

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 épis; 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 l'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 Konsdal, 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 cultivar 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*, *Rinchosporium* 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 cariossidi 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 fitolessine. 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 (Mittra, 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 Auja, 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 (Aujla 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. ebrhartae*, *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 enniatine, 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.
- BRUINS 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 Suecia. 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_bioviversitypublications_pi1\[showUid\]=2177](http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=19&user_bioviversitypublications_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 phytodiagnosics – 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., SLIID 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., KENSALL 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): *Ustilosporae 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., Koba 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., FACCIANI 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, «Georgofili. Quaderni», 2008, VII, Firenze, pp. 1-28.
- WAALWIJK 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).