

LEZIONE 27/09/2018

La patologia vegetale è importante perché sin dall'antichità malattie, insetti, roditori ed altri organismi parassiti sono stati una costante minaccia da cui proteggersi.

Cosa si intende per protezione delle piante?

Una strategia che prevede l'applicazione di misure che sono sicure per l'uomo, animali e ambiente sotto il punto di vista scientifico. Queste devono essere riconosciute appropriate e necessarie dalle autorità competenti e che siano praticate da utenti esperti.

La *protezione integrata delle piante* richiede ricerche su:

gestione dei parassiti;
 irrigazione e nutrizione nei sistemi agricoli;
 interpretazione, selezione, sviluppo e applicazione dei metodi di gestione integrata più efficaci e con il minor impatto sull'ambiente;
 indagini di tutte le misure di controllo, che sono rilevanti per i parassiti in una coltivazione;
 modalità di azione dei pesticidi;
 salute e sicurezza.

Quando si studia la protezione delle piante bisogna considerare che il danno è causato alle piante da diversi gruppi di parassiti (infestanti, insetti, funghi, virus...) e che i modelli biologici di base sono simili e le loro tipologie di danni spesso si sovrappongono. Per questo molto spesso si utilizzano approcci simili per controllare la maggior parte dei diversi gruppi di parassiti.

La protezione delle piante è un approccio multidisciplinare per avere una piena comprensione dei problemi e per sviluppare una serie di strumenti che consentano di risolvere questi problemi.

Gli studiosi delle seguenti discipline devono essere coinvolti:

- patologi, biologi: lavorano sull'identificazione di specie di parassiti per capire le loro dinamiche di popolazione e i fattori naturali che influenzano il loro sviluppo;
- agronomi: determinano l'impatto che l'attacco dei parassiti ha sulla pianta, il ruolo della tolleranza delle piante e delle strategie per compensare i danni causati;
- chimici e ingegneri: sviluppano nuovi pesticidi e bio-pesticidi e progettano tecnologie per l'applicazione di pesticidi;
- genetisti: sviluppo di tecniche di identificazione molecolare e di colture resistenti agli attacchi dei parassiti;
- esperti di tecnologia dell'informazione e della comunicazione: sviluppano supporti di identificazione online fornendo nuove tecnologie di comunicazione;
- scienziati sociali (tra cui economisti e sociologi): indagano sulla fattibilità e i risultati economici delle strategie di protezione delle piante, compresi gli aspetti politici e i vincoli alla protezione con piante migliorate.

E' importante conoscere: specie invasive e da quarantena e le organizzazioni internazionali, nazionali e regionali per la protezione delle piante.

La Convenzione internazionale per la protezione delle piante (IPPC) è stata adottata nel 1951 per gestire organismi che sono direttamente o indirettamente nocivi per le piante con lo scopo di armonizzare e promuovere delle misure di controllo dei parassiti. Quindi IPPC fornisce un quadro di riferimento per le misure contro le specie esotiche invasive in base a quanto stabilito dalla Convenzione sulla diversità biologica (CBD).

La CBD mira a conservare la diversità biologica e a proteggere gli ecosistemi, gli habitat o le specie, nel caso specifico di specie esotiche invasive.

L'IPPC cerca di proteggere le piante e i prodotti vegetali; non si limita alle piante agricole ma tutte le piante.

CBD definisce specie aliena come "una specie, sottospecie o un taxon inferiore, introdotto al di fuori della sua passata o presente distribuzione"; comprende quindi qualsiasi parte, gameti, semi, uova o propaguli di tali specie che potrebbero sopravvivere e successivamente riprodursi. Prescrive inoltre che una specie esotica invasiva è "una specie aliena la cui introduzione e/o diffusione minaccia la diversità biologica".

IPPC definisce parassita delle piante "qualsiasi specie, ceppo o biotipo di pianta, animale o agente patogeno dannoso per i vegetali o per i prodotti vegetali". Mentre un parassita di

quarantena è “un parassita di potenziale importanza economica per l’area a rischio, non ancora presente, oppure presente ma non ampiamente diffuso e ufficialmente sotto controllo”. La definizione di IPPC di un parassita di quarantena copre molto, ma non tutto, quello che è considerato come specie esotica invasiva nel quadro della CBD. Entrambe comunque intendono qualsiasi organismo che è dannoso per le piante e che ha un impatto ambientale (minaccia la diversità biologica). Dove per impatto ambientale intendono entrambe l’introduzione dell’organismo e/o la sua diffusione.

Le *specie esotiche invasive* sono state introdotte intenzionalmente (uso ornamentale o agroforestali) o accidentalmente (contaminanti o alimentazione bestiame). In alcuni casi (piante) possono ridurre il deflusso di bacini idrografici diminuendo il flusso nei torrenti e influenzando negativamente la gestione delle acque. (es. *Eichornia crassipes*)

Specie invasive aliene sono piante, animali, funghi e microrganismi che sono stati trasportati attraverso barriere ecologiche, come catene montuose, oceani a seguito dell’intervento umano. Diventando stabili in una zona fuori del loro areale naturale. Nel nuovo contesto alcune si diffondono rapidamente diventando specie esotiche invasive (IAS), causando gravi danni alla biodiversità, alla salute umana o all’economia.

Le specie esotiche invasive è stimato che costano 12 miliardi di euro l’anno (EU) per costi sanitari e salute animale; perdite di resa e di stock ittici; danni alle infrastrutture, navigabilità dei fiumi e specie protette. (*Amaranthus palmeri*, *Ambrosia trifida*...)

La Commissione europea accoglie il regolamento “Invasive Alien Species”, permettendo di bloccare la rapida crescita dei rischi per la biodiversità da specie invasive. Serve perciò ad arrestare la perdita di biodiversità in UE, impegnandosi a stabilire regole per affrontare le minacce poste da queste specie (CBD).

Il sistema si basa su un elenco di specie di interesse dell’Unione, basato su valutazioni complete del rischio e di valide prove scientifiche. La lista si concentrerà sulle specie che causano i danni più gravi.

Barriere fitosanitarie

Limitazioni al commercio internazionale per tutelare il proprio territorio e la propria agricoltura; presupposto per valorizzare il sistema agricolo nazionale; attività negoziale spesso lunga e complessa con le Autorità competenti. Nel rapporto tra CBD e IPPC in relazione alle specie esotiche invasive risulta una parziale sovrapposizione dei mandati e richiama il coinvolgimento di diverse altre organizzazioni internazionali.

Il primo e più importante è *Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS Agreement)* dell’Organizzazione Mondiale del Commercio (OMC-World Trade Organization WTO) svolge un ruolo di primo piano. L’accordo SPS stabilisce norme relative al commercio in materia di misure sanitarie e fitosanitarie. L’obiettivo principale dell’ SPS è quello di impedire ai paesi di stabilire barriere commerciali arbitrarie e ingiuste avendo ingiustificate restrizioni alle importazioni.

Accordo SPS/WTO

Minimizzare ostacoli al libero commercio internazionale; chiara giustificazione scientifica (Pest Risk Analysis-PRA); riferimento a norme, direttive o raccomandazioni internazionali.

Al fine di stabilire quali misure siano necessarie, SPS agreement si basa sul lavoro di tre organizzazioni internazionali di normazione nei settori della sicurezza alimentare, salute degli animali e salute delle piante.

L’IPPC è stata designata nell’accordo SPS come l’organizzazione internazionale rilevante per il settore fitosanitario. Comporta quindi che le regole commerciali per i parassiti delle piante che sono anche specie esotiche invasive devono rispettare anche l’SPS agreement.

I paesi che stabiliscono i requisiti fitosanitari per l’importazione dovranno rispettare non solo le disposizioni IPPC e CBD, ma anche le regole base dell’SPS agreement.

Comporta la cooperazione tra queste tre organizzazioni per evitare qualsiasi discrepanza.

Una Commission on Phytosanitary Measures (CPM) è stata istituita dalla Food and Agriculture Organization (FAO) a cui possono tutte le parti contraenti la IPPC. Approva gli Standards for Phytosanitary Measures (ISPMs) e s’impegna in altre attività a sostegno della quarantena internazionale delle piante. Le sovrapposizioni di mandati di organizzazioni internazionali e

regionali, come IPPC e RPPOs funzionano come organismi di coordinamento nelle aree geografiche coperte per partecipare a varie attività volte a raggiungere gli obiettivi della direttiva IPPC.

Le Regional Plant Protection Organization (RPPO) è un'organizzazione inter-governativa che funge da organo di coordinamento per le organizzazioni di protezione vegetale nazionali (NPPO) a livello regionale. Non tutte le parti contraenti della IPPC sono membri RPPO. Attualmente vi sono 9 RPPOs.

RPPO funzionano come organismi di coordinamento nei diversi continenti per raccogliere e diffondere informazioni. Ognuno ha un proprio statuto indipendente e stabilisce il proprio programma di cooperazione regionale. Cooperano tra loro e con la FAO per promuovere lo sviluppo e l'utilizzo di norme pertinenti, incoraggiare la cooperazione interregionale relativa a misure fitosanitarie per il controllo di organismi nocivi da quarantena e prevenire la loro introduzione e diffusione.

EPPO è la Regional Plant Protection Organization per l'Europa e ha sede a Parigi.

Promuove la circolazione di materiale di interesse globale tra i suoi membri e collabora in modo informale con la Commissione dell'Unione Europea per garantire un approccio equilibrato sulle questioni internazionali. Aiuta i paesi membri ad impedire l'ingresso o la diffusione di parassiti pericolosi (impianto di quarantena). Oltre ad avere il compito di individuare i parassiti che possono essere un rischio, proponendo misure fitosanitarie che possono essere adottate.

EPPO obiettivi:

- Proteggere, la salute delle piante in agricoltura, silvicoltura e nell'ambiente incolto;
- sviluppare, una strategia internazionale contro l'introduzione e la diffusione di organismi nocivi (piante esotiche invasive) dannosi per gli ecosistemi naturali e agricoli;
- incoraggiare, l'armonizzazione delle normative fitosanitarie;
- promuovere, l'uso di metodi di controllo dei parassiti moderni, sicuri ed efficaci;
- fornire, un servizio di documentazione in materia di protezione delle piante.

