

Oltre la forma: sistematica molecolare e diagnostica fitopatologica

Giovanni Vannacci^{1*} e Giuseppe Firrao²

¹Dipartimento di Coltivazione e difesa delle specie legnose "G. Scaramuzzi", Università di Pisa
Via del Borghetto 80, 56124 Pisa

²Dipartimento di Biologia applicata alla difesa delle piante, Università di Udine
Via Scienze 208, 33100 Udine

Società Italiana di Patologia Vegetale

Riassunto

Tra le molteplici opzioni offerte dalle moderne strategie di protezione delle piante dalle avversità biotiche, certamente la prevenzione costituisce la più attrattiva opportunità di minimizzare l'impatto ambientale garantendo produzioni economicamente convenienti. La diagnostica fitopatologica, perlomeno per quanto attiene il riconoscimento degli organismi causali delle malattie, ha utilizzato strategie diversificate per i diversi organismi. Storicamente i funghi sono stati identificati sulla base della morfologia delle strutture riproduttive, i batteri sulla base di test fisiologici ed i virus sulla base dei sintomi causati su piante indicatrici. I saggi immunologici prima (validamente impiegati per batteri e virus) e i saggi che si basano sugli acidi nucleici successivamente (validamente impiegabili per tutti i patogeni biotici) hanno portato ad una maggiore uniformità di strategie possibili.

La recente evoluzione degli strumenti, sia tecnologici che legislativi, ha profondamente cambiato i termini del problema. Da un lato è tecnicamente possibile mettere a punto strumenti diagnostici che consentano, in tempi ragionevolmente brevi e con alta specificità e sensibilità, di determinare (e quantificare) la presenza di tutti i patogeni di interesse per una singola coltura (multiplexing) in ogni singolo campione, dall'altro è possibile, anche tramite sistemi automatizzati, esaminare un elevato numero di campioni contemporaneamente.

Diversamente da quanto accadeva soltanto 10-15 anni fa, oggi è lecito affermare che non esiste più patogeno che non possa essere diagnosticato con tecniche che garantiscono la sensibilità e specificità necessarie a programmi di certificazione, eradicazione e costituzione di barriere fitopatologiche. L'avanzamento tecnico è continuo, e rende il ricorso a sofisticati e potenti sistemi diagnostici sempre più economico e conveniente.

Tuttavia le nuove acquisizioni sulla epidemiologia e biologia dei fitopatogeni hanno causato uno spostamento del problema da tecnico a concettuale. In particolare per i funghi, la tassonomia convenzionale non è in grado di fornire schemi sistematici coerenti con le ricadute fitopatologiche della complessità biologica; la filogenesi molecolare ha aperto nuovi orizzonti e posto nuove domande.

L'introduzione di nuovi concetti di sistematica molecolare ha le carte in regola per armonizzare il rapporto tra schemi sistematici, complessità della diversità biologica ed aspetti fitopatologici. Al fine di chiarire i concetti esposti, saranno discussi alcuni esempi inclusi *Fusarium* micotossinogeni e funghi, quale *Diaporthe helianthi*, esemplificativi degli organismi da quarantena.

Parole chiave: patogeni, quarantena, diagnosi, funghi.

Abstract

TITOLO IN INGLESE??

Crop protection can be implemented by several strategies, among them prophylaxis guarantees profitable productions and a slight environmental impact. Diagnosis of pathogens exploited different strategies, according to the organisms to be detected. Historically, fungi have been identified by morphological characters, bacteria by physiological tests and viruses by symptoms on indexing plants. Immunological assays (devised to detect bacteria and viruses) at first, and nucleic acid based assays (available for all biotic pathogens) later, reduced strategy discrepancies. The fast evolution in regulation and techniques that we are living nowadays, deeply changed the terms. It is, now,

* Afferenza

possible to identify all the pathogens affecting a crop in a single sample (multiplexing) and to examine a high number of samples at a time. We can state that there is no pathogen that cannot be identified through assays that guarantee the sensitivity and the specificity required by certification schemes, eradication procedures and quarantine protocols. The same fast technical evolution renders the exploitation of the new sophisticated and powerful tools more and more cheap and simple.

At the present stage, a deeper knowledge of the biology and the epidemiology of plant pathogens changes the problem from technical to conceptual. Conventional fungal taxonomy is no more apt to depict frameworks to house the biological complexity of fungal pathogens; molecular phylogeny opened new horizons and posed new questions. Molecular systematics can bring into harmony systematic schemes, biological complexity and phytopathological aspects. To explain concepts, examples including toxigenic *Fusarium* and *Diaporthe helianthi*, as a quarantine pathogen, will be discussed.

Key-words: pathogens, quarantine, diagnosis, fungi.

