Malattie virali trasmesse per seme: ruolo epidemiologico e impatto sulla coltivazione

Salvatore Walter Davino

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali
Università degli Studi di Palermo

Un po' di storia…

- La prima trasmissione di un virus attraverso il seme è stata sospettata nel 1910 da Westerdijk e successivamente da Allard nel 1914 (semi infetti da *Tobacco mosaic virus*)

- Successivamente *Soybean mosaic virus* nel 1916, *Lima bean mosaic virus* nel 1917, *Bean common mosaic virus* nel 1917, *Cucumber mosaic virus* nel 1919…….

- Nel 1988 Agarwal e Sinclair hanno stilato una lista di 156 virus trasmessi per seme

- Durante questi primi 100 anni di ricerca sono stati commessi anche degli errori. Lo stesso virus aveva nomi diversi in differenti parti del mondo ed alcuni virus erano stati erroneamente considerati come trasmissibili per seme.

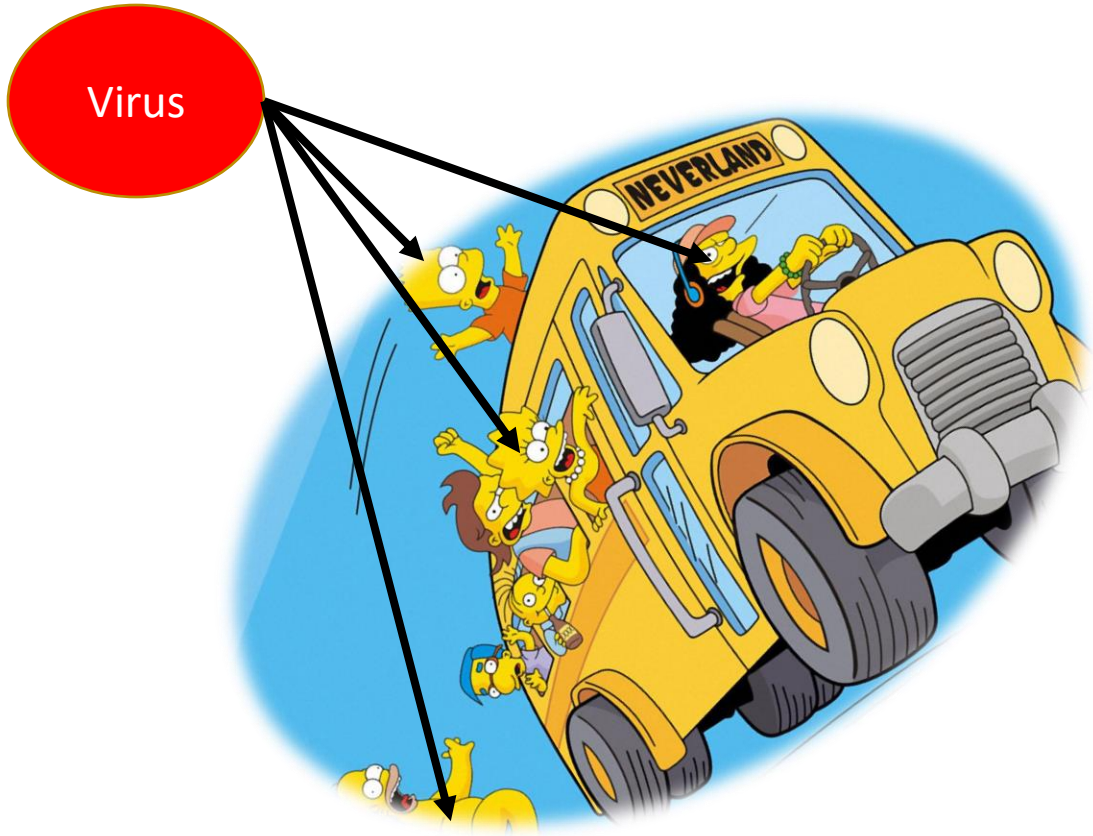
- Oggi i fitovirus trasmessi per seme sono circa 200

Sinonimi di *Cucumber mosaic virus* (CMV)
Banana infectious chlorosis virus
Coleus mosaic virus
Cowpea banding mosaic virus
Cowpea ring spot virus
Cuculi virus 1
Cucumber virus 1
Lily ring spot virus
Marmor cucumeris
Pea top necrosis virus
Pea western ring spot virus
Peanut yellow mosaic virus
Southern celery mosaic virus
Soybean stunt virus
Spinach bligth virus
Tomato fern leaf virus

Per comprendere meglio il significato della trasmissione via seme, si rende necessaria una distinzione tra virus **seed-borne** e virus **seed-transmitted**.

Seed-borne: il virus viene trasportato dal seme. Si può localizzare nei tegumenti esterni o nell'endosperma, mai nell'embrione. L'infezione alle nuove piantine è un evento casuale.

Seed-transmitted: il virus viene trasportato dal seme. Si localizza nell'embrione. Trasmissione verticale dalla madre alla progenie.



Un esempio di trasmissione **seedborne** e **seed-transmission**

Seed-borne

Tomato brown rugose fruit virus

Percentuale di trasmissione: 2,8%

Rischio per le produzioni: ALTISSIMO

Seed-transmitted

Southern tomato virus

Percentuale di trasmissione: 80%

Rischio per le produzioni: QUASI NULLO

Gli effetti della trasmissione dei virus via seme

- Danno diretto poiché anche una bassa incidenza di semi infetti seminati si traduce in numerosi focolai di inoculo sparsi in modo casuale, facilitando la diffusione secondaria precoce nella coltura attraverso vettori;

- Sopravvivenza dell'inoculo virale da una stagione all'altra (anche anni);

- Rapida diffusione a livello mondiale dovuta allo spostamento di semi apparentemente sani (visivamente). Risulta difficile la diagnosi ai punti di accesso.

Impatto economico dei virus trasmessi per seme

- Lo 0,1% di seme infetto da *Lettuce mosaic virus* (LMV) può portare alla perdita totale del raccolto di lattuga (Broadbent *et al.*1951; Grogan *et al.* 1952; Zink *et al.* 1956).
- Nel Montana, un'incidenza del 90% di *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) ha ridotto le rese dell'orzo del 35-40% (Eslick 1953).
- In termini «monetari» la perdita totale stimata in orzo dovuta a BSMV ha superato i 30 milioni di dollari durante il periodo 1953-1970 (Carroll 1980).
- Di solito, un infezione precoce da virus causa una perdita significativa di raccolto. Per esempio, Fletcher *et al.* (1969) hanno riportato una perdita di resa del 15% in cetrioli affetti da *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMV) quanto l'infezione scaturiva da semi infetti, mentre le perdite erano trascurabili quanto l'infezione era secondaria e si manifestava su piante adulte.
- Alcuni virus influenzano direttamente la germinabilità del seme. Un ceppo blando di *Prunus necrotic ring pot virus* (PNRSV) causa la riduzione del 20% della germinabilità dei semi di luppolo, mentre un ceppo severo riduce la germinazione del 90%.