European Food Safety Authority - EFSA

Istituita nel 2002, con sede a Parma, come fonte indipendente di consulenza scientifica e comunicazione sui rischi associati alla catena alimentare. E' la chiave di volta della valutazione del rischio dell'Unione Europea in materia di alimenti e sicurezza dei mangimi. Fornisce consulenza scientifica indipendente e una comunicazione chiara sui rischi esistenti ed emergenti alle autorità nazionali.

E' finanziata dal bilancio dell'UE ma opera separatamente dalla Commissione, dal Parlamento e dagli stati membri dell'UE.

PATOLOGIA VEGETALE - PROTEZIONE DELLE PIANTE

Si ha continuamente a che fare con piante, funghi, batteri, virus, insetti, acari e nematodi, che danneggiano colture e piante di tutto il mondo. I costi per misure preventive e danni possono essere ridotti se una fonte sana di materiale è reso disponibile ai produttori. Per proteggere la salute delle piante dei paesi hanno imposto politiche di controllo e di restrizione all'importazione, al movimento e alla detenzione di alcune piante, parassiti vegetali e altri materiali come il suolo. Istituzioni nazionali specifiche sono responsabili della politica fitosanitaria in ogni paese (Italia: Servizio Fitosanitario Nazionale, SFN).

Gli obblighi fitosanitari di un paese membro nel contesto del commercio internazionale sono: WTO/SPS-IPPC, EPPO,EU, Stato membro.

I controlli si differenziano a seconda della specie e possono richiedere un certificato fitosanitario o un passaporto delle piante. Alcune piante sono vietate, altre devono rispondere a determinati requisiti ed essere accompagnati da un certificato fitosanitario. Invece per essere esportati devono soddisfare i requisiti del paese importatore.

Ci sono due elementi principali nel controllo fitosanitario rilevanti per i coltivatori e gli agricoltori: protezione contro gli organismi di quarantena: misure per impedire l'introduzione e la diffusione di organismi nocivi ai vegetali e malattie che non sono stabiliti nel paese importatore; sistemi di certificazione per il controllo fitosanitario: assicurare la produzione di piante di alta qualità, che risultino esenti da parassiti e malattie specifiche, disponibili per i coltivatori.

Le misure di quarantena contribuiscono a mantenere i parassiti non autoctoni lontani dalle zone in cui potrebbero danneggiare le colture e gli ecosistemi. Gli elenchi degli organismi da quarantena sono pubblicati e aggiornati da EPPO.

I sistemi di certificazione per il controllo fitosanitario assicurano che i coltivatori e gli agricoltori abbiano accesso a materiali di moltiplicazione di elevata qualità.

Lo schema di certificazione è un sistema per la produzione di piante a propagazione vegetativa ottenuti da materiale candidato e selezionato dopo una o più fasi di propagazione in condizioni che garantiscono che gli standard di sanità prefissati siano rispettati. La filiazione del materiale viene registrata durante tutto il processo. All'interno di un sistema di certificazione vi sono diverse classi in base ai controlli e test utilizzati, i livelli di tolleranza applicati e le precauzioni prese.

Certificati fitosanitari

Servono per indicare che le partite di prodotti vegetali siano conformi con la dichiarazione di certificazione del certificato appropriato.

Si possono raggiungere degli accordi bilaterali quando ci sono differenze tra il punto di vista del paese di importazione e quello di esportazione per quanto riguarda la giustificazione nel richiedere un certificato fitosanitario. Modifiche riguardo il requisito di un certificato fitosanitario dovrebbero rispettare i principi di trasparenza e non di discriminazione.

Il servizio fitosanitario della regione Emilia-Romagna svolge attività come attuare interventi di profilassi nei confronti di organismi ad elevato rischio fitosanitario; definire strategie di difesa delle piante innovative e compatibili con la tutela dell'ambiente; promuovere la produzione di materiale di moltiplicazione regionale di alta qualità; concorrere alla definizione di norme fitosanitarie di valenza regionale, nazionale e comunitario; fornire supporti specialistici in materia fitosanitaria. Oltre a predisporre dei piani di difesa e di diserbo; coordinamento dei programmi di lotta integrata e biologica; supporto specialistico alle attività di assistenza alle aziende agricole; previsione e avvertimento dei rischi fitosanitari; sperimentazione e studi nel settore fitosanitario. Monitoraggio del territorio, ispezioni e certificazioni in importazione, esportazione e transito; autorizzazioni e accreditamenti; certificazioni fitosanitarie ai materiali di moltiplicazione.

I monitoraggi del territorio e controlli ufficiali sono per la presenza di flavescenza dorata della vite, colpo di fuoco delle pomacee, malattie batteriche e avversità della patata; sharka delle drupacee.

zona indenne= territorio dove non è stato riscontrato il virus PPV o dove lo stesso è stato eradicato ufficialmente. Nelle zone indenni le ispezioni ufficiali annuali devono essere effettuate prioritariamente nei campi di piante madri, nei campi collezione, nei vivai e nei frutteti di nuovo impianto.

area contaminata= campo di produzione o vivaio in cui è stata accertata ufficialmente con analisi di laboratorio la presenza del virus PPV. Nelle aree contaminate ogni pianta ospite con sintomi sospetti del virus PPV deve essere estirpata senza necessità di ulteriori analisi.

zona di insediamento= territorio dove il virus PPV è in grado di perpetuarsi nel tempo e la sua diffusione è tale da rendere tecnicamente non più possibile l'eradicazione. I servizi fitosanitari regionali delimitano ufficialmente le zone di insediamento. Nelle zone di insediamento è assicurata adeguata informazione e assistenza tecnica alle aziende frutticole presenti, per l'adozione di strategie volontarie di controllo e per favorire l'impiego di varietà tolleranti o resistenti.

zona tampone= zona con larghezza minima di 1 km a partire dal perimetro esterno di una zona di insediamento o di un'area contaminata; una zona di separazione fra una zona indenne e un'area contaminata o fra una zona indenne e una zona di insediamento. I servizi fitosanitari regionali eseguono annualmente monitoraggi ufficiali degli appezzamenti di drupacee sensibili collocati nelle zone tampone, al fine di verificare la presenza del virus PPV.

LEZIONE 3/10/18 - I VIRUS

Dal latino: veleno.

Sono piccoli e semplici parassiti obbligati intracellulari. Sono entità biochimiche visibili solo al microscopio elettronico, composti da un solo acido nucleico (RNA o DNA) racchiuso da un involucro proteico, capaci di replicarsi soltanto all'interno delle cellule ospiti.

1892: Tabacco mosaic virus, TMV. Primo virus.

1950-70: Microscopia elettronica e purificazione.

1970-80: sierologia (1977 ELISA).

1983: tecniche molecolari.

I virus sono presenti in ogni ambiente e sono capaci di infettare ogni essere vivente. (solo per il genoma dell'HIV-1 con 10000 nucleotidi esistono 10⁶20 varianti).

I virus dipendono dal proprio ospite, quindi una volta morto questo, muoiono anche loro. Se i virus sono troppo poco aggressivi le difese dell'ospite ne impediscono la replicazione e vengono eliminati. I virus sopravvivono perché producono un immenso numero di mutanti e la selezione elimina quelli mal adattati.

I virus non hanno struttura cellulare e sono privi di metabolismo proprio. Sono in grado di manipolare il congegno biosintetico della cellula ospite (ribosomi, fonti energetiche, sostanze necessarie) per duplicare le proprie particelle. Esplicano la loro azione di parassitismo a livello genetico.

Le componenti virali sono: acido nucleico (RNA o DNA) e proteine strutturali per la replicazione con funzioni accessorie.

L'acido nucleico nella maggior parte dei fitovirus è costituito da RNA a singola catena di polarità positiva ssRNA(+), che ha proprietà di RNA messaggero e contiene tutte le informazioni per la sua replicazione, traduzione ed incapsidazione.

Poi ci sono quelli con RNA a doppia elica dsRNA o RNA a singola elica di polarità negativa ssRNA(-), non sono direttamente infettivi, ma necessitano di una polimerasi codificata dal virus stesso. Altra tipologia DNA a doppia elica o singola, che sono entrambi infettivi.

“immagine frequenza di differenti virus”

Virione= particella virale completa e infettiva;

capside= rivestimento proteico contenente il genoma;

capsomero= sub-unità morfologica di natura proteica del capsido;

subunità proteica= singola catena di polipeptidi.

Il virione serve come protezione del genoma (rotture/mutazioni; da enzimi nucleolitici/proteolitici; da pH/fluttuazione di t° ; da radiazioni naturali). Media l'attacco alle cellule ospiti appropriate e si disassembla facilmente al tempo opportuno a seguito dell'entrata nella cellula.

Il capsido ha simmetria elicoidale, icosaedrica o complessa.

In quella elicoidale le subunità sono organizzate in elica destrorsa con passo 2,3 nm. Le proteine formano il capsidio che riveste l'acido nucleico. Un capsidio può essere costituito da una sola proteina o da più proteine che possono avere funzioni strutturali e funzioni enzimatiche. La componente proteica è dotata di proprietà antigeniche.

La simmetria icosaedrica (20 facce a forma di triangoli equilateri e 12 vertici). Le subunità del rivestimento proteico sono organizzate in pentameri ed esameri. Un virus icosaedrico comprende 60 proteine identiche (3 proteine per ogni faccia).

Forma e dimensione

Virus allungati, bacilliformi, tondeggianti, a forma geminata.

Quelli con forma allungata filamentosa hanno una forma flessuosa. 12-15nm diametro e 600-900 nm monopartici.

Quelli con forma tondeggianti e sferica (mosaico del cetriolo, nanismo giallo dell'orzo)

Quelli con forma bacilliforme con estremità arrotondate (mosaico dell'erba medica genoma ssRNA(+), suddiviso).

Quelli con forma a particelle geminate (2 strutture icosaedriche unite, tipo nanismo del frumento genoma ssDNA).

Quelli provvisti di involucro, hanno una struttura complessa. L'RNA è legato alla proteina N a formare la struttura centrale RNP avvolto ad elica. La membrana esterna contiene due proteine: M (matrice): organizzata in serie esagonali e G (glicoproteine) che forma le proiezioni dalla superficie.

immagine “virus provvisti d'involucro”

SISTEMATICA DEI VIRUS

Per la classificazione si può utilizzare:

tipo di genoma;

modalità di replicazione;

morfologia dei virioni;
 proprietà biologiche (modalità di trasmissione, ospite, patologia, sintomatologia);
 proprietà sierologiche.

