al patogeno o sia un semplice effetto collaterale. Un esaustivo elenco dei soppressori di silenziamento codificati dai virus e delle loro modalità di azione è riportato da Li e Ding (2006).

In alcune combinazioni virus/ospite, l'attivazione del silenziamento come risposta di difesa della pianta è indicata dalla remissione di sintomi (*recovery*, secondo gli autori anglosassoni) prodotti nelle fasi iniziali della infezione. Nelle infezioni da nepovirus il *recovery* è un fenomeno assai frequente e indicativo del fatto che la pianta attiva e amplifica il silenziamento e che il virus non possiede un adeguato soppressore. Per le finalità di questa nota è interessante osservare che nel lavoro pionieristico di Ratcliff et al (1997) si legge testualmente «Why do nepoviruses and members of a few other virus groups elicit such pronounced recovery? One explanation, at least for nepoviruses, may follow from an earlier suggestion that there is an association between recovery and the potential of the virus to be transmitted through the seed of the infected plant. Normally, transmission through seed does not take place because viruses are excluded from the meristem and surrounding area of the plant in which gametes are produced. When seed transmission does take place, it is probably because this exclusion from the meristem has been overcome. Perhaps recovery is initiated when the nepovirus penetrates the meristem», e alcune righe dopo «Green islands and mosaics that are induced by non-seed transmitted viruses are examples of localized areas of virus-specific resistance in infected plants». Si è scoperto successivamente che il segnale di silenziamento e quindi tutte le attività connesse con la degradazione degli RNA virali, si ferma in corrispondenza del sottile strato di cellule che segnano il confine tra tessuto differenziato e meristema. In *A. thaliana*, il segnale di silenziamento sarebbe attivo nell'ipocotile e nella radichetta ma verrebbe bloccato a livello del cono vegetativo della radice e del germoglio (Kobayashi and Zambryski, 2007). In base a queste evidenze appare ovvio che la degradazione del virus attraverso il silenziamento e parimenti la sua reazione tramite i soppressori deve avvenire prima dell'invasione del meristema. Se questo modello spiega come, ad esempio, PSbMV e TRV riuscirebbero a evadere il silenziamento tramite il rispettivi soppressori HC-Pro e proteina 16K e a entrare nei meristemi per essere successivamente trasmessi attraverso il seme, lo stesso modello non spiega come ci riuscirebbero i nepovirus che, apparentemente, sono privi di

soppressori. Eppure i nepovirus sono efficientemente trasmessi attraverso il seme. Il lavoro di Siddiqui et al. (2008a) suggerisce una interessante ipotesi in base alla quale la difesa della pianta tramite il silenziamento porterebbe a una sensibilissima riduzione del titolo virale che indurrebbe il *recovery* ma, al contempo, consentirebbe al virus di eludere ulteriori attività di silenziamento a causa della bassissima concentrazione raggiunta e invadere i meristemi. Secondo questa ipotesi, ci potrebbe essere una “soglia di concentrazione virale” al di sotto della quale il silenziamento non verrebbe attivato o risulterebbe inefficiente. Questi modelli sono in studio per altri nepovirus come AILV in carciofo e tabacco (Mascia et al., 2009; Santovito et al., 2010).

Interessante, infine, appare il caso di virus a DNA le cui sequenze, integrate nel genoma dell'ospite, possono dare origine alla espressione episomale del virus anche se, in diversi casi, il fenomeno scatenante non è stato identificato. Fra questi, *Tobacco vein-clearing virus* (TVCV) e *Petunia vein-clearing virus* (PVCV) sono trasmessi attraverso il seme e in entrambi casi la comparsa episomale dei rispettivi virus nei sementali è stata documentata (Harper et al., 2002).

FITOPLASMI

Le malattie indotte da fitoplasmi, o fitoplasmosi, erano conosciute già nella prima metà del secolo scorso sotto il nome di ‘Giallumi’ (*yellow diseases*) e oggetto di vivo interesse sia per l' insolita sintomatologia, caratterizzata da alterazioni non riscontrabili, nel loro insieme, in nessun tipo delle fitopatie allora conosciute, sia perché ne era ignota l'eziologia. Considerato, però, che il sintomo più frequente consisteva nell'ingiallimento della vegetazione e che i giallumi risultavano trasmissibili per innesto e con insetti in modo ‘persistente’ ma non per inoculazione meccanica, esattamente come i virus floematici, era opinione diffusa che anch'essi fossero causati da agenti virali. Sia per questa ragione sia perché, di fatto, fitoplasmi e virus persistenti presentano somiglianze patogenetiche ed epidemiologiche, i fitoplasmi sono tuttora studiati dalla Virologia vegetale. Nella presente nota si è pertanto ritenuto opportuno riferire anche i pochi ma interessanti dati finora acquisiti sulla trasmissione per seme dei fitoplasmi la cui esistenza – va premesso subito – deve essere ancora provata con chiarezza.

La natura eziologica dei giallumi venne chiarita soltanto verso la fine degli Anni Sessanta del secolo scorso, quando ricercatori giapponesi individuavano in piante affette da malattie diverse (Mulberry dwarf, Pawlonia witches’

broom, Aster yellows e Potato witches' broom) cellule identiche a quelle dei micoplasmi, microrganismi già noti come agenti di malattie dell'uomo e degli animali ma fino ad allora mai rilevati nelle piante (Doi et al., 1967). Essi furono provvisoriamente indicati con il termine 'mycoplasma like organisms' (MLOs), poi sopravvissuto fino a quando la denominazione di fitoplasmi venne proposta e accettata (Jarausch et al., 1994).

I fitoplasmi sono organismi unicellulari assimilabili ai batteri ma privi di una parete rigida e delimitati semplicemente da una membrana cellulare per cui, visualizzati al microscopio elettronico, risultano tipicamente pleomorfici, presentandosi con forme tondeggianti o allungate di dimensioni variabili da 60 a 1.100 nm circa. Si ritiene che essi potrebbero aver avuto origine da un'evoluzione regressiva di batteri Gram-positivi, forse dei generi *Bacillus* e *Clostridium*. Nelle piante, i fitoplasmi sono localizzati nelle cellule del floema anche se, occasionalmente, sono stati reperiti anche nel parenchima e nelle cellule compagne del floema e nel parenchima corticale. Sono presenti nelle cellule di tutti gli organi vegetali, comprese le radici, e sono pertanto patogeni intracellulari e sistemici. La loro concentrazione nei vari tessuti vegetali è alquanto irregolare ed è soggetta a variazioni stagionali, fatto che, insieme con l'impossibilità di coltivarli su substrati artificiali, ha reso e rende particolarmente difficile il loro studio.

La possibilità che i fitoplasmi si trasmettano attraverso il seme non è stata presa in considerazione con indagini specifiche fino alla fine del secolo scorso e oltre, verosimilmente perché le piante infette sono colpite da alterazioni fiorali di tale gravità – quali virescenza, fillodia, apostasi e altri fenomeni degenerativi – da indurre spesso la completa sterilità, facendo ritenere la trasmissione per seme dei fitoplasmi quanto mai improbabile, se non impossibile. Questa opinione era confortata anche dalla considerazione che la trasmissione per seme potesse escludersi a priori nel caso di patogeni tipicamente floematici come i fitoplasmi, viste le già ricordate analogie con virus floematici, a trasmissione persistente, nessuno dei quali è trasmesso attraverso il seme. Ricerche mirate sulla trasmissibilità per seme dei fitoplasmi sono iniziate solo nel 2000 ma i primi risultati hanno confermato la difficoltà dell'argomento, lasciando tuttora adito a molte incertezze.

La prima segnalazione del coinvolgimento dei semi nella reazione a un'infezione fitoplasmica sembra essere quella di Limberk e Ulrychová (1972) i quali infettarono piante di pomodoro con un isolato di 'Scopazzi della patata' (*Potato witches' broom*, PWB) mediante innesto sia a spacco apicale che per inserzione laterale, osservando che, soprattutto nel secondo caso, si manife-

stava germinazione prematura dei semi ancora allocati all'interno dei frutti, fenomeno che essi definirono 'viviparia'. I giovani semenzali sviluppatasi nei frutti risultarono però molto vigorosi conservando tale condizione anche dopo il trasferimento su carta bibula umida, in capsule Petri, e quindi in piena terra. Continuando a svilupparsi, le piante fiorirono e produssero frutti normalmente, senza presentare alterazioni di alcun tipo così come le piante loro discendenti, per tre generazioni successive.