Introduzione

A partire dalla seconda guerra mondiale, l'agricoltura è andata incontro a profondi cambiamenti. Nei paesi industrializzati l'obiettivo di massimizzare le produzioni ha, da un lato, portato ad un forte incremento degli input energetici ed all'adozione di nuove tecnologie di produzione, dall'altro ha consentito a pochi agricoltori di produrre quanto necessario a soddisfare i bisogni della popolazione. A fianco di innegabili effetti positivi, tutto ciò ha avuto dei costi ambientali e sociali quali l'erosione del suolo e la contaminazione delle acque, o la drastica riduzione delle aziende a conduzione familiare e la disgregazione del tessuto sociale delle comunità agricole o la riduzione della biodiversità. Gli stessi mezzi tecnici che contribuiscono a garantire elevate quantità di prodotto possono avere effetti collaterali negativi quali, ad esempio, la presenza di residui di prodotti chimici nelle derrate alimentari. Un vasto movimento di opinione si è venuto, quindi, formando con l'obiettivo di mettere a punto strategie di difesa delle colture più rispettose dell'ambiente. Una corretta e tempestiva identificazione della causa di una malattia è, molto spesso, un prerequisito essenziale per gran parte degli interventi di difesa miranti a risparmiare alle piante i danni causati da agenti biotici.

Diagnostica: perché

Può sembrare strano, nell'attuale mondo del commercio globale e del facile e veloce movimento delle persone e delle merci, ma ancora

molte malattie delle piante sono circoscritte a definiti areali geografici e quindi molti patogeni vegetali si riscontrano comunemente in alcune regioni del mondo, ma sono totalmente assenti in altre. Le spiegazioni più ovvie di questo fenomeno, e cioè che i patogeni non si adattino a tutte le condizioni climatiche ed ambientali, e che il loro ospite primario non sia presente in tutte le regioni, non sono del tutto esaustive. Per esempio in Italia non sono mai stati individuati in campi coltivati patogeni quali *Xylella fastidiosa* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, che pure producono significativi danni economici rispettivamente su vite e patata in Paesi il cui clima non è troppo diverso da quello di alcune regioni italiane. Vi sono dunque elementi di criticità, legati verosimilmente alla competizione, ai cicli colturali, all'epidemiologia, alla diffusione sul territorio delle colture e dei potenziali insetti vettori che non sono ancora del tutto noti, ma che certamente hanno grande influenza sulla probabilità che un patogeno esotico, introdotto accidentalmente in una nuova area, sia capace di sviluppo epidemico. Tuttavia la storia ci insegna che qualora le condizioni si verificano, un patogeno esotico di nuova introduzione può determinare danni enormi all'agricoltura ed all'economia della regione.

A causa di mancanza di controllo su materiale (probabilmente legno) proveniente dal centro America, la peronospora della patata, *Phytophthora infestans*, arrivò in Irlanda nel 1845 e si adattò rapidamente al nuovo ambiente. Le cronache del tempo solo nel Settembre 1845 segnalavano la presenza nel mercato di Dublino di una malattia della patata, che pure

era già da almeno un paio d'anni comparsa in altre regioni europee con importanti, ma non drammatiche conseguenze economiche. Solo due anni più tardi, nel 1847, non si reperivano in Irlanda sufficienti tuberi sani da utilizzare come seme per poter rinnovare la coltivazione della patata, delineando la distruzione della principale coltura della nazione e causando, nel lustro successivo circa un milione di decessi ed un flusso migratorio che, con la creazione di una forte comunità irlandese negli USA, ha cambiato la storia del mondo.

Oggi il nostro sistema agricolo non è così fragile come lo era quello irlandese del XIX secolo, pur tuttavia l'introduzione e la diffusione di nuovi patogeni sono tra le principali minacce alla sua stabilità. Nella maggioranza dei casi, la presenza di un nuovo patogeno comporta almeno la necessità di interventi fitoiatrici protettivi su una o più colture. Ciò non soltanto implica la distribuzione di fitofarmaci con i conseguenti deprecabili effetti ambientali, ma anche l'aumento del costo del prodotto, eventualmente la riduzione della qualità, comunque una diminuzione della competitività sul mercato. Gli esempi non mancano, anche in anni recenti, di attuazione di procedure di pur costosi piani di intervento diagnostico e protettivo che sono risultati economicamente vantaggiosi rispetto al subire l'introduzione di un patogeno esotico. Dalla metà degli anni Novanta il fitoplasma associato con il giallume della vite noto come flavescenza dorata (FD) rappresenta uno dei più sentiti problemi della viticoltura italiana. La sua introduzione in Friuli Venezia Giulia (FVG) è stata ritardata per diversi anni e la sua diffusione tenuta a bassi livelli grazie ad un programma diagnostico su ampia scala basato su saggi, quali l'analisi per ibridazione del gene per il 16S rRNA amplificato via PCR (Polymerase Chain Reaction), capaci di discriminare tra FD ed altri giallumi sintomatologicamente simili, ma di minor potenzialità epidemica, causati da altri fitoplasmici già presenti in forma endemica nella regione. Il risultato si è visto non solo nella protezione del comparto vivaistico, ma anche nella dimensione dei costi medi dovuti alla flavescenza dorata che per esempio nel triennio 2001-2003, secondo recenti stime (Frausin and Osler, 2004) erano di circa 46/ha in FVG, da compararsi con 490/ha in Piemonte nello stesso periodo.