La classificazione va in taxa (ordini, famiglie, generi e specie) con gerarchia linneiana.

Famiglie: raggruppamenti di generi, denominazioni terminanti -viridae.

Generi: denominazioni terminanti in -virus. Ciascun genere comprende una o più specie che hanno proprietà in comune.

Specie: singoli virus dotati di caratteristiche sufficientemente distinte da quelle di virus simili da permetterne un'identificazione.

Nella denominazione si contrae il nome della specie tipo Tobamovirus, da Tobacco mosaic virus.

Oppure dalla morfologia delle particelle virali (Closterovirus dal greco clostri, filamento) o dalla morfologia e caratteristiche epidemiologiche (Nepovirus che sintetizza il concetto di virus trasmessi da nematodi) o nome della principale pianta ospite (Vitivirus, Vitis)

Tutte le categorie tassonomiche sono scritte in corsivo con l'iniziale della prima parola in maiuscolo.

Funzioni dell'ospite utilizzate dai virus vegetali?

Componenti per la sintesi del virus: i virus utilizzano aminoacidi e nucleotidi prodotti dal metabolismo cellulare per sintetizzare le proteine e gli acidi nucleici virali;

Energia: necessaria per la sintesi proteica o degli acidi nucleici è fornita dall'ospite;

Sintesi proteica: utilizzano i ribosomi, tRNA ed enzimi dell'ospite per la sintesi di proteine virali partendo dall'mRNA virale.

Sintesi degli acidi nucleici: quasi tutti codificano per uno o più enzimi coinvolti nella sintesi dei loro acidi nucleici;

Componenti strutturali della cellula: le membrane cellulari possono essere coinvolte nella replicazione virale.

Patogenesi delle malattie virali

Inoculazione: penetrazione e disassemblaggio;

Replicazione: sintesi proteine virali, replicazione acido nucleico, assemblaggio particelle virali;

Traslocazione nell'ospite: locale (da cellula a cellula), sistematica (a grandi distanze);

Trasmissione.

CICLO D'INFEZIONE DEI FITOVIRUS (con RNA a singola elica positivo ssRNA⁺) immagine "ciclo fitovirus 1" "ciclo infettivo 2"

1. *Penetrazione del virus nella cellula (trasmissione):* i virus non sono in grado di superare attivamente la cuticola e le pareti delle cellule epidermiche. La loro penetrazione nei tessuti è passiva. Sono necessarie (micro) ferite, in modo da essere a diretto contatto con il protoplasma. Disassemblaggio del capsido.

2. *Decapsidazione (liberazione dell'involucro proteico e traduzione dell'RNA in proteine) - replicazione del genoma virale - incapsidazione o assemblaggio (associazione della proteina del capsido con acido nucleico).* Il genoma virale è composto da diversi gruppi di geni, con grande variabilità nell'organizzazione genomica dei fitovirus (tipo di acido nucleico, numero di segmenti del genoma, sequenza nucleotidica, ORF e sequenze regolatrici).

La decapsidazione avviene quando la particella virale entra nella cellula vegetale e il genoma deve essere rilasciato dal capsido.

La replicazione è quando il genoma virale viene tradotto per ottenere i primi prodotti: replicasi o altre proteine virali (necessarie nelle fasi successive del ciclo). Avviene nel citoplasma per quelli ad RNA, mentre per i virus a DNA avviene nel nucleo della cellula. L'mRNA virale deve competere con l'mRNA dell'ospite per il meccanismo di traduzione e deve esprimere i vari prodotti genici nella giusta quantità. Per regolare i propri geni i virus hanno adottato diverse strategie (sintesi di una poliproteina come singolo ORF, genoma suddiviso in distinti segmenti di RNA, soppressione saltuaria di un codone di arresto (readthrough, RT)) "immagine vitivirus"

I prodotti del genoma virale sono: proteine strutturali (coat-protein) capsidio ed gli enzimi, replicasi che è un complesso di enzimi in grado di copiare l'intero genoma RNA e mRNA subgenomici; RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) trascrive RNA da uno stampo RNA; polimerasi (sintesi ac.nucleici); proteasi; trascrittasi e trascrittasi inversa (copia intero RNA in DNA genomico). Le funzioni di questi prodotti sono: movimento e trasmissione (da cellula a

cellula e sistemico nella pianta ospite); ruolo non enzimatico (proteina 5'VPg funziona come iniziatore nella sintesi di RNA); riconoscimento (recettori sulla membrana inter cellulare dell'ospite che riconoscono particolari proteine virali).

I virus ss RNA(+) avvenuta la penetrazione entro la cellula ospite il capsido si separa dal materiale genetico e inizia la sintesi delle proteine virali. Le particelle virali scompaiono: eclissi. L'RNA virale funge da messaggero (mRNA) e dirige la sintesi di una o più proteine è detto di polarità positiva RNA(+). La prima funzione espressa nella cellula ospite è la traduzione di una proteina (RNA polimerasi) necessaria per catalizzare la replicazione dell'RNA virale. Grazie a questa proteina si originano molecole complementari RNA(-), riutilizzati per la sintesi di nuovi RNA(+). Le forme + e - del genoma contengono segnali in grado di controllare la specificità e la tempistica della loro replicazione. Immagine "replica" Incapsidazione o assemblaggio è di particelle virali accumulate nel citoplasma.

3. *Trasporto del virus da una cellula all'altra-diffusione sistemica del virus nei tessuti dell'ospite:* molti codificano proteine di movimento (MP) che regolano il trasferimento virale nei tessuti della pianta. Caratteristiche MP: si legano agli acidi nucleici virali o al virione completo; stabiliscono interazioni idrofobe con il sistema di endomembrana dell'ospite; spesso incrementano il limite esclusione molecolare dei plasmodesmi, facilitando il passaggio intracellulare di acidi nucleici o virioni completi. La diffusione di un virus nell'ospite passa attraverso o i plasmodesmi (cellula-cellula) o il floema (lunga distanza). Plasmodesmi= strutture dinamiche che consentono il mantenimento della continuità del citoplasma, della membrana plasmatica e reticolo endoplasmatico. diametro di 2-3NM, al contatto con proteine virali il limite di esclusione raggiunge 10NM. Immagine "plasmodesma" Nel meccanismo cellula-cellula ci sono 2 meccanismi fondamentali uno il passaggio dell'acido nucleico virale associato con la MP; l'altro prevede la formazione di strutture tubolari costituite da MP attraverso cui il virus si muove come acido nucleico o virione maturo. Immagine "diffusione A e B" I virus nel meccanismo a lunga distanza viene introdotto nel floema da vettori floemomizi. Infatti passa dalle cellule del mesofillo alle cellule compagne del floema, poi ai tubi cribrosi.
4. *Trasmissione dell'infezione ad altre piante ospiti.*

SINTOMI

Sono gli effetti macroscopici dell'infezione sulla pianta, i quali non sono sufficienti per un corretto rilevamento del virus. Proprio perché più cause possono dar luogo a sintomi simili, oppure si possono avere sintomi diversi dati dallo stesso virus; i sintomi possono essere alterati dalla presenza di infezioni miste, da cui può verificarsi un effetto sinergico; le condizioni ambientali (t°, umidità, luminosità, pH).

In fiori, frutti e semi possiamo avere anomalie del colore, dello sviluppo e necrosi. In foglie e fusto anomalie del colore e dello sviluppo, deformazioni e necrosi; nelle radici anomalie dello sviluppo.

Classificazione

Modificazione di forma e dimensione: nanismo o riduzione di taglia, getti e foglie soprannumerari; fasciazioni e nodi doppi; riduzione della superficie e perdita della simmetria di organi vari (foglie, frutti, fusto, rami, radici) o neoplasie.

Modificazioni cromatiche: decolorazione e rottura di colore.

Imbrunimenti ed altre alterazioni degenerative.

Alterazione delle fasi fenologiche della pianta.

LEZIONE 11/10/2018 - VIROSI DELLA VITE

65 tipi di virus, 5 tiroidi, 8 fitoplasmi e un batterio xilematico trasmesso da insetti.

TRASMISSIONE E DIFFUSIONE MEDIANTE PROPAGAZIONE VEGETATIVA (innesto)

SINDROMI

I°GRUPPO

- degenerazione infettiva o arricciamiento: ci sono ceppi deformanti e ceppi cromogeni. Le piante presentano minor vigore e produzione ridotta per qualità e quantità. Sindromi di difficile rilevazione e dipendono da condizioni ambientali, sensibilità varietale, stato vegetativo, virulenza del ceppo. Sul grappolo dai ceppi deformanti possiamo avere grappoli più piccoli, perdite di produzione 90% e vari gradi di colatura e acinellatura. Foto "degenera infettivo" (ci sono altre foto che mostrano le varie virosi es. mosaico giallo) Nome virus: Grapevine fanleaf virus (GFLV) Arabis mosaic virus (ArMV) entrambi del genere Nepovirus, sono trasmessi da

nematodi longidoridi (*Xiphinema index* x GFLV e *X. diversicaudatum* x ArMV). Colonizzano tutti i tessuti, si trasmette attraverso materiale di propagazione o a breve distanza con i nematodi. La diagnosi avviene con test ELISA, PCR, indicatori legnosi (*V. rupestris*) e la sindrome cromogena.