Come gestire i virus trasmessi per seme?

Cinque approcci indipendenti o integrati tra di loro:

- Evitare che il virus si muova con i semi (sterilizzazioni o inattivazioni di vario tipo);
- Prevenire (eliminare le piante infette e gli insetti vettori dai siti di produzione);
- Legislazione (norme che impediscano l'entrata nel territorio nazionale di un determinato patogeno);
- Produzione di semi sani attraverso programmi di certificazione;
- Moderni approcci diagnostici molecolari.

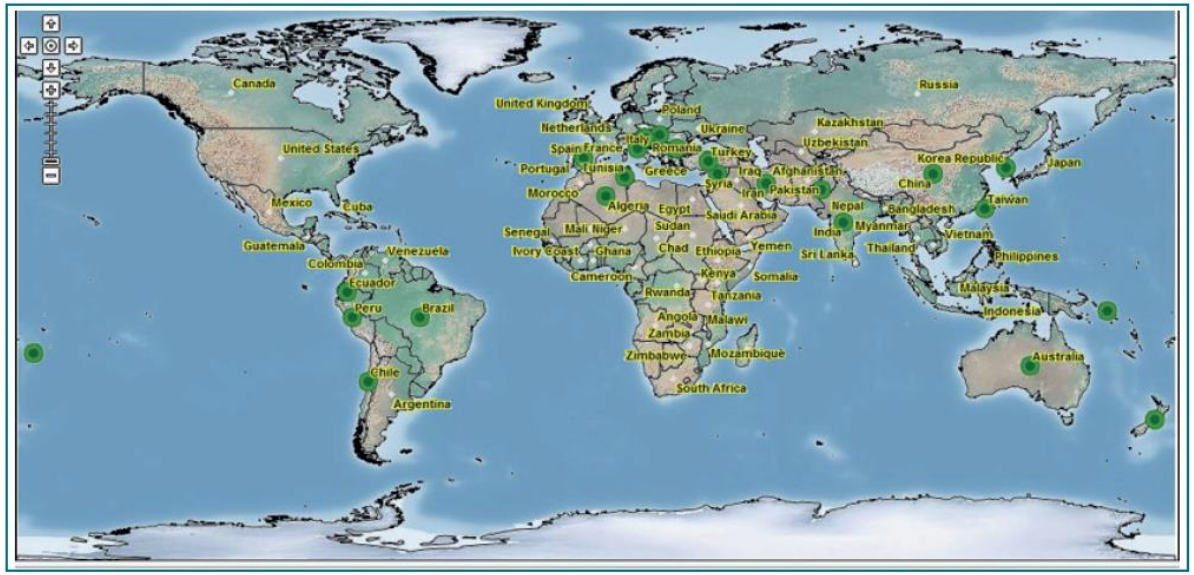
Un virus che ha cambiato l'evoluzione del pomodoro commerciale: *Tomato mosaic virus*

- Oggi in tutti i Paesi dove si coltiva il pomodoro in maniera intensiva vengono utilizzati ibridi con resistenze a ToMV.
- Questo fenomeno ha portato ad avere piante resistenti al patogeno, ma alla non curanza nella disinfezione dei semi.
- **Quali sono le conseguenze?**

Semi portatori di ToMV girano liberamente in vivaio contaminando le seminatrici, macchine dalle quali successivamente passano varietà autoctone o genotipi locali senza resistenze.

- **Quali sono le conseguenze?**

Le varietà locali vengono abbandonate perché si infettano e manifestano sintomi



Cosa succede in un vivaio:

Seed transmitted viruses

↓

Piantine potenzialmente infette → Amplificazione esponenziale dell'infezione in vivaio se il virus si trasmette anche per contatto

↓

Focolai casuali su tutto il territorio nazionale

Generalmente le macchine seminatrici non si contaminano

Cosa succede in un vivaio:

Seedborne viruses

Piantine infette a bassa percentuale → Amplificazione esponenziale dell'infezione in vivaio. Il virus si trasmette per contatto pianta-pianta!

Focolai casuali su tutto il territorio nazionale

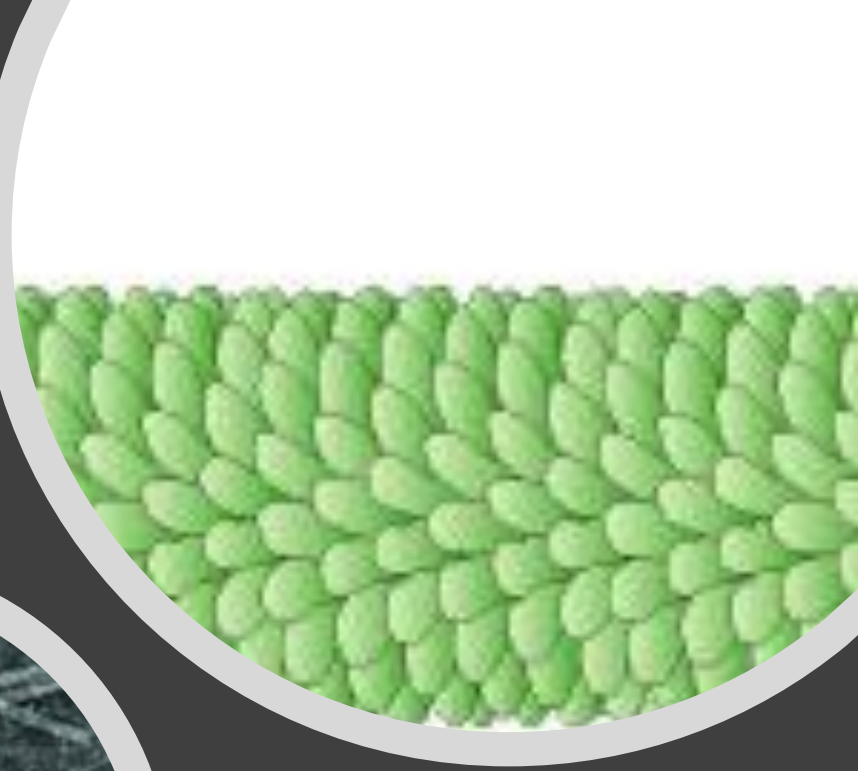
Immediata comparsa di focolai secondari dovuta al *modus operandi* del patogeno