Dopo risultati di ricerche preliminari mai pubblicati ufficialmente e che sembravano non escludere - per la prima volta - la trasmissibilità per seme dei fitoplasmi (cf. Bertaccini, 2002), indagini vennero condotte su semi di erba medica provenienti dall'Oman, dove una malattia da fitoplasmi causa gravi perdite di produzione alle coltivazioni di questa specie (Khan et al., 2002a). Le giovani piante ottenute dai semi predetti sia in ambiente sterile, a prova di insetto, che *in vitro* risultarono affette da fitoplasmi (Khan et al., 2002b). Con il progredire della crescita, tuttavia, la concentrazione di questi nelle piante diminuì progressivamente, anche se la loro presenza risultò ancora rilevabile fino a 154 giorni dalla germinazione nelle piante coltivate *in vivo* e fino a 84 giorni in quelle allevate *in vitro*. Tra il materiale micropropagato e risultato infetto, inoltre, alcune piante manifestarono sintomi di nanismo e accentuata riduzione del vigore vegetativo (cf. Bertaccini, 2002).

Altre ricerche, condotte mediante microscopia elettronica e PCR sulla distribuzione del fitoplasma agente del 'Nanismo del gelso' (*Mulberry dwarf*, MD) nella pianta ospite, hanno evidenziato la presenza del patogeno in diversi organi riproduttivi come fiori, frutti e tegumento dei semi. Non sono stati però effettuati accertamenti sulla effettiva trasmissione per seme del patogeno (Jiang et al., 2004). Simili risultati sono stati conseguiti da Chung et al. (2006) che, mediante PCR, hanno dimostrato la presenza del fitoplasma agente degli 'Scopazzi della limetta messicana' (*Lime witches' broom disease*, LWBD) nei semi di questa specie, peraltro senza effettuare accertamenti sulla sua trasmissibilità.

Sempre utilizzando la PCR, il DNA del fitoplasma agente del 'Giallume letale della palma da cocco' (*Palm lethal yellowing*, PLY) è stato rilevato negli embrioni di palme ospiti (Cordova et al., 2003) e, ancora in base ai risultati di saggi diagnostici, è stata ipotizzata la trasmissione di fitoplasmi a giovani semenzali di pomodoro, di colza e di limetta messicana provenienti da semi infetti (Botti e Bertaccini, 2006).

Dalla casistica riportata, che include praticamente la totalità degli studi in argomento, si evince che le indagini sulla trasmissibilità per seme dei fito-

plasmi sono state finora affrontate prevalentemente con approcci diagnostici orientati a verificare la presenza dei patogeni (o del loro DNA) nel seme o in altri organi riproduttivi di piante infette e nei semenzali ottenuti dal seme di individui infetti. I risultati di queste indagini hanno evidenziato che i fitoplasmi possono ritrovarsi nei semi di piante infette e talora nei semenzali che da questi hanno origine, anche se la loro concentrazione sembra diminuire progressivamente negli stadi di sviluppo successivi. Soltanto nel caso, citato, della fitoplasmosi dell'erba medica segnalata in Oman sembra siano stati osservati sintomi di malattia in giovani semenzali provenienti da seme infetto, allevati *in vitro* e risultati positivi alla diagnosi di laboratorio (cf. Bertaccini, 2002). Ciò premesso, sembra auspicabile che le future ricerche sulla trasmissibilità per seme dei fitoplasmi si rivolgano a verificare non solo la presenza dei patogeni nel materiale sottoposto a diagnosi (semi e semenzali) ma anche la manifestazione della malattia sulla progenie. Solo in questo caso si potrà effettivamente parlare di *seed transmission* anche nel caso dei fitoplasmi. Contemporaneamente è atteso che, grazie alle moderne tecniche di laboratorio brevemente descritte per i virus, siano svolte indagini sulle vie attraverso le quali i fitoplasmi potrebbero raggiungere il seme e sui meccanismi molecolari che potrebbero favorirne il trasferimento.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Molta strada è stata percorsa nell'avanzamento delle conoscenze sui meccanismi che regolano la *seed-transmission* dei fitovirus e molta ne resta da percorrere prima che la complessa biologia del fenomeno sia chiarita nei suoi aspetti fondamentali. La trasmissibilità attraverso il seme è una caratteristica che non tutti i virus sembrano possedere e che rimane del tutto da verificare nel caso dei fitoplasmi. Per quanto riguarda i primi, al momento, non è ancora chiaro se tale incapacità sia effettivamente dovuta al patogeno o non sia piuttosto il risultato di meccanismi di resistenza presenti in alcuni ospiti ma non ancora individuati. Anche dal punto di vista eco-epidemiologico questo tipo di studi dovrebbe essere incoraggiato, almeno per le colture di maggiore ritorno economico come pure incoraggiato dovrebbe essere lo studio dei meccanismi dipendenti dalla genetica virale – e, se del caso, da quella dei fitoplasmi – che consentono ad alcuni di essi ma non ad altri di invadere il seme. Il significato eco-epidemiologico della trasmissione attraverso il seme è ugualmente importante sotto l'aspetto applicativo che riguarda la problematica della certificazione dello stato fitosanitario delle sementi.

Il tumultuoso progresso nelle conoscenze della biologia e degli strumenti di analisi molecolare che caratterizza i tempi attuali garantisce che significativi risultati saranno raggiunti in tempi relativamente brevi se gli sforzi dei ricercatori saranno sostenuti da finanziamenti adeguati allo scopo.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il prof. Giovanni P. Martelli per la lettura critica del testo.

RIASSUNTO

Si riportano gli aspetti più recenti degli studi sulla trasmissione dei fitovirus attraverso il seme. I risultati ottenuti dimostrano che i virus utilizzano una via simplastica che passa attraverso i tegumenti seminali, l'endosperma e il sosensore utilizzando strutture non presenti nelle piante superiori ma che si formerebbero *ex novo* nelle piante infette da virus. È anche valutato il ruolo dei soppressori del silenziamento genico di origine virale nel determinare la trasmissibilità dei virus attraverso il seme. Tra le possibilità di intervento per contenere le conseguenze eco-epidemiologiche ed economiche della trasmissione di virus attraverso il seme si enfatizza la necessità di una diagnosi precoce e si valutano vantaggi e svantaggi dei saggi di laboratorio disponibili. Si accenna, infine, alla possibilità che anche i fitoplasmi agenti di malattie siano trasmissibili attraverso il seme delle piante infette secondo modalità che meriterebbero un approfondimento rispetto alle indagini sinora effettuate.

ABSTRACT

Seed transmission of viruses and phytoplasmas: facts, factors and mechanisms. An account is given of the mechanism(s) involved in the seed transmission of plant viruses, most of which have been elucidated only recently and in few instances. Evidence has been provided that seed transmission by direct invasion of the embryo via the ovule depends upon symplastic transport of the virus from infected maternal cells. Such transport pathways have not been identified in higher plants but it has been shown that symplastic connections at the testa-boundary wall as well as porelike structures at the endosperm-suspensor boundary do exist in virus-infected plants. The role of virus determinants like the suppressors of posttranscriptional gene silencing in seed transmission is also discussed. Control measures to limit seed transmission capitalize on the availability of sensitive, reliable and labour saving immunological and nucleic acid-based laboratory techniques however emphasis is placed on the risk of sample contamination in doing these tests. Finally, some preliminary results suggest that also phytoplasmas agents of plant diseases could be transmitted through seeds, posing the needs for a more accurate investigation.