- **accartocciamento fogliare:** è la più diffusa, causata da 10 virus GLRV-grapevine leaf roll virus 1-10. Ben visibile a fine stagione e dipende dalla presenza simultanea di più virus e interazione ospite/ambiente/patogeno. Sintomatologia: accartocciamento verso il basso, arrossamento o ingiallimento precoce, consistenza rigida delle foglie, frattura vitrea della lamina. (ci sono foto rappresentative) I virus associati sono del genere Ampelovirus GLRaV-1 e -5e Closterovirus GLRaV-2. La trasmissione e diffusione è naturale attraverso le cocciniglie (bassa specificità tra virus e vettore, quindi più di una portano i 3 virus), coccidae e pseudococcidae. Sintomi: sui grappoli->piccoli, incolori, riduzione produzione. I tessuti colonizzati sono quelli floematici. Diagnosi: ELISA x 1 e 3, PCR, biosaggi su Cabernet franc ed erbacee solo alcune, il 2 è responsabile della disaffinità d'innesto nelle viti su Kober 5BB. Non tutti gli accartocciamenti sono dovuti a virus, perché ci sono quelli dati da fitoplasmi FD e LN. foto "confronto fito-virus"
- **complesso del legno riccio:** i virus causano sintomi accentuati solo su indicatori. Possono avere effetti sinergici con virus di altri complessi. Localizzazione floematica causa alterazioni a livello del floema e dello xilema, che risultano in: minore vigoria, ritardo vegetativo, morte, evidente disaffinità del punto d'innesto (diverso accrescimento). Sindromi: scanalatura Kober 5BB (Kober stem grooving, KSG), suberosi corticale (Corky bark, CB), butteratura di *V. rupestris* (RSP). Virus agenti sono del genere Vitivirus, Foveavirus. foto "legno riccio" Trasmissione e diffusione naturale sono cocciniglie (mealybug), coccidae, pseudococcidae. Gli agenti sono 4 virus flessuosi filamentosi, tessuti colonizzati floematici. Diagnosi: biologica, PCR, ELISA e ospiti erbacei per GVA e GVB. Alcune cocciniglie trasmettono anche quelle dell'accartocciamento fogliare, infatti molte coesistono le due malattie.
- **maculatura infettiva:** (Grapevine fleck virus-GFkV) di solito è latente, tranne che su *V. rupestris* dove causa maculatura e riduzione dello sviluppo, oltre al deperimento o riduzione della rizogenesi. Agente è un virus isodiametrico, forse è una malattia dovuta ad un complesso virale perché sono stati identificati nelle stesse piante altri 3 virus. Colonizza tessuti floematici. Vettori naturali non se ne conoscono, ma si espande in campo. Diagnosi: ELISA, PCR e *V. rupestris*.

II° GRUPPO

- **enazioni:** agente sconosciuto. Sintomi: nazioni sulle foglie basali, piccole e a forma di ventaglio; ritardo nell'apertura delle gemme, aspetto cespuglioso della vegetazione. Diagnosi: osservazione in campo (non c'è ripetibilità dei sintomi in tutte le piante e in tutti gli anni); innesto sull'indicatore biologico LN33. ELISA e PCR non effettuabili.

III° GRUPPO

- **necrosi delle nervature:** agente è sconosciuto. Sintomi: latente, piante più sensibili ai freddi invernali e possono anche essere nane; reticolo necrotico sulle nervature su 110R; riduzione delle rese in vivaio. Diagnosi solo con indicatore legnoso 110R.
- **mosaico delle nervature:** agente sconosciuto. Sintomi: latente, causa deperimento; decolorazione nervale su *V. riparia* "Gloire de Montpellier". Diagnosi solo con indicatore.

Le virosi quindi in generale compromettono la sanità delle viti per deperimento e morte.

Diminuzione della durata dei vigneti. Minore resistenza agli stress di tipo biotico e abiotico.

Impatto negativo sulla quantità e qualità della produzione (meno zuccheri, bassa acidità e scarsa colorazione) e bassa % di attecchimento degli innesti.

Tutto ciò è dimostrabile attraverso studi effettuati dopo interventi di risanamento che dimostrano la diminuzione della qualità sulle piante colpite da virosi.

LOTTA CONTRO LE VIROSI

Utilizzo di materiale di propagazione sano, con diagnosi precoci delle infezioni, risanamento dei cloni con termoterapia e coltura di meristemi, lotta contro i vettori, ma questo è difficile in quanto i nematodi sono legati alla rizosfera e possono trovarsi a vari mt. di profondità e le cocciniglie sono numerose e aspecifiche.

LEZIONE 11/10/18 - PROBLEMATICHE APERTE

Disaffinità d'innesto

Sindrome di origine virale, provoca una cattiva saldatura fra i 2 bionti.

Sintomi: nanismo, germogli raccorciati, arrossamento delle foglie, ingrossamento punto d'innesto e lesioni necrotiche soprattutto K5BB e morire in 2 anni.

Cause: presenza costante del GLRaV-2 (accartocciamento fogliare), am sono ancora in corso degli studi. La presenza simultanea nella pianta del GVB o della maculatura infettiva peggiora la disaffinità d'innesto.

GPGV

Sintomi: malformazioni e asimmetrie fogliari; maculature fogliari; internodi raccorciati; sviluppo stentato; scarsa allegazione; acinellatura.

La sintomatologia si manifesta già in germogliamento.

Nessun virus noto è stato associato alla sintomatologia osservata con test ELISA e PCR. Solo attraverso Deep Sequencing è stato possibile scoprire il virus agente, fino ad allora sconosciuto. E' molto simile a GINV (virus giapponese), solo per il 70% ed i sintomi non sono proprio identici. Questo nuovo virus è chiamato virus del pinot grigio (Grapevine Pinot Gris virus - GPGV)

Le modalità di trasmissione fanno pensare alla presenza di un vettore in pieno campo e negli impianti colpiti vi era la concomitante presenza di galle indotte da *Columerus vitis*.

Si trasmette facilmente per innesto legnoso. Esiste un protocollo di diagnosi affidabile.

La prevenzione si basa sull'utilizzo di materiale certificato, formazione, lotta a possibili vettori, espianto dei ceppi infetti ed ospiti e segnalazione ad enti certificati.

LEZIONE 18/10/18 - DIFESA ASPETTI GENERALI

Le avversità possono essere non biotiche (ambientali, nutrizionali, inquinamento o traumi) o biotiche (agenti di malattie, organismi animali es. fitofagi o piante es. competitive).

Avversità biotiche

Tra gli agenti di malattie abbiamo funghi, batteri, fitoplasmi, virus e viroidi.

Hanno livelli di rischio e dannosità variabile. I danni derivanti dalla sottrazione parassitaria di sostanze nutritive, produzione di sostanze tossiche e alterazioni fisiologiche.

Organismi animali: artropodi (insetti-acari-miriapodi) -nematodi-molluschi-roditori-uccelli.

Nel caso degli artropodi i problemi sono causati principalmente dagli insetti; con danni collegati all'attività alimentare dei diversi stadi di sviluppo. Nel caso dei nematodi i danni sono diretti alla pianta o come vettori di virus. Molluschi, roditori, uccelli problematiche generalmente di importanza secondaria.

Piante infestanti importanza rilevante economicamente; con danni derivanti dalla competizione con la specie coltivata. Oltre alle piante infestanti, ma pochi casi es. *Cuscuta*, vischio.

La diffusione di queste avversità sono dovute al forte sviluppo dell'agricoltura intensiva e monocolturale, poi alla circolazione dei materiali vegetali in tutto il mondo.

Tipologie di intervento delle avversità biotiche

Interventi indiretti: non va a colpire direttamente il potenziale organismo competitore, ma va a limitare l'aggressività o la dannosità attraverso la gestione della pianta bersaglio o ambiente.

Mettendo in atto riduzioni della suscettibilità della piante (genetica, chimica, biologica, agronomica) oppure con modificazioni delle condizioni ambientali in senso sfavorevole all'organismo patogeno.

Interventi diretti: hanno lo scopo di ridurre o annullare la sua capacità di aggredire o danneggiare la pianta. E' il metodo principale attualmente messo in pratica. Si possono utilizzare mezzi di diverso tipo: meccanici, manuali, fisici, biologici o chimici. Realizzati a quattro livelli: sulla pianta (insetti e funghi), sul seme (malattie infettive e alcuni insetti), al terreno (malattie e animali-nematodi) o sul prodotto in post-raccolta (comuni in alcuni settori).

AVVERSITA' BIOTICHE

Agenti di malattia

La difesa da questi dipende dalle diverse categorie di patogeni e conseguente differenziazione delle strategie d'intervento (dirette o indirette).

- Virus, viroidi, fitoplasmi: dannosi per la produttività, anche per colture perenni. Non sono disponibili mezzi di lotta diretta, quindi esclusivamente sulla prevenzione (materiale di propagazione sano, utilizzo di resistenze genetiche, controllo del terreno, eliminazione dei vettori o ospiti, distruzione delle piante infette).
- Batteri: hanno grande capacità patogena, arrecando gravi danni sia alla produzione dell'anno sia alla vitalità delle colture. Limitati mezzi di lotta diretta (rame e alcuni composti di sintesi), quindi si utilizzano misure di prevenzione (materiale sano, pratiche agronomiche sfavorevoli ai patogeni, eliminazione delle piante e del materiale infetto, disinfezione delle piante e del materiale infetto, disinfezione di materiale e strutture, utilizzo di resistenze genetiche).
- Funghi: dannosi per la maggior parte delle colture. Arrecano danno per la produzione dell'anno, a volte anche per la sopravvivenza delle piante. Attività di difesa dirette in campo (fungicidi) o misure preventive (pratiche agronomiche o utilizzo di resistenze genetiche). La loro aggressività

dipende dalle condizioni climatiche (piogge e umidità elevata). I fungicidi sono passati da prodotti di sola copertura, breve persistenza, a quelli con capacità penetrante, maggiore persistenza. Non sempre è possibile effettuare trattamenti dopo la manifestazione dei sintomi; c'è difficoltà di valutazione in anticipo; per l'elevata dannosità dei patogeni è problematica anche la lotta biologica.

Organismi animali

- Artropodi (insetti e acari): difesa con prodotti chimici di sintesi dannosi per i competitori, piuttosto selettivi. Strategie post comparsa della specie e al superamento di una soglia limite. In alcuni settori sono possibili utilizzare mezzi biologici (predatori e parassiti) e biotecnici (attrattivi sessuali).
- Nematodi: diminuzione nell'utilizzo di mezzi chimici e crescente di mezzi agronomici.
- Molluschi, roditori, uccelli: problemi di importanza economica secondaria, soluzioni di vario tipo, non solo chimico.

Piante infestanti

In passato la lotta era basata su interventi manuali o meccanici, poi è passata all'uso di diserbanti chimici di sintesi (motivi socio-economici). I prodotti chimici impiegati prima erano di tipo residuale, preventivamente applicati nel terreno; ora si utilizzano erbicidi selettivi e impiegabili dopo lo sviluppo delle infestanti.

Gli aspetti comuni a questi tre settori d'intervento sono la gestione legislativa e normativa degli agrofarmaci: aspetti tossicologici ed ecotossicologici, autorizzazione e impiego; processo industriale di messa a disposizione, messa a punto e commercializzazione; definizione e aggiornamento dei modelli decisionali per gli interventi e assistenza tecnica a livello applicativo.