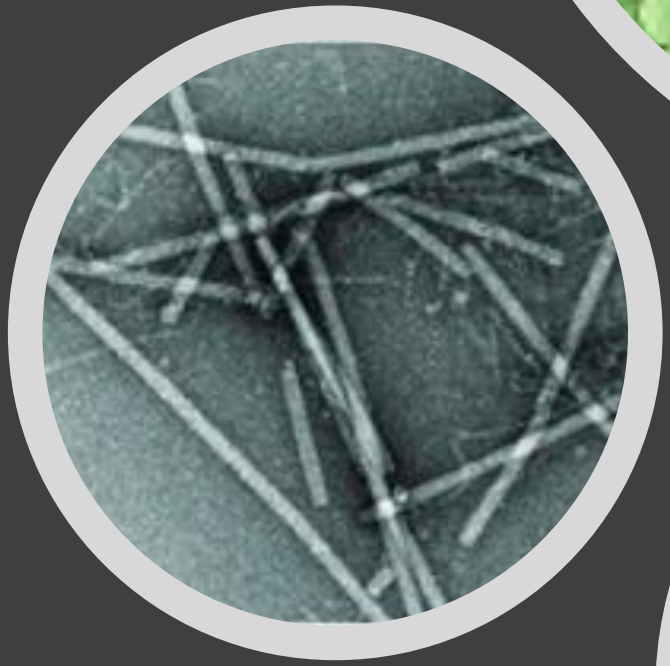
Le macchine seminatrici si contaminano. Potenzialmente pericolose anche per altre varietà

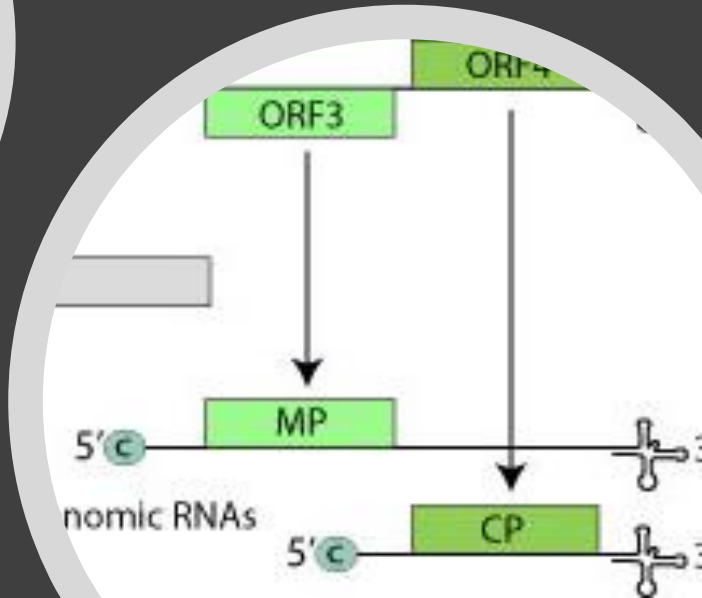
Ruolo epidemiologico ed impatto sulla coltivazione: l'esempio del *Tomato brown rugose fruit virus* in Sicilia

Tomato brown rugose fruit virus

- Famiglia: *Virgaviridae*
- Genere: Tobamovirus
- Specie: *Tomato brown rugose fruit virus*
- Acronimo: ToBRFV o TBRFV