LAVORI CITATI

- ALLISON R.F., DOUGHERTY W.G., PARKS T.D., WILLIS L., JOHNSTON R.E., KELLY M AND ARMSTRONG F.B. (1985): *Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface*, «Virology», 147, pp. 309-316.
- APARICIO F., SANCHEZ-PINA M.A., SANCHEZ-NAVARRO J.A. AND PALLAS V. (1999): *Location of prunus necrotic ringspot ilarvirus within pollen grains of infected nectarine trees: evidence from RT-PCR, dot-blot and in situ hybridisation*, «European Journal of Plant Pathology», 105, pp. 623-627.
- APARICIO F., SOLER S., ARAMBURU J., GALIPIENSO L., NUEZ F., PALLÁS V. AND LÓPEZ C. (2009): *Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe*, «European Journal of Plant Pathology», 123 (1), pp. 117-123.
- BENNETT C.W. (1969): *Seed transmission of plant viruses*, «Advances in Virus Research», 14, pp. 221-261.
- BERTACCINI A. (2002): *Malattie da fitoplasmi: stato dell'arte*, «Petria», 12 (3), pp. 325-343.
- BOTTALICO G., PADULA M., CAMPANALE A., FINETTI SIALER M.M., SACCOMANNO F., GALLITELLI D. (2002): *Seed transmission of Artichoke Italian latent virus and Artichoke latent virus in globe artichoke*, «Journal of Plant Pathology», 84, p. 167.
- BOTTI S. E BERTACCINI A. (2006): *Phytoplasma infection through seed transmission: further observations*, Proc. 16th Int. Congress of the Int. Organization on Mycoplasmaology, (Ayling R. D., Citti C. & Nicholas R.A.J. Eds), Cambridge, UK, veterinary Lab. Agency, 76 pp.
- CAMPBELL R.N., WIPF-SCHEIBEL C. & LECOQ H. (1996): *Vector assisted seed transmission of melon necrotic spot virus in melon*, «Phytopathology», 86, pp. 1294-1298.
- CARROLL T.W., GOSSEL P.L. AND HOCKETT E.A. (1979): *Inheritance of resistance to seed transmission of barley stripe mosaic virus in barley*, «Phytopathology», 69, pp. 431-433.
- CHUNG K.-R., KHAN I.A. AND BRIANSKY R.H. (2006): *Citrus diseases exotic to Florida: Witches' broom disease of lime (WBDL)*, Plant Pathology Dept, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. Fact Sheet P-228, 3 pp.
- CÓRDOBA-SELES C., GARCÍA-RÁNDEZ A., ALFARO-FERNÁNDEZ A., JORDÁ-GUTIÉRREZ C. (2007): *Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments*, «Plant Disease», 91, pp. 1250-1254.
- CORDOVA I., JONES P., HARRISON N.A. AND OROPEZA C. (2003): *In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease*, «Molecular Plant Pathology», 4, pp. 99-108.
- DE ASSIS FILHO F.M. AND SHERWOOD J.L. (2000): *Evaluation of seed transmission of Turnip yellow mosaic virus and Tobacco mosaic virus in Arabidopsis thaliana*, «Phytopathology», 90, pp. 1233-1238.
- DOI Y., TERANAKA M., YORA K. AND ASUYAMA H. (1967): *Mycoplasma or PLT group like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or pawlonia witches' broom*, «Annals of the Phytopathological Society Japan», 33, pp. 259-266.
- DOMIER L.L., STEINLAGE T.A., HOBBS H.A., WANG Y., HERRERA-RODRIGUEZ G., HAUDENSHIELD J.S., MCCOPPIN N.K. AND HARTMAN G.L. (2007): *Similarities in seed and aphid transmission among Soybean mosaic virus isolates*, «Plant Disease», 91, pp. 546-550.

- GALLITELLI D., MASCIA T. (2009): *Virosi*, in Renzo Angelini, Nicola Calabrese, Ivan Ponti, *Coltura & Cultura: Il Carciofo*, pp. 232-245, Bologna, ART Servizi editoriali.
- GENOVÉS A., NAVARRO J.A. AND PALLÁS V. (2006): *Functional analysis of the five melon necrotic spot virus genome-encoded proteins*, «Journal of General Virology», 87, pp. 2371-2380.
- GUERRI J., PINA J.A., VIVES M.C., NAVARRO L. AND MORENO P. (2004): *Seed Transmission of Citrus leaf blotch virus: Implications in Quarantine and Certification Programs*, «Plant Disease», 88, p. 906.3.
- HARPER G., HULL R., LOCKHART B. AND OLSZEWSKI N. (2002): *Viral sequences integrated into plant genomes*, «Annual Review of Phytopathology», 40, pp. 119-136.
- HIEBERT E., TREMAINE J.H. AND RONALD W.P. (1984): *The effect of limited proteolysis on the amino acid composition of five potyviruses and on the serological reaction and peptide map of the tobacco etch capsid protein*, «Phytopathology», 74, pp. 4114-416.
- HULL R. (2002): *Matthews' Plant Virology*, 4th edn. San Diego, Academic Press.
- JARAUSCH W., SAILLARD C., DOSBA F. AND BOVÈ J.M. (1994): *Classification of phytoplasmas infecting European fruit trees*, Proc. 10th Intern. Congress of the Int. Organization on Mycoplasmaology, Bordeaux (France), July 19-26, p. 232.
- JIANG H., WEI W., SAIKI T., KAWAKITA H., WATANABE K. AND SATO M. (2004): *Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees*, «Journal General Plant Pathology», 70, pp. 168-173.
- JOHANSEN I.E., DOUGHERTY W.G. K.E. KELLER E. WANG D. AND HAMPTON R.O. (1996): *Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in Pisum sativum*, «Journal of General Virology», 77, pp. 3149-3154.
- JOHANSEN E., EDWARDS M.C. AND HAMPTON R.O. (1994): *Seed transmission of viruses: Current perspectives*, «Annual Review of Phytopathology», 32, pp. 363-386.
- JONES R.A.C. (2000): *Determining 'threshold' levels for seed-borne virus infection in seed stocks*, «Virus Research», 71, pp. 171-183.
- JONES R.A.C., COUTTS B.A., MACKIE A.E. AND DWYER G.I. (2005): *Seed transmission of Wheat streak mosaic virus shown unequivocally in wheat*, «Plant Disease», 89, pp. 1048-1050.
- KHAN A.J., BOTTI S., AL-SUBHI A.M., GUNDERSEN-RINDAL D.E. AND BERTACCINI A. (2002a): *Molecular identification of a new phytoplasma strain associated with alfalfa witches' broom in Oman*, «Phytopathology», 92 (10), pp. 1038-1047.
- KHAN A.J., BOTTI S., PALTRINIERI A.M., AL-SUBHI AND BERTACCINI A. (2002b): *Phytoplasma in alfalfa seedlings: contaminated or infected seeds?*, Proc. 12th Congress of the Int. Organization on Mycoplasmaology, Wien (Austria) July 7-12, n. 205.
- KOBAYASHI K. AND ZAMBRYSKI P. (2007): *RNA silencing and its cell-to-cell spread during Arabidopsis embryogenesis*, «Plant Journal», 50, pp. 597-604.
- KRAUSE-SAKATE R., LE GALL O., FAKHFAKH H., PEYPELUT M., MARRAKCHI M., VARVERI C., PAVAN M.A., SOUCHE S., LOT H., ZERBINI F.M. AND CANDRESSE T. (2002): *Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most*, «Phytopathology», 92, pp. 563-572.
- KUHN C.W. AND DAWSON W.O. (1973): *Southern bean mosaic virus in single and double infections in cowpea*, «Phytopathology», 63, pp. 1380-1385.
- LAPIDOT M., GUENOUNE-GELBART D., LEIBMAN D., HOLDENGREBER V., DAVIDOVITZ M., MACHBASH Z., KLIEMAN-SHOVAL S., COHEN S. AND GAL-ON A. (2010): *Pelargonium zonate spot virus is transmitted vertically via seed and pollen in tomato*, «Phytopathology», 100, pp. 798-804.