PROTEZIONE DELLE PIANTE DALLE MALATTIE: MEZZI DISPONIBILI

Bisogna essere certi innanzitutto della diagnosi basata sulle conoscenze: biologia e sintomatologia del patogeno, epidemiologia (capacità di diffusione), eventuali difese naturali della specie/varietà (caratteri di resistenza), provenienza del materiale vegetale...per passare poi alla scelta delle strategie e metodi da adottare e alla fitoiatria.

Le tipologie di difesa sono: mezzi legislativi (esclusione ed eradicazione), agronomici, fisici, genetici, biologici, di sintesi chimica.

L'organizzazione e legislazione fitosanitaria si basa sulla tutela del sistema produttiva e sulla regolamentazione dell'impiego dei prodotti fitosanitari.

L'obiettivo della tutela del sistema produttivo è quello di salvaguardare il sistema dall'introduzione di organismi dannosi indesiderati e dalla loro diffusione. Gli strumenti a disposizione sono le norme fitosanitarie sulla commercializzazione del materiale vegetale (controllo e certificazioni) e norme di comportamento nei riguardi di avversità primarie (decreti di lotta obbligatoria).

Le strutture di riferimento sono il Ministero delle Politiche agricole e forestali con funzione di coordinamento generale (rapporti con i servizi fitosanitari esteri, determinazione degli standard tecnici, provvedimenti di lotta obbligatoria). Altra struttura è quella dei Servizi fitosanitari regionali, il quale applica sul territorio le normative fitosanitarie, vigilanza, monitoraggio per la quarantena, certificazione fitosanitaria per i vegetali, certificazione genetico-sanitaria del materiale vivaistico...

NORME FITOSANITARIE

Sono cambiate molto nel corso degli anni a partire dagli anni '30, così come i decreti di lotta obbligatoria.

Gli aspetti principali della attuale normativa sono che negli scambi extracomunitari permane il certificato fitosanitario con controllo sia in entrata (frontiera) che in uscita (spedizione); mentre negli scambi intracomunitari sono stati soppressi i controlli e le certificazioni alle frontiere, istituendo dei controlli alla produzione con emissione di un documento di garanzia da parte del produttore (passaporto delle piante)...

Mezzi agronomici

Adeguamento delle tecniche colturali con l'obiettivo di impedire o limitare (direttamente o indirettamente) il rischio di insediamento o sviluppo dei patogeni, ad esempio evitando condizioni ambientali favorevoli alle infezioni. Principali linee guida: scelta appropriata dell'ambiente di coltivazione, adozione di sesti di impianto non troppo fitti, corretta gestione del terreno, concimazioni equilibrate, razionale gestione della pianta (allevamento e potatura), irrigazioni

controllate (tempi e modi), aerazioni degli ambienti protetti (non condizionati), pacciamatura, avvicendamenti colturali adeguati (rotazioni), eliminazione dei residui colturali, utilizzazione di materiale di propagazione sano.

Mezzi fisici

Eliminazione dei patogeni o prevenirli con l'applicazione di diverse forme di energia.

Applicazione di calore (solarizzazione, risanamento materiale di propagazione...), applicazione del freddo (post-raccolta), atmosfera controllata, radiazioni (sterilizzazione materiale).

Mezzi genetici

Ottenendo così la resistenza che può essere genetica o indotta. Quella genetica prevede la determinazione di barriere strutturali dovute ad 1 o più geni. Quella indotta, invece, è dovuta all'applicazione di induttori chimici di resistenza, ad esempio per la vite è riconosciuta ormai da anni l'efficacia dei fosfiti (peronospora). Quest'ultima tecnica non è sempre efficace quindi bisogna integrarla con altri mezzi di difesa.

Mezzi biologici

Attraverso la competizione per lo spazio, produzione di antibiotici, iperparassitismo, aumento della vigoria della pianta ospite.

Quindi la difesa fitosanitaria è passata ad essere programmata, a criteri più razionali, attraverso la lotta integrata fino ad arrivare al rilancio dell'agricoltura biologica, in cui si utilizzano tecniche colturali di prevenzione.

Lotta a calendario: si basa sulla conoscenza delle fasi fenologiche delle piante agrarie e sulla possibilità di infestazioni o infezioni in quel momento. I trattamenti vengono ripetuti senza verificarne l'effettiva necessità. Il vantaggio è quello di non richiedere conoscenze approfondite, ma questo crea maggior inquinamento ambientale e resistenza di funghi, insetti e piante infestanti.

Lotta guidata: prima tappa verso la razionalizzazione della difesa chimica, introducendo il concetto di soglia di intervento o soglia economica, quindi il trattamento va effettuato solo quando le avversità raggiungono pericolosità tali da giustificare l'intervento. Quindi si effettua il monitoraggio o campionamento. I vantaggi sono di tipo economico e ambientale/sanitario.

Difesa integrata: è volto a razionalizzare ed ottimizzare l'utilizzo di tutte le tecniche di difesa disponibili (chimica, fisica, agronomica, biologica, biotecnologica). E' fondamentale conoscere la bio-epidemiologia dei patogeni, effettuare controlli nei periodi a rischio, dare priorità agli interventi agronomici, fisici e biologici, per poi scegliere quello meno tossico tra i trattamenti chimici. L'obiettivo è l'ottenimento di produzioni di qualità nel rispetto dell'uomo (produttore e consumatore) e dell'ambiente.

Le linee guida:

- misure di prevenzione con pratiche agronomiche e scelte varietali tolleranti o resistenti;
- priorità a metodi ecologicamente più sicuri;
- definizione soglie d'intervento;
- valutazione del rischio durante il ciclo colturale;
- applicazione dei prodotti fitosanitari

Lotta biologica: uso e potenziamento di antagonisti naturali per contenere le popolazioni degli organismi dannosi. Gli antagonisti permettono di mantenere l'organismo nocivo entro certi limiti, non azzerando la popolazione. Lo scopo è quello di mantenere un equilibrio nell'agrosistema salvaguardando la biodiversità, la fertilità organica e difendendo le colture con prodotti naturali. Devono essere attuate specifiche rotazioni, concimazioni e fertilizzazioni per garantire gli scopi detti sopra.

LEZIONE 18/10/2018 - TOSSICOLOGIA DEGLI AGROFARMACI

Devono essere autorizzati dal Ministero della salute, prima della commercializzazione. La valutazione analizza la potenziale pericolosità delle singole sostanze e dei relativi formulati. Vengono autorizzati solo i prodotti efficaci, selettivi e quando il rischio per la salute dell'uomo e per l'ambiente è considerato accettabile.

Pericolo= potenzialità di produrre effetti nocivi a carico degli organismi esposti. E' una caratteristica intrinseca della sostanza.

Esposizione= durata e intensità del "contatto" con quella sostanza. Può avvenire per via orale, inalatoria e dermica. E' modificabile.

Rischio= probabilità che si possano verificare effetti avversi in un organismo a seguito dell'esposizione.

Rischio= pericolo x esposizione

La valutazione del rischio consiste nel determinare l'accettabilità, la natura o la severità degli effetti nocivi.

Tossicologia

Descrive le proprietà pericolose dei composti chimici e determinare a quali livelli di esposizione insorgono gli effetti nocivi.

La legislazione europea disciplina la commercializzazione e l'uso dei prodotti fitosanitari nonché i limiti di residuo ammessi nei prodotti agricoli.

I rischi più importanti, connessi all'uso di questi prodotti, sono: rischi sanitari per il consumatore (residui negli alimenti), rischi sanitari per l'operatore agricolo (manipolazione e trattamenti), rischi ambientali (acque superficiali e fauna).

Gli effetti tossici variano in base alle vie di esposizione e si manifestano quando la dose assorbita dall'organismo supera la "soglia di effetto".

La tossicità di una sostanza si valuta sul principio attivo.

- valutazione della tossicità acuta: DL50 (dose letale orale o dermale) mg p.a./kg animale prodotti solidi o liquidi; CL50 (concentrazione letale in aria o acqua) prodotti gassosi. foto "DL50"
- valutazione della tossicità a breve termine: definizione del NOAEL con somministrazione entro le 24 ore;
- valutazione della tossicità cronica: definizione della dose massima di p.a. (oralmente) espressa in mg p.a./kg animale/giorno. foto "valutazione cronica"

Il livello di incertezza o fattore di sicurezza dovuto all'extrapolazione dei dati di tossicità da animale a uomo è in genere pari a 100: un fattore x10 per considerare la differenza interspecifica (topo->uomo) e altro x10 per considerare le differenze intraspecifiche (uomo->popolazione).

Acute Reference Dose=ARfD: tossicità acuta a breve termine (mg p.a./kg peso corporeo).

Sarebbe NOAEL rapportato ad un fattore di sicurezza (100)

Acceptable Daily Intake=ADI: Dose giornaliera accettabile per l'uomo (DGA), esprime la tossicità cronica, senza avere effetti tossici.

Acceptable Operator Exposure Level= AOEL: quantità massima di sostanza che un operatore agricolo può essere esposto giornalmente senza effetti tossici. Sarebbe NOAEL rapportato a un fattore di sicurezza pari a 10 o a 100.

ADI generalmente è più bassa rispetto AOEL, perchè deve proteggere l'intera popolazione, quindi anche bambini e anziani.

Rischi ambientali ed ecotossicologici

Durante un trattamento, solo una parte raggiungerà il bersaglio, il resto si disperderà nell'ambiente.

Deriva= quando si forma una massa nebbiosa trasportata lontano dal vento o dalla macchina;

Volatilità= quando la miscela può evaporare in aria e trasportata dal vento;

Ruscellamento= quando si discioglie nel terreno ed è trasportata lungo la superficie del terreno a seguito di piogge o irrigazione;

Lisciviazione= quando penetra nel terreno, attraverso l'acqua di percolazione e raggiungere le acque di falde.

I prodotti fitosanitari una volta dispersi sono soggetti a:

processi di degradazione (trasformazioni), grazie anche ai microrganismi, che li utilizzano come fonte di energia;

fotocomposizione rottura dei legami chimici per azione della luce solare;

variazione di concentrazione sia della sostanza attiva che dei metaboliti nei diversi comparti ambientali (suolo, aria, acqua) per i processi di degradazione e di dispersione ambientale;

persistenza: in un determinato comparto (suolo, aria, acqua). Viene valutata misurando il suo tempo di dimezzamento (DT50), più alto sarà e meno sarà disponibile alla degradazione.