Nella percezione dell'uomo comune la protezione di una nazione dagli agenti biologici agenti di malattie delle piante si associa alle ispezioni dei viaggiatori e dei loro bagagli alla dogana per impedire l'introduzione accidentale (o dolosa) di microrganismi o insetti dannosi. In certa misura non si tratta di un'idea infondata, come dimostra la recente diffusione in Italia di *Diabrotica virgifera*, dannoso insetto del mais, a partire dalle aree limitrofe agli aeroporti di Malpensa e di Aviano (Boriani and Gervasini, 2000). Tuttavia, le risorse nazionali sono principalmente impiegate per evitare l'introduzione dei patogeni esotici che potenzialmente avviene attraverso il commercio del loro ospite vegetale piuttosto che attraverso occasionali mezzi o vettori impropri. Fin dagli anni cinquanta le problematiche della regolamentazione del commercio dei vegetali sotto il profilo fitopatologico e della armonizzazione delle regole imposte dai diversi paesi sono state ritenute non procrastinabili per pervenire ad un sicuro commercio dei prodotti vegetali e segnatamente del materiale di propagazione. Gli sviluppi dei metodi diagnostici sono stati determinanti per pervenire all'ambizioso risultato della libera, ancorché protetta, circolazione dei vegetali in aree omogenee, come per esempio l'Unione europea. La loro implementazione è stata, ed è, tuttavia dipendente dal particolare contesto del campo applicativo.

Diagnostica: dove e quando

Le piante nel loro complesso, e più in particolare le piante coltivate, possono essere oggetto dell'attacco di organismi patogeni. Questi possono essere considerati patogeni da quarantena, qualora la loro presenza non sia mai stata segnalata e, se introdotti, rappresentino un rischio per la coltura, oppure patogeni che influiscono sulla quantità/qualità della produzione agricola, qualora la loro presenza sia già stata segnalata. La diagnostica di patogeni appartenenti a queste due categorie deve rispondere a specifiche diverse. La ricerca di patogeni da quarantena mira ad escludere la presenza di questo tipo di organismi nel materiale che deve essere introdotto nel Paese importatore. È un tipo di indagine la cui risposta è di tipo sì/no, vale a dire è qualitativa e non quantitativa e teoria vuo-

le che non sia accettabile alcun livello di errore. In altre parole non dovrebbe essere accettato il rischio insito nella valutazione dello stato sanitario di una popolazione di piante, o di materiale da propagazione, tramite la valutazione di un suo campione, esteso quanto si vuole, e quello insito in qualunque metodo di diagnosi. Tuttavia, sulla base del principio che non si può rifiutare l'ingresso in un paese di materiale nel quale non sia stata dimostrata la presenza di un patogeno da quarantena ne consegue che il materiale deve essere esaminato seguendo specifici protocolli e che non potendo, nella gran parte dei casi, esaminare l'intera popolazione, l'intercettazione deve avvenire sulla base dell'esame di campioni. I metodi impiegati devono essere, quindi, i più specifici ed i più sensibili possibile, essendo più accettabile, comunque, rifiutare l'introduzione di materiale sano che accettare l'introduzione di materiale infetto. Alquanto diversa è la situazione, quando ad essere coinvolti sono i patogeni che influiscono sulla qualità. Si può accettare, in questo caso, una tolleranza maggiore, come conseguenza del campionamento ed insita nel metodo di diagnosi, e, salvo casi particolari, possono essere indicati dei livelli di soglia superati i quali sono richiesti specifici interventi. I metodi, in questo caso devono essere quantitativi.

Vi sono casi poi ancor più critici, quando un patogeno produce metaboliti potenzialmente dannosi per la salute dell'uomo e degli animali. Diversi funghi sintetizzano metaboliti secondari dalla riconosciuta tossicità, acuta o cronica, il cui contenuto nelle derrate è oggi regolamentato per legge. Sfortunatamente molto spesso il contenuto in tossina e quello in microrganismi produttori non sono tra loro correlati: capita che durante il processamento i propaguli fungini vengano ridotti o allontanati in una derrata che tuttavia rimane contaminata dalla tossina (come accade nella produzione industriale di grassi alimentari); d'altra parte l'immagazzinamento in condizioni non ottimali di derrate che all'origine non contenevano tossine può favorire lo sviluppo di eventuali propaguli fungini con successiva produzione di tossine durante la conservazione. Quindi tanto le tossine che i funghi che le producono richiedono di essere monitorati, e dovrebbero essere diagnosticati indipendentemente in diversi punti critici del percorso produttivo.