- LI F. AND DING S.W. (2006): *Virus Counterdefense: Diverse Strategies for Evading the RNA-Silencing Immunity*, «Annual Review in Microbiology», 60, pp. 503-531.
- LIMBERK J AND ULRYCHOVA M. (1972): *Vivipary in fruits of tomato plants infected with a mycoplasma disease - Potato witches' broom*, «Phytopathologische Zeitschrift», 73, pp. 227-234.
- MANDAHAR C.L., GILLS P.S.: *The epidemiological role of pollen transmission of viruses*, «Journal of Plant Disease Protection», 91, pp. 246-249.
- MASCIA T., PRIGIGALLO I., GALLITELLI D. (2009): *Artichoke italian latent virus and RNA silencing: implications in sanitation schemes of nepovirus infected plants*, Proc. XV Convegno annuale della Società Italiana di Patologia Vegetale, Locorotondo (BA), 28 ottobre-1 novembre 2009, p. 64.
- MATZKE M.A., PRIMIG M., TRNOVSKY J., MATZKE A.J.M. (1989): *Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants*, «EMBO Journal», 8, pp. 643-49.
- MAULE A.J. AND WANG D.W. (1996): *Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity*, «Trends in Microbiology», 4, pp. 153-158.
- MAURY Y., DUBY C. AND KHETARPAL R.K. (1998): *Seed certification for viruses*, in *Control of Plant Virus diseases*, Khetarpal R.K., Koganezawa and Hadidi A. (Eds). APS Press, St. Paul, MN, pp. 237-248.
- MINK G.I. (1993): *Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids*, «Annual Review of Phytopathology», 31, pp. 375-402.
- NAPOLI C., LEMIEUX C., JORGENSEN R. (1990): *Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans*, «Plant Cell», 2, pp. 279-89.
- PAPANICE M.A., BOTTALICO G., MASCIA T., DI FRANCO A., GALLITELLI D. (2009): *Virosi del carciofo, possibilità di risanamento e vivaismo: lo stato dell'arte*, «Protezione delle Colture», 5, 2009, pp. 26-30.
- PATHIPANAWAT W., JONES R.A.C. AND SIVASITHAMPARAM K. (1997): *Factors influencing transmission of alfalfa mosaic virus through seed of annual medics (Medicago spp.) and the genetic control of seed transmission rate*, «Australian Journal of Agriculture Research», 48, pp. 989-997.
- RATCLIFF F., HARRISON B.D., BAULCOMBE D. (1997): *A similarity between viral defense and gene silencing in plants*, «Science», 276, pp. 1558-60.
- ROBERTS I.M., WANG D., THOMAS C.L., AND MAULE A.J. (2003): *Pea seed-borne mosaic virus seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance*, «Protoplasma», 222, pp. 31-43.
- SALDARELLI P., BARBAROSSA L., GRIECO F., GALLITELLI D. (1996): *Digoxigenin-labelled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy*, «Plant Disease», 80, pp. 1343-1346.
- SANTOVITO E., MASCIA T. AND GALLITELLI D. (2010): *Unravelling the mechanism(s) of Artichoke italian latent virus entry in plant meristems*, Atti 54th Annual Congress of the Italian Society of agriculture genetics, Matera 27-30 settembre 2010.
- SAPONARI M., SAVINO V., MARTELLI G.P. (2002): *Seed transmission in olive of two olive-infecting viruses*, «Journal of Plant Pathology», 84, p. 167.
- SIDDIQUI S.A., SARMIENTO C., KIISMA M., KOIVUMAKI S., LEMMETTY A., TRUVE E. AND LEHTO K. (2008a): *Effects of viral silencing suppressors on tobacco ringspot virus infection in two Nicotiana species*, «Journal of General Virology», 89, pp. 1502-1508.

- SIDDIQUI S.A., SARMIENTO C., TRUVE E., LEHTO H. & LEHTO K. (2008): *Phenotypes and functional effects caused by various viral RNA silencing suppressors in transgenic Nicotiana benthamiana and N. tabacum*, «Molecular Plant Microbe Interactions», 21, pp. 178-187.
- WANG D., MAULE A.J. (1992): *Early embryo invasion is a determinant in the seed transmission of pea seed-borne mosaic virus in pea*, «Journal of General Virology», 73, pp. 1615-1620.
- WANG D., MAULE A.J. (1994): *A model for seed transmission of a plant virus: genetic and structural analyses of pea embryo invasion by pea seed-borne mosaic virus*, «Plant Cell», 6, pp. 777-787.
- WANG D.W. AND MAULE A.J. (1997): *Contrasting patterns in the spread of two seed-borne viruses in pea embryos*, «Plant Journal», 11, pp. 1333-1340.
- WANG D.W., MACFARLANE S.A. & MAULE A.J. (1997): *Viral determinants of pea early browning virus seed transmission in pea*, «Virology», 234, pp. 112-117.
- YAMAGISHI N., YOSHIKAWA N. (2009): *Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with Apple latent spherical virus vectors*, «Plant Molecular Biology», 71, pp. 15-24.

Nematodi fitoparassiti trasmessi per seme

I. INTRODUZIONE

I nematodi fitoparassiti, sebbene rappresentino solo circa il 15% del totale delle specie note di nematodi, rivestono un notevole interesse socio-economico per il loro impatto nel settore agro-alimentare, in quanto responsabili di specifiche patologie che sono la causa di perdite di raccolto, su scala mondiale, stimate annualmente tra il 10 e il 15% (Sasser and Freckman, 1987). Essi attaccano ogni tipo di pianta, sviluppando specifiche relazioni parassitarie a danno dei vari organi dell'ospite (radici, bulbi, steli, foglie, fiori e semi), che vanno dal semplice ectoparassitismo occasionale, fino alle complesse interazioni pianta-patogeno tipiche dell'endoparassitismo sedentario. I nematodi fitoparassiti compiono il loro ciclo biologico nei tessuti vegetali o nel terreno e si diffondono principalmente con terreno e materiale di propagazione infestati.

Particolare interesse nel gruppo dei parassiti delle piante rivestono quelli che si diffondono attraverso il seme. Circa una dozzina di specie, appartenenti a otto distinti generi, sono in grado di arrecare danni, talora gravi, ai semi e alle piante agronomicamente importanti. Per ognuna di esse, vengono fornite informazioni sulla distribuzione geografica, sulla gamma degli ospiti principali e secondari, sulla sintomatologia e i danni causati, sul ciclo biologico, sui principali caratteri morfo-diagnostici, fornendo infine alcune appropriate e aggiornate informazioni sulle strategie di controllo.

* CNR - Istituto per la Protezione delle Piante (IPP), U.O.S. di Bari

2. PROCESSI DI TRASMISSIONE E METODI DI ESTRAZIONE DAI SEMI O DAI TUBERI

Nei vegetali o prodotti vegetali non trasformati i nematodi fitoparassiti (appartenenti al gruppo degli endo-parassiti sedentari) si insediano durante una determinata fase del loro ciclo di sviluppo in diverse parti della pianta ospite (radici, fusti, bulbi, *tuberi*, steli, foglie, gemme e *semi*). La loro disseminazione quindi può avvenire principalmente per infezione dell'embrione (*trasmissione embrionale*), o per contaminazione della superficie e/o dei tessuti dei tuberi da seme (*trasmissione non embrionale*) e possono essere estratti mediante tecniche di laboratorio di routine (omogeneizzazione, incubazione, centrifugazione o da esame microscopico diretto sul materiale vegetale).

In tabella 1, vengono elencate le diverse specie trattate e, per ognuna di esse, sinteticamente riportate le piante ospiti e i mezzi di disseminazione/diffusione.

Per ciascuna delle specie elencate in tabella 1 vengono di seguito schematicamente fornite informazioni specifiche relative alla morfo-biologia, alla distribuzione e importanza economica, accompagnate da illustrazioni significative sulla sintomatologia patologica.

SPECIE	OSPITE PRINCIPALE	VIE DI DISSEMINAZIONE	DIFFUSIONE
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	Riso	Semi di riso	trasmissione embrionale
<i>Anguina tritici</i>	Grano, orzo, altri cereali	Semi di cereali	trasmissione embrionale
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Fava, trifoglio, veccia, erba medica, altre leguminose, bulbilli di aglio e bulbi vari	Semi di fava	trasmissione embrionale
<i>Ditylenchus destructor</i>	Batata, patata	Trasporto con i tuberi	non embrionale
<i>Globodera pallida</i>	Patata	Trasporto con i tuberi	non embrionale
<i>Globodera rostochiensis</i>	Patata	Trasporto con i tuberi	non embrionale
<i>Meloidogyne</i> spp.: <i>M. fallax</i> <i>M. chitwoodi</i> <i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i> <i>M. arenaria</i> <i>M. hapla</i>	Patata	Trasporto con i tuberi	non embrionale
<i>Nacobbus aberrans</i>	Patata	Trasporto con i tuberi	non embrionale

Tab. 1. Alcuni casi di diffusione di nematodi endoparassiti attraverso i semi utilizzati per la propagazione dei loro ospiti principali

3. DESCRIZIONE DELLE SPECIE

3.1 «*Aphelenchoides besseyi*» Christie

3.1.1 Nome comune e sintomatologia

Nematode delle foglie del riso, o dell'apice bianco del riso.