I fattori che influenzano il destino ambientale di una sostanza sono: proprietà chimico-fisiche della sostanza (movimento, persistenza, degradazione); condizioni climatiche; caratteristiche dell'ambiente (tipologia di suolo).

RISCHIO ECOTOSSICOLOGICO

I prodotti fitosanitari possono determinare effetti tossici, acuti e a lungo termine, sugli organismi "non bersaglio" terrestri e acquatici, animali e vegetali. Le sostanze attive possono penetrare e concentrarsi negli organismi attraverso i processi di bioaccumulo (si accumulano all'interno di un organismo, in concentrazioni superiori a quelle riscontrate nell'ambiente circostante) e biomagnificazione (concentrazione delle sostanze attive negli organismi man mano che si procede dai livelli più bassi a quelli più alti della catena alimentare). La valutazione del rischio per gli organismi "non bersaglio" prende in considerazione la fauna e la flora, serve a prevedere gli effetti tossici. E' possibile comunque ridurre il rischio e riportarlo a valori accettabili attraverso "misure di mitigazione del rischio" (utilizzo ad una certa distanza dall'acqua o in certe fasi fenologiche).

Il rischio non sarà mai 0, quindi si parla di rischio accettabile.

PROTEZIONE DELLE PIANTE DALLE AVVERSITA' BIOTICHE

A partire dagli anni'90 la Comunità europea intervenne con l'obiettivo di limitare gli effetti negativi della difesa. foto "quadro normativo"

Con la direttiva 91/414 si definiscono le procedure per l'immissione in commercio, l'utilizzazione e controllo degli agrofarmaci. Per essere omologati si prendono in considerazione caratteristiche tossicologiche p.a., prove di compatibilità ambientale, efficacia agronomica... Quindi ci è stata una riduzione di molecole autorizzate.

Reg. 1107/2009 novità sull'omologazione degli agrofarmaci. Dividendo in 4 categorie le sostanze: di base, a basso rischio, standard e candidate alla sostituzione. Quest'ultime dovranno essere sottoposte a valutazione comparativa per verificare la presenza di sostanze che le possano sostituire. Altra novità è la divisione dell'Europa in tre macro regioni (nord, centro, sud) per l'autorizzazione zonale dei formulati (mutuo riconoscimento).

Reg. 396/2005 e successive integrazioni limiti massimi di residuo definiti a livello europeo, niente più emanazione a livello di statale. EFSA (ente terzo) conduce la valutazione del rischio per il consumatore. Diminuzione dei LMR compatibile con la buona pratica agricola.

Direttiva 127/2009 "Macchine per l'applicazione" Definizione norme a livello di progettazione e costruzione.

Direttiva 128/2009 "Uso sostenibile dei pesticidi" Riduzione impatto sulla salute umana e sull'ambiente, promuovendo la difesa integrata e di tecniche alternative ai mezzi chimici. In Italia è recepito con i Piani d'Azione Nazionali (PAN). Formazione per utilizzatori, distributori e tecnici con relativa certificazione, limitazione per alcune zone d'impiego e dal 2014 c'è l'obbligatorietà della difesa integrata.

AGROFARMACI E LA LORO ETICHETTA

In ambito tecnico si parla di AGROFARMACI, mentre in quello normativo di PRODOTTI FITOSANITARI, comunque si parla di biocidi, utilizzati specificatamente per trattamenti contro avversità delle piante (PPO=Plant Protection Products)

Tipologie:

Antiparassitari (fungicidi e battericidi, insetticidi, acaricidi, nematocidi), erbicidi, repellenti, modificatori del comportamento (attrattivi sessuali e feromoni), fisiofarmaci (x carenze, ristagni...) fitoregolatori (alleganti, nanizzanti...)

Preparati= formulati commerciali contenenti una o più: sostanze attive (interiscono sulle funzioni biologiche dei parassiti animali e vegetali), coadiuvanti (aumento dell'efficacia o salvaguardia dall'azione fitotossica della sostanza attiva) o coformulati (riduzione della concentrazione della sostanza attiva es. sost.inerti o diluenti)

Lettura:

documento ufficiale contenente tutte le informazioni, con anche le istruzioni d'impiego obbligatorie. La scelta del prodotto è fondamentale per l'efficacia e limitazione di effetti collaterali. Sono presenti quindi: autorizzazione (colture e target) - modalità d'impiego (dose mg/hl o kg/ha, periodo) - n° massimo applicazioni - zona tampone - proprietà (tempo carenza o intervallo sicurezza), a volte sono presenti anche il tempo di rientro, la selettività nei confronti degli insetti utili, tossicità per l'uomo ed ecocompatibilità.

La classificazione tossicologia viene stabilita in base alla valutazione integrata della tossicità acuta e della tossicità cronica dell'intero formulato. foto "tossicità"

SCHEDA DI SICUREZZA: informazioni sul rischio potenziale per la salute umana e ambiente. Deve essere resa disponibile per gli usi professionali. Sono presenti i vari rischi e le misure di primo soccorso...

Per favorire il commercio mondiale l'ONU ha definito i criteri armonizzati per la classificazione e l'etichettatura ed i principi generali per la loro applicazione. Il risultato è GHS (Globally Harmonized System), mentre il regolamento CLP (Classification, Labelling and Packaging) è emanato dalla Commissione Europea per integrare GHS nel diritto comunitario.

L'evoluzione della tecnologia formulativa
foto "formulati"

Le regole di base per la corretta miscelazione di formulati sono quelle di attenersi alle indicazioni dell'etichetta, effettuare test preliminari su piccola scala in assenza di indicazioni sulla miscibilità dei diversi formulati, segnalare eventuali incompatibilità ed utilizzare una corretta sequenza di inserimento in botte dei vari formulati.

Ordine di inserimento dei prodotti: regolatori pH, sacchetti idrosolubili, granuli idrosolubili, polveri solubili, granuli dispersibili, polveri bagnabili, sospensioni concentrate e suspoemulsioni, emulsioni acquose, emulsioni concentrate, concentrati solubili in acqua e bagnanti, fertilizzanti e prodotti antideriva.

Chiedere a giulia se Difesa della vite della lezione del 18/10 bisogna sapere le tabelle o meno.

LEZIONE 25/10 - DIFESA PIANTE CON AGROFARMACI

LA DIFESA DELLE PIANTE CON GLI AGROFARMACI: ASPETTI GENERALI

Ci sono tre momenti fondamentali nel processo della difesa fitosanitaria:

messa a disposizione dei preparati per il contenimento degli agenti dannosi - definizione e aggiornamento dei protocolli d'intervento (strategie) - applicazione pratica dei programmi d'intervento

Queste tre fasi porta alla collaborazione di diversi soggetti: industria agrochimica, centri di sperimentazione, aziende agricole e contoterzisti.

Criticità uso di agrofarmaci:

- possibili effetti secondari indesiderabili: su organismi non bersaglio, quindi squilibrio degli ecosistemi; tossicità per gli operatori; residuo nelle derrate; inquinamento ambientale.
- complessità e costi: nella loro ricerca e verifiche agronomiche e successiva brevettazione.
- complessità nella normazione: per la definizione delle norme di valutazione degli aspetti tossicologici e ambientali, successivi controlli.
- difficoltà pratiche di utilizzo: perché ci sono una moltitudine di opzioni e variabili da tenere in considerazione, strategie di intervento in continua evoluzione, a volte necessità di servizi di formazione.

MESSA A PUNTO DI UN AGROFARMACO

L'immissione in commercio richiede 10 anni, con costi superiori ai 200 milioni di euro e la durata del brevetto è di 20. Terminato questo periodo la molecola può essere sfruttata da chiunque. Le informazioni sugli aspetti tossicologici e ambientali del principio attivo sono alla portata di tutti.

PRESUPPOSTI FONDAMENTALI PER L'ATTIVITA' DI UN FUNGICIDA

Fungittossicità della sostanza attiva e adeguata disponibilità della sostanza attiva a livello del sito-bersaglio (possibilità per la sostanza attiva di entrare "in contatto" con i siti sensibili del patogeno in quantità idonea. Infatti l'azione del prodotto deriva dalla combinazione fra tossicità e disponibilità. Quest'ultima può essere limitata da diversi fattori funzionali e strutturali (eliminazione attiva, disattivazione o mancata attivazione).

L'attività tossica deriva da interferenze sulle cellule del patogeno sia a livello metabolico che strutturale: anabolico (blocco di varie biosintesi) - catabolico (mancata produzione di energia) - strutturale (danneggiamento di parete e membrana). Nel maggiore dei casi interferisce con l'attività enzimatica dei processi di respirazione/biosintesi. Altre volte invece agisce indirettamente sul patogeno, ovvero sull'interazione pianta/patogeno, cioè stimolando autodifese della pianta o perturbando la comunicazione pianta-patogeno.

COMPORAMENTO DEI FUNGICIDI

E' condizionato dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza attiva, dai coformulati e dalla pianta. **Prodotti di copertura (o di superficie):** formazione di un film della sostanza attiva e coformulati, la sua durata è legata a fenomeni di dilavamento/degradazione/accrecimento dell'organo, hanno azione preventiva. **Prodotti penetranti (mobili):** la sostanza attiva penetra con un semplice movimento locale per diffusione semplice, oppure con trasporto nei vasi xilematici o floematici, la sua durata dipende dalla resistenza della molecola alla degradazione da parte della

pianta ed ha azione curativa(incubazione)/eradicante(post-incubazione). Prodotti ambivalenti: hanno entrambe le caratteristiche.

EPOCA

E' legata all'attività del prodotto in funzione del ciclo infettivo dei funghi e dei batteri. Dal punto di vista tecnico si cerca di evitare quelli con finalità curative ed sradicanti, perché potrebbero risultare poco efficaci e dar luogo a fenomeni di resistenza.

Bisogna poi tener in considerazione i fenomeni collaterali:

- persistenza d'azione: durata della sua efficacia, espresso in gg. E' influenzata dalle condizioni meteorologiche e dalla crescita della nuova vegetazione (x i prodotti di copertura e citotropici);
- resistenza al dilavamento: sia pioggia che irrigazione. Dipende soprattutto dai coformulati, dalla sostanza attiva e intensità della pioggia, per questo quelli endoterapici non sono molto influenzati se non per il momento della penetrazione.
- fitotossicità: dipende dalla sensibilità della specie o varietà, dalla fase fenologica o derivante dalla miscelazione di due o più prodotti fitosanitari.
- miscibilità: per evitare fenomeni di insolubilizzazione e precipitazione dei componenti. Bisogna considerare l'intervallo di sicurezza più lungo.