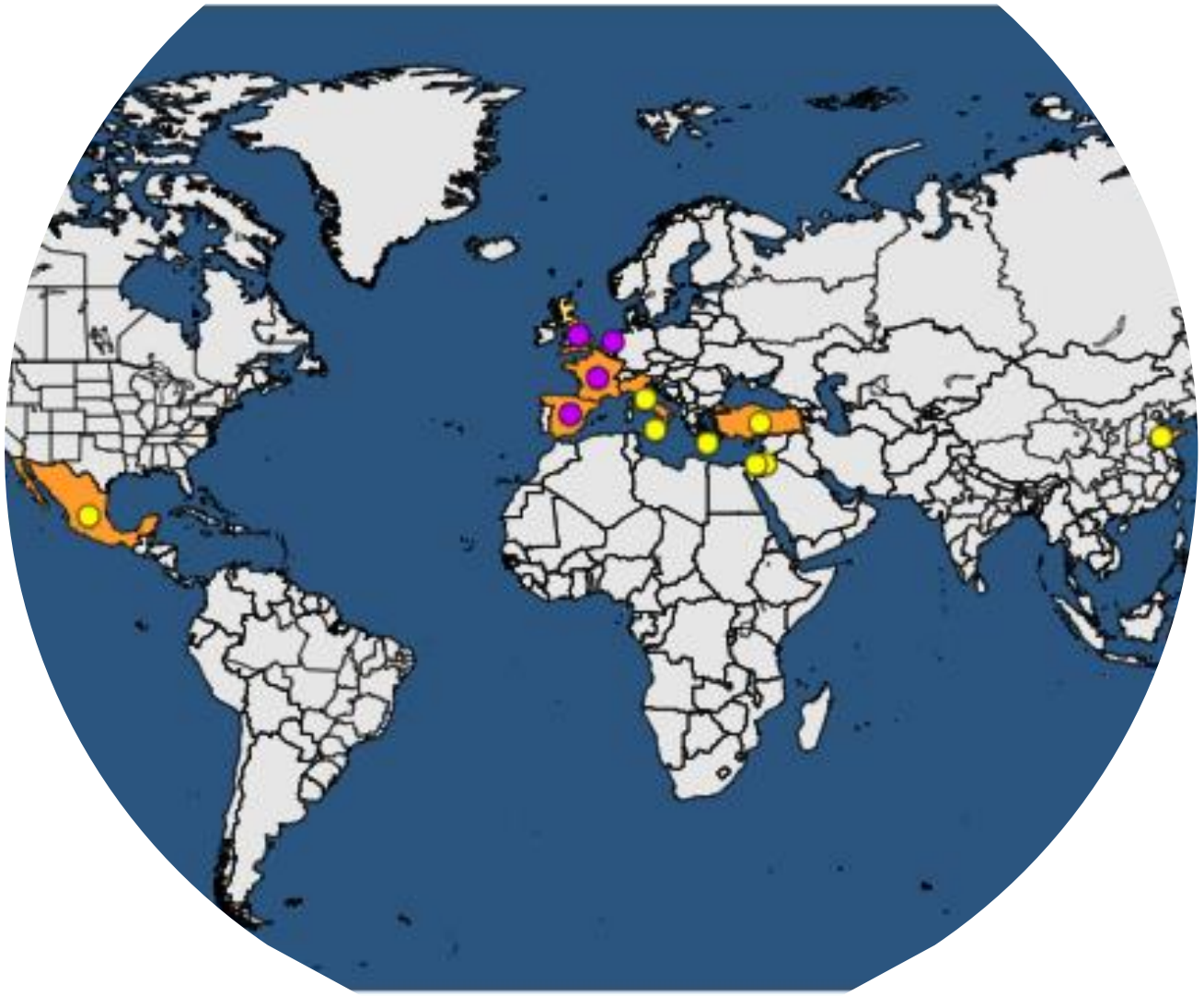


Focus: trasmissione ToBRFV

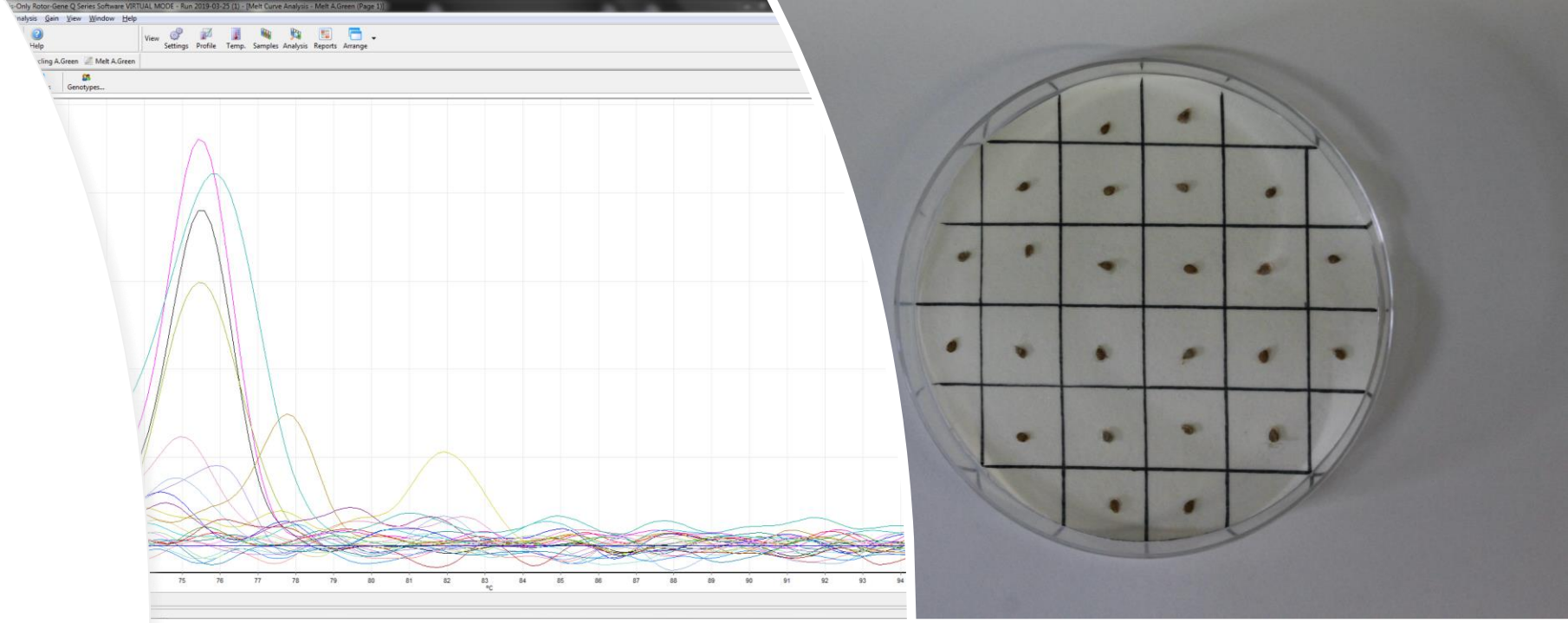
- Trasmissione meccanica estremamente alta
- Bassa trasmissione per seme
- Trasmissione a lunga distanza: SEMI e BACCHE INFETTE
- Trasmissione a breve distanza: semi, contatto pianta-pianta, insetti impollinatori, operai e astanti
- Altamente stabile nel suolo e nel materiale di risulta.

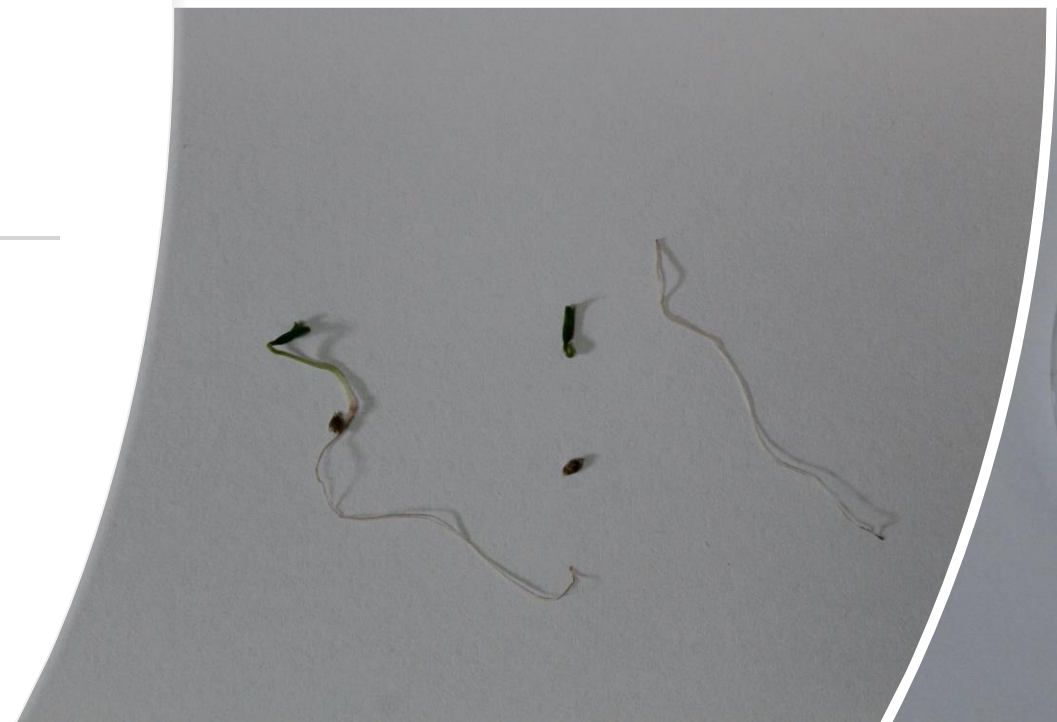
- **Israele 2014:** primo rinvenimento (una variante di ToMV?)
- **Giordania 2015**: Caratterizzazione molecolare e biologica. Nome scietifico proposto: TBRFV;
- **Messico 2018:** rinvenimento in differenti aziende e vivai.
- **Germania 2018:** rinvenimento in alcune serre. Potenziamento dei piani di eradicazione e contenimento (Eradiradcato);
- **Italia 2018:** rinvenimento in Sicilia e successivamente in altre regioni;
- Stati Uniti d'America: rinvenuto in pomodoro (Eradicato)
- **Turchia 2019:** rinvenimento in alcune aree coltivate a pomodoro e peperone;
- **Grecia 2019:** rinvenuto in pomodoro
- **Regno Unito 2019:** rinvenuto in pomodoro;
- **Cina 2019**: rinvenuto in pomodoro
- **Spagna 2019:** rinvenuto in pomdoro nella regione Andalucia
- **Olanda 2019**: rinvenuto in serre coltivate a pomodoro
- **Francia 2020:** rinvenuto in poche serre isolate di pomodoro