3.1.2 Ospiti

Ospiti principali di questo nematode sono il riso (*Oryza sativa* L.) e la fragola (*Fragaria chiloensis* Dutch.). Vovlas e Lamberti (1973) e Fortuner and Williams (1975) hanno riportato un elenco di specie di piante ospiti appartenenti a oltre 35 generi, molte delle quali piante da fiore e ornamentali.

3.1.3 Distribuzione geografica

Presente in molti Paesi ove si coltiva il riso (Europa, Africa, Asia, Nord-, Cen-



Fig. 1 A) *Pannocchia con cariossidi annerite* (da: Tacconi e Ambrogioni, 1995, modificata);
B) *Foglie di pianta di riso con apice bianco* (da: Cotroneo e Moretti, 2003, modificata)

tro e Sud America e Oceania) in particolare in Giappone e negli Stati Uniti. In Italia il nematode è stato rinvenuto su semente (Tacconi, 1996) e in campo (Moletti, 1997). Ad oggi il parassita è presente nelle regioni dove la coltura del riso è maggiormente diffusa (Lombardia, Piemonte, Emilia Romagna e Veneto).

3.1.4 Ciclo Biologico

Il nematode si diffonde principalmente attraverso il seme e il suo ciclo biologico si può completare in una decina di giorni alla temperatura ottimale di 30 °C, mentre il numero delle generazioni annuali varia in rapporto alle temperature. Il nematode generalmente si trova sotto le glume che avvolgono il seme, in stato di quiescenza. Quando la cariosside infestata cade nel terreno, il nematode si riattiva, si porta verso i punti di crescita della pianta fino a insediarsi nella spighetta, prima della fioritura. Con la maturazione della cariosside, la riproduzione del nematode si attenua e solo le larve di 3° stadio continuano a svilupparsi fino a quando il seme, maturando, non si è indurito. I nematodi aggregati nella cariosside matura si disidratano ed entrano in anabiosi, stato in cui possono sopravvivere a lungo (da otto mesi a tre anni) dopo la raccolta del seme.

3.1.5 Breve descrizione morfo-biometrica

È un nematode dal corpo sottile, con tutti gli stadi di sviluppo vermiformi che si adattano all'endoparassitismo migratore. Gli adulti hanno lunghezze del corpo comprese tra 0,44-0,84 mm. Le femmine sono caratterizzate da uno stiletto esile, lungo 9-15 µm, e da una regione cefalica ben separata e sporgente dal resto del corpo. Il poro escretore è situato in posizione leggermente anteriore all'anello nervoso; la spermateca è di forma ovale e piena di spermatozoi; i campi laterali hanno quattro incisure longitudinali. La vulva è posizionata al 68-70 % della lunghezza totale del corpo. Il sacco post-uterino è poco sviluppato e stretto, circa 1/3 della distanza vulva-ano. La coda è conica, sottile e termina con un mucrone provvisto di 3-4 minuti processi spinosi.

Il maschio è simile alla femmina e si distingue per lo stiletto più breve (9-12,5 µm) e, soprattutto, per la coda fortemente ricurva, mucronata (2-4 processi terminali) e provvista di spicole, tipicamente a forma di spina di rosa, che sono prive del processo dorsale nella loro parte prossimale.

3.1.6 Importanza economica

Aphelenchoides besseyi è riconosciuto come un'avversità del riso a livello mondiale. Esso è iscritto nelle liste da quarantena dell'UE e di molti altri paesi ed è regolamentato dal D.Lgs. 19/08/2005 n. 214 e successive integrazioni, per cui la semente deve esserne esente.

Le prime segnalazioni di danni causati da questo nematode risalgono ai primi anni del secolo scorso; oggi tuttavia, il miglioramento delle tecniche colturali, tra cui l'uso di cultivar resistenti, ne hanno ridotto l'importanza, almeno nei paesi dell'UE. L'entità del danno economico che questo fitofago è in grado di causare varia a seconda della varietà di riso, dell'andamento climatico e delle pratiche agronomiche impiegate. Stime di perdite di raccolto documentate, in paesi quali il Giappone e gli Stati Uniti, variano rispettivamente dal 15 al 47 % e dal 17 al 54 %.

3.1.7 Difesa

La lotta contro questo fitoparassita può essere effettuata principalmente con mezzi agronomici, e fisici, mentre sono improponibili mezzi di lotta chimica.

Tra i primi, si consiglia la semina in acqua, da preferire a quella in asciutta, poiché in quest'ultimo caso la sopravvivenza del nematode nel terreno è molto maggiore. Sono utili anche le semine anticipate e l'impiego di cultivar resistenti. Tra i mezzi fisici, si è dimostrato assai efficace l'immersione dei semi in acqua calda a 52-53°C per una decina di minuti.

3.2 «*Anguina tritici*» (Steinbuch, 1799) Chitwood, 1935

3.2.1 Nome comune

Nematode delle “galle” delle sementi e delle foglie di cereali.

3.2.2 Ospiti

Gli ospiti principali sono: la segale (*Secale cereale*) e il frumento (*Triticum* spp.). L'orzo (*Hordeum vulgare*) è considerato un ospite secondario.



Fig. 2 Cariossidi di grano (A) e di orzo (B) annerite e deformate in comparazione con i semi non infetti

3.2.3 Distribuzione geografica

La specie è cosmopolita, anche se è ormai rara in Europa e nei paesi sviluppati in genere, grazie ai moderni sistemi colturali, la trebbiatura e all'adozione di semente di alta qualità. Si rinviene invece frequentemente nei paesi africani che si affacciano sul Mediterraneo, in Medio Oriente e India.

3.2.4 Brevi cenni di biologia

La dispersione di questa specie avviene attraverso le cariossidi infette (fig. 2, 3A) cadute sul terreno, dalle quali emergono le larve che invadono le nuove piantine appena germinate, preferendo le giovani foglie. Sui tessuti fogliari si nutrono da ectoparassiti, provocando distorsioni e increspamenti superficiali. Successivamente, si trasferiscono ai boccioli fiorali, al momento della formazione della gemma, stimolando la formazione di *galle* nei tessuti floreali mentre si completa lo sviluppo del nematode all'interno della cariosside. Le femmine del nematode che si sviluppano all'interno delle galle depositano le uova dalle quali fuoriescono le larve di seconda età, che rimangono racchiuse nella galla stessa, perpetuando l'infezione negli anni successivi. I nematodi aggregati nella cariosside matura si disidratano ed entrano in quiescenza, stato in cui possono sopravvivere fino a 15-20 anni.

3.2.5 Breve descrizione morfo-biometrica

Adulti con corpo obeso, lungo da 2 a 4 mm, con femmine quasi immo-

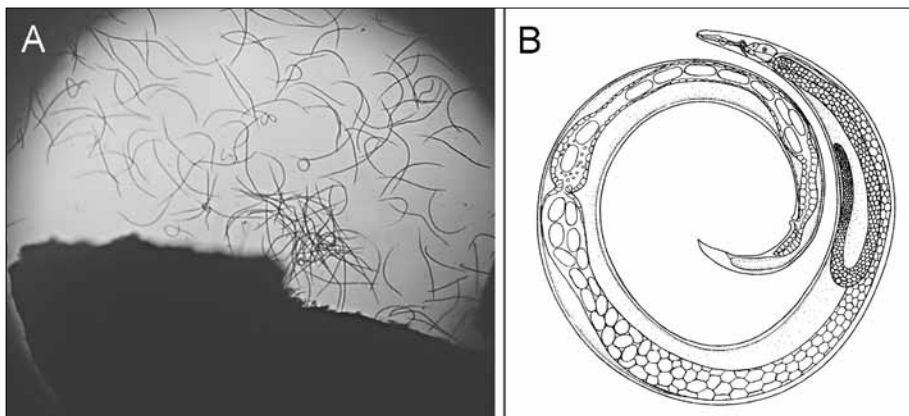


Fig. 3 A) Cariosside di frumento che, dopo incubazione, ha rilasciato numerosi esemplari di *Anguina*; B) Femmina di *Anguina tritici* (da Southey, C.I.H.-C.A.B. 1972, modificato).

bili, spirali (fig. 3B) e maschi più attivi. Regione labiale appiattita e provvista di un breve stiletto (8-10 μm); faringe con bulbo basale ben sviluppato, non sovrapposto all'intestino. L'interno del corpo è quasi interamente occupato dalla gonade anteriore, con l'ovario flesso due o più volte; la gonade posteriore è ridotta a un sacco post-uterino. La vulva è in posizione terminale (80 % del corpo in media); la coda è conica, con l'estremità arrotondata.