RESISTENZA DEI PATOGENI AI FUNGICIDI

E' un fenomeno dovuto alla selezione dei patogeni, a seguito dell'impiego ripetuto del fungicida. Ha una base genetica, derivando da mutazioni naturali ed è quindi ereditaria.

Questo fenomeno, oltre che dal meccanismo d'azione e dal modo d'impiego del fungicida, dipende anche dalla capacità di moltiplicazione e sopravvivenza delle popolazioni divenute resistenti (competitività).

Si manifesta con aumento della dose di fungicida e del numero di trattamenti. Altre cause sono prodotto deteriorato, errata diagnosi della malattia.

I fattori del rischio di resistenza: associati al fungicida meccanismo d'azione del p.a. e tipo d'impiego; associati all'agente patogeno numero di cicli infettivi, intensità di sporulazione, elevata competitività dei ceppi resistenti; associati all'ambiente e alla tecnica colturale condizioni pedoclimatiche e pratiche agronomiche (concimazione, irrigazione...)

PRODOTTI PER LA DIFESA DELLA VITE

Si dividono in prodotti di origine naturale (microbiologici ed inorganici (minerali) e prodotti di sintesi.

MICROBIOLOGICI: spore vive di diversi microrganismi dotati di capacità antagonistica nei confronti dei patogeni (lotta biologica). Le modalità di funzionamento possono essere: competizione (spazio e nutrimento), produzione di sostanze tossiche, stimolazione autodifesa della pianta. Hanno una limitata efficacia pratica, per la vite sono autorizzati come agrofarmaci solo 1 fungo e 1 lievito e 2 batteri. Slide 4 sentire cosa dice Giulia.

INORGANICI (MINERALI): base rame e zolfo, fondamentali per la produzione biologica ed integrata. Tipici prodotti di copertura (azione antigerminativa). Il rame ha un'azione tossica su diversi processi cellulari (respirazione). E' ad ampio spettro, indicato per le peronosspore; fitotossicità per le piante avviene quando hanno uno strato troppo sottile di cuticola (giovane); la criticità attuale è la non degradabilità del metallo e conseguente accumulo nel suolo. Soggetto a limitazioni quantitative in agr. biologica (max 6kg/ha/anno). Ora sono autorizzati sono i sali insolubili: poltiglia bordolese, solfato tribasico, ossicloruro, idrossido ed ossido.

Lo zolfo usato prevalentemente come antioidico, come multisito e di copertura; inibendo la respirazione delle cellule. E' attivo allo stato gassoso, e il passaggio da solido a gassoso è funzione della t° (10-12 $^{\circ}$), UR e dimensione particelle. I rischi di fitotossicità possono essere diminuiti con applicazioni nelle ore più fresche della giornata. Si può utilizzare zolfo puro, polisolfuro di calcio. Altro prodotto minerale è bicarbonato di potassio naturalmente presente nel suolo e nei tessuti vegetali. Concentrazioni superiori a 0,5% può determinare effetti fitotossici; ha un'attività antioidica e può essere utilizzato fino ad 1 giorno prima della raccolta.

DI SINTESI (ORGANICI): si dividono in tradizionali di copertura e moderni (in gran parte penetranti). Tradizionali di copertura dotati di un'azione chimica tossica diretta verso il patogeno. Hanno una breve persistenza d'azione (dilavabili); ampio spettro d'azione, meccanismo multisito, azione fungitossica fundamentalmente diretta sui processi respiratori cellulari. Sono ditocarbammati (economici), chinoni. Fungicidi moderni: capacità penetrante, abbinata a sistemicità, ha anche attività curativa; talvolta sono specifici; costo più elevato. Quelli moderni si dividono a loro volta: -prodotti a spettro più ampio: IBS (inibitori della biosintesi degli steroli) antioidici sono i triazoli, RIS (inibitori della riduttasi isomerasi), QI (inibitori del Quinolo); -prodotti

contro agenti di marciumi (Botrytis, Monilia, Sclerotinia): es. dicarbossimidi; - prodotti specifici per gli oomiceti: hanno meccanismo piuttosto specifico quindi rischio di resistenza; - prodotti specifici per gli agenti di oidio; - a spettro vario: piridinamina.

LEZIONE 30/10 - FITOPLASMI

Sono batteri e nelle piante si sviluppano nelle cellule del floema, quindi sono patogeni sistemici. La modalità di moltiplicazione è scissione e divisione diretta. Sono trasmessi da insetti vettori. I principali fitoplasmi sono: giallumi della vite - scopazzi del melo - giallume europeo delle drupacee - moria del pero - fitoplasmosi di piante ornamentali.

La trasmissione non avviene per seme, meccanicamente per succo o forbici ed altri attrezzi. Si trasmettono con bassa frequenza tramite innesto radicale (nel melo) o piante passite (cuscuto). Mentre con elevata frequenza mediante materiale di propagazione vegetativa ed innesto, tramite insetti vettori attraverso la loro saliva. L'acquisizione da parte dei fitoplasmi vengono acquisiti durante l'alimentazione, accumulandoli nell'intestino. Poi si moltiplicherà nel vettore, raggiungendo le ghiandole salivari (fase di latenza), mentre l'inoculazione avviene sempre durante l'attività trofica. I principali vettori nella vite e negli alberi da frutto sono le cicadellidae (Scaphoideus titanus), cixidae (Hyalosthes obsoletus). L'interazione vettore-fitoplasma ha una forte specificità. I fitoplasmi rilasciano della fillosfera sostanze attrattive, che facilitano così la diffusione. L'eradicazione quindi è un'importante misura di lotta. I fattori che hanno contribuito alla diffusione di questi microrganismi sono la commercializzazione di materiale vivaistico infetto, terreni incolti, riduzione insetticidi ed aumento delle temperature, soprattutto invernali. Infatti la temperatura incide molto sull'attività degli insetti, dato che un aumento di 2° fa raddoppiare il numero di cicli biologici, ampliando anche l'areale geografico di alcune specie e mortalità invernale più bassa, ma anche riduzione delle "finestre di opportunità" per gli iperparassiti.

DIAGNOSI

- metodi biologici;
- trasmissione con vettori;
- trasmissione a vinca con ponte di cuscuto;
- innesto su vinca;
- microscopia elettronica;
- test sierologici (ELISA);
- metodi molecolari

La diagnosi e la caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi può avvenire con vari test come PCR, ELISA o sequenziamento.

La classificazione dei fitoplasmi sono stati classificati in base alle caratteristiche biologiche (sintomi indotti...), ora invece grazie alle tecniche molecolari, si classificano in base alle sequenze del gene 16S, in 19 gruppi indicati col nome della malattia a cui è stato associato.

Tassonomia

Super-regno: Prokaryota; regno: monera; Dominio: Bacteria; Phylum: Firmicutes; Candidatus genus: Phytoplasma.

In base alla grandezza del genoma (Kb) dipende il numero di piante ospiti.

Lotta

Utilizzo di materiale di moltiplicazione sano, lotta ai vettori, distruzione delle piante infette, pratiche agronomiche (diserbo, distruzione di spontanee), induttori di resistenza.

La lotta diretta ai fitoplasmi mediante iniezioni di ossitetracicline alle piante è proibita nell'UE.

LEZIONE 8/11 - GIALLUMI DELLA VITE

Insieme delle malattie che causano ingiallimenti alla vegetazione (vitigni a bacca bianca). Prime indagini dimostrarono che l'agente eziologico era una cicadina (Scaphoideus titanus). Poi con lo studio al microscopio elettronico (anni '70) si vide che erano gli attuali fitoplasmi. Queste affezioni vengono indicate con nomi diversi (legno nero) e sono stati identificati almeno 3 fitoplasmi diversi. CLASSIFICAZIONE GIALLUMI IN BASE AI VETTORI E LOCALIZZAZIONE GEOGRAFICA

- flavescenza dorata (sensu strictu) FD: trasmessa da Scaphoideus titanus, gruppo tassonomico 16SrV;
 - bois noir - legno nero LN: trasmesso da Hyalosthes obsoletus, appartiene al gruppo tassonomico 16SrXII;
 - altri giallumi: diffusi in zone dove S.titanus non è presente (Australia) e diffusi da altri cicadellidi.
- I fitoplasmi nella vite non si differenziano per forma e dimensione; per i sintomi sulla vite e metodo ELISA.

SINTOMATOLOGIA

E' impossibile distinguerli con osservazione dei sintomi in campo. Possiamo avere sulla foglia ad inizio estate una vegetazione clorotica, stentata e cadente, con riflessi dorati o arrossamenti di solito perinervale e accartocciamento; nei tralci abbiamo un accorciamento degli internodi, scarsa lignificazione e pustole nerastre; nei grappoli invece infiorescenze e grappoli dissecano e cadono precocemente. In generale la sindrome può essere localizzata solo in alcuni tralci o tutta la chioma.

Ci sono diverse variabili comunque che condizionano il comportamento di FD.

EPIDEMIOLOGIA FD E LN

I vettori li ho già scritti sopra, l'acquisizione ore-gg, i fitoplasmi sono acquisiti dalle attere. Hanno un periodo di latenza di 14-18 gg (all'interno dell'insetto); l'inoculazione effettuata da adulti e servono alcune ore, non vengono trasmesse alle uova, ma attraverso le mute. Queste sono le analogie tra i due fitoplasmi.

Le differenze sono i vettori.

Hyalesthes: ampelofago occasionale, depone le uova e sverna come ninfa III°età sulle radici.

Diffuso nell'area mediterranea e asia minore. Adulto color grigio-nero, ali membranose, polifago e occasionalmente presente su vite; stadi giovanili (ninfe e neanidi) bianchi e vivono nel terreno sulle radici. *Ciclo biologico*: deposizione uova in estate sul colletto delle piante erbacee, sverna come ninfa di III età; non sopravvive per più di qualche giorno sulla vite.

Scaphoideus: tutto il ciclo vitale sulla vite, sverna come uovo nel ritidioma. Presente nell'Europa meridionale. E' monofago su vite su cui compie una sola generazione. *Ciclo biologico*: deposizione uova nel ritidioma dei tralci di 2 anni in estate e la schiusura avviene a fine maggio e gli adulti volano da fine luglio a fine ottobre. La trasmissione avviene da vite a vite.

Metcalfa pruinosa è un insetto polifago e questa sua caratteristica ha portato al suo studio, ma è stato visto che è in grado di assumere "altri giallumi", ma non di trasmetterli.

Altre modalità di propagazione dei fitoplasmi, oltre agli insetti, è possibile tramite materiale di propagazione (marze e barbatelle e gemme).

Le conseguenze principali sono un forte calo sulla produzione ed elevate incidenze e presente in tutto il territorio nazionale.

MISURE DI CONTROLLO

Il ciclo epidemiologico di FD è stretto vite/*S.titanus* quindi scoppi epidemici di FD quando c'è la contemporanea presenza di vettori, piante infette sorgenti d'inoculo e piante ospiti suscettibili porta ad intervenire sul vettore (trattamenti insetticidi), espianti o sugli ospiti suscettibili. La lotta a questo vettore quindi nelle zone indenni consiste in un semplice monitoraggio; nelle zone focolaio in cui sono presenti sia FD che il vettore si richiede l'espianto che trattamenti insetticidi; nei barbatellai e campi di piante madri si effettuano monitoraggi e comunque si effettuano 3 trattamenti. La lotta agronomica per il contenimento della FD consiste nell'eliminazione dei tralci e succhioni con *S.titanus* svernante, o estirpo delle viti ammalate. Nella lotta non-convenzionale si utilizzano metodi della confusione sessuale (feromoni sessuali), anche se *S.* utilizza delle vibrazioni per l'accoppiamento, anziché scie odorose, perciò si è visto che ponendo degli shaker sui filari si ottiene una riduzione del 90% degli accoppiamenti.

Per il legno nero invece bisogna tenere sottocontrollo le piante spontanee ospiti del citoplasma e del suo vettore, isolando gli appezzamenti o intervenendo con potature terapeutiche e forme di allevamento (da quello meno malato a quello più, guyot-capovolto-cordone-gdc).

PUNTI CRITICI

Difficoltà ad identificare eventuali infezioni tardive e/o latenti e il ruolo dei portinnesti, quali potenziali portatori latenti del fitoplasma, rimane non precisato.

RISANAMENTO-> termoterapia in acqua del materiale di moltiplicazione, coltura in vitro e copertura con rete nei campi di piante madri di base.

La prospettiva futura nella lotta a questa malattia è quello di un risanamento naturale grazie alla co-evoluzione delle piante con vari organismi, induzioni chiamate "recovery".

Recovery= remissione dei sintomi nella parte epigea della pianta, ma il patogeno è riscontrato mediante PCR. La totale scomparsa del patogeno consiste nel "risanamento". E' un fenomeno noto per i giallumi della vite e gli scopazzi del melo dove può essere attivato da interventi agronomici (capitozzatura) o induttori chimici o biologici.

Altra prospettiva è quella della semina di piante competitori non-ospiti del vettore.

Ci sono altri casi in cui si hanno dei sintomi molto simili a quelli dati dai fitoplasmi, come GLR, disaffinità d'innesto, funghi o altri insetti. Quindi i procedimenti diagnostici utilizzati sono la PCR estraendo DNA del patogeno.

I VIROIDI

Ad esempio il pesco soffre “di mosaico calico” che mostra anche delle aree decolorate. Altri viroidi possono essere l’affusolamento del tubero nella patata. Tutte queste sono causate da un’entità biologica detta “viroide” che ha un RNA più piccolo del più piccolo virus conosciuto. Quindi sono RNA circolari a basso peso molecolare (80-125KDa). Sono patogeni esclusivi delle piante superiori. Il loro RNA non agisce come mRNA, per cui non codificano proteine, infatti per la loro replicazione e le proprietà patogenetiche utilizzano enzimi codificati dal genoma dell’ospite. Non hanno rivestimento proteico, replicazione e sintomi alle piante favoriti a $t^{\circ} > 20^{\circ}$.

Ha una struttura primaria circolare, mentre quella secondaria più stabile è quella a bastoncino.

La presenza di parecchie regioni con basi appaiate e l’assenza di estremità libere rendono i viroidi molto stabili ai raggi UV, calore e degradazione enzimatica.

Si conoscono 30 specie di viroidi.

- Famiglia pospiviroidae o viroidi tipici: 4 generi, sono tutti i viroidi della vite. Nella loro struttura sono stati identificati 5 moduli strutturali comuni: terminale sinistro TL, patogenetico P, centrale C, variabile V e terminale destro TD
- famiglia avsunviroidae: 3 generi

REPLICAZIONE

Avviene attraverso la via del circolo rotante (rolling circle) mediante 2 modalità: simmetrica o asimmetrica, a seconda che l’RNA viroidale sia dotato o meno di attività catalitica. In entrambe inizia con la duplicazione del filamento infettante circolare (polarità +) e la conseguente formazione di filamenti complementari lineari (-). 1.duplicazione dell’RNA RNA polimerasi 2.scissione dei filamenti che si formano durante la replicazione RNasi 3.ligazione delle estremità dei filamenti monomeri RNA ligasi.

Nei pospiviroidae la replicazione avviene nel nucleo secondo il meccanismo asimmetrico. L’RNA circolare di polarità + serve da stampo per la sintesi di filamenti, che poi verranno tagliati e convertiti in molecole circolari mature.

Gli Avsunviroidae si replicano nel cloroplasto in maniera simmetrica. In questo caso il filamento si autoscinde (non necessita dell’RNAasi come sopra). foto “replicazione”

I viroidi nelle piante si possono muovere legandosi alle proteine della pianta ospite passando per i plasmodesmi, mentre per movimenti a lunga distanza entrano nel floema.

I sintomi più frequenti sono: modificazioni aspetto della pianta (nanismo), alterazioni epidermiche, decolorazioni e spaccature. A differenza dei virus, i viroidi si replicano, accumulano ed esprimono ad alte temperature ed intensità luminose. Poi ci sono molti viroidi che rimangono latenti.

Localizzazione prevalente è nel nucleo, causando danni con la loro interferenza alla regolazione genica della cellula ospite.

DIAGNOSI

Biologica: innesto su indicatori;

molecolare: ibridazione molecolare, PCR e sequenziamento;

diagnosi sierologica non è possibile per l’assenza di proteine prodotte dal viroide.

La trasmissione avviene mediante materiale di propagazione vegetativa infetto; tagli; alcuni anche per seme ed in pochi casi è stata dimostrata la trasmissione per afidi.

LOTTA: non esistono P.A. contro questi patogeni; infatti è soprattutto di tipo preventivo (materiale sano e disinfezione degli arnesi) . Neanche la termoterapia è efficace.

Nella vite sono conosciute 5 specie, di cui 3 specifici per la vite. Solo 2, della picchiettatura gialla causano sintomi evidenti, gli altri 3 sono latenti. I sintomi della picchiettatura gialla GYSVd-1 e -2, sono variabili in base alla simultaneità dei 2, sensibilità varietale e condizioni ambientali.

L’embriogenesi somatica ha un’altissima efficienza di risanamento. E’ un processo attraverso cellule somatiche passando attraverso una serie di cambiamenti morfologici e biochimici, danno origine ad un embrione. Il motivo per cui si risani non è sicuro, si pensa che sia colpa dell’elevata concentrazione di fitoregolatori interferiscono la replicazione; scarsa attitudine alla traslocazione o degradazione dovuto ad un silenziamento genico.

LEZIONE 22/11/2018

MICOVIRUS

Sono virus che infettano i funghi. Genoma dsRNA, ssRNA e dsDNA.

La loro riproduzione intracellulare in orizzontale è per anastomiosi, mentre verticale è per sporulazione.

VIRUS DI FUNGHI MUTUALISTICI: tolleranze ad alte t°

I micovirus negli ospiti sono criptici, latenti; alcuni conferiscono un vantaggio, altri riducono la crescita del fungo ospite inducendo ipovirulenza. In funghi mutualistici può apportare endofiti e micorizze.

Possono essere agenti di bio-controllo dei funghi fitopagani. Un aspetto per cui riesce a controllare le malattie è la poca compatibilità vegetativa.

Sono stati ritrovati 15 virus anche nella *Botrytis cinerea* per la quale aumenta la velocità di crescita.

Anche per la *Rosellinia necatrix* riduce l'effetto di questo fungo, i micovirus riducono i problemi causati dal fungo.

Quindi si sta studiando per avere una maggiore diffusione di utilizzazione di questi agenti di controllo.

PATOGENI VIRALI DA QUARANTENA

Grapevine red blotch disease è una nuova malattia virale su vite. I sintomi principali sono a carico delle foglie basali e la composizione zuccherina del grappolo (4-5°brix). Nelle foglie appunto troveremo delle macchie, i margini non si arrotolano come nei casi dei virus.

Non sono conosciuti vettori naturali.

La diagnosi viene fatta con PCR dai piccioli fogliari. Si tratta di un patogeno da quarantena, al momento non esiste una normativa precisa, giusto il monitoraggio. In Europa non è presente, solo America.

Virus della maculatura anulare del pomodoro è un nepovirus americano, dove è un patogeno da quarantena. E' trasmesso da un nematode, per seme e polline in varie specie. In Italia è stato riscontrato principalmente in piante di melograno e mai nella vite, anche se questa è una specie suscettibile.

I sintomi sono: sviluppo stentato - maggiore sensibilità alle gelate tardive; in primavera, foglie piccole deformate e clorotiche; in estate-autunno: deformazioni fogliari, ingiallimenti e necrosi internodali; sul grappolo, aborto dei grappoli, produzione ridotta o stentata.

Rimedi: eradicazione e blocco del materiale di propagazione e monitoraggio.

Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV): sintomi principali a carico delle foglie (decolorazioni, arricciamento lamina e venature anomale) e riguardano la maturazione e il contenuto zuccherino del grappolo (rimangono acerbi).

E' meccanicamente trasmissibile alla vite, materiale di propagazione infetto e si ipotizza un vettore coinvolto nella trasmissione (cocciniglie).

I possibili rischi sono difficili da valutare per mancanza di dati sulla biologia, epidemiologia, distribuzione e impatti sulla produzione di vite. I casi in cui è stata riscontrata erano tutti asintomatici.