Vi è poi un'altra, recente e meno determi-

nata frontiera, dov'è richiesta la diagnostica fitopatologica. I continui e gravi attacchi terroristici che, in diverse parti del mondo, colpiscono la popolazione civile, dimostrano come atti di guerra possano essere intrapresi in paesi formalmente in condizioni di pace. D'altra parte la diffusione della BSE nei bovini ha evidenziato la vulnerabilità dei sistemi agricoli ed i gravi danni, in termini di vite umane e/o di perdite economiche, che la diffusione, intenzionale o non intenzionale, di agenti patogeni di animali, ma anche di piante, potrebbe causare all'economia ed al morale di un paese. I primi a rendersi conto del rischio, ed a reagire con atti legislativi, sono stati gli Stati Uniti, forse anche in conseguenza dello shock causato dall'attacco alle Torri gemelle. Il nuovo sistema, che vede protagonisti la Food and Drug Administration (FDA), il Department of Agriculture (USDA) e il Department of Homeland Security (DHS), si basa, tra l'altro, sul "Public Health Security and Bioterrorism Preparedness and Response Act of 2002" che prevede la pubblicazione, aggiornati ogni due anni, di elenchi di organismi e tossine che possono rappresentare un rischio per piante o animali negli Stati Uniti. L'aggiornamento più recente (Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002; Possession, Use, and Transfer of Biological Agents and Toxins; Final Rule, 18 marzo 2005) include patogeni comunemente considerati fungini (ad es. *Peronosclerospora philippinensis*), batterici (ad es. *Ralstonia solanacearum*, race 3, biovar 2), tossine (T-2) ed acidi nucleici (per maggiori informazioni si può visitare il sito: <http://www.nationalaglawcenter.org/readingrooms/biosecurity/>). Le due principali strategie per fronteggiare il rischio si basano sulla capacità di prevenire l'introduzione e sulla capacità di scoprire e reagire prontamente ad un'introduzione. Ambedue queste strategie dipendono dalla disponibilità di saggi diagnostici che potranno essere complessi ma altamente affidabili, se chi li dovrà eseguire sarà un laboratorio specializzato, ma dovranno essere semplici e molto sensibili (a costo di accettare il rischio di considerare infetto un campione sano) se chi li dovrà eseguire sarà una persona (tecnico di campagna, agricoltore...) priva di specifica esperienza nel settore della diagnosi delle malattie delle piante ma che, con ogni probabilità, sarà il primo ad entrare in contatto con la pianta presumibilmente ammalata.

Diagnostica: come

Non sarebbe mai esistita la diagnostica fitopatologica come oggi la conosciamo senza l'immunologia. Prima, per pervenire ad una diagnosi presunta, l'isolamento, l'arricchimento o la coltivazione dell'agente patogeno, con successive osservazioni o analisi delle caratteristiche biochimiche, fisiologiche e colturali, erano passi indispensabili e, in tutta evidenza, lunghi, faticosi e frequentemente incerti, con le ovvie conseguenze sulla certezza della diagnosi stessa. Indubbiamente l'ingresso dei saggi immunologici, ed in particolare dell'ELISA (Voller et al., 1976), nella routine diagnostica ha rappresentato il più importante progresso nella storia del settore, rendendo praticabili la diagnosi in tempi brevi ed il processamento parallelo dei campioni, elevando la ripetibilità e la solidità dei protocolli, aggiungendo elementi di analisi quantitativa all'individuazione del patogeno. Naturalmente l'impatto principale è stato sulle malattie di origine batterica e virale. Per i funghi, la cui più complessa morfologia che ha sempre reso la diagnosi diretta più pratica e facilitata da una diffusa, ancorché non generalizzabile, opportunità di coltivazione *in vitro*, l'approccio convenzionale ha resistito più a lungo. Oggi il ricorso a metodi indiretti per i funghi è dovuto non soltanto all'avanzamento tecnologico, ma anche alla riduzione del numero degli specialisti ed alla maggior diffusione delle competenze di biochimica e biologia molecolare rispetto a quelle micologiche. Infatti, l'evoluzione naturale dell'immunodiagnostica è stata nella biologia molecolare, prospettiva dominante nell'odierna concezione dell'approccio alle problematiche biologiche, che ha sottratto agli specialisti il monopolio del saggio diagnostico.