Il maschio è simile alla femmina, dalla quale differisce per la presenza delle spicole, robuste e arcuate, nella regione caudale che è provvista di "bursa".

Le larve sono snelle e sottili, lunghe da 0,8 a 1,0 mm.

3.2.6 Mezzi di propagazione e dispersione

La principale via di dispersione sono i semi, all'interno dei quali vi sono le larve infettive (larve di seconda età), che possono rimanere in quiescenza anche a lungo e ritornare vitali quando le condizioni ambientali diventano favorevoli.

3.2.7 Importanza economica

Questo fitoparassita causa perdite di raccolto di un certo rilievo solo in Paesi in via di sviluppo, ove le pratiche colturali arretrate e l'uso di semente di scar-

sa qualità è ancora diffuso. Esso è tuttavia sottoposto ancora a severi controlli e a quarantena anche in diversi Paesi di Europa e Stati Uniti.

3.2.8 Difesa

Il metodo più efficace di lotta contro questo fitoparassita consiste nell'uso di seme sano, o selezionato con mezzi moderni, che eliminino le galle e i semi infetti.

3.3 «*Ditylenchus dipsaci*» (Kühn) Filipjev

3.3.1 Nome comune

Nematode dei bulbi e degli steli.

3.3.2 Ospiti

Ditylenchus dipsaci attacca oltre 450 differenti specie vegetali, tra spontanee e coltivate. Tra le colture economicamente importanti, la cui diffusione avviene attraverso i semi, si possono annoverare la fava (*Vicia faba*), il trifoglio (*Trifolium* spp.), l'aglio (*Allium sativum*), la cipolla (*Allium cepa*) e l'erba medica (*Medicago sativa*).

3.3.3 Distribuzione geografica

Ha un'ampia diffusione, essendo presente in Europa, Africa, Asia, Australia, Nord, Centro e Sud America.

3.3.4 Ciclo biologico e parassitismo

Ditylenchus dipsaci è un endoparassita migratore che attacca vari organi epigei della pianta ospite (steli, foglie fiori e semi), ma non le radici (eccetto quelle di riserva). Il nematode migra attraverso i tessuti, perfora le pareti cellulari creando necrosi e cavità visibili esternamente come tumefazioni e iperplasie. Nei semi il nematode si localizza generalmente sotto il tegumento, nell'ilo.

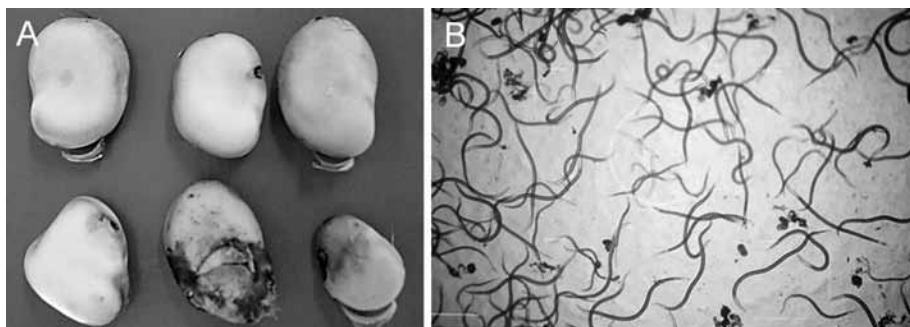


Fig. 4 A) Semi di fava infestati (sotto) in comparazione con quelli sani (sopra); B) popolazione di *D. dipsaci* in sospensione acquosa

3.3.5 Vie di diffusione

Questa specie può essere introdotta e diffusa con i semi o i bulbi usati per la propagazione.

3.3.6 Breve descrizione morfo-biometrica

Specie con riproduzione anfimittica, vermiforme in tutti gli stadi di sviluppo, con adulti lunghi 1,0-1,4 mm, provvisti di un piccolo ma robusto stiletto di 10-12 μm di lunghezza; regione cefalica, caratteristicamente tronca e appiattita. Altri parametri morfologici che caratterizzano questa specie sono il lobo ghiandolare faringeo che si sovrappone leggermente al primo tratto dell'intestino, le 4 linee nei campi laterali, la coda conica, appuntita e la lunghezza del sacco uterino post-vulvare della femmina pari alla metà circa la distanza vulva-ano.

Di questa specie si conoscono numerose razze biologiche che attualmente, mediante studi morfologici e molecolari, si sta cercando di elevare a rango di specie distinte.

3.3.7 Difesa

Occorre un accurato controllo fitosanitario delle sementi destinate alla riproduzione per difendere le piante dagli attacchi precoci di questo nematode che avvengono già durante la germinazione del seme.

3.4 «*Ditylenchus destructor*» Thorne

3.4.1 Nome comune

Nematode del marciume della patata, o nematode del tubero di patata.

3.4.2 Caratteristiche tassonomiche

Fino alla prima metà del secolo scorso, *Ditylenchus destructor* era considerato una razza biologica di *D. dipsaci*. Le due specie tuttavia, pur essendo assai simili tra loro e avendo numerose piante ospiti comuni, differiscono nettamente per il loro comportamento biologico-parassitario: la prima attacca gli organi ipogei delle piante, mentre la seconda soprattutto quelli epigei.

3.4.3 Ospiti

La patata (*Solanum tuberosum* L.) è l'ospite principale. Ospiti meno frequenti sono le piante da fiore bulbose, rizomatose e tuberose in generale. Si nutre inoltre di ife fungine di numerosi funghi coltivati.

3.4.4 Distribuzione geografica

La specie è presente in Europa, Africa, Asia, Australia e in Nord-, Centro e Sud America.

3.4.5 Vie di diffusione

Il nematode può essere introdotto e diffuso con i tuberi di patata usati per la propagazione.

3.4.6 Ciclo biologico

Ditylenchus destructor è particolarmente diffuso nelle aree temperate ed è un endoparassita migratore. Nella patata, le larve penetrano nei tuberi attraverso

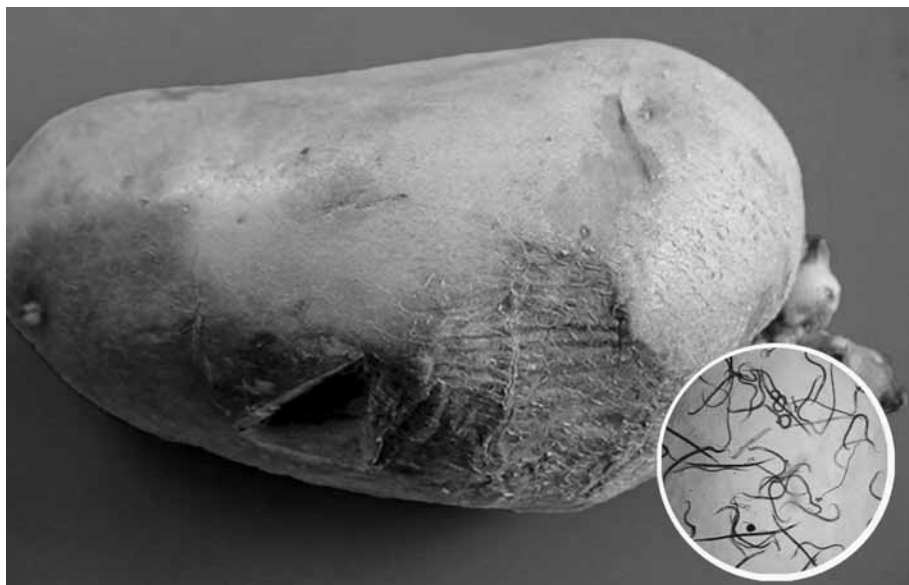


Fig. 5 Tubero di patata con sintomi di attacco da *Ditylenchus destructor* (nell'inserto)

le gemme e le lenticelle e si moltiplicano attivamente nei tessuti meristemati- ci. L'attività trofica del nematode porta la patata ad apparire raggrinzita, con fessure e rugosità in superficie. In casi di infestazioni gravi, il tubero si svuota ed emana un forte odore poiché subentrano fenomeni di decomposizione.