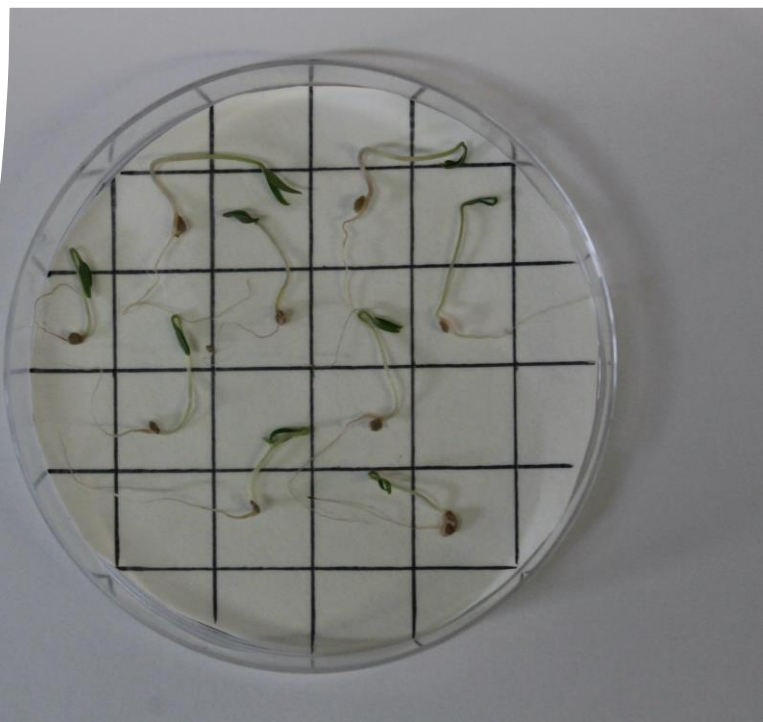
Dispersione globale di ToBRFV



ToBRFV: è un seedborne o un seed-transmitted?



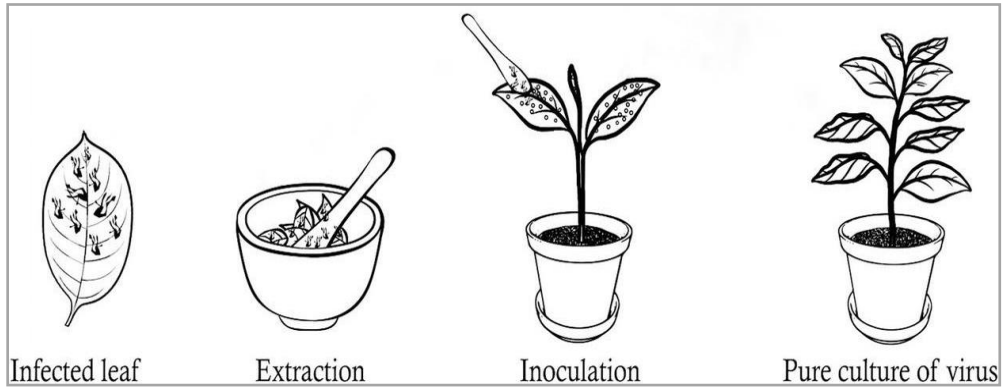




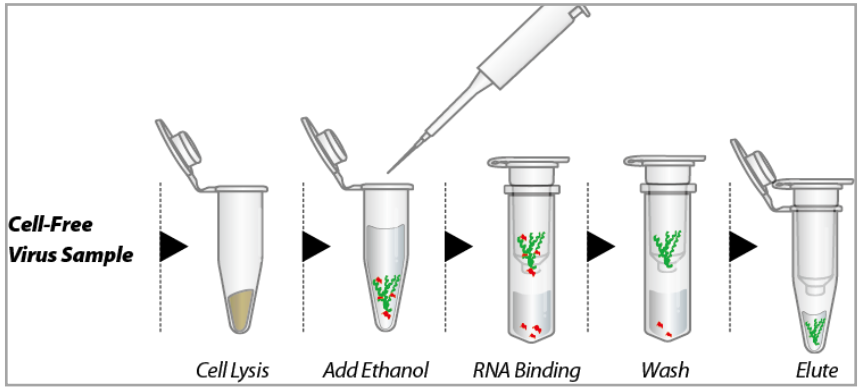
PREPARAZIONE E RACCOLTA DEL MATERIALE VEGETALE INFETTO

MATERIALI E METODI

Inoculazione meccanica su 10 piante di pomodoro



Estrazione RNA totale



Analisi di Real time RT-PCR

10 bacche/pianta

Estrazione dei semi da bacche di pomodoro

Primer e sonda	Sequenza nucleotidica (5'–3')	Dimensione (nt)[1]
ToB5520F	5'–GTAAGGCTTGCAAAATTTCGTTCG–3'	101
ToB5598R	5'–CTTTGGTTTTTGTCTGGTTTCGG–3'	
ToB-probe	5'–FAM-GTTTAGTAGTAAAAGTGAGAAT-MGB–3'	

[1]Nucleotidi

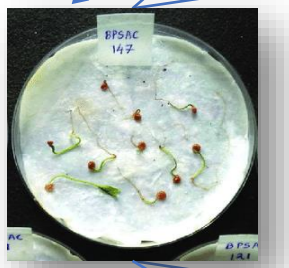
PROTOCOLLO DI REAZIONE : Panno *et al.*, 2019

Panno *et al.*, 2019

LOCALIZZAZIONE SUL SEME DI TOBRFV

Semi non trattati - Bnt

Semi trattati con 10% Na_3PO_4 (3h) - Bt



Tegumento - T

Radichetta e cotiledone – R+C

Tegumento - T

Radichetta e cotiledone – R+C

Possiamo affermare che RoBRFV è un patogeno seedborne.

Il virus si localizza nei tegumenti esterni e a volte nell'endosperma.

N° campioni positvi/campioni analizzati

Bt-T	Bt-RC	Bnt-T	Bnt-RC
1/500	0/500	500/500	9/500

Bt= **Lotto trattato**; Bnt= **Lotto non trattato**;
T= **Tegumento**; RC= **Radichetta+Cotiledone**.