Il riconoscimento degli acidi nucleici per ibridazione come tecnica diagnostica si presentò subito come un'opzione più versatile – svincolandosi dalla necessità di ricorrere a topi e conigli per la produzione del materiale più indispensabile – ed in alcuni casi più potente, come per il riconoscimento di virus e viroidi (Dodds et al., 1984). Ma l'adozione dei metodi "molecolari" ha stentato ad affermarsi in fitodiagnostica: la preparazione ed il processamento di esperimenti di ibridazione risultava più lunga e complessa senza garantire quel vantaggio in ter-

mini di specificità, sensibilità e solidità del saggio che in definitiva erano le richieste più urgenti. È con la graduale introduzione negli anni Novanta della PCR (Saiki et al., 1985) che assistiamo al reale decollo della fitodiagnostica molecolare (Henson and French, 1993): non solo e non principalmente a causa del consistente aumento di sensibilità del saggio, che pure raggiunge con questa tecnica i livelli praticamente desiderabili, ma soprattutto per il completo superamento delle problematiche relative alla portabilità e ripetibilità del saggio, che avevano di fatto sempre afflitto la diagnostica. Con la PCR non è più necessario entrare fisicamente in possesso di antisieri (dalla variabile e spesso incerta affidabilità) o sonde a DNA, ma diventa sufficiente conoscere la sequenza degli iniziatori e le condizioni di reazione per poter prontamente eseguire il saggio.

La PCR è oggi la tecnica d'elezione nel laboratorio fitodiagnostico. Amplificazioni con iniziatori specifici sono utilizzate per la diagnosi di routine, eventualmente con metodologia real-time per la valutazione degli aspetti quantitativi, mentre amplificazioni con iniziatori universali sono impiegate per ottenere le sequenze variabili comprese tra gli iniziatori al fine di identificare e classificare nuovi isolati. La sostanziale identità tra la metodologia usata nel laboratorio diagnostico e nel generico laboratorio di biologia molecolare da una parte garantisce il rapido accesso al campo della diagnostica ad un largo numero di operatori, e dall'altra rende le innovazioni tecnologiche prontamente integrabili nel laboratorio fitodiagnostico. Il ventaglio di possibili opzioni per la velocizzazione e ottimizzazione della diagnosi si apre così ad includere la robotica e le numerose tecniche basate sulla PCR e inizialmente sviluppate per altri scopi: le sigle o i nomi più o meno fantasiosi di PCR-ELISA (Poggi Pollini et al., 1997), Immunocapture PCR (Hartung et al., 1996), TaqMan (Marzachi and Bosco, 2005), beacons (Leone et al., 1998), skorpions (Skena et al., 2002), nanobiotrasduttori (Firrao et al., 2005), sottendono lo sforzo ed il desiderio di pervenire a saggi diagnostici che alla sensibilità e specificità della PCR uniscano l'adattabilità all'uso in fitodiagnostica, e quindi risultino semplici, rapidi, ed adeguati al processamento parallelo di numerosi campioni. La capacità di analizzare numerosi campioni allo stesso tem-

po, congiunta con la capacità di individuare, con una singola analisi, patogeni diversi sullo stesso campione (multiplexing) indicano la via verso cui la diagnostica dovrà tendere, per giungere all'obiettivo, particolarmente importante, ad esempio, per le malattie trasmesse per seme, di diagnosticare tutti i patogeni trasmissibili di una coltura con una singola analisi. La tecnica offre già oggi strumenti per poter effettuare questo tipo di analisi, quali la multiplex RT PCR, i DNA array (ad esempio il sistema DNA Multiscan, <http://www.dnamultiscan.com/en/home.html>), o il sistema OpenArray (TM) SNP Genotyping System (http://www.biotrove.com/products/open_array/snp/) ma è evidente come l'effettivo impiego di questi sistemi dipenda dalla disponibilità di sequenze specifiche per tutti i patogeni di interesse, da cui la necessità di stimolare ricerche miranti alla loro identificazione.

Tuttavia, nonostante il notevole progresso della diagnostica fitopatologica in questi ultimi anni, è la tecnologia che si sta sviluppando più recentemente che è destinata a superare quelle che sono le attuali principali limitazioni ed ad avere un dirompente impatto sulla diagnostica fitopatologica di routine. I protocolli al momento utilizzati sono ancora visti come troppo costosi, lenti, caratterizzati da un'eccessiva richiesta di impegno e specializzazione per essere convenientemente applicati in agricoltura, un campo in cui i grandi volumi di campioni e il modesto valore dell'individuo sono la regola. L'agricoltura e l'ambiente sono i settori d'elezione per l'implementazione di biosensori basati sul riconoscimento di acidi nucleici e antigeni. La tecnologia per la produzione su larga scala di sensori riusabili, a basso costo, come ad esempio i sensori plastici amperometrici con elettrodi stampati (Minunni et al., 2001), è già matura ed aspetta solo di essere applicata nella diagnosi fitopatologica, anche grazie alla richiesta modesta in termini di strumentazione ed alla facilità di uso ed interpretazione dei risultati. Ancora le nanotecnologie offrono strumenti, già impiegati per contrastare il bioterrorismo o in ambito medico e che si stanno sviluppando anche in ambito agricolo, quali i lab-on-a chip (<http://en.wikipedia.org/wiki/Lab-on-a-chip>), dove su un singolo chip di pochi cm quadrati sono integrati tutti i processi funzionali ad una specifica analisi. Ad esempio è possibile effettuare una diagnosi tramite RT PCR su

picoltri di volume di reazione in tempi assolutamente contenuti. Infine, ma si tratta di tecniche ancora acerbe, possiamo ricordare l'uso del naso elettronico, già impiegato per la diagnosi di *Fusarium verticilloides* in mais (Falasconi et al., 2005) o dei MIP (Molecularly Imprinted Polymers) nei quali nanocavità riconoscono selettivamente strutture specifiche, ad esempio cellule batteriche (Scott et al., 2006).

La rilevazione del segnale non è, tuttavia, il solo punto critico della procedura diagnostica, ed è forse la problematica che investe la raccolta dei campioni ed il loro processamento o estrazione quella che ancora impedisce il definitivo successo dei metodi molecolari.

Negli sviluppi della biologia molecolare di quest'ultimo decennio, il processo di estrazione del DNA, benché si sia modificato solo modestamente nei principi generali, è stato oggetto di miglioramenti tecnologici che lo hanno reso estremamente rapido, ripetibile ed in generale, affidabile. L'utilizzo del detergente noto come CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) si è rivelato determinante nella rimozione di potenziali inibitori delle polimerasi nelle estrazioni di tessuti vegetali e fungini (Doyle and Doyle, 1987). Nel caso della diagnosi fitopatologica si deve tuttavia evidenziare che la gran diversità di patogeni ed ospiti, in particolare quando si richiede l'estrazione da tessuti infetti, ha impedito lo sviluppo di protocolli realmente universali. L'esistenza di diversi protocolli per l'estrazione, in stridente contrasto con l'ormai generalizzato impiego della tecnica di PCR come procedura analitica, ha rappresentato un vero e proprio collo di bottiglia per la diffusione delle metodologie diagnostiche. Anche in questo settore, tuttavia, gli sviluppi sono attesi nei tempi brevi: lo sviluppo di sempre più efficienti sistemi basati su adsorbimento su polimeri o separazioni magnetiche ed un accesso più diffuso ed economico alla robotica permetteranno presto non solo di analizzare tutte le matrici vegetali e fungine con metodi universali, ma anche di estendere le analisi al suolo, all'acqua ed all'aria in modo da anticipare sempre più il momento della diagnosi, fino a poter affrontare in modo organico la problematica della prevenzione (Mumford et al., 2006).

Infine, il subdolo problema del campionamento mortifica in modo ancora irrisolto le speranze di sviluppo della diagnostica in fitopato-

logia. L'aumento della sensibilità dei saggi, così significativo dall'introduzione delle tecniche basate sull'amplificazione degli acidi nucleici, non consente una riduzione della dimensione dei campioni altrettanto consistente, come si vorrebbe per rendere la diagnosi rapida ed economica. La tipologia (solida) dei campioni e la numerosità degli individui che costituiscono le partite soggette ad analisi impongono procedure di ripetuto campionamento ed aggregazione di sottocampioni per tenere in considerazione la presenza erratica dei patogeni. Non sono solo le complesse procedure di campionamento, ma soprattutto i conseguenti elevati volumi processati che impongono l'uso di attrezzatura adeguata ed importanti quantità di reagenti, limitano il numero di campioni processabili in parallelo e causano l'aumento dell'impegno e dei costi. La tentazione di ridurre la dimensione dei campioni, sulla scorta della sempre più elevata sensibilità, porta con sé il rischio di compromettere la rappresentatività del campionamento e di vanificare il saggio.

Diagnostica: oltre la forma

L'attenzione del tassonomo, che al non specialista appare quasi maniacale, alla definizione e gerarchia di quegli elementi che risultano necessari per determinare ciò che è simile e ciò che è diverso, deriva dall'evidenza del fallimento di pratiche diagnostiche basate su caratteristiche ritenute discriminanti e rivelatesi invece soggette a variabilità. Per quel che riguarda i funghi, la morfologia ha provveduto generosamente a fornire elementi di differenziamento interpretati, per oltre un secolo, come funzionali a palesare una sottesa corrispondente diversità biologica. È stato evidente, in micologia, il tentativo di riproporre schemi classificatori a base morfologica derivati dalla botanica per l'individuazione e la definizione dell'unità tassonomica d'elezione, la specie.

Negli eucarioti superiori, la coincidenza del concetto tassonomico (unità classificatoria) e biologico (interfertilità degli individui) fa della specie una solida entità, riconoscibile come un momento di discontinuità nell'organizzazione naturale. Ogni specie evolve sue proprie caratteristiche che permettono e facilitano il reciproco riconoscimento dei membri della stessa,

requisito preliminare alla riproduzione. Nella visione classica, forma e morfologia hanno dunque rappresentato non solo lo strumento più immediatamente disponibile, ma anche il più fondato ed opportuno. Nei funghi, per contro, il concetto stesso di specie biologica, basato sull'interfertilità sessuale, non può essere sempre applicato; molti di essi non hanno riproduzione sessuata mentre possono, a seguito di fusione del tallo (compatibilità vegetativa), andare incontro a ricombinazione genica (ciclo parasessuale) indipendentemente dalla gamia. La ricerca micologica recente sta svelando la complessità del genoma che contiene un relativamente modesto numero di geni associati a caratteristiche morfologiche, la semplicità ed universalità dei meccanismi molecolari che governano la riproduzione dei funghi, la prevalenza di meccanismi di riconoscimento biochimico su quelli morfologici, la convergenza evolutiva verso strutture funzionali comuni e l'impatto determinante del trasferimento genico orizzontale nell'evoluzione. Questi elementi hanno portato ad una riconsiderazione del significato tassonomico della morfologia. Infine, l'introduzione ed il successo dei metodi di filogenesi molecolare, dimostrando, in alcuni casi per ora, l'assenza di corrispondenza tra le ricostruzioni basate sull'analisi di sequenze geniche e le classificazioni morfologiche, hanno dato il via ad un processo di revisione della classificazione e dell'associata nomenclatura, portando alla definizione di specie criptiche, vale a dire di specie filogeneticamente separate ma morfologicamente indistinguibili, non scervo da consistenti ripercussioni sulla diagnostica. Il sovrapporsi di definizioni alternative di specie (morfologica, biologica, filogenetica, molecolare) certo non favorisce una disciplina in cui la chiarezza della comunicazione e l'unicità nomenclaturale sono requisiti irrinunciabili. Tuttavia è innegabile che il concetto classico di specie sia stato poco rispondente ai fini pratici della diagnostica. L'esistenza di microrganismi morfologicamente indistinguibili ma agenti di malattia solo su alcune colture vegetali, ha imposto la creazione di ranghi tassonomici subspecifici (*formae specialis*, razze) determinabili solo attraverso l'inoculazione e l'osservazione dello sviluppo della malattia. Oggi gli aspetti di relazione del patogeno con l'ospite non sono più visti come secondari nell'ambito evolutivo, anche grazie alla finestra sull'evoluzione che si è aperta anche per i funghi con la

genomica comparativa. Quanto più si conosce del genoma dei patogeni, tanto più si evidenzia l'estensione dei tratti coevoluiti con l'ospite e gli aspetti fisiopatologici si precisano. Tassonomia e fisiopatologia si incontrano in un momento in cui, finalmente, la sistematica non è l'imposizione di uno schema discreto ad una natura contrassegnata dalla continuità, ma è invece la ricezione attenta degli elementi di discontinuità naturali che hanno una base fisiologica.

Un tipico esempio della rilevanza pratica di questa nuova interpretazione di sistematica e tassonomia viene dall'articolata problematica posta dal genere *Phomopsis*. In questo vasto genere di funghi imperfetti (per lo più in rapporto metagenetico con il genere *Diaporthe*) l'approccio sistematico convenzionale si basa sulla morfologia e l'ospite di isolamento, conferendo il rango di specie ad ogni gruppo di isolati che siano isolati da una stessa specie vegetale e non siano tra loro distinguibili per la forma delle strutture riproduttive. Ma su alcuni vegetali di interesse agronomico, come la soia ed il girasole, gli isolati non sono uniformi sotto il profilo genetico. Nel caso del girasole, *Phomopsis (Diaporthe) helianthi* è un temibile patogeno noto per aver causato epidemie devastanti nelle regioni centrali ed orientali dell'Europa; nonostante la segnalazione in Italia fin dal 1987, nel nostro Paese non si sono mai avuti danni significativi. Le indagini molecolari (Vergara et al., 2004; Rekab et al., 2004; Pecchia et al., 2004) hanno dimostrato che gli isolati italiani sono filogeneticamente diversi da quelli dell'Europa centrale ed orientale (Fig. 1). Dunque in Italia non è stata ancora introdotta quella unità sistematica, almeno dal punto di vista molecolare, i cui membri hanno una forte potenzialità epidemica e che quindi rappresentano ancora una minaccia per un'area le cui caratteristiche meteorologiche e agronomiche conferiscono un alto rischio. Nonostante le precedenti segnalazioni, ed alla luce dei recenti risultati di filogenesi molecolare, *D. helianthi* dovrebbe essere considerata un patogeno da quarantena per il nostro Paese, e la diagnostica molecolare lo strumento d'analisi indispensabile per intercettare l'introduzione.

Alcuni generi, come *Fusarium*, rappresentano un vero rompicapo, che l'introduzione dei metodi molecolari ha reso, se possibile ancora più complesso. Una morfospécie quale *Fusarium graminearum* oggi è ritenuta l'insieme di al-

meno 9 specie diverse (O'Donnell et al., 2004), ognuna con il suo nome latino (*F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. boothii*, ecc.) e sostanzialmente correlate con l'origine geografica, distinguibili sulla base di differenze nucleotidiche in specifiche posizioni di alcuni geni. Il riconoscimento delle specie non è dunque più possibile col solo ausilio del microscopio, a dispetto del complesso bagaglio di chiavi e metodi per il riconoscimento morfologico che aveva raggiunto, con i molti anni dedicati dai micologi classici, livelli di elevata sofisticazione. Poiché le differenze risiedono nelle sequenze del DNA, solo metodi molecolari saranno in grado di distinguerle, a meno che, come è già successo per *Aspergillus flavus*, non si possa osservare, a posteriori, una correlazione tra le nuove specie definite su base molecolare e le variazioni in caratteri fenotipici (Taylor et al., 2000).

Se il progresso nella tassonomia ci porta oltre la forma, l'allontanarsi dal microscopio, strumento tradizionalmente d'elezione della classificazione micologica, non è privo di insidie. Nella diagnostica dobbiamo sempre tenere presente che l'affidarsi esclusivamente a strumenti molecolari, in grado ad esempio di identificare un organismo sulla base di una sequenza nucleotidica, ci espone al rischio che il nostro patogeno muti in quello specifico sito e non sia più riconosciuto; problema particolarmente insidioso quando si tratta di patogeni da quarantena. In conclusione, oggi la diagnostica dei funghi fitopatogeni si trova a metà del guado. I metodi tradizionali hanno mostrato i loro limiti, ma i metodi molecolari non sono ancora così rapidi e semplici da permettere al diagnosta di avvicinarsi con sicurezza ed al laboratorio non specializzato di utilizzarli nella routine. Ma i segnali che provengono dai campi più avanzati ci indicano chiaramente che la riva non è lontana e sarà presto raggiunta con una diffusa e presumibilmente soddisfacente adozione dei metodi della biologia molecolare e delle nanobiotecnologie.

Bibliografia

- Dodds J.A., Morris T.J., Jordan R.L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. Annual Review of Phytopathology, 22:151-168.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochemistry Bulletin, 19:11-15.

- Falascioni M., Gobbi E., Pardo M., Torre M.D., Bresciani A., Sberveglieri G. 2005. Detection of toxigenic strains of *Fusarium verticilloides* in corn by electronic olfactory system. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108 (1-2):250-257.
- Hartung J.S., Pruvost O.P., Villemot I., Alvarez A. 1996. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 86:95-101.
- Henson J.M., French R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31:81-109.
- Leone G., van Schijndel H., van Gemen B., Kramer F.R., Schoen C.D. 1998. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Research*, 26:2150-2155.
- Marzachi C., Bosco D. 2005. Relative quantification of chrysanthemum yellows (16Sr I) phytoplasma in its plant and insect host using real-time polymerase chain reaction. *Molecular Biotechnology*, 30:117-128.
- Minunni M., Tombelli S., Mariotti E., Mascini M., Mascini M. 2001. Biosensors as new analytical tool for detection of Genetically Modified Organisms. (GMOs). *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369:589-93.
- Mumford R., Boonham N., Tomlinson J., Barker I. 2006. Advances in molecular phytodiagnosics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116:1-19.
- O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Corby Kistler H., Aoki T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet Biol.*, 41:600-23.
- Pecchia S., Mercatelli E., Vannacci G. 2004. Intraspecific diversity within *Diaporthe helianthi*: evidence from rDNA Intergenic spacer (IGS) sequence analysis. *Mycopathologia*, 157:317-326.
- Poggi Pollini C., Giunchedi L., Bissani R. 1997. Immunoenzymatic Detection of PCR. Products for the Identification of Phytoplasmas in plants. *J. Phytopathology*, 145:371-374.
- Rekab D., del Sorbo G., Reggio C., Zoina A., Firrao G. 2004. Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of *Phomopsis* pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined geographic origin. *Mycol Res.*, 108:393-402.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. 1988. Primer directed enzymic amplification of DNA with a thermostable polymerase. *Science*, 239:487-491.
- Schena L., Nigro F., Ippolito A. 2002. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. *European J. Plant Pathol.*, 108:355-366.
- Scott D.H., Gary M.M., Richard M.O., Jeffrey S.M., Shannon M.G., Nancy B.V., Jim K.F. 2006. Preparation and evaluation of spore-specific affinity-augmented bio-imprinted beads. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386:211-219.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 31:21-32.
- Vergara M., Cristani C., Regis C., Vannacci G. 2004. A coding region in *Diaporthe helianthi* reveals genetic variability among isolates of different geographic origin. *Mycopathologia*, 158:123-30.
- Voller A., Bartlett A., Bidwell D.E., Clark M.F., Adams A.N. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, 33:165-167.