

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

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

### VIRUS

#### 1. *Da fenomeno poco studiato a paradigma*

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

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

\*\* Istituto di Virologia Vegetale del CNR, Torino

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

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

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

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

Per una esaustiva rassegna bibliografica sulla *seed-transmission* dei fitovirus si rimanda anche al sito del Consorzio Resistvir ([http://www.resistvir-db.org/docs/deliverables/WP2/WP2\\_D4\\_Seed\\_Transmission.pdf](http://www.resistvir-db.org/docs/deliverables/WP2/WP2_D4_Seed_Transmission.pdf)).

## 2. Caratteristiche biologiche

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3. *Aspetti eco-epidemiologici*

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

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



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

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

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

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

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

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

#### 4. *Possibilità d'intervento*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 5. *Acquisizioni recenti*

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

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

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

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

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



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

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

#### FITOPLASMI

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

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

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

#### RINGRAZIAMENTI

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

#### RIASSUNTO

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

#### ABSTRACT

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

## LAVORI CITATI

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

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

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



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