Tasso di trasmissione di ToBRFV attraverso il seme

1000 semi infetti non trattati - Bnt

Cotiledone

Terza foglia vera

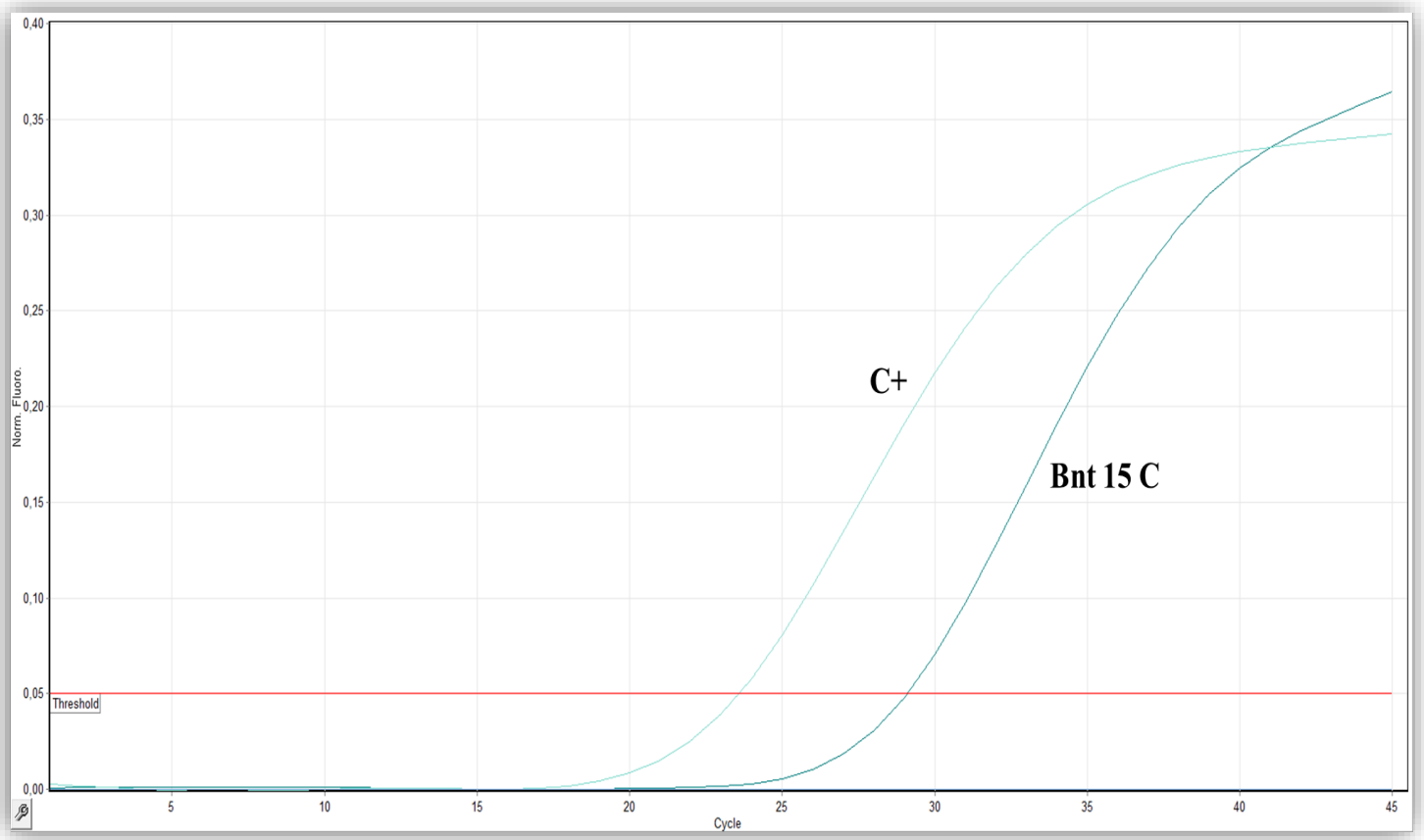
TASSO DI TRASMISSIONE DI TOBRFV ATTRAVERSO IL SEME

COTILEDONI

2,8% dei cotiledoni prelevati dalle piantine germinate da Bnt è risultato positivo

TERZA FOGLIA VERA

1,8% della terza foglia vera da Bnt è risultato positivo

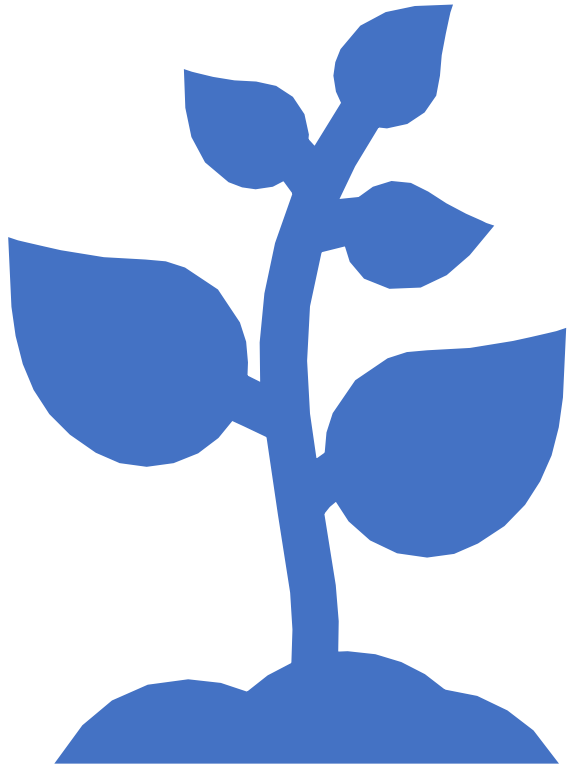


Esempio di curve di amplificazione della RT-qPCR relative ai cotiledoni prelevati dal lotto Bnt (C+= Controllo positivo).

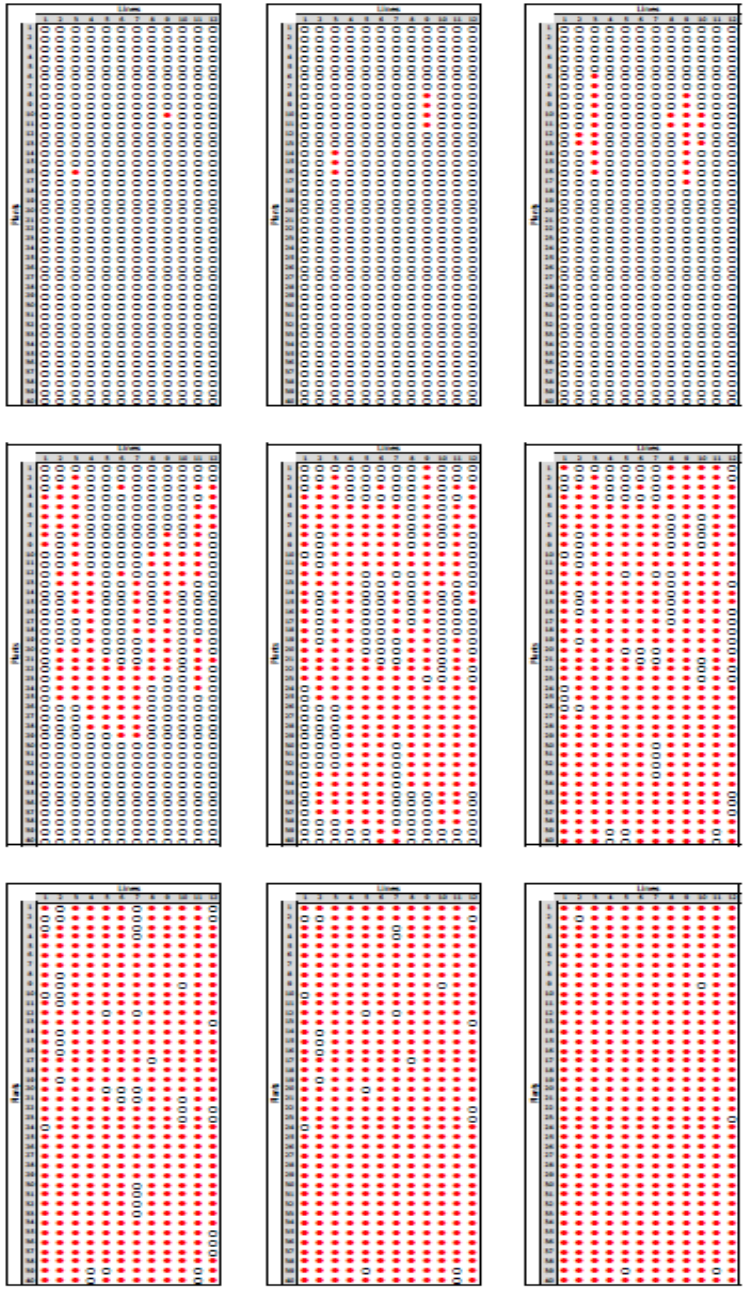
La trasmissione avviene in maniera casuale al momento della germinazione mediante la formazione di ferite

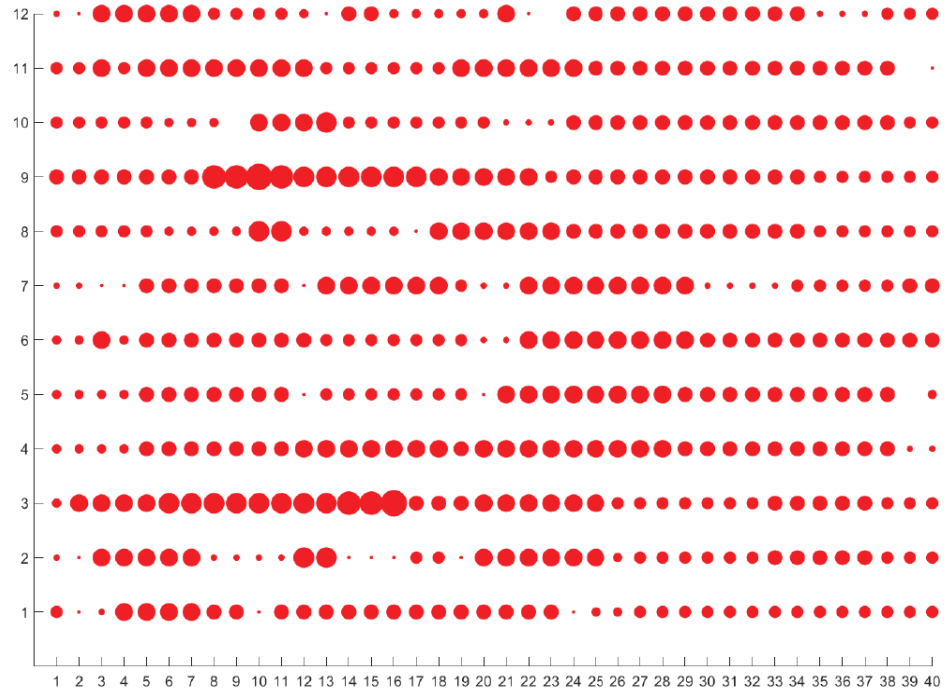
Impatto sulla coltivazione:

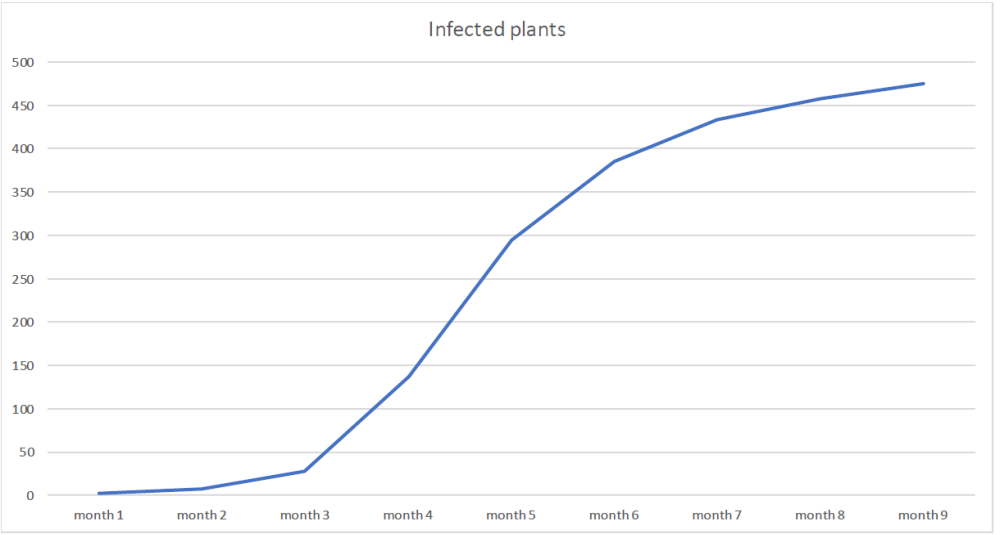
Cosa succede quando ToBRFV si instaura in un areale di coltivazione



Progressione spazio-temporale di ToBRFV all'interno di una serra







Malformazioni e diffusi ingiallimenti internervali

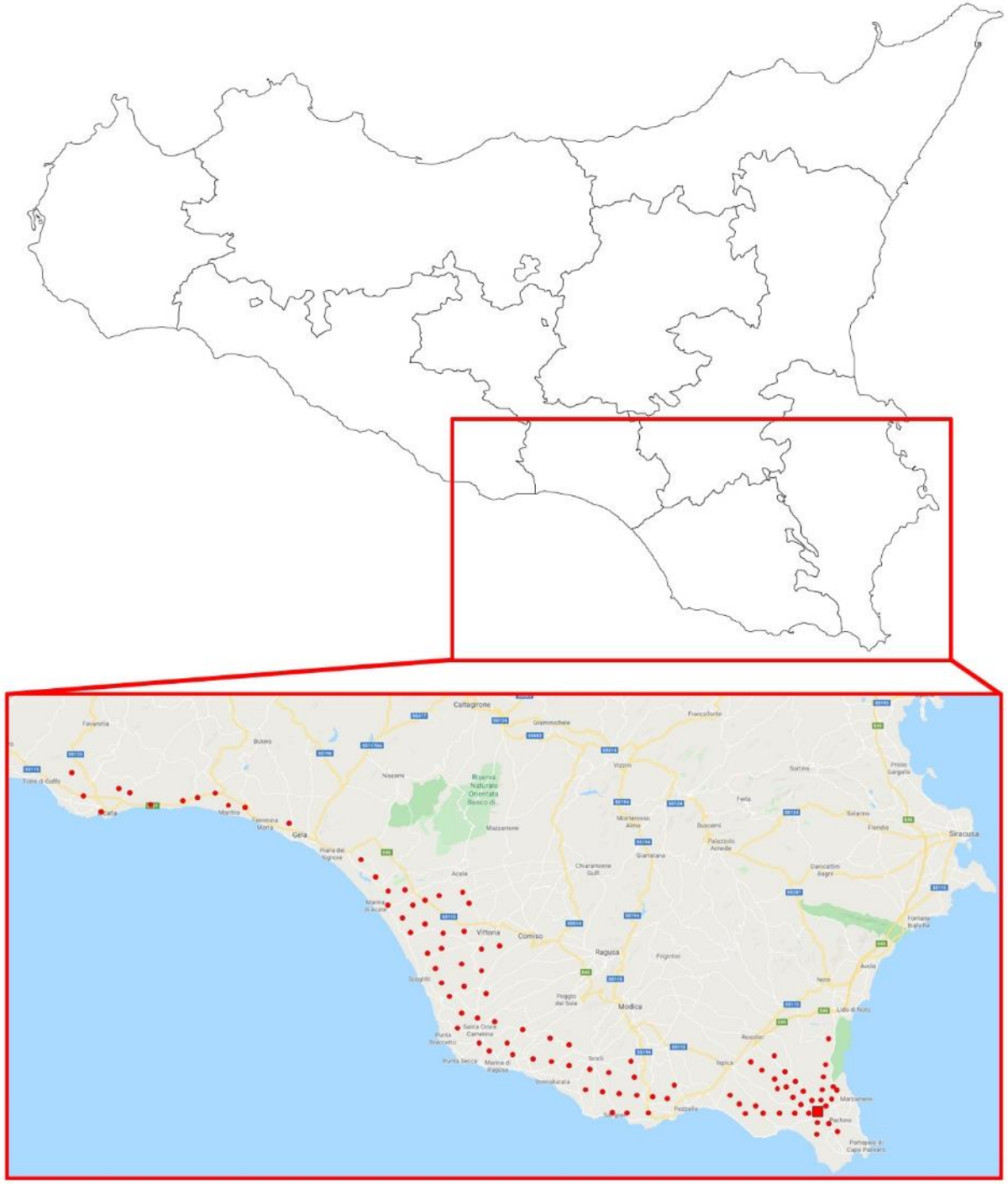
Decolorazione e marmorizzazione a carico delle bacche

Necrosi delle bacche

Situazione siciliana a 2 anni dal primo rinvenimento di ToBRFV nell'isola.

Circa il 45% delle aziende agricole in coltura protetta lamentano sintomi evidenti di ToBRFV.

Si è verificato lo scenario peggiore immaginabile!!



Cosa non ha funzionato?

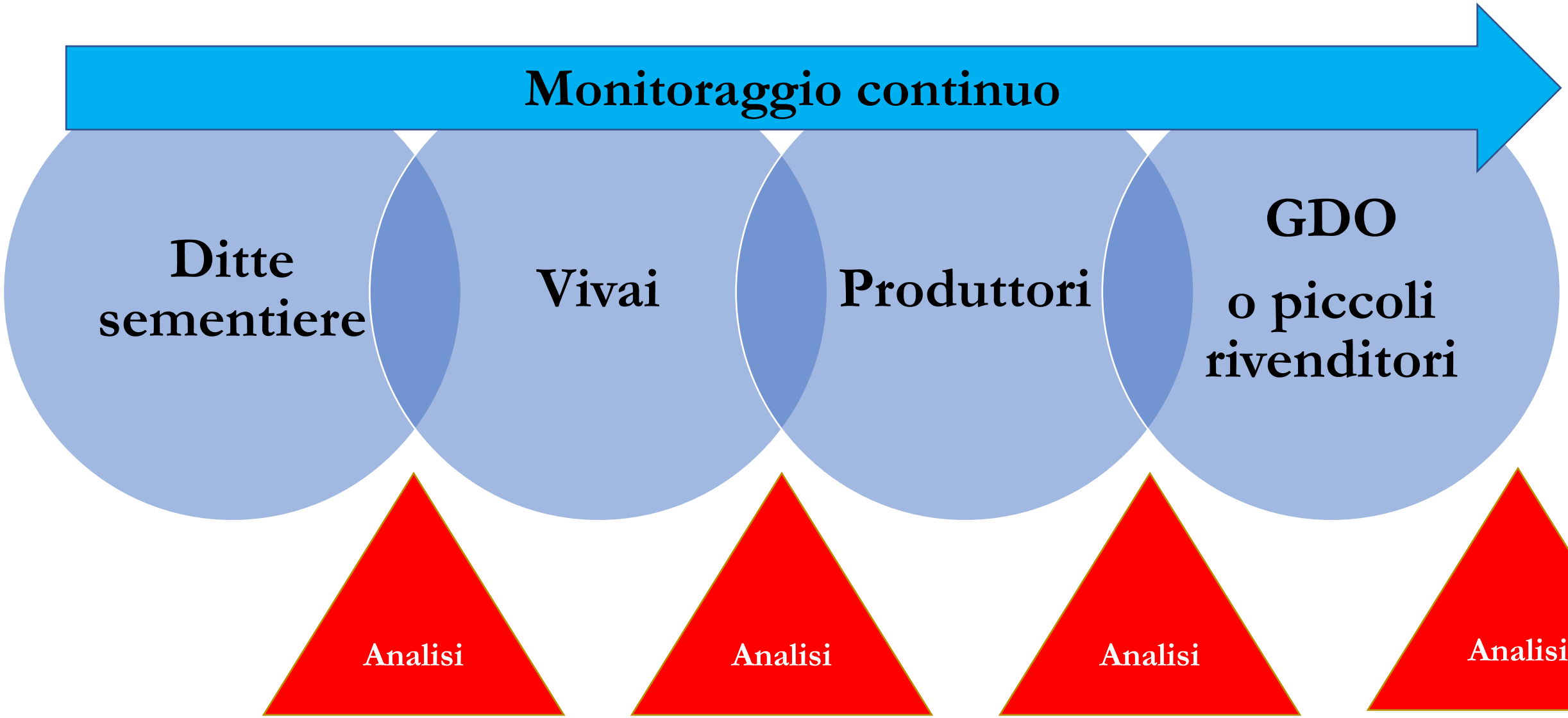
- **Nessun alert sul possibile pericolo di introduzione di ToBRFV in Italia**
- **Nessuna decisione «forte» su una strategia di contenimento**
- **Nessun metodo di analisi efficace disponibile (al 2018)**
- **Nessun metodo efficace di tracciabilità della malattia (gli operatori del settore nascondevano le infezioni)**

Cosa possiamo fare adesso

Considerato il *modus operandi* di questo patogeno le **norme igienico-sanitarie** e la **diagnosi precoce** rappresentano, ad oggi, l'unico importante mezzo per il contenimento della malattia

- Ditte sementiere
- Vivai
- Produttori
- Distributori

…….tutto questo ha un senso se si lavora insieme…..



Un esempio di errata gestione aziendale

Un esempio di profilassi andata a buon fine

Un esempio di profilassi andata a buon fine

Grazie per
l'attenzione