3.4.7 Breve descrizione morfo-biometrica

La morfologia degli adulti è molto simile a quella di *Ditylenchus dipsaci*. Piccole differenze rispetto a quest'ultimo riguardano la lunghezza del corpo, con una variazione più ampia ($L = 0,69-1,85$ mm), le sei linee nei campi laterali, la coda molto acuta e la lunghezza del sacco uterino post-vulvare della femmina pari $\frac{3}{4}$ della distanza vulva-ano.

3.4.8 Difesa

Occorre un accurato controllo fitosanitario preventivo dei tuberi destinati alla riproduzione per evitare l'ulteriore diffusione del fitofago, suggerendo

l'immagazzinamento dei tuberi in ambiente asciutto che limiti la marcescenza e quindi la diffusione del parassita dai tuberi infestati a quelli sani.

3.4.9 Importanza economica

Nelle aree temperate, è considerato il fitofago più importante dopo i nematodi cisticoli. In Europa, i danni da questo nematode sono stati segnalati nei paesi più settentrionali, con clima più freddo e umido.

3.5 «*Globodera rostochiensis*» (Wollenweber) Behrens

3.5.1 Nome comune

Nematode dorato della patata.

3.5.2 Ospiti

L'ospite principale è la patata (*Solanum tuberosum* L.) e vari ibridi, pomodoro e melanzana.

Attacca anche solanacee coltivate e spontanee di vari generi, ma soprattutto *Solanum*.

3.5.3 Distribuzione geografica

Trasportata con i tuberi di patata e il terreno a essi aderente, si è diffusa dalle regioni delle Ande del sud America in tutto il mondo. La specie introdotta in Europa è stata ulteriormente disseminata attraverso i tuberi da riproduzione.

3.5.4 Ciclo biologico

La specie è anfimitica ed è caratterizzata da un accentuato dimorfismo sessuale. Il maschio adulto è vermiforme e libero di muoversi nel terreno mentre la femmina è globosa e sedentaria. Dalle uova racchiuse nelle cisti rilasciate nel terreno alla conclusione del ciclo di sviluppo, emergono le larve infestanti pronte a

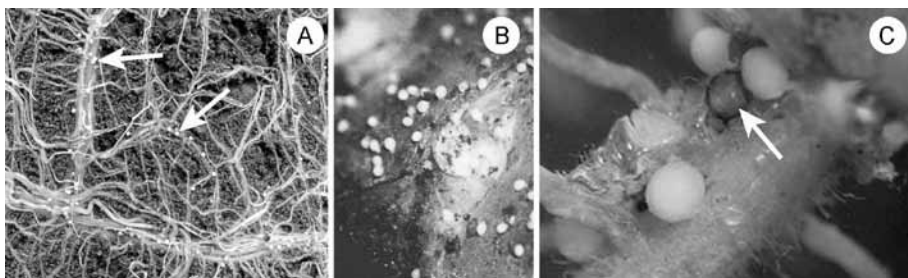


Fig. 6 A e B) Superficie radicale (A) e di tubero (B) con numerose femmine di *Globodera* sp. infisse nei tessuti epidermici. C) Femmine globose e cisti (freccia) sulla superficie radicale

iniziare il parassitismo nei tessuti radicali e/o nei tuberi in formazione.

La temperatura ottimale per lo sviluppo del nematode è tra i 15-20 °C.

3.5.5 Vie di diffusione

Questa specie può essere introdotta e diffusa con i tuberi di patata usati per la propagazione.

3.5.6 Difesa

La lotta contro questa specie di nematode cisticolo può essere attuata con l'applicazione di mezzi chimici e agronomici.

3.6 «*Globodera pallida*» (Stone) Behrens

3.6.1 Nome comune

Nematode cisticolo bianco della patata.

3.6.2 Ospiti

La gamma di piante ospiti di *G. pallida* coincide con quella di *G. rostochiensis*. L'ospite principale è la patata (*Solanum tuberosum*), mentre su pomodoro e melanzana il suo tasso di riproduzione è minore.

3.6.3 Distribuzione geografica

La specie è ubiquitaria, anche se la sua diffusione è meno nota rispetto a quella di *G. rostochiensis* in quanto è stata distinta tassonomicamente in epoca più recente (1973).

3.6.4 Ciclo biologico

La specie è anfimittica e ha un ciclo biologico del tutto analogo a quello della *G. rostochiensis*. A differenza di quest'ultima, la temperatura ottimale per il suo sviluppo è di 10-18 °C, ma sopporta anche temperature attorno i 25 °C.

3.6.5 Vie di diffusione

Questa specie può essere introdotta e diffusa con i tuberi di patata usati per la propagazione.

3.6.6 Difesa

La lotta contro questa specie del nematode cistico può essere attuata con l'applicazione di mezzi chimici e agronomici.

3.7 «*Nacobbus aberrans*» (Thorne) Thorne & Allen

3.7.1 Nome comune

Falso nematode galligeno.

3.7.2 Ospiti

Questa specie è ospite di una vasta gamma di piante sia coltivate che spontanee. Barbabietola da zucchero, patata, peperone e melanzana sono gli ospiti principali.

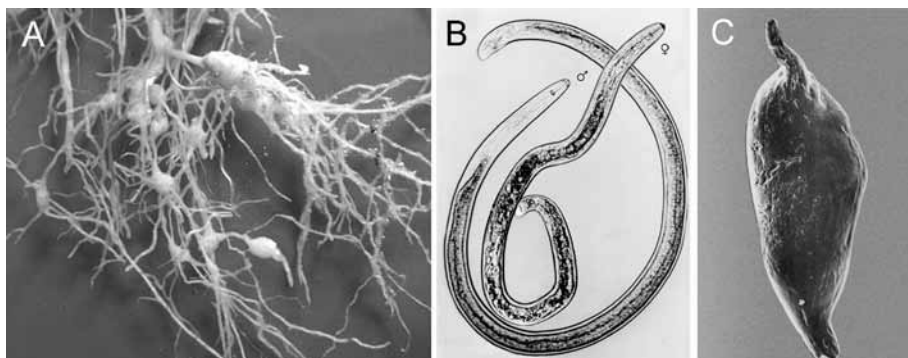


Fig. 7 A) Vistose ipertrofie (galle) radicali su radici di pomodoro indotte da *Nacobbus*; B) Femmina immatura e maschio; C) Femmina matura

3.7.3 Importanza economica

Questa specie è uno dei principali fitoparassiti in America latina. I danni sono considerati catastrofici quando intervengono contemporaneamente infestazioni di *Nacobbus*, *Meloidogyne*, *Globodera* e infezioni di *Spongospora subterranea*.

3.7.4 Vie di diffusione

Questa specie può essere introdotta e diffusa con i tuberi di patata usati per la propagazione.

3.7.5 Difesa

La lotta contro questa specie può essere attuata con l'applicazione di mezzi chimici (geodisinfestanti ad azione fumigante) e agronomici. È consigliabile inoltre l'immersione dei tuberi in acqua calda o in sospensioni di nematocidi.

3.8 «*Meloidogyne*» spp. («*M. arenaria*», «*M. chitwoodi*», «*M. fallax*», «*M. incognita*», «*M. javanica*»)

3.8.1 Nome comune

Nematodi galligeni.

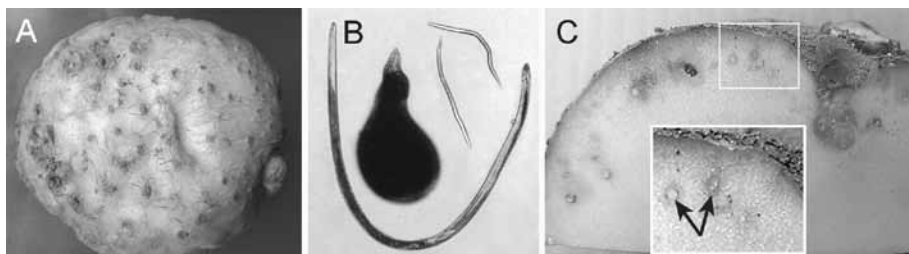


Fig. 8 A) Formazione di galle sulla superficie di un tubero B) Stadi di sviluppo (da sinistra: maschio, femmina e larve) di *Meloidogyne* sp. C) Sezione trasversale di un tubero mostrante vari siti trofici (indicati con le frecce nel riquadro) del nematode

3.8.2 Note tassonomiche

Delle oltre 80 specie descritte, quelle di riconosciuta patogenicità per la patata sono: *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. incognita* e *M. javanica*. La loro identificazione può avvenire attraverso l'esame microscopico di alcuni caratteri morfo-diagnostici, e in modo particolare della regione anteriore e posteriore del corpo della femmina, che variano a seconda della specie. L'andamento delle pieghe cuticolari dell'area vulvare disegna una impronta tipica per ogni specie, mentre il rapporto EP/ST (distanza del poro escretore dall'estremità anteriore diviso la lunghezza dello stiletto) fornisce un valore molto stabile e quindi utile ai fini diagnostici. In aggiunta ai metodi di identificazione tradizionali, le moderne analisi molecolari forniscono un indispensabile supporto alla caratterizzazione delle specie.

3.8.3 Morfologia

Queste specie sono anfimittiche, caratterizzate da un accentuato dimorfismo sessuale, con femmine globose di dimensioni comprese tra 0,5 e 1,3 mm di lunghezza per 0,4-0,7 mm di larghezza e maschi vermiformi, lunghi e sottili. Il corpo della femmina è perlaceo, con la regione anteriore (collo) allungata a forma di fiasco e una parte posteriore emisferica, ove si aprono la vulva e l'ano, caratteristicamente circondati da pieghe cuticolari (impronta perineale). All'estremità anteriore vi è lo stiletto, lungo solitamente 14-15 μm , con minuti bottoni basali. Il corpo è quasi interamente occupato dalle due gonadi, con ovari estesi e convoluti. In prossimità della vulva, ci sono sei grandi ghiandole rettali, responsabili della produzione della *matrice gelatinosa* che racchiude e protegge le uova deposte.

Il maschio è lungo in genere da 1 a 2 mm, vermiforme, con una regione cefalica nettamente separata dal resto del corpo. Lo stiletto è lungo 18-24 μm per la maggior parte delle specie. L'estremità caudale è breve, da conica a emisferica e include la cloaca, le spicole e il gubernaculum. La coda è priva di espansioni cuticolari (velum o bursa).

Le larve di seconda età sono lunghe solitamente 0,3-0,6 mm. Il corpo è sottile, con uno stiletto delicato e termina con una coda conica con estremità finemente arrotondata, il cui terzo inferiore è solitamente trasparente (parte jalina) e la sua estensione ha valore diagnostico.

3.8.4 Ciclo vitale e parassitismo

La larva di secondo stadio che emerge dall'uovo (fig. 8B) migra nel terreno ed è importante in quanto rappresenta lo stadio infettivo, che va alla ricerca delle radici e del tubero in formazione. Penetrando all'interno del parenchima corticale, si fissa nei tessuti vascolari e, una volta scelto il sito trofico, conduce vita parassitaria totalmente sedentaria, alimentandosi del contenuto delle "cellule nutrici". La femmina si sviluppa quindi all'interno della galla, costituita dalle cellule nutrici e dalle numerose cellule iperplastiche circostanti. In condizioni ottimali il ciclo biologico si completa in 28-35 giorni a una temperatura ambientale di circa 30 °C. Ogni femmina può deporre dalle 100 alle 800 uova.

3.8.5 Vie di diffusione

Queste specie possono essere introdotte e diffuse con i tuberi di patata infetti usati per la propagazione.

3.8.6 Importanza economica

Il gruppo dei nematodi "galligeni", appartenenti al genere *Meloidogyne*, è largamente diffuso e con elevata e riconosciuta patogenicità, tanto che si stimano annualmente perdite di raccolto a loro riconducibili superiori al 20% della produzione mondiale. Il nome di nematodi "galligeni", assegnato a questi parassiti, deriva dalla loro caratteristica reazione che inducono nelle piante da essi invase, principalmente a danno dell'apparato radicale. Diversa invece è la sintomatologia dell'infezione dei tuberi della patata (fig. 8A, C).

3.8.7 Difesa

I metodi di lotta più appropriati contro i nematodi galligeni della patata sono i mezzi agronomici e chimici. Tra i primi, si raccomanda una accurata selezione fitosanitaria dei tuberi utilizzati per la propagazione, nonché una accurata eliminazione delle erbe infestanti, al fine di evitare la sopravvivenza del nematode nel terreno.

RIASSUNTO

I nematodi fitoparassiti sono diffusi in ogni ambiente del nostro pianeta e hanno sviluppato modalità specifiche di vita parassitaria nei confronti di specie vegetali, poiché tutte le piante sono suscettibili agli attacchi da parte di una o più specie di essi. I nematodi fitoparassiti sono responsabili di specifiche patologie in quando sono causa di perdite di raccolto da effetti diretti su parti e organi di piante come radici, steli, foglie e semi. Nel presente articolo sono prese in esame alcune specie, quali *Aphelenchoides besseyi*, *Anguina tritici*, *Ditylenchus dipsaci*, *D. destructor*, *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Meloidogyne* spp. (*M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. incognita*, *M. javanica*) e *Nacobbus aberrans* per le quali è stata riconosciuta una certa patogenicità, mentre possiedono la comune caratteristica di essere disseminate con i semi utilizzati per la propagazione delle specie vegetali.

ABSTRACT

Plant parasitic nematodes dispersed by seeds. Plant parasitic nematodes are widespread in every area of our planet and have developed typical parasitism to plant species, since all plants are susceptible of attacks by one or more species of them. Plant parasitic nematodes are responsible for specific diseases causing crop losses by direct effects on plant parts and organs, such as roots, stems, leaves and seeds. In this article are examined some species, such as *Aphelenchoides besseyi*, *Anguina tritici*, *Ditylenchus dipsaci*, *D. destructor*, *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Meloidogyne* spp. (*M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. incognita*, *M. javanica*) and *Nacobbus aberrans* of which the pathogenicity has been demonstrated, while possessing the common characteristic of being spread by the seeds used for propagation of plant species. For all them, general information (listed as tabs) is given on geographical distribution, host range of economic interest, symptoms and damage, life cycle, main diagnostic morphological characters. Finally, information are also given on appropriate control strategies.

BIBLIOGRAFIA

COTRONEO A., MORETTI F. (2003): *Il nematode del riso* *Aphelenchoides besseyi*, in Schede di Fitopatologia, supplemento al n. 35/03 dei «Quaderni della Regione Piemonte – Agricoltura», Ed. Regione Piemonte, 4 pp.

- FORTUNER R., WILLIAMS, O.K.J. (1975): *Review of the literature on Aphelenchoides besseyi*, Chritie 1942, the nematode causing "white tip" disease in rice, *Helminthological abstracts*, Series B., «Plant Nematology», 44, pp. 1-38.
- MOLETTI M. (1997): *White tip: nuova malattia del riso in Italia causata dal nematode del riso Aphelenchoides besseyi*, «Informatore Agrario», 53, pp. 47-51.
- VOVLAS N., LAMBERTI F. (1973): *Aphelenchoides spp. su colture floreali nell'Italia meridionale*, «Nematologia Mediterranea», 1, pp. 141-146.
- SASSER J.N., FRECKMAN D. (1987): *A world perspective on nematology: The role of the society*, in J.A. Veech and D. W. Dickson (eds.), *Vistas on nematology*, Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, 509 pp.
- SOUTHEY J.F. (1972): *Anguina tritici*. *CIH description of plant parasitic nematodes Set 1*, No. 13, St. Albans, UK: Commonwealth Institute of Helminthology, 4 pp.
- TACCONI R., AMBROGIONI L. (1995): *Nematodi da quarantena. Lo Scarabeo*, Bologna, 191 pp.
- TACCONI R. (1996): *Rinvenimento di Radopholus similis su Maranth a makoyana e di Aphelenchoides besseyi su Oryza sativa*, «Informatore Fitopatologico», 46, pp. 40-42.

Finito di stampare in Firenze
presso la tipografia editrice Polistampa
nell'ottobre 